

Índice

Resumen	iv
Abstract	v
1. Introducción	
1.1 <i>Leptospira</i> : morfología y hábitat.	1
1.2 Leptospirosis	2
1.3 Avances moleculares y comparación genética	4
1.4 Clonación de ADN y elaboración de bibliotecas genéticas	5
2. Objetivos	
2.1 Objetivos generales	8
2.2 Objetivos específicos	8
3. Justificación	8
4. Área de estudio	9
5. Métodos y materiales	
5.1 Materiales	9
5.1.1 Bacterias	9
5.1.2 Vectores	9
5.1.3 Medios	10
5.2 Métodos	11
5.2.1 Construcción de biblioteca de <i>L. biflexa</i> y <i>L. interrogans</i> serovar cannicola	11
5.2.2 Cálculo de clones en el genoma de <i>Leptospira biflexa</i>	12
5.2.3 Titulación de biblioteca de <i>L. biflexa</i>	12
5.2.3.1 Cultivo de fagos	12
5.2.3.2 Conteo de Colonias	13
5.2.4 Comparación genómica por métodos de hibridación	13
5.2.4.1 Siembra de los fagos que contienen el genoma de <i>L. biflexa</i>	13
5.2.4.2 Transferencia de fagos a una membrana de nylon	13
5.2.4.3 Prehibridación de membranas para Southern blot	14
5.2.4.4 Marcación ADN con DiG (Invitrogene, 1999)	14
5.2.4.5 Hibridación de membranas	14
5.2.4.6 Selección de placas que hibriden y no hibriden con	

el genoma de <i>L. interrogans</i>	15
5.2.5 Aislamiento de fagos lambda conservados en 5.2.4.6	16
5.2.5.1 Titulación de fagos	16
5.2.5.2 Aislamiento de fago Lambda puro	16
5.2.5.3 Multiplicación de clones	16
5.2.6 Extracción de DNA de lambda por medio de PEG	16
5.2.6.1 Extracción de DNA de lambda por medio de PEG	16
5.2.6.2 Comprobación de calidad de ADN extraído en el paso 5.2.6.1 por medio de Electroforesis y la enzima de restricción EcoR1.	18
5.2.6.2.1 Electroforesis	18
5.2.6.2.2 Corte del ADN extraído en el paso 5.2.6.1 con la enzima de restricción <i>EcoRI</i>	18
5.2.7 Comparación de clones homólogos y no homólogos con <i>L. interrogans</i>	19
5.2.7.1 Dot blotting	19
5.2.8 Extracción de DNA por medio de QIAGEN Kit	19
5.2.8.1 Preparación de cultivos de <i>Echerichia coli</i> y fagos nH1, nH3, nH4 y H4 para la extracción de ADN por medio de columnas de extracción QIAGEN Lambda Kit (Qiagen, 1999)	19
5.2.8.2 Extracción de ADN de los fagos nH1, nH3, nH4 y H4 por medio de las columnas de extracción de QIAGEN Lambda Kit. (QIAGEN,1999)	20
5.2.8.3 Comprobación de calidad de DNA	21
5.2.8.3.1 Medición OD	21
5.2.8.3.2 Electroforesis	21
5.2.8.3.3 Corte del ADN extraído en el paso 5.2.8.2 con la enzima de restricción EcoRI	21
5.2.8.4 Precipitación de ADN de los clones extraídos por columna QIAGEN	21
5.2.9. Mapeo de clones	22
5.2.9.1 Extracción DNA <i>Leptospira biflexa</i> usando DNAzol	22
5.2.9.2 Corte ADN de <i>Leptospira biflexa</i> con enzima de restricción BamH1	22

5.2.9.3 Southern blot de los clones nH1, nH3, nH4 y H4	22
6. Resultados	
6.1 Titulación de biblioteca de <i>L. biflexa</i>	23
6.2 Comparación de clones homólogos y no homólogos de la biblioteca de <i>L. biflexa</i> con el genoma de <i>L. interrogans</i> utilizando métodos de hibridación	23
6.3 Titulación y multiplicación de fagos lambda nH1, nH3, nH4 y H4 aislados en el paso 5.2.5	24
6.4 Extracción de ADN de lambda por medio de PEG	24
6.5 Comparación de clones homólogos y no homólogos con <i>L. interrogans</i>	25
6.6 Extracción de ADN de nH1, nH3, nH4, y H4 medio de columnas de extracción de QIAGEN kit	25
6.7 Mapeo de clones	25
7. Discusión	26
8. Conclusiones	30
9. Bibliografía	33
10. Figuras	
Figura 1	35
Figura 2	36
Figura 3	36
Figura 4	37
Figura 5	38
Figura 6	39
Figura 7	40
Figura 8	41
Figura 9	42
Figura 10	42
Figura 11	43
11. Tablas	
Tabla 1	45
Tabla 2	45
Tabla 3	46

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Análisis de clones obtenidos de una genoteca de *Leptospira*
biflexa en el vector Lambda**

María Elena Espinosa

Proyecto Final para obtención del título de BS en Biotecnología

Quito, Julio 2006

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROVACIÓN DE TESIS

Análisis de clones obtenidos de una genoteca de *Leptospira biflexa* en el
vector Lambda

María Elena Espinosa

Gabriel Trueba, PhD
Director de Tesis

.....

María de Lourdes Torres, PhD
Miembro del comité de Tesis

.....

Sonia Zapata
Miembro del comité de Tesis

.....

Hugo Valdebenito, PhD
Decano del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

.....

Quito, Julio 2006

© Derechos de autor

María Elena Espinosa del Hierro

2006

Resumen

La espiroqueta saprofítica *Leptospira biflexa* sensu lato difiere en una gama de genes de su pariente cercana la bacteria patógena *Leptospira interrogans* sensu lato. Las diferencias genéticas son consecuencias de los diferentes estilos de vida de cada especie. La identificación y análisis de secuencias genéticas es clave para el entendimiento de la evolución filogenética de la *Leptospira* patógena. Con métodos de hibridación se seleccionaron cuatro fragmentos de ADN, uno homólogo y tres no-homólogos entre ambas especies. Utilizando el fago Lambda como vector se multiplicó y se extrajo el ADN de dichos segmentos para ser analizado por hibridación con el genoma original de *Leptospira biflexa*.

Después de la investigación, se evidenció que ambas especies de *Leptospira* comparten una cantidad indeterminada de genes. Así también se comprobó que existen secuencias presentes en solo una de estas especies. La parte de la biblioteca genética de *L. biflexa* estudiada está correctamente construida. Y de los clones analizados fue posible extraer ADN de suficiente calidad para ser secuenciado en futuras investigaciones.

Abstract

Leptosipira biflexa sensu lato is a saprophytic spiroquete which is genetically different from its close relative the pathogenic bacteria *Leptospira interrogans* sensu lato. Their genetic differences result from their different life stiles. Four DNA fragments were selected using DNA hybridization techniques (one present in both strains and 3 present only in saprophitic strain). Using Lambda phage as a vector, the DNA fragments were multiplied for further purification and extraction. The vector's DNA was studied to proof the quality of the genomic library in question.

After the research, it was proven that both species of *Leptospira* share an amount of genes. Also it was clear that there are sequences that are present only in one of them. The part of the genetic library of the saprophytic bacteria which was studied is well constructed. Besides, it was able to extract DNA from a clone, which has enough quality to be sequenced in future investigations.

1. Introducción

1.1. *Leptospira*: morfología y hábitat

Entre las eubacterias, las espiroquetas son evolutivamente primitivas (Shuang-Xi, et al., 2003). Las espiroquetas son bacterias gram negativas con forma espiral y pared celular sumamente flexible. Los movimientos ondulatorios se deben a flagelos internos únicos de esta clase, llamados filamentos axilares. Entre las espiroquetas existen especies de vida libre que se encuentran en agua dulce o marítima, otras viven simbióticamente con otros organismos y algunas son parásitas (Ville et. al; 1998). Existe cuatro géneros patógenos en el orden spirochaetales: *Borrelia*, *Brachyspira*, *Tremonema* y *Leptospira*. Los patógenos más conocidos son la bacteria *Treponema pallidum* causante de la sífilis, algunas especies de *Borrelia* que causan la enfermedad de Lyme y la *Leptospira*, patógeno de la leptospirosis (Euzéby, 2005).

La *Leptospira* es una bacteria aerobia obligatoria, mide entre 6-20 μm de largo y 0.1 μm de ancho, tiene forma espiral y superenrollada y sus extremos terminan en forma de gancho (Nacimiento, 2004, Faine et al., 1999) (Figura 1). Comúnmente se la encuentra en reservorios de animales domésticos, y en agua de ríos, lagos y lodos contaminados por orina de estos animales. En los lugares donde usualmente se descubre la cepa parásita *L. interrogans*, también habita su pariente saprofítico *L. biflexa* (Shuang-Xi, et al., 2003).

Hasta el año 2000, se habían clasificado catorce especies de *Leptospira*. (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, 2003). La primera especie de este género fue identificado en 1907 por Stimson, el parásito *L. interrogans*. La segunda especie registrada fue la bacteria saprofítica *L. biflexa* en al año de 1914 por Wolbach and Binger. En 1999, el último registro aprobado, lo hace el científico

Brenner quien identifica la especie *L. alexanderi* (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, 2003). Hasta la actualidad se han identificado cientos de diferentes serovares de las diferentes nueve especies patógenas y cinco saprófitas en el género (Savio, 1994) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, 2003).

1.2. Leptospirosis

La leptospirosis es una enfermedad comúnmente encontrada tanto en animales como en el ser humano en todo el mundo. Se encuentra en países en vías de desarrollo como en desarrollados, en climas cálidos como templados por lo que se le considera la zoonosis más expandida en el planeta (Faine et al., 1999). Su agente patógeno es la bacteria *Leptospira* cuya infección puede pasar asintómicamente o puede provocar síntomas parecidos a gripe con frecuente dolor muscular, hemorragias e ictericia. Los casos más severos se los conoce como la enfermedad de Weil que produce fallo renal y hepático, y en algunos casos presentan meningitis que puede llegar a ser mortal (Nacimiento et al., 2004).

Para el ser humano la leptospirosis es una amenaza ocupacional pues se la contrae por exposición a agua y suelos contaminados con orina de animales infectados. (CDC, 2003, Faine et al., 1999). La *Leptospira* infecta al huésped normalmente ingresando por las mucosas del cuerpo, por aberturas en la piel o infiltrándose por el tejido conjuntivo. Existen casos reportados donde se cree que la infección fue ocasionada por transmisión horizontal entre humanos (Faine et al., 1999).

Los síntomas de la enfermedad se presentan de dos días a tres semanas después de la exposición a la fuente contaminada. La infección se puede presentar de dos formas, la primera genera fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, dolor muscular, vómito y

diarrea. En la segunda y más severa etapa la persona sufre daño renal y hepático seguido de meningitis (CDC, 2003). La completa mejoría de la infección toma desde tres semanas a varios meses.

La leptospirosis es una constante amenaza en países tropicales en vías de desarrollo ya que las condiciones sanitarias generalmente permiten la presencia de orina en agua y suelo (Shuang-Xi, et al., 2003).

Debido a inundaciones ocasionadas por fenómenos naturales como la corriente del El Niño, en países tropicales las infecciones de *Leptospira* suelen ocurrir con frecuencia y ser sumamente graves. En el Ecuador, la región costera del país es perjudicada por las inundaciones que favorecen a la propagación de la bacteria aumentando la incidencia de la enfermedad. La mayoría de casos se reportan entre los meses de junio y agosto cuando las lluvias son más intensas (Carter, 1998). El diario El Comercio en marzo del 2002, reportó después de una lluvia fuerte en Portoviejo provincia de Manabí seis casos de leptospirosis confirmando la relación que tiene la afluencia del incremento de reservorios acuíferos y la incidencia de la enfermedad. Según la Organización Panamericana de Salud, en enero de 1998 en Ecuador se reportaron 160 casos de leptospirosis humana en las provincias frecuentemente inundadas de Guayas y Manabí, 10% de ellos tuvieron resultados fatales (Panamerican Health Organization, 2002). Por la falta de recursos y mecanismos de diagnóstico en todas las urbes, miles de casos pasan sin ser reportados, por lo que los casos estudiados son únicamente una muestra de la verdad. En la Sierra del país, la enfermedad está presente en animales domésticos generando grandes pérdidas económicas. La infección en el ganado bovino genera mastitis, abortos y decrecimiento en la producción de leche (Merial, 1999). Los controles ambientales para esta región son difíciles de implementar y las vacunas encontradas en el mercado aun son de baja efectividad (Nacimiento, 2004).

La *Leptospira* es sensible a antibióticos en cultivos *in vitro*, sin embargo existe menor eficiencia de los fármacos *in vivo* cuando el hospedador, sea animal o humano, tiene un caso avanzado de leptospirosis (Faine et al; 1999). El patógeno es sensible a la penicilina, estreptomina y tetraciclina. A diferencia del resto de eubacterias la *Leptospira* es resistente a la rifampicina y cloronfenicol (CDC, 2003).

1.3. Avances moleculares y comparación genética

En el año de 1953 Watson y Crick descubrieron la estructura de la doble cadena de ADN (Lodish, 2002). A partir de entonces la biología dio un importante giro abriendo la era del estudio del genoma. Gracias a adelantos técnicos, es posible en la actualidad, conocer genomas completos de toda clase de organismos vivos. El primer genoma secuenciado de una forma de vida fue el de la bacteria, *Haemophilus influenza*, un huésped frecuente en el tracto respiratorio humano, en el año de 1995 (Pages y Homes, 1998). A partir de entonces se han estudiado y secuenciado varios centenares de cadenas de ADN, teniendo el mayor logro en el año 2003 cuando se completó la secuencia del genoma humano (NCBI, 2003).

En enero del 2003, científicos chinos publicaron el genoma completo de la espiroqueta *Leptospira interrogans* serovar Lai que consiste de dos cromosomas circulares, uno grande de 4.33 megabases y uno pequeño de 359 kilo bases. Con sus estudios se predijo que en esta bacteria cuenta con un total de 4768 genes (Shuang-Xi, et al., 2003). El análisis genómico realizado por Shuang-Xi y sus colaboradores en el año 2003 confirma características metabólicas de esta *Leptospira* como la ausencia de hexokinasa, la presencia de genes que permiten el uso de ácidos grasos del ciclo de ácido tricarbónico, así como genes para la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa.

Uno de los aspectos más interesantes presentados por Shuang-Xi y sus colaboradores (2003) es el análisis evolutivo del genoma secuenciado. Existe evidencia que permite decir que la *Leptospira interrogans*, un patógeno animal, es el resultado de transferencias laterales de genes así como de operaciones paralelas de eventos evolutivos que afectaron a lo largo del tiempo a una bacteria ambiental; sugiriendo que a partir de *L. biflexa*, una bacteria saprófita ambiental, evolucionó *L. interrogans*, una amenaza para la humanidad.

La comparación de genomas es una potente herramienta para el entendimiento de la evolución (Winnacker, 1987). El material genético es el libro de la historia natural de la vida. Las mutaciones a lo largo de los años más las inserciones de nuevas secuencias de ADN que han sido adquiridas de forma viable se encuentran en los genomas de los organismos actuales (Audesirk, 1997). Por lo que se cree existen vinculaciones entre casi todos los seres vivos. En algunos casos diferencias genéticas mínimas generan condiciones de vida completamente distintas.

Mediante la comparación genómica se puede identificar genes importantes que han sido preservados a lo largo de la evolución. Gracias a este mecanismo, ahora es posible entender como dos especies tienen un solo ancestro común, donde se encuentran genes iguales o no entre ciertas especies que revelan su relación en una ramificación de la filogenia. La secuenciación del material genético provee esta información que puede ser utilizada no únicamente para descifrar el pasado, pero para predecir el futuro (Audesirk, 1997, Winnacker, 1987).

1.4. Clonación de ADN y elaboración de bibliotecas genéticas

La clonación de segmentos de material genético generalmente se hace por medio de vectores, plásmidos o fagos, de *Echerichia coli*, debido a la facilidad de su uso. Para

la clonación de todo el material genético de un organismo vivo se utiliza como vectores a bacteriofagos de la misma bacteria, ya que los plásmidos tienen una baja eficiencia en transformación cuando los fragmentos a clonarse son muy grandes. (Lodish et al.; 2002) (Figura 2).

El bacteriofago Lambda consiste de una cabeza donde se encuentra el genoma viral y una cola que actúa en la infección de las células huésped de *E. coli* (Figura 3). Lambda se replica líticamente, y genera 100 viriones por cada célula infectada (Lodish et al.; 2002). El fago Lambda posee también genes que codifican su proliferación lisogénica, sin embargo en los mecanismos de clonación de ADN, éstos no son utilizados, sino que son removidos y reemplazados por el ADN que se desea clonar. Es posible insertar hasta aproximadamente 20kb de ADN ajeno en un genoma de Lambda Dash II (Stratagene, 1999). El material genético propio del fago más la secuencia externa de interés, se empaquetan *in vitro* y forman viriones capaces de replicarse y formar placas en células huésped de *Escherichia coli* (Lodish et al.; 2002).

Se han creado distintos vectores Lambda que permiten insertar fragmentos de ADN dependiendo de la enzima de restricción utilizada. Para construir una biblioteca genética se debe cortar el ADN del organismo a estudiarse con una enzima de restricción que encuentra una secuencia específica y con la misma enzima se debe extraer el material genético innecesario del vector Lambda. Posteriormente se unen los brazos del vector al fragmento de ADN externo por medio de ligasas (Stratagene, 1999). Si el ADN insertado en Lambda tiene el tamaño indicado para el empaquetamiento *in vitro*, se genera un virión recombinante que posee el ADN de interés en su genoma y que es capaz de proliferarse exitosamente en células de *Escherichia coli* (Figura 4). Para saber el número de clones que deben obtenerse para abarcar todo el genoma se sigue una fórmula: $N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$

N = número de clones necesarios que abarquen el genoma

f =kb insertadas/ kb genoma

Inserto= 9-23 kilobases

Genoma= kilo bases estimadas del genoma

Se obtiene una biblioteca genómica cuando todo el material genético de un organismo está insertado en distintos clones que randómicamente pueden recrear genéticamente al espécimen (Figura 5) (Winnacker, 1987, Lodish et al, 2002).

El fago Lambda DASH II es utilizado para clonar grandes fragmentos de ADN genómico. Al ser éste un fago sensible a la inhibición del lisógeno P2, puede vivir dentro de cepas bacterianas lisógenas a P2 como *Echerichia coli* lisógeno de P2. Esto asegura su reproducción únicamente cuando exista una inserción exitosa de material genético externo. Una de las complicaciones que tiene este procedimiento es que el momento de insertarse es ADN externo dentro del material genético del fago pueden unirse dos fragmentos que no necesariamente se encontraban juntos en el genoma inicial. Gracias a este mecanismo se pueden clonar pedazos de ADN que hayan sido extraídos de otros lugares dentro del fago, como es el caso del genoma de *Leptospira*.

Se puede comparar el material genético de una biblioteca con otra por hibridación, donde se encuentra diferencias entre genomas claves para el entendimiento de diferentes especies de organismos. Existen mecanismos de mapeos genéticos donde el material genético es sometido a enzimas de restricción, ofreciendo diferentes patrones de revelado, certificando la similitud entre la biblioteca con el genoma en cuestión. También se utiliza este método como diagnóstico de mutaciones, identificación de diferencias genéticas entre especies de un mismo género, e incluso como forma de análisis evolutivo de especies (Zuerner et al.;1993).

En este proyecto compararemos la biblioteca con el genoma de *Leptospira biflexa* y el genoma de *Leptospira interrogans* con el fin de identificar genes que diferencien a una especie de la otra. Así como también comprobaremos la validez de la biblioteca realizada del genoma de la espiroqueta saprofítica.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Analizar la características de los clones encontrados en la biblioteca genética de *Leptospira biflexa*.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar genes homólogos y no homólogos entre *Leptospira biflexa* y *Leptospira interrogans* serovar Cannicola.
- Verificar la validez de la biblioteca estudiada mediante la hibridación de cuatro clones al azar con el genoma de *Leptospira biflexa*.
- Analizar la calidad de los clones en la biblioteca del genoma de *Leptospira biflexa*.
- Analizar tres segmentos de genes insertados en el vector lambda que están presentes solo en *L. biflexa*.

3. Justificación

Este es el primer trabajo a nivel genómico realizado en la Universidad San Francisco de Quito con la espiroqueta saprofítica *Leptospira biflexa*; la mayoría de estudios y de secuenciaciones han sido realizados en cepas patógenas de *Leptospira*. Se cree que *Leptospira biflexa* tiene genes homólogos y no homólogos al genoma de la bacteria *Leptospira interrogans* serovar cannicola. La identificación y análisis de estas secuencias es clave para el entendimiento de la evolución filogenética de la *Leptospira* patógena.

Al descubrir el grado de parentesco y las diferencias genómicas entre ambas especies se podrá entender mejor la evolución, los mecanismos de vida e inocuidad de las bacterias saprofíticas así como la razón de la patogenicidad de las infecciosas. El material genético codifica los mecanismos de supervivencia de la *Leptospira*, por lo que su estudio también nos permitirá encontrar claves para futuros estudios que permitan desarrollar planes de prevención para la enfermedad.

El mapeo de genes podrá revelarnos la veracidad de la biblioteca trabajada para estudios posteriores. Así como afirmará la capacidad de realizar bibliotecas genéticas en el laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco, de óptima calidad, indispensables para la investigación de genomas.

4. Área de estudio

El área de estudio fue el laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

5. Materiales y métodos

5.1. Materiales

5.1.1. Bacterias

- Cepa *Echerichia coli* lisogeno P2
- Cepa *Staphilococcus aureous*

5.1.2. Vectores

- Fago lítico Lambda DASH II (Stratagen, USA)

5.1.3. Medios

- Acetato de Sodio 3M: 40.82 acetato de sodio, 20 ml acido acetico glacial, 100 ml H₂O.
- Agar nutritivo: 10% agar nutritivo en agua
- Bromuro de Etidio: 10 mg/ml Bromuro de etidio, 1 g/100 ml H₂O
- Buffer 1: 100mM Tris, 150 mM NaCl, 1000 ml H₂O
- Buffer 2: 8.4 g NaHCO₃, 800 ml H₂O, pH 9.6
- Buffer 3: 100mM Tris, 100mM NaCl, 1000ml H₂O
- Buffer bloqueante: Buffer1, 0.05% TWEEN 20
- Buffer L1: 300 mM NaCl; 100 mM Tris-Cl, pH 7.5; 10 mM EDTA ; 0.2 mg/ml BSA ; 20 mg/ml Rnase A; 6mg/ml Dnase I.
- Buffer L2: 30% polyethylene glycol (PEG 6000); 3 M NaCl
- Buffer L3: 100mM NaCl; 100 mM Tris-Cl, pH7.5; 25 mM EDTA
- Buffer L4: 4% dodecyl sulfato de sodio (SDS)
- Buffer L5: 3M acetato de potasio, pH 5.5
- Buffer QBT: 750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH7.0; 15% isopropanol; 0.15% Triton X-100
- Buffer QC : 1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH7.0; 15% isopropanol
- Buffer QF: 1.25M NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH8.5; 15% isopropanol
- Buffer H: Stratagene 1999
- Chloroformoisomyl alcohol (25:1): 250 ml cloroformo, 10ml isoamyl alcohol
- Denhart 100X: 2g polirininil, 2g BSA, 100 ml H₂O
- EMJH: medio basal: 1g/l Na₂PO₄, 1g/l NaCl, 0.25 g/l NH₄Cl, 0.3 g/l KH₂PO₄, 0.005g/l Thiamin B1, pH 7.4
- NZY Agar: NZY Broth, 1.5% agar
- NZY Agar semi sólido: NZY Broth, 0.7% agar
- NZY Broth: 5g NaCl, 2 g MgSO₄, 5 g extracto de levadura, 10 g caldo CASO, 1000 ml H₂O
- Proteinasa K: 100 mg Proteinasa K, 5 ml H₂O

- SM Buffer : 5.8 g NaCl, 2g MgSO₄, 50 ml 1 M Tris-HCl, 5.0 ml 2% gelatin, 1000 ml H₂O
- SSC 20X: 175.3g NaCl, 88.2g citrato de sodio, 800 ml H₂O
- TE: 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.121g Tris base, 90 ml H₂O pH 8.0
- Trisborato: 10.8g Tris base, 0.99 Na₄EDTA, 5.5g Boric Acid, 1000 ml H₂O
- Solución de prehibridación: 50 ul DNA salmón 10mg/ml, 15 ml SSC 20X, 2.5 ml SDS 10%, 22.5 ml formamida, 2.5 ml solución Denhart 100X, 7 ml H₂O destilada.

5.2. Métodos

En 1999, el laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito fabricó la biblioteca del genoma de *L. biflexa* insertando segmentos de genes de esta bacteria en fagos Lambda DASH II. Con este material se contaba al inicio del proyecto. El proyecto fue dividido en diferentes etapas interconectadas entre sí. Primero se seleccionaron cuatro clones del genoma con los que se iba a trabajar. Estos fueron multiplicados y se extrajo su ADN para ser probados por medio de dot blotting si el pedazo de material genético extraído coincidía con el genoma inicial de *L. biflexa*. Se hicieron extracciones masivas de ADN de los clones mediante el uso del kit QIAGEN (Stratagene, 1999) y Polietilenglicol (PEG) para obtener óptima calidad de ADN para ser secuenciado. Finalmente se mapeó cuatro clones extraídos con el genoma de *L. biflexa* al azar, sometido a varias enzimas de restricción para ver la calidad de la biblioteca, utilizando mecanismos de Southern blot.

5.2.1. Construcción de biblioteca de *L. Biflexa* y *L. Interrogans* serovar *cannicola*

En 1999 el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito generó dos biblioteca genómicas de las bacterias *L. biflexa* y *L. interrocans* serovar *cannicola*.

Se extrajo ADN por DNAzol (Invitrogen, 1999) como detalla el paso 5.2.8.1. Se colocó 6 ug de ADN en tubos eppendorf y se cortó parcialmente con una mínima exposición a la enzima de restricción *EcoRI*, como detalla el paso 5.2.6.1.2. Se tomó el vector Fago lítico Lambda DASH II (Stratagene, 1999) y se lo expuso a la enzima *EcoRI* y a *BamHI* como detalla el protocolo 5.2.6.1.2 y 5.2.8.2. Se unió el material genético de ambas cepas de aproximadamente 20 kb al vector por medio de ligasa T4 y finalmente se empaquetó con el Kit Giga Pack Gold (Stratagene, 1999, Sevilla, 2003).

5.2.2. Cálculo de clones en el genoma de *Leptospira biflexa*

Se estima que *Leptospira biflexa* tiene un número aproximado de kilo bases que el genoma ya secuenciado de *L. interrogans*; aproximadamente 4 700 kb. Para saber el número de clones que deben cultivarse para abarcar todo el genoma se siguió la formula: $N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$

N= número de clones necesarios que abarquen el genoma de *Leptospira*:

F=kb insertadas/ kb genoma

Inserto= 9-23 kilobases

Genoma= 4 700 kilo bases

Lo que sugiere que se necesitan aproximadamente 580 fagos distintos para abarcar todo el genoma de la bacteria, logrando 90 % de exactitud.

5.2.3. Titulación de biblioteca de *L. Biflexa*

Para poder realizar este proyecto era necesario saber con que concentración de material inicial se contaba por lo que se procedió a realizar una titulación de la biblioteca de *L. Biflexa*.

5.2.3.1. Cultivo de fagos

Se tomó una muestra de *E. coli* lisógeno de P2 y se estrió sobre una caja petri con medio sólido NZY, se lo cultivó por 18h a 37° C. Posteriormente se tomó una colonia aislada de la cepa y se cultivó en caldo NZY por 8h a 37° C. Se centrifugó el caldo con bacterias por 10 min a 5000RPM. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 3 ml de MgSO₄ 10 mM.

Paralelamente se prepararon diluciones de 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 de fagos que contenían la biblioteca de *L. biflexa* en MgSO₄ 10mM. Se incubaron 1ul de las diferentes concentraciones de fagos con 200 ul de *E. coli* resuspendido en MgSO₄ por 15 min a 37° C. Se diluyó el medio semisólido NZY en baño María y se agregó la suspensión de fago y *E. coli* lisógeno de P2, se homogenizó la solución y se vertió sobre la caja petri con medio sólido NZY precalentado a 37° C. Se incubó por 24h a 37 °C.

5.2.3.2. Conteo de Colonias

Luego de 24 horas se contó el número de placas formadas en las cajas petri y se calculó la concentración inicial de fagos en las muestras.

5.2.4. Comparación genómica por métodos de hibridación

5.2.4.1. Siembra de los fagos que contienen el genoma de *L. biflexa*

En un pirex estéril de 200 cm², se repartió 300 ml de medio sólido NZY y se esperó que solidifique. Se mezcló 5 ml de cultivo de *E. coli* lisógeno de P2 en caldo NZY con 50 ml de medio semisólido NZY diluido y se colocó en el recipiente mencionado. Cuando se solidificó el medio, se traspasaron 580 fagos de diferentes placas, cantidad calculada en el paso 5.2.2 para abarcar todo el genoma de *L. biflexa*, siguiendo una cuadrícula imaginaria. Se incubó el cultivo hasta lograr ver placas de fagos formados a 37° C.

5.2.4.2. Transferencia de fagos a una membrana de nylon

Se humedeció una membrana de transferencia de ácidos nucleicos con agua destilada y se la colocó sobre las colonias de fagos del paso 5.2.4.1, marcando la exacta posición donde se encontraba. Se la dejó por 4 minutos hasta que se transfieran los fagos del medio a la membrana. Luego se denaturó el ADN de los vectores Lambda por un minuto con cada una de las soluciones, NaOH 1M, Tris 1 M pH 7.5 y finalmente Tris 0.5 M pH 7,5. Se secó la membrana a temperatura ambiente y se fijó el ADN denaturalizado con luz UV.

5.2.4.3. Prehibridación de membranas para Southern blot

La membrana de transferencia de ácidos nucleicos fue prehibridada para realizar luego un Southern blot con solución de prehibridación en una bolsa de plástico sellada en baño María con agitación a 42° C por seis horas.

5.2.4.4. Marcación ADN con DiG (Boehringer, 1999)

Se tomó 20 ul de ADN del genoma de *Leptospira interrogans* serovar cannicola y se los precipitó con etanol y se resuspendió en 15 ul de agua destilada estéril en un tubo eppendorf. Seguidamente se denaturó el ADN en baño María a 80° C por 10 minutos seguido de dos y medio minutos en hielo. Se agregó al tubo eppendorf 2 ul de hexanucleotide mix 10X, 2 ul dNTP labeling mix y 1 ul Klenow (Invitrogen, 1999); se agitó y se incubó por 12 horas a 37 °C. Se agregó posteriormente 1:10 volúmenes de acetato de sodio 3M y dos volúmenes de etanol 100%. Se mezcló y se centrifugó por seis minutos a 14 000 rpm; se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 50 ul de TE. Se lo almacenó en -8°C.

5.2.4.5. Hibridación de membranas

Se tomó el ADN marcado en el paso 5.2.4.4, se lo denaturó sometiéndole a hervor por 10 minutos seguidos por 2 minutos en hielo y se lo agregó a la

solución donde se encontraba la membrana prehibridada en el paso 7.2.4.3. Se selló nuevamente la bolsa plástica con la solución de prehibridación y la sonda de ADN marcada, y se incubó con agitación por 24 horas a 42° C.

Se eliminó la solución de hibridación y se lavó la membrana dos veces con 2X SSC y 0.1% SDS por cuatro minutos cada ocasión, seguido de dos lavados más con una solución de 0.2X SSC y 0.1% SDS del mismo tiempo. Luego se lavó con una solución de 0.16X SSC y 0.1X SDS por 15 minutos a 50° C dos veces. Posteriormente se realizó tres ciclos de lavados con SSC 2X por cuatro minutos cada vez. Se equilibró la membrana con 50 ml de Buffer 1 por 2 minutos y con buffer bloqueante por un minuto más. Se preparó una solución de 0.05% Tween 20 en el buffer 1 con una concentración de Anti-DiG 1/5000 y se dejó la membrana con agitación por 60 minutos. Se lavó 2 veces con Buffer 1 por 15 minutos y se equilibró con el Buffer 3.

Finalmente se reveló la membrana con 45 ul de Nitro Blue Tetrazolium Chloride (NBT) y 35 ul de X-fosfato en 10 ml de buffer 3. Se dejó por dos horas o menos en la oscuridad. Se paró la reacción con agua destilada el momento que las marcas estaban claras.

5.2.4.6. Selección de placas que hibriden y no hibriden con el genoma de *L. interrogans*

Se analizó la membrana revelada en el paso 5.2.4.5 y se seleccionó al azar ocho clones de *L. biflexa* que hibriden y ocho que no hibriden con la sonda marcada de *L. interrogans*. Se sobrepuso la membrana sobre las placas cultivadas y se tomó la colonia de fago que correspondía. Para conseguir eficiencia en el trabajo y con fines prácticos para ésta investigación, de las cantidad de fagos aislados se tomó únicamente tres colonias de fagos que no hibridaron con *L.*

interrogans y se los enumeró nH1, nH3 y nH4, y una colonia que si hibridó y se lo marcó como H4. Se guardó los vectores en tubos eppendorf con 500 ul de SM buffer y 20 ul de cloroformo en refrigeración a 4°C.

5.2.5. Aislamiento de fagos Lambda conservados en 5.2.4.6

5.2.5.1. Titulación de fagos

Se tituló los fagos aislados en el paso 5.2.4.6, nH1, nH3, nH4 y H4 para saber con que concentración de material inicial se contaba, repitiendo el paso 5.2.3.1 y 5.2.3.2.

5.2.5.2. Aislamiento de fago Lambda puro

Se tomó las colonias aisladas del paso 5.2.5.1 y se sembró nuevamente según el protocolo 5.2.3.1.

5.2.5.3. Multiplicación de clones

Se tomó los clones del paso 5.2.5.2 y se repitió el protocolo 5.2.3.1 monitoreando el crecimiento de las colonias hasta lograr un amplio desarrollo sin que se mezclen unas colonias con otras. Se agregó 3 ml de SM buffer y se dejó reposar a temperatura ambiente por 12 horas. Posteriormente se tomó aleatoriamente 500 ul de sobrenadante de cada clon, nH1, nH3, nH4 y H4 y se guardó en tubos eppendorf con 20 ul de cloroformo a 4° C.

5.2.6. Extracción de DNA de Lambda por medio de PEG

5.2.6.1. Extracción de DNA de Lambda por medio de PEG

Se centrifugó un cultivo de *Echerichia coli* lisógeno de P2 cultivado en caldo NZY por 10 minutos a 10 000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2 ml de MgSO₄ 10 mM.

Una alícuota de 400 ul de los clones aislados nH1, nH3, nH4 y H4 en el paso 5.2.5.3, se agregó a 200 ul de la solución de *E. coli* lisógeno de P2 resuspendido

en MgSO₄. Se incubó las mezclas por 20 minutos a 37° C y se los agregó a 5 ml de caldo NZY a cada uno. Se incubó las cuatro muestras con agitación por 12 horas a 37° C.

Pasado este tiempo se añadió 100 ul de cloroformo a cada cultivo y se dejó nuevamente con agitación a 37° C por 15 minutos más. Simultáneamente se centrifugó por 10 minutos a 10 000 rpm un cultivo de *Staphilococcus aureus* en caldo nutritivo y se agregó 500 ul del sobrenadante a los cuatro caldos NZY que contenían los clones nH1, nH3, nH4 y H4, como fuente de endonucleasa. Subsiguientemente se agregó NaCl hasta que las soluciones llegaran a una concentración de NaCl 1 M. Se mantuvo las muestras en hielo por una hora. Se centrifugó las cuatro muestras por 10 minutos a 10 000 rpm y se recogió los sobrenadantes.

A los cuatro sobrenadantes se aumentó polientilenglicol hasta lograr 10% v/w y se incubó otra vez en hielo por otros 30 minutos. Se centrifugó las cuatro muestras a 8 000 rpm por 20 minutos a 4° C y se resuspendió los pellets en 200 ul de TE estéril. Se aumentó 1 volumen de cloroformo puro y se centrifugó por 2 minutos a 12 000 rpm. Se transfirió las partes superiores de las muestras después de la centrifugación a tubos nuevos y se agregó 1% SDS y 1 ug/ml de proteinasa K. Se incubó los clones por 1 hora y se agregó un volumen de fenolcloroformo, repitiendo el proceso de centrifugación y transferencia de la parte superior a un tubo nuevo. Se repitió el mismo procedimiento con cloroformo-isoamilalcohol dos veces y en la última transferencia se agregó 1:10 v/v de acetato de potasio 3 M frío y 2 volúmenes de etanol 100%. Se incubó los cuatro tubos a -20° C por 20 minutos. Se centrifugó por 10 min a 10 000 rpm para sedimentar el pellet con el ADN de interés. Se lavó los pellets de ADN de

cada clon con 1 ml de 70% etanol y se secó a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió los fragmentos de ADN extraído de los cuatro clones nH1, nH3, nH4 y H4 en 40 ul de TE y se guardaron a -20° C.

5.2.6.2. Comprobación de calidad de ADN extraído en el paso 5.2.6.1 por medio de Electroforesis y la enzima de restricción *EcoRI*.

5.2.6.2.1. Electroforesis

Se preparó un gel de electroforesis a una concentración de 0.86% P/V de agarosa en trisborato y se agregó 0.014 % V/V de bromuro de etidio. Se lo virtió en la cámara de electroforesis ya preparada con peineta delgada. Se mezcló 10% V/V de buffer de carga con 10 ul de ADN extraído en el paso 5.2.6.1 para cada clon, nH1, nH3, nH4 y H4. De la misma forma se combinó 75% V/V de buffer de carga con ladder de 1kb. Se agregó una solución de trisborato al gel completamente seco para que corra la carga eléctrica apropiadamente y se cargó las cinco muestras preparadas. Se dejó correr el gel a 65 V por aproximadamente 3 horas. Se analizó el gel en una cámara UV.

5.2.6.2.2. Corte del ADN extraído en el paso 5.2.6.1 con la enzima de restricción *EcoRI*

Se preparó una solución de 60% agua destilada estéril, 1% BSA, 35 % Buffer H (Stratagene, 1999) y 1 % *EcoRI*. Se tomó 15 ul de la solución preparada con la enzima de restricción y se mezcló con 5 ul de ADN resuspendido de los clones nH1, nH3, nH4 y H4 respectivamente. Se incubó las muestras por 10 horas a 37° C y se corrió un gel de electroforesis como describe el paso 5.2.6.2.1 para analizar los resultados.

5.2.7. Comparación de clones homólogos y no homólogos de la biblioteca con *L. interrogans*

5.2.7.1. Dot blotting

Se tomó cuatro membranas de transferencia para ácido nucleicos de 6 cm² cada una. Se puso 2 ul de ADN de *L. biflexa* en un extremo de cada membrana y 2ul de ADN de *L. interrogans* en el otro, extraídos en el paso 5.6.2.1. Se esperó a que se sequen completamente a temperatura ambiente. Se denaturó las muestras de ADN de las membrana mediante inmersiones de 30 minutos en solución de 1.5 M NaCl y seguida de 0.5 M NaOH. Se esperó a que se sequen por completo y se fijó el ADN a la membrana en la cámara de luz UV por 2 min.

Siguiendo el protocolo de 5.2.4.4 se construyeron sondas de ADN marcadas con DiG para cada uno de los cuatro clones nH1, nH3, nH4 y H4 (Boehringer, 1999). Posteriormente se repitió el paso 5.2.4.3 y 5.2.4.5 con las membranas para la prehibridación y elaboración de Souther blot. Finalmente se observó los resultados.

5.2.8. Extracción de DNA por medio de QIAGEN Kit

5.2.8.1. Preparación de cultivos de *Echerichia coli* y fagos nH1, nH3, nH4 y H4 para la extracción de ADN por medio de columnas de extracción QIAGEN Lambda Kit (Qiagen, 1999)

Por medio de estriación en agar nutritivo fue aislada una colonia de *Escherichia coli* lisógeno de P2, que fue cultivada en caldo NZY con agitación hasta tener una concentración de 100 000 bacterias por ml. Sabiendo que la medición de uno en un espectrofotómetro medido a OD 600 representa una concentración de aproximadamente 100 000 000 células bacterianas por ml, se logró la concentración de bacterias deseadas.

De la solución de bacterias a la concentración de 100 000 células por ml, se tomó cuatro diferentes alícuotas de 5000 ml cada una. Estas fueron centrifugadas por 10 minutos a 8 000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió los pellets en 3ml de buffer SM. A cada pellet resuspendido se agregó cerca de 20 000 000 fagos de cada uno de las 4 muestras aisladas, nH1, nH3, nH4 y H4. Se dejó las muestras en incubación a 37° C por 20 minutos. Después de este tiempo se agregó a cada lisaje 250 ml de caldo NZY. Para lograr una máxima propagación de los fagos nH1, nH3, nH4 y H4, se dejó al cultivo en incubación con agitación a 37°C por 15 horas.

5.2.8.2. Extracción de ADN de los fagos nH1, nH3, nH4 y H4 por medio de las columnas de extracción de Qiagen Lambda Kit. (Qiagen, 1999)

Después de haber propagado los fagos en el paso 5.2.8.1, se aumentó 2%v/v de cloroformo y se incubó las cuatro muestras por 15min a 37° C. Posteriormente se centrifugó cada una a 10 000 rpm por 10 minutos y se eliminó el sedimento de residuos de bacterias. A los sobrenadantes se agregó 240 ul de buffer L1, se incubó por 30 minutos a 37° C. Posteriormente se agregó 30 ml de buffer L2 a 4° C y se incubó por 60 minutos en hielo. Pasado este tiempo las muestras fueron centrifugadas a 10 000 rpm por 10 minutos y se descartó los sobrenadantes. Se resuspendió los pellets en 5.4 ml de buffer L3 y 5.4 ml de buffer L4, y se los incubó a 70° C por 20 minutos y se los pasó inmediatamente a hielo. Enfriadas las suspensiones se agregó 5.4 ml de buffer L5 a cada clon y se centrifugó a 4° C por 30 min a 15 000 rpm. A los sobrenadantes se centrifugó nuevamente por 10 minutos en las mismas condiciones térmicas ya citadas. Simultáneamente se equilibró la membrana de la columna de extracción de ADN de lambda QIAGEN (Qiagen, 1999) con 10 ml de buffer QBT. Se añadió a las

columnas de extracción los sobrenadantes de la última centrifugación más 30 ml de buffer QC. Se extrajo el ADN que quedó en las columnas con 15 ml de buffer QF. Se añadió 10.5 ml de isopropanol a temperatura ambiente a cada muestra y se centrifugó por 30 min a 15 000 rpm a 4° C. Se eliminó los sobrenadantes y se lavó por dos ocasiones los pellets de ADN de los fagos nH1, nH3, nH4 y H4 con 5 ml de etanol al 70%, y se los resuspendió en 120ul TE estéril. Se guardó las muestras en tubos eppendorf a -10° C.

5.2.8.3. Comprobación de calidad de DNA

5.2.8.3.1. Medición de OD

Se realizaron mediciones de absorbancia para comprobar la calidad de ADN de las muestras nH1, nH3, nH4 y H4 extraídas en el paso 5.2.8.2. Se tomó 10 ul de ADN resuspendido en TE y se diluyó en 570 ul de agua destilada estéril. Se calibró el espectrofotómetro de longitud de onda a 260 nm y luego a 280 nm. Se realizó las mediciones de las muestras preparadas en las dos diferentes longitudes de onda.

5.2.8.3.2. Electroforesis

Se siguió el protocolo 5.2.6.2.1 utilizando las muestras nH1, nH3, nH4 y H4.

5.2.8.3.3. Corte del ADN extraído en el paso 5.2.8.2 con la enzima de restricción *EcoRI*

Para comprobar la calidad de ADN y si puede cortarse adecuadamente con una enzima de restricción, se siguió nuevamente el protocolo 5.6.1.2 con el ADN de los clones nH1 y H4 ya que éstos tenían la mayor cantidad de material genético extraído en el paso 5.2.8.2.

5.2.8.4. Precipitación de ADN de los clones extraídos por columna QIAGEN

Se agregó 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M y dos volúmenes de etanol 100% a las muestras nH1, nH3, nH4 y H4 y se dejó a -80° C por 30 minutos. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas por 30 minutos y se eliminó los sobrenadantes. Se añadió 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó por 15 minutos más. Se secó por completo los pellets y se los guardó a -10° C.

5.2.9. Mapeo de clones

5.2.9.1. Extracción DNA *Leptospira biflexa* usando DNAzol

En medio EMSSH líquido, se cultivó *Leptospira biflexa* hasta tener una concentración de 10 000 000 células por ml. Se centrifugó 20 ml aproximadamente de caldo y se lavó el pellet con TE y se lo pasó a un tubo eppendorf. Se resuspendió la muestra en 100 ul de TE, con 900 ul de DNA zol y 500 ul de etanol 100%. Se mezcló por 3 min y se extrajo el DNA por enrollamiento y por centrifugación por 10 min a 4 000 rpm. Finalmente, se lavó el pellet con etanol 70% y se resuspendió en NaOH 8mM.

5.2.9.2. Corte ADN de *Leptospira biflexa* con enzima de restricción *BamHI*

Se cortó el ADN de *L. biflexa* extraído en el paso 5.2.9.1 con la enzima de restricción BamHI. A 8 ul de ADN de *L. biflexa* se mezcló con 12 ul de una solución de 76% agua destilada estéril, 16% React 3 y 8% *BamHI*. Se incubó esta mezcla a 37° C durante toda la noche y se corrió un gel de electroforesis como se detalla en el paso 5.2.6.2.1.

5.2.8.3. Southern blot de los clones de nH1, nH3, nH4 y H4

Se denaturó el ADN de *L. biflexa* presente en el gel gracias a una inmersión por 30 minutos en una solución de 1.5 M NaCl 0.5 M NaOH y posteriormente en 3 M NaCl 0.5 M NaOH. Se armó una estructura de Souther blot descrita por Lodish, (2002), utilizando una membrana de transferencia de ácido nucleicos.

Siguiendo el protocolo de 5.2.4.4, se creó una sonda marcada con DiG con el ADN de los clones nH1, nH3, nH4 y H4.

En la membrana de transferencia de ácidos nucleicos, se repitió los pasos 5.2.4.3 y 5.2.4.5 con las sondas de ADN recién preparadas. Se reveló las marcas de hibridación y observó los resultados.

6. Resultados

6.1. Titulación de biblioteca de *L. biflexa*

Se obtuvieron tres concentraciones que dieron una media de 315 000 fagos por ml de la concentración inicial de la biblioteca genómica de *L. biflexa* (Tabla 1).

Se aplicó la fórmula citada en el paso 5.2.2 para saber el número de clones que deben cultivarse para abarcar todo el genoma. Se calculó que se necesitan aproximadamente 580 fagos distintos para abarcar todo el genoma de la bacteria, teniendo un 90 % de certeza.

6.2. Comparación de clones homólogos y no homólogos de la biblioteca con *L. interrogans* con métodos de hibridación

Se sembró, ordenadamente en cuadrícula, 600 fagos de la genoteca que se cree contenían todo el material genético de *L. biflexa*. Se esperó a que formen colonias y se transfirió su ADN a una membrana de transferencia de ácidos nucleicos.

Se marcó con DiG el material genético de *L. interrogans* y se hizo la comparación genómica con la membrana anteriormente mencionada, utilizando métodos de hibridación. Después del revelado se vio que varios clones tuvieron una clara hibridación con ambas especies de *Leptospira*, por lo contrario otros fagos no tuvieron homología con el genoma de la cepa patógena *L. interrogans* ya que su material genético no hibridó. También se observó que existía aproximadamente un 45%

de colonias de fagos que no hibridaron adecuadamente, por lo que no fue posible contar el número de clones que hibriden y los que no (Figura 6).

De los 600 fagos que contenían secuencias de *L. biflexa* se seleccionó para aislarlos, de lo que tenían los mejores y más evidentes resultados, al azar un fago que hibridó y se lo llamó H4 y tres que no hibridaron, nH1, nH3 y nH4. Se seleccionó ésta mayor proporción de fagos que no hibriden ya que se consideró representativo contar con mayor cantidad de secuencias que no hibriden con la cepa patógena, y trabajar con cuatro muestras permite un patrón para el trabajo y los resultados del estudio.

6.3. Titulación y multiplicación de fagos lambda nH1, nH3, nH4 y H4 aislados en el paso 5.2.5.

Se titularon los clones nH1, nH3, nH4 y H4 y se calcularon las concentraciones de fagos por ml de cada muestra (Tabla 2). Después de la multiplicación de los fagos, se obtuvo muestras de 2.5 ml de solución de bacteriofagos en Buffer SM, teniendo en menor cantidad nH1 con aproximadamente 75 000 fagos, se obtuvo 4.5 veces más de nH3, 3.3 veces más de nH4 y una doble cantidad de H4.

6.4. Extracción de ADN de Lambda por medio de PEG

Después de la extracción de ADN de los cuatro clones con PEG, se corrió dos geles de electroforesis. El segundo gel tenía ADN de la genoteca sometido a la enzima de restricción *EcoRI*. Se vio claramente en la primera electroforesis, había una banda gruesa de ADN en la parte superior del gel y en la parte inferior del gel había un poco de impurezas que podía ser ARN en todos los clones analizados. El momento de correr el ADN cortado con *EcoRI* se vio que había varias bandas de diferentes tamaños para los fagos H4, nH1, nH3 y nH4 (Figura 7). También se pudo distinguir claramente dos bandas superiores más pesadas que corresponden al genoma del fago lambda (Figura 2).

6.5. Comparación de clones homólogos y no homólogos con *L. interrogans*

Por medio de la técnica de dot blotting se confirmó que los clones aislados H4 y nH1, nH3 y nH4 pertenecen a la cepa de *L. biflexa*. El clon H4 presenta una muy leve marcación en el sitio de *L. interrogans*, mientras que nH1, nH3 y nH4 solo presentan hibridación con la cepa de *L. biflexa* (Figura 8).

6.6. Extracción de ADN de nH1, nH3, nH4, y H4 medio de columnas de extracción de QIAGEN kit

Se extrajo material genético de cuatro clones nH1, nH3, nH4 y H4 por medio de un QIAGEN kit (Qiagen, 1999). Al final del proceso se vieron pellets mucho más pequeños en comparación con los pellets de la extracción por medio de PEG.

Al hacer la electroforesis y cortar el material con *EcoRI* se vio muy poco material en el gel (Figura 9). Se calculó la cantidad total de ADN extraído del clon nH1, sabiendo que la medición 1 a 280 nm equivale a 50 ug de ADN. Se obtuvo aproximadamente 5 ug de ADN puro de cada clon. Se midió la calidad del mismo midiendo 260nm de una muestra dividiendo para la medición de 280 nm, se logró una calidad de 2.55 260nm/280nm (Tabla 3). La medición de OD se realizó únicamente en el clon nH1 para preservar el material de buena calidad de los otros clones para una futura secuenciación.

6.7. Mapeo de clones

Se trabajó con el ADN extraído con PEG de los cuatro clones, nH1, nH3, nH4 y H4. Se corrió geles de electroforesis con las muestras de cada clon y el genoma de *L. biflexa* sometidas tanto los clones como el genoma completo a la enzima de restricción *BamHI*. El material se cortó exitosamente, sin embargo las líneas en el gel no estaban bien definidas (Figura 10).

Al realizar el Southern Blot con la sonda de los clones nH1, nH3, nH4 y H4, se pudo observar en el revelado bandas claras y bien definidas en los dos carriles, el de *L. biflexa* y el de el clon de interés. Para el caso del clon H4, éste presentó un patrón muy similar después de la hibridación de la membrana. La diferencia se encontró en una banda que estaba presente en el genoma de la bacteria y no existía en el clon (Figura 11a). Por otro lado el material genético presente en el fago nH1 tiene dos bandas similares en los carriles del clon y de la bacteria, y siete bandas pequeñas presentes únicamente en el carril de *L. biflexa* (Figura 11b).

El clon nH3 muestra una homología perfecta entre el material genético de la bacteria y el clon, las bandas reveladas después de la hibridación son iguales (Figura 11c). Finalmente el fago Lambda nH4 mostró después de la hibridación y revelado, 5 bandas iguales con el material genético de *L. biflexa* y 2 bandas desiguales ya que están presentes únicamente en el genoma de la bacteria (Figura 11d).

7. Discusión

Las secuencias de ADN son importantes ya que codifican la información necesaria para la vida de un organismo; su funcionamiento y cómo fue construido cada parte de éste (Page and Holmes, 1998). Al trabajar con dos especies bacterianas estrechamente relacionadas como *Leptospira biflexa* y *Leptospira interrogans* se puede encontrar la relación existente entre ambas y el grado de su divergencia. La comparación entre dos cadenas de ADN de parientes tan cercanos pero tan divergentes en su forma de vida, provee enormes cantidades de información que podría ser utilizada en tratamientos, prevención y diagnóstico de enfermedades infecciosas (Fraser et al. 2000). De esta forma, la información genética de la *Leptospira* puede contribuir,

mediante investigaciones futuras, al entendimiento de los mecanismos de virulencia y patogenicidad en la leptospirosis.

Comparación de clones homólogos y no homólogos de la biblioteca *L. biflexa* con el material genético *L. interrogans* resultó en varios clones que poseían secuencias similares que hibridaron claramente con el genoma de la sepa patógena. Otras eran secuencias no homólogas entre ambas especies dando placas que no hibridaron en absoluto. Sin embargo existieron placas que no era una hibridación clara, se encontraban medianamente marcadas; esto se debe a que seguramente el momento de la transferencia de las placas a la membrana de hibridación no fue adecuada ya que poseían o muy poca cantidad de ADN o simplemente la hibridación no resultó en esos casos. Por lo tanto no se pudo realizar un conteo de la cantidad de placas que poseían secuencias homólogas y no homólogas entre las bacteria *L. biflexa* y *L. interrogans*.

Se extrajo segmentos de ADN de *Leptospira biflexa* insertados en fagos lambda por dos mecanismos, Polietilenglicol (PEG) y utilizando columnas de extracción ya preparadas de QIAGEN maxi Lambda Kit. El primer mecanismo, utilizando PEG, extrajo bastante cantidad de material genético, sin embargo tenía grandes cantidades de impurezas. Con el segundo mecanismo, utilizando una columna de purificación para el fago Lambda, QIAGEN Lambda Kit (1999), permitió extraer ADN libre de impurezas. Como se pudo confirmar en la medición de OD el material genético extraído por columnas de extracción era apto para ser secuenciado, tenía una alta calidad de 2.55 OD₂₆₀/OD₂₈₀, considerando que 2.00 de proporción, es material de muy buena aptitud para secuenciamiento (Watson, 2001); (Figura 9 y Tabla 3). Debido a que había muy poca cantidad de ADN en estas extracciones, se prefirió hacer el menor número de pruebas posibles, y la medición de OD con el espectrofotómetro solo se realizó en el clon nH1. Debido a fallas de logística, no pudo concluirse el secuenciamiento de

ningún segmento de material genético de *L. biflexa* extraído dentro del ámbito de este proyecto.

Al de construir una biblioteca genética, existe la posibilidad que los pedazos de ADN cortados con una determinada enzima de restricción se ligan a vectores de forma desordenada. Los clones formados tendrían toda la información genética, sin embargo el orden en la cual se presentarían los segmentos de ADN dentro del fago sería incorrecto, generando un proceso que se conoce como rearreglo genético. El momento de ligar los pedazo de ADN del genoma de interés a los brazos del vector, la ligasa une dos pedazos de material independiente como uno solo generando un clon con dos pedazos aleatoriamente unidos el uno al otro, sin estar presente de la misma manera al genoma original (Winnacker, 1987).

Para verificar el orden de los segmentos de los clones se utilizó una enzima distinta a la utilizada en la creación de la biblioteca. En los resultados obtenidos en el mapeo de los cuatro clones de *L. biflexa* se encontraron varias bandas iguales en ambos carriles, presentes en un carril donde se encontraba el material genético de los clones y no donde se encontraba el genoma completo de la bacteria o donde ocurrió lo opuesto. Se cree que esto se debe en alguna medida a ya que al crear la biblioteca de *L. biflexa*, el material genético de la bacteria y el vector Lambda, fueron sometidas a la enzima de restricción *EcoRI*. Y que el momento de someterle al vector a la enzima *EcoRI*, se eliminó un pedazo de su secuencia, el sitio *BamHI*. (Figura 2). Al ligarse los fragmentos de ADN de *L. biflexa* en el sitio *EcoRI* del vector Lambda, queda eliminado la secuencia *BamHI*. El momento de mapear los genes se utilizó la enzima de restricción *BamHI*, para cortar en el sitio *BamHI*, que por la razón antes mencionada se cree ya no se encontraba en el genoma del vector, lo que resultó en algunos casos

como bandas desiguales en los dos carriles, del genoma de la bacteria y del clon de interés (Stratagene, 1999).

Para mapear los segmentos de ADN de la bacteria insertados en el vector Lambda, se sometió a los clones y al genoma completo de *L. biflexa*, a la enzima de restricción BamH1. En los clones, la enzima funcionó bien en la mayoría de sitios donde la secuencia que reconocía la enzima de restricción estaba dentro del genoma del clon; sin embargo en los extremos donde los brazos de lambda se ligaron al material externo habiendo sido omitido el sitio *BamH1* por la razones antes mencionadas, se generó secuencias de ADN incompletas que no pudieron separarse de la misma forma como sucedió en el genoma de *L. biflexa*. Como se evidenció en el mapeo de los clones, se revelaron bandas en la membrana de hibridación que estaban presentes en el carril donde estaba el genoma de la bacteria y no se encontraban en la columna del genoma del fago. El pedazo de ADN del clon que no hibridó, seguramente se encontraba ligado al material presente en las dos bandas superiores correspondiente al genoma del fago, que se ven únicamente en la electroforesis mas no se lo observa en el Southern blot. (Figura 7), (Figura 11).

El revelado de la membrana del clon H4 revela una banda en el genoma no presente en el clon, esto se debe seguramente al caso explicado anteriormente, el genoma completo de *L. biflexa* tiene un sitio de restricción más para la enzima *BamH1* que el del clon, ya que este lo perdió al momento de la creación e la genoteca (Figura 11a).

El clon nH1 se cree contiene una secuencia repetitiva o un transposón. Un transposón es un segmento de ADN que se encuentra en diferentes secciones del genoma de un organismo generando copias de sí mismo (Lodish, 2002). Existen dos bandas similares que nos revela el lugar donde se encuentra el material genético del clon

nH1 en el genoma de la bacteria. Sin embargo se tiene siete bandas repetitivas en el carril donde hibridó el genoma de la bacteria que no están presentes en el genoma del clon, indicando que existe una secuencia determinada que está presente en la sonda marcada del clon nH1 que se encuentra en más de un lugar en el material genético de *L. biflexa*. Esto nos revela una secuencia repetitiva que puede ser el resultado de la presencia de un transposón en el genoma de la bacteria *L. biflexa* (Figura 11 b).

El caso del clon nH3 es ideal, presenta bandas idénticas en ambas columnas de la membrana de hibridación. Una de las alternativas para que estos ocurra es debido a que el sitio *BamHI* fue eliminado en el segmento de ADN insertado en el vector, seguramente se debió a que el siguiente sitio estaba tan abajo en la cadena del segmento genético que la sonda ya no hibridó como homólogo. Por lo tanto el momento de la hibridación, todas las bandas marcaron como propias del genoma, dando un revelado idéntico en el carril del genoma de la bacteria y en el del clon nH3 (Figura 11c).

El clon nH4 resultó con dos bandas desiguales en la membrana de hibridación. Esto se debe seguramente a que el sitio *BamHI* en el genoma estaba muy cerca al fin de la secuencia insertada, y el genoma de la bacteria se cortó en dos lugares más que el segmento de ADN insertado en el vector Lambda (Figura 11d).

Si la genoteca hubiese sido creada con la enzima de restricción *BamHI* y el mapeo de los clones con *EcoRI*, los errores se hubieran eliminado.

8. Conclusiones

Existen genes homólogos y no homólogos entre ambas especies de *Leptospira*. Gracias a los mecanismos de hibridación de genomas se observó que existen genes iguales y distintos entre la bacteria saprofítica *Leptospira biflexa* y la espiroqueta

patógena *Leptospira interrogans* serovar *cannicola*. Las diferencias genéticas se cree son las responsables de las diferentes estilos de vida de cada una.

La cantidad de material genético extraído por medio de columnas de extracción del QIAGEN kit, resultó de muy buena calidad, sin embargo debido a que se contaba con poca cantidad, no se pudo realizar el secuenciamiento deseado. Creo que si se contara con equipos de centrifugación para mayor volumen e instrumentos mejor adecuados para el proceso en el laboratorio de Microbiología de la USFQ, se hubiese podido extraer cantidades suficientes para lograr secuenciarlo.

La biblioteca genética de *L. biflexa* es de buena calidad. El mapeo de los cuatro clones de la biblioteca de *L. biflexa* confirmó que ésta está bien construida. Existen pocos errores que se pueden acusar al uso de enzimas de restricción que recortaron el sitio de restricción de otras enzimas. La muestra de la biblioteca estudiada no presenta rearrreglos genéticos, pues las bandas son similares en muchos casos. Esto promueve al uso de este material estudiado en próximas investigaciones. Así mismo se puede concluir que los métodos con los que se trabajó son apropiados para futuros proyectos.

Debido a que no se tomó en cuenta el problema del sitio de la enzima *BamHI* eliminado, los resultados no pueden decirnos si la biblioteca es exacta o no, sin embargo el trabajo puede continuar y se puede analizar los siguientes clones con dos enzimas o con una distinta a *EcoRI* y *BamHI*, como por ejemplo *NotI*.

La extracción, comparación y mapeo de clones del genoma de la bacteria *Leptospira biflexa* realizado en este proyecto es un paso que puede ayudar a comprender muchas ramas de la biología. La filogenética bacteriana realizada con genes secuenciados de cepas relacionadas puede aportar conocimientos al entendimiento de la evolución. La comparación del material genético entre *Leptospira biflexa* y *Leptospira*

interrogans pudo revelarnos detalles y razones por las cuales una es patógena y la otra se encuentra como organismo de vida libre.

En conclusión se puede afirmar que la investigación realizada fue provechosa. Se logró tener resultados positivos que sin duda ayudarán a investigaciones futuras en el laboratorio. El proyecto debe cerrar su circuito. Se sabe que la biblioteca está bien construida y que los protocolos utilizados son óptimos. Si la investigación prosiguiera y se lograra extraer suficiente cantidad de material genético de los clones aislados, se pudiera contribuir en la decodificación del genoma de la bacteria *L. biflexa*.

Si se contara con todo el genoma de la espiroqueta saprofítica *L. biflexa*, se pudiera realizar estudios filogenéticos que son clave para el entendimiento de la evolución de la *Leptospira* patógena.

9. Bibliografía

- Astd: Association of State and Territorial Directos of Health Promotion and Public Health Education.
<http://www.astdhpphe.org/infect/lepto.html>. Abril, 2003.
- [Caroline Boursaux-Eude](#), Unité de Bactériologie Moléculaire et Médicale, Institut Pasteur, 28 rue du Dr. Roux, 75724, Paris Cedex 15, France, 2004.
- Carter K.. **Disease (Leptospirosis)** Ecuador,
<http://darwin.bio.uci.edu/~sustain/Enso97/0298/12FebEcu.htm> Febrero, 1998.
- CDC: Center for Disease Control and Prevention **Leptospirosis** www.cdc.gov
Dicembre 2003.
- Chinese National Human Genome Center at Shangai: **Leptospira interrogans Database.** <http://www.chgc.org.cn/gn/bio.php?name=XForum&file=index>
Abril, 2003.
- Diario El Comercio. Marzo, 2002.
- DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen **Bacterial Nomenclature:Leptospira** Alemania
<http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm> Febrero 2003.
- Faine S., Adler B., Boli C., Perolat.:**Leptospira and Leptospirosis** MediSci, 2da Edición, Melbourne Australia, 1999.
- Fraser CM, Eisen J, Fleischmann RD, Ketchum KA, Peterson S.: **Comparative genomics and understanding of microbial biology**; Emer Infect Dis 2000 Sep-Oct;6(5):505-12.
- Fraser CM, Eisen JA, Salzberg SL.: **Microbial genome sequencing.** Nature 2000 Aug 17;406(6797):799-803.
- **J.P. Euzéby : Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire**
<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ss/spirochaetales.html> J.P. EUZÉBY, 1998-2005
- Judith Green-McKenzie, **Leptospirosis,**
<http://www.emedicine.com/emerg/topic856.htm> August 14, 2001.
- *Leptospira interrogans* genome project,
<http://www.chgc.org.cn/gn/news/lepinfo.html> 2002
- Lodish **Biología Celular y Molecular.** Cuarta edición, Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires 2002.

- M L Savio, C Rossi, P Fusi, S Tagliabue, and M L Pacciarini **Detection and identification of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA.** J Clin Microbiol. 1994 April; 32(4): 935–941.

 - Merial Cattle Vaccines; **The Merial Bovine Infectious Disease Series: Leptospirosis**
http://us.merial.com/veterinary_professionals/veterinarians/cow_calf/disease_pdf/Lepto.pdf, EEUU, 1999.

 - O. Nascimento, L. Martins, B. Monteiro-Vitorello, A. Haake, S. Verjovski-Almeida, A. Hartskeerl, V. Marques, M. Oliveira, C. Menck, C. Leite, H. Carrer, L. Coutinho, W. Degraeve, O. Dellagostin, H. El-Dorry, S. Ferro, **Comparative Genomics of Two *Leptospira interrogans* Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis** Journal of Bacteriology, April 2004, p. 2164-2172, Vol. 186, No. 7

 - Page Robert y Holmes Edward: **Molecular Evolution a Phylogenetic Approach:** Backwell, Cambridge 1998.

 - Panamerican Health Organization **Core Health Data Selected Indicators.** http://www.paho.org/English/DD/AIS/cp_218.htm. 2002.

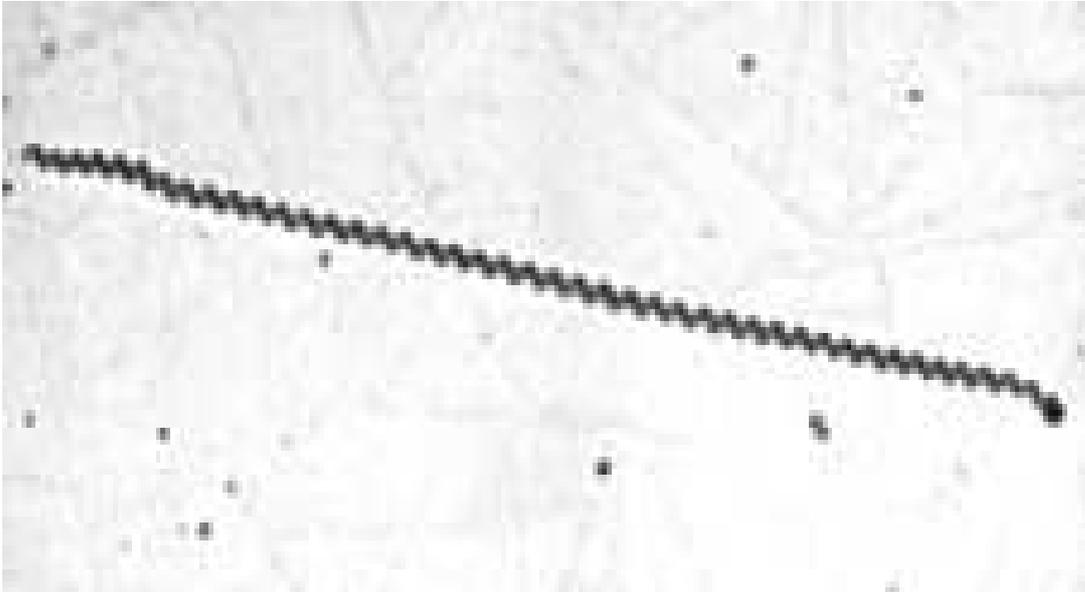
 - Shuang et al. **Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* reveals by whole-genome sequencing.** [Nature 422\(6934\):888-893](http://www.nature.com/4226934). April 2003.

 - Stratagene **Lambda Dash II/EcoRI Vector Kit. Instruction Manual,** 1999.

 - **UN Office for the Coordination of Humanitarian Affairs**
<http://www.reliefweb.int/w/rwb.nsf/0/3f2963ed0bff1902c1256bab00516024?OpenDocument> 30 Apr 2002.

 - Ville C., Solomon E., Berg L., Martín D.,**Biología de Ville,** McGraw-Hill Interamericana, México 1998.
- Watson, James D. 2001. Passion for **DNA:** Genes, Genomes and Society. Ebrary UIPR Barranquitas
- Zuerner RL, Herrmann JL, Saint Girons I. **Comparison of genetic maps for two *Leptospira interrogans* serovars provides evidence for two chromosomes and intraspecies heterogeneity.** J Bacteriology 1993 Sep;175(17):5445-51.

10. Figuras



(Boursaux-Eude, 2004).

Figura 1. Foto electrónica de una leptospira. Mide entre 6-20 μm de largo y 0.1 μm de ancho, tiene forma espiral y sus extremos terminan en forma de gancho.

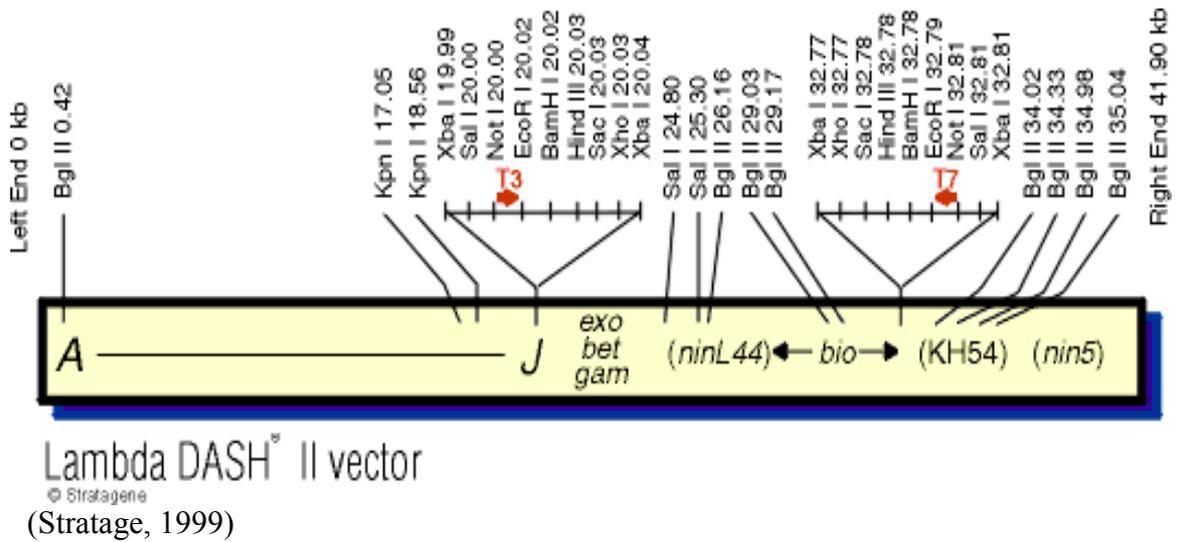
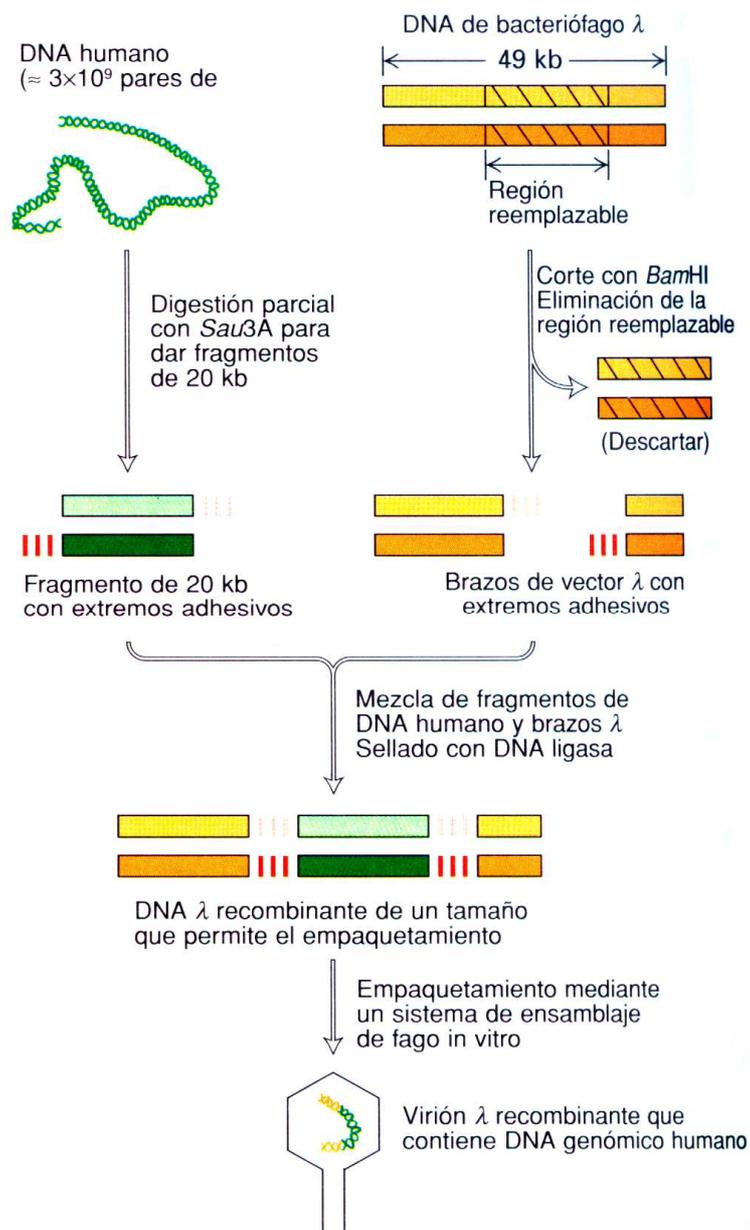


Figura 2. Mapa genético del vector Lamba Dash II Dentro del genoma hay sitios de corte para diferentes enzimas de restricción como EcoR1 o BamH1.

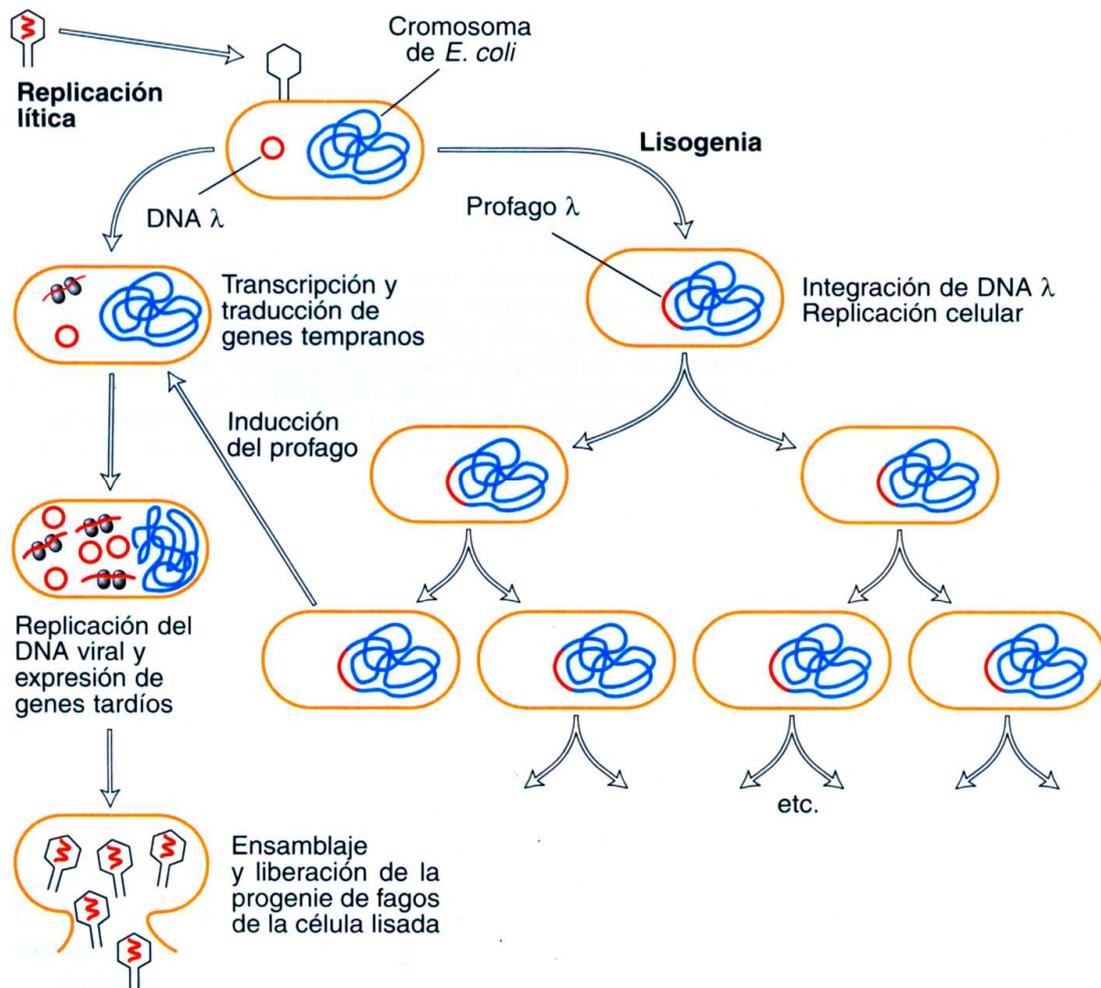


Figura 3. Esquema de un bacteriofago lambda. El genoma viral se encuentra en la cabeza y la cola que actúa en la infección de las células huésped de *E coli* lisógeno de P2.



(Lodish, 2002)

Figura 4. Elaboración de una biblioteca genómica de ADN en el bacteriófago lambda. Cuando se corta con la enzima restricción el material genético del vector lambda, las regiones internas se eliminan y se las reemplaza por fragmentos de ADN de *Leptospira* de máximo 20 kb. Estos fragmentos se adhieren a los pedazos de ADN externos de los brazos del fago gracias a la acción de ligasas y se empaquetan in vitro para lograr un fago lambda recombinado con material genético de *Leptospira* en su interior.



(Lodish, 2002)

Figura 5. Reproducción de Lambda en células hospederas de *E. coli*. En este gráfico se evidencia el proceso que debe seguir el vector Lambda para multiplicarse. El proceso que se llevó a cabo con las células de *E. coli* lisógeno de P2 para propagar el vector que contenían la secuencia de interés, fue el lítico. Este proceso resultó en millones de clones que contenían las secuencias de interés insertadas.

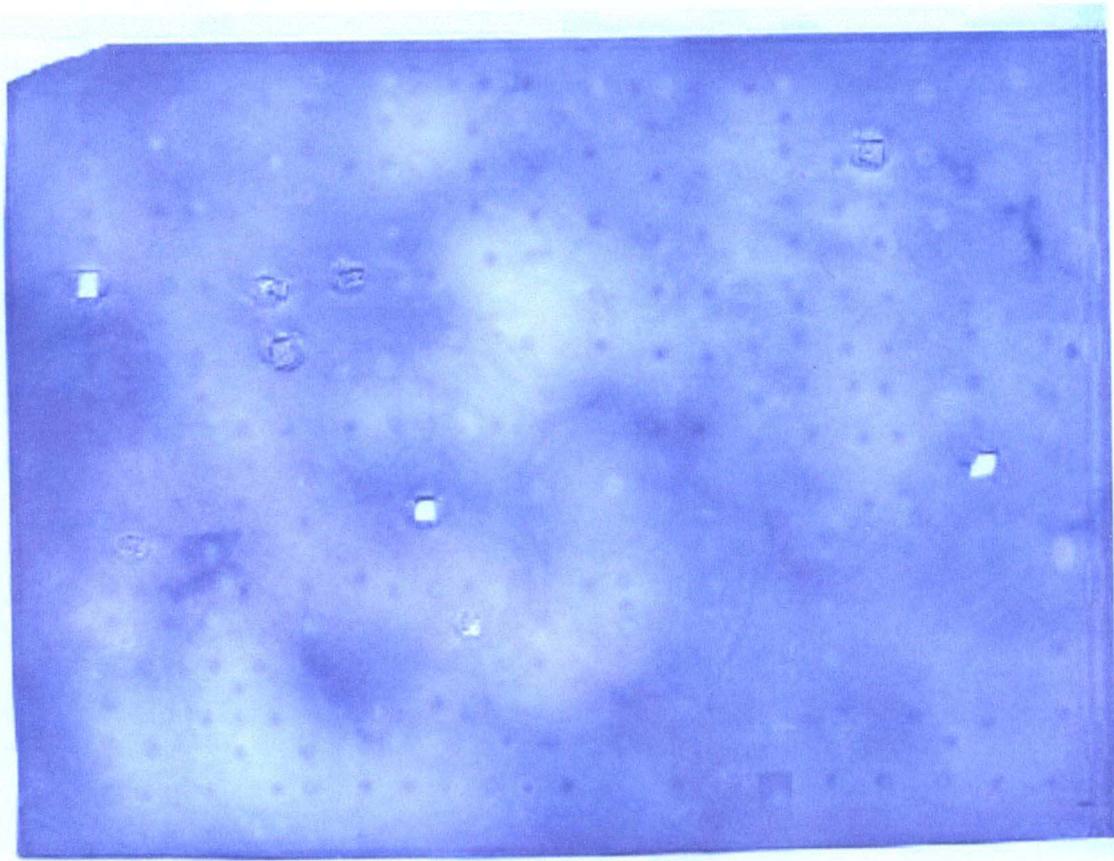
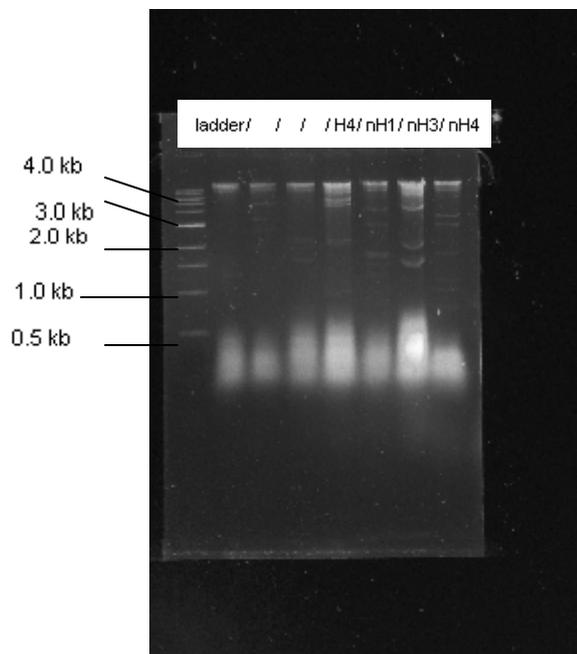


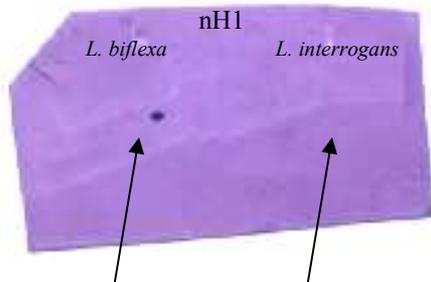
Figura 6. Selección de placas con el fago Lambda que contiene el genoma de *L. biflexa* que hibridan y no hibridan con el genoma de *L. interrogans*. Esta membrana revela los 600 fagos sembrados que contenían el genoma completo de *L. biflexa* y su resultado después de la hibridación con el genoma de la bacteria patógena. Los huecos se deben a la selección de clones para el trabajo posterior a realizarse. Así también se puede evidenciar que existen placas que no tienen un resultado definido pues su hibridación no es clara.



ladder / / / / H4/nH1 / nH3 / nH4

Figura 7. Gel de electroforesis de ADN de clones H4, nH1, nH3 y nH4 extraídos por medio de PEG y cortados con enzima de restricción EcoR1. Se observa en todos los carriles una banda superior que corresponde al genoma del fago. Los cuatro clones presentan bandas de diferentes tamaños, confirmando que el ADN si se cortó con la enzima de restricción EcoR1.

(a)



(b)

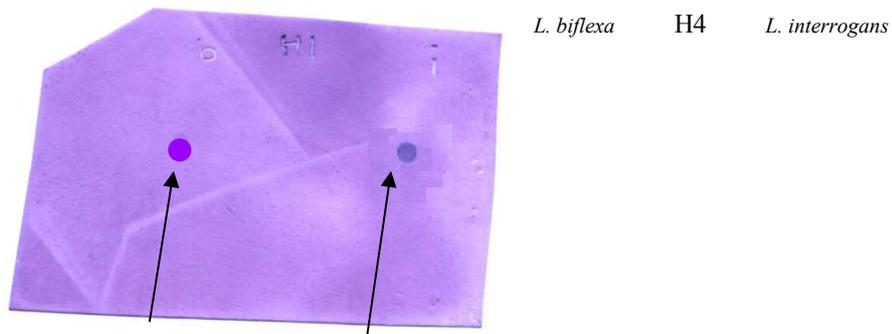


Figura 8. Dot blotting con los genomas de *L. biflexa* y *L. interrogans* de los clones nH1 (a) y H4 (b). En el gráfico (a), que contiene la sonda del clon nH1, se observa claramente como el material genético del clon hibridó únicamente con el genoma de la cepa saprofítica *L. biflexa* (punto obscuro al lado izquierdo de la membrana) y no con el genoma de la espiroqueta patógena *L. interrogans* (lado derecho de la membrana). En la figura (b), está el material genético del clón H4, y se observa que hibrida con ambas genomas del género *Leptospira*.

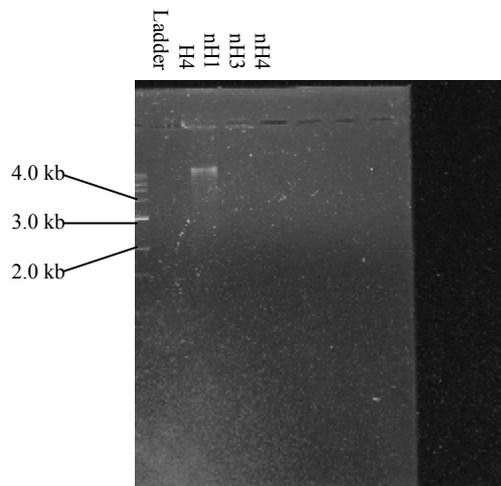


Figura 9. Gel de electroforesis de ADN de clones, H4, nH1, nH3 y nH4 extraídos con ayuda de QIAGEN kit. El resultado de la electroforesis es muy tenue ya que existía poco material genético. Sin embargo en vista directa se pudo observar bandas en todos los clones, de un tamaño superior al ladder, representado el genoma completo de cada clon.

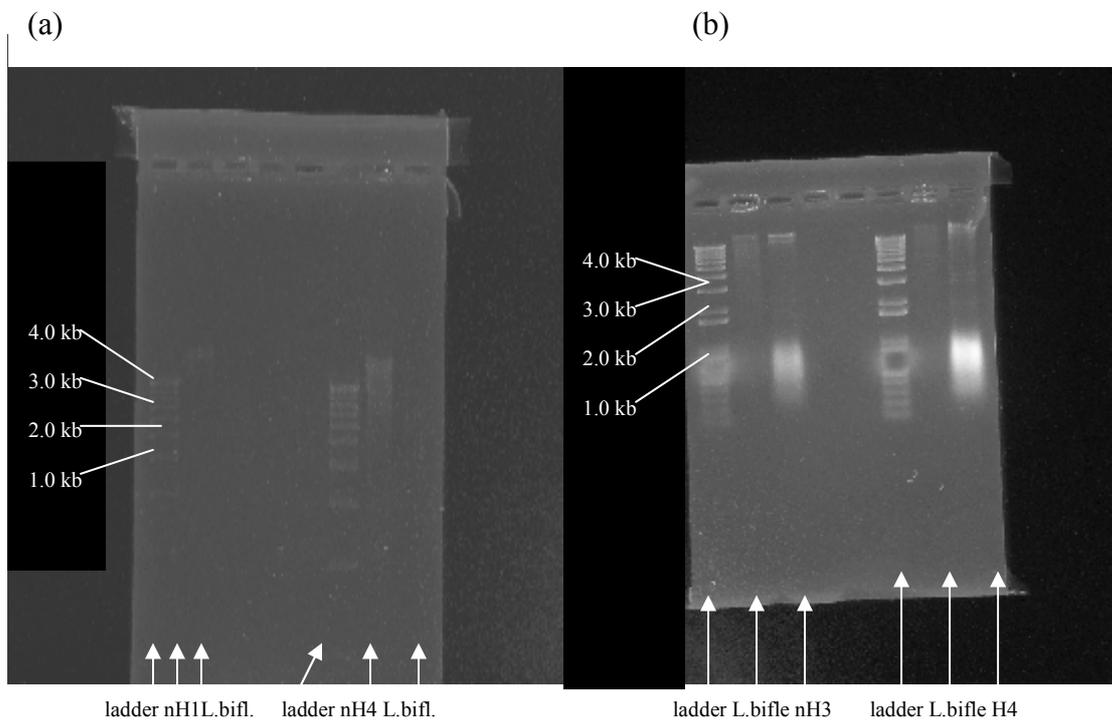
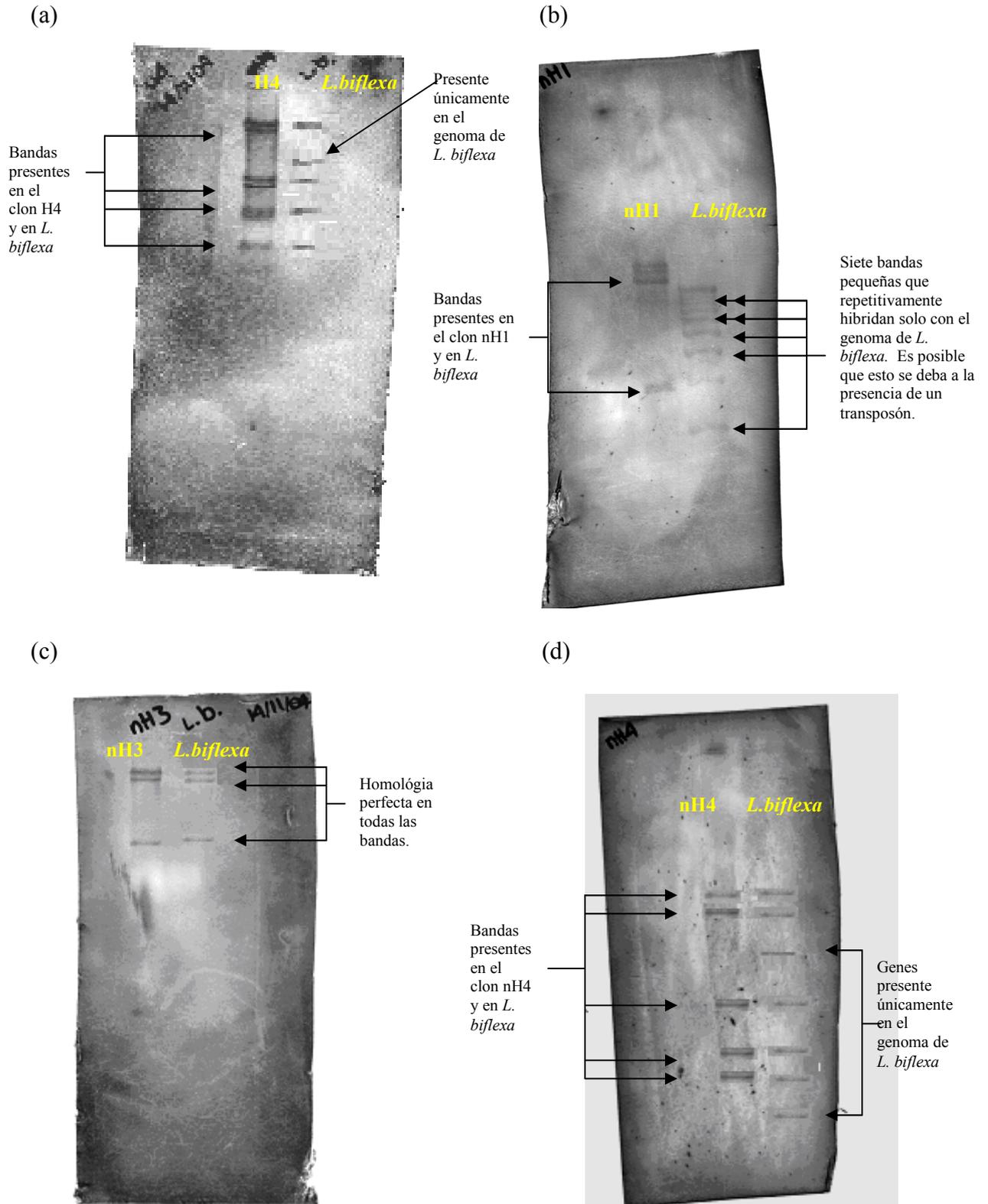


Figura 10. Gel de electroforesis de ADN extraído por PEG de los clones nH1, nH4, nH3 y H4 y genoma de *L. biflexa* cortados con enzima de restricción BamH1. La figura 10 a y b revelan como se cortó adecuadamente con la enzima BamH1, el material genético de los cuatro clones y el genoma de la bacteria en todos los casos. Debido a fallas en la operación de equipos, no se observa claramente la fotografía 10 a.



(*Debido a que algunas de las bandas presentes en las figuras 11c y 11d no fueron captados con claridad el momento de fotografiarlas, estas han sido resaltadas digitalmente)

Figura 11. Membranas de hibridación de los clones nH1, nH3, nH4 y H4 con el genoma de *L. biflexa* respectivamente, mediante Southern blot para el mapeo de secuencias presentes en cada clon. Como se observa, en todos los casos existen bandas bien definidas las cuales serán analizadas una por una. En la figura (a), que revela los genes presentes en el clon H4, éste presentó un patrón muy similar el momento de compararlo con el genoma de *L. biflexa*, después de la hibridación de la membrana. La diferencia se encontró una banda que estaba presente en el genoma de la bacteria y no existía en el clon. En la figura (b), que indica la hibridación de membranas del clon nH1 junto a *L. biflexa*, tiene dos bandas similares en los carriles donde se encuentra el genoma del clon y donde está el genoma de la bacteria. Lo que llama la atención en ésta membrana son siete bandas pequeñas presentes repetitivamente solo en el carril de *L. biflexa*, indicando la posibilidad de encontrar un transposón. En el inferior izquierdo de la página está la figura (c), donde está el revelado del Southern blot de clon nH3 y *L. biflexa*. Ambos carriles presentan una homología perfecta las bandas reveladas después de la hibridación son iguales entre el material genético de la bacteria y el clon nH3. Finalmente el fago Lambda nH4 (d), mostró después de la hibridación y revelado, 5 bandas iguales con el material genético de *L. biflexa* y 2 bandas desiguales ya que están presentes únicamente en el genoma de la bacteria.

11. Tablas

Concentración de placas	Numero de fagos	Total concentración de fagos por ml.
0.1	Incontable	Incontable
0.01	Incontable	Incontable
0.001	155	115 000
0.0001	23	230 000
0.00001	6	600 000

Tabla 1. Conteo inicial de bacteriofagos que contienen la biblioteca genómica de *L. biflexa*. Después de contar el número de placas presentes en cada muestra a diferentes concentraciones, se obtuvieron tres concentraciones que dieron una media de 315 000 fagos por ml de la concentración inicial de la biblioteca genómica de *L. biflexa*

FAGOS	Titulación Fagos/ml
nH1	30 000
nH3	145 000
nH4	100 000
H4	64 000

Tabla 2. Titulación de clones nH1, nH3, nH4 y H4 que serán aislados y conservados para futura extracción de ADN y mapeo de sus genes. Se tituló los clones nH1, nH3, nH4 y H4 y se calculó las concentraciones de fagos por ml de cada muestra trabajada.

Longitud de onda	DNA nH1
280 nm	0.02
260 nm	0.05
Calidad:260/280	2.55

Tabla 3. Medición de calidad de ADN del clon nH1 extraído por columnas de QIAGEN kit (Qiagen, 1999) Se calculó la cantidad total de ADN extraído del clon nH1, sabiendo que la medición 1 a 280 nm equivale a 50 ug de ADN. Se obtuvo aproximadamente 5 ug de ADN puro de cada clon. Se midió la calidad del mismo midiendo 260nm de una muestra dividiendo para la medición de 280 nm, se logró una calidad de 2.55 260nm/280nm, siendo a partir de 2.00 una óptima calidad para poder secuenciar.