



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA
REGIÓN GÉNICA QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA
ENLAZANTE DE SULFATO DE HEPARINA (HSBP)
DE 71.5 kDa DE *Helicobacter pylori***

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

present a

Claudia Celina López Bolaños

La Paz, B.C.S., Julio de 2003.

RESUMEN

Helicobacter pylori es un importante patógeno gástrico del humano, que posee una variedad de factores de adhesión con afinidad por receptores glicosídicos de la mucosa gástrica, uniéndose a ellos como mecanismo inicial de la colonización, por lo que a éstas moléculas se les ha considerado como excelentes candidatas para la construcción de vacunas genéticas. En trabajos previos, realizados en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, se han identificado adhesinas de *H. pylori* asociadas a membrana celular, entre las que se encuentra la proteína de 71.5 kDa. La clonación de la secuencia parcial que codifica la proteína de 71.5 kDa que reconoce sulfato de heparina (HSBP71.5), se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando como templado ADN genómico y oligos diseñados a partir de la secuencia de aminoácidos de péptidos internos generados mediante digestión parcial con tripsina, a partir de la proteína pura. Los productos de PCR fueron ligados al vector de clonación pGemT-easy, con el que se transformó *Escherichia coli* DH5 α mediante shock térmico. El ADN plasmídico se obtuvo por el método de lisis alcalina. La titulación y el tamizado de la librería genómica se llevó a cabo utilizando como sonda la secuencia clonada. De la secuenciación de clonas positivas se obtuvieron dos secuencias parciales de 741 y 774 pb respectivamente. La primera secuencia mostró similitud parcial del 37% con proteínas que reconocen a penicilina (PBPs), mientras que la segunda presentó una homología del 36% con proteínas que corresponden a una subunidad de proteasa *clp* dependiente de ATP. El análisis de proteínas realizado sobre el genoma de *H. pylori* en las cepas 26695 y J99 del Gen Bank, reveló que el gen *hsbp71.5* puede situarse alrededor de los genes que codifican la PBPs y *clp*-proteasa, por lo que en estudios futuros se diseñarán primers para amplificar la secuencia completa del gen.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, adhesión, proteína, secuencias.

Dr. Felipe Ascencio Valle

ABSTRACT

Helicobacter pylori is an important gastric pathogen of humans. It possesses a variety of adhesion factors that recognizes a number of glycosidic receptors on the gastric mucosa, using them to start the colonization process, becoming an excellent candidate for the construction of genetic vaccines. Previous works at the Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste identified a number of cells associated and extracellular proteins among *H. pylori* strains with affinity for heparan sulfate-proteoglycan (HSBP). One of these heparan sulfate binding protein (HSBP) is a 71.5 kDa adhesin, which is the subject of the present study. Cloning of the gene coding the 71.5 kDa HSBP was performed by polymerase chain reaction (PCR), using genomic DNA as a template and degenerate primers. Primers were designed from the internal peptides generated by partial digestion of the 71.5 HSBP with trypsin. The PCR products were ligated into pGEMT-easy and used to transform *Escherichia coli* DH5 α by thermic shock. Plasmid DNA was obtained by alkali lysis. Screening of the genomic library was performed with the cloned sequence as a probe. Plasmids, with confirmed inserts, were used for sequencing. Two partial sequences of 741 and 774 bp were obtained, the first showed a 37% similarity with a penicillin-binding protein (PBPs) and the second had a 36% homology with a protein that corresponds to an ATP-dependent *clp* proteolytic subunit. According to sequence analysis of the *H. pylori* genome from strains 26695 and J99 reported in the Gen Bank, these two genes are flanking the *hsbp71.5* gene. Future work will be done to amplify and sequence the complete gene.

Key words: *Helicobacter pylori*, adhesion, protein, sequences

DEDICATORIA

A Dios:

Por haberme dado la vida y la fuerza necesaria para seguir siempre adelante.

A mis padres:

Por ser mi razón de vida y de lucha en todas mis metas.

A mis hermanos:

(Daniel, Arturo, Eduardo[†], Lorenia, Manuel, Rene[†], y Alma)

Que aún en la distancia y ausencia física siempre cuento con su apoyo y cariño.

A mis sobrinos:

(Arturo, Gerardo, Daniel, Erick, Cristian, Alí, Kitsia, Vianey, Sonia, Dassia, Dessire y Sughey).

Por ser mis grandes tesoros y al mismo tiempo dejarme vivir de nuevo la infancia y su etapa de adolescentes.

A mi cuñada: Profra. Juanita Fuerte.

Por ser mi ejemplo de lucha y superación.

A mis amigos en general:

Por apoyarme en todo y compartir grandes momentos juntos.

A mis papis postizos:

Dr. Felipe Ascencio, Dra. Norma Hernández, Dr. Eduardo y la Dra. Toni.

Porque no hay palabras para agradecer todo su apoyo y confianza para la realización del presente trabajo, pero sobre todo el haber ganado su amistad.

A mi niño:

Por ser mi fuente de inspiración y superación.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR) por la realización de éste trabajo en sus instalaciones.

Al CONACyT por el apoyo económico otorgado mediante la beca No. 158432.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Norma Hernández Saavedra, Dr. Felipe Ascencio y Dr. Eduardo Ruiz Bustos. Por todo su apoyo, consejos y asesorías para la realización del presente trabajo.

A Posgrado en especial a la Dra. Thelma Castellanos y a todo su equipo de trabajo (Lety, Osvelia, Bety, Horacio y Manuel) por todo el apoyo otorgado durante mi estancia.

Al Dr. Cadena. Por el apoyo en mi última etapa de estudiante.

A mis hermanitos del laboratorio de Patogénesis Microbiana: (Chula, Angel, Gabriel, Toño, Roberto, Lili Gama, Hector, Angy y los veraniegos: Armando, Yeni y Viry) por hacer el laboratorio todo una familia lleno de momentos inolvidables.

A mis amigos y compañeros de Patología Marina en especial a Arturo Sierra por su apoyo y asesoría. A Delia, Nacho, Meliza, Roger, Barbara, Alicia, Hever, Pedro, Adrián, etc...por compartir grandes momentos en el edificio

A mis amigos y compañeros de Maestría y Doctorado en especial a mis amigos de generación.

A todos mis amigos externos del CIBNOR (Ma. Esther, Celia, Rosa Ma., Margarita, Ada, Rosy, Eduardo, Enrique, Yhassir, Carlos, etc...) por todo su apoyo, "paciencia", y cariño.

A mis grandes cuates a quienes admiro y quiero mucho y de ellos he aprendido a saber quien soy (Eduardo Ruiz, Toni y Felipe).

INDICE GENERAL

CONTENIDO	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE GENERAL	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS	ix
GLOSARIO	x
1. INTRODUCCION	1
1.1 Introducción general	1
1.2 Enfoque actual en el diseño de vacunas	2
1.3 Generalidades de <i>Helicobacter pylori</i> .	5
1.4 Epidemiología	7
1.5 Factores de patogenicidad	7
1.5.1 Flagelinas	7
1.5.2 Ureasa	8
1.5.3 Adhesión	8
1.5.4 Citotoxicidad	9
1.6 Tratamientos	10
1.6.1 Antibióticos	10
1.6.2 Vacunas	12
2. ANTECEDENTES	15
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVOS	19

4.1	General	19
4.2	Específicos	19
5.	DISEÑO EXPERIMENTAL	20
5.1	Parte I. Purificación de la HSBP71.5.	20
5.2	Parte II. Librería genómica.	22
5.3	Parte III. Caracterización de secuencias parciales del gen hsbp71.5	23
6.	RESULTADOS	26
6.1	Identificación, aislamiento y purificación de la proteína de 71.5 kDa	26
6.2	Construcción de la librería genómica de <i>H. pylori</i> 25.	30
6.3	Caracterización de la secuencia nucleotídica del gen hsbp- 71.5 kDa.	33
6.3.1	Southern Blot	35
6.3.2	Tamizaje de la librería	36
6.4	Análisis de secuencias.	37
6.4.1	Análisis de la secuencias (CCHP1-T3 y CCHP2-T3) en el genoma de <i>H. pylori</i>	43
7.	DISCUSION	45
8.	CONCLUSIONES	51
9.	PERSPECTIVAS	52
10.	BIBLIOGRAFIA	53
11.	APÉNDICE	59
11.1	Apéndice I. Metodología	59
11.2	Apéndice II. Secuencias	70
11.3	Apéndice III. Alineaciones	72
11.4	Apéndice IV. Análisis de las secuencia sobre el genoma	77
11.5	Apéndice V. Soluciones	87

Lista de Figuras	Página
Figura 1. Microfotografía electrónica que muestra las características generales de <i>H. pylori</i> .	5
Figura 2. Perfil electroforético SDS-PAGE (12%) del sobrenadante de cultivos de <i>H. pylori</i> 25 cultivada en medio Brucella durante tres días. Técnica de tinción: CBB R-250.	26
Figura 3. Detección específica de proteínas enlazantes de heparina mediante el uso de sulfato de heparina marcado con peroxidasa (HS-POD).	27
Figura 4. ADN genómico de <i>H. pylori</i> cepa 25.	30
Figura 5. ADN genómico digerido con <i>Sau</i> 3AI.	30
Figura 6. Vector de clonación pBluescript -SK, (+/-)	31
Figura 7. PCR de ADNg de <i>H. pylori</i> cepa 25 utilizando diferentes juegos de oligos ($T_m = 45^\circ\text{C}$).	33
Figura 8. PCR de ADNg de <i>H. pylori</i> cepa 25 utilizando diferentes juegos de oligos ($T_m=50^\circ\text{C}$).	33
Figura 9. Secuencia de aminoácidos resultado de la traducción de la secuencia de nucleótidos del fragmento de 250 bp amplificado con los oligos CHPIF y HP2RR.	34
Figura 10. Validación sonda por Southern blot,	35
Figura 11. Identificación de colonias positivas obtenidas del tamizaje de la librería genómica de <i>H. pylori</i> .	36
Figura 12. Análisis del alineamiento de la secuencia CCHP1-T3 mediante BLASTX.	38
Figura 13. Dendograma de homología obtenido del análisis de alineamiento de la secuencia CCHP1-T3 (741 bp) con las 4 secuencias de mayor similitud encontradas en Blastx (tabla 5).	39

- Figura 14.** Dendograma de homología obtenido del análisis de la secuencia CCHP1-T3 (741bp) con las 4 secuencias de mayor similitud encontradas en Blastx para *H. pylori* (tabla 5). 39
- Figura 15.** Análisis del alineamiento de la secuencia CCHP2-T3 mediante BLASTX. 40
- Figura 16.** Dendograma de homología obtenido del análisis de alineamiento de la secuencia CCHP2 T3 (774 bp) con las 5 secuencias de mayor similitud encontradas en Blastx. 41
- Figura 17.** Dendograma de homología obtenido del análisis de alineamiento de la secuencia CCHP2 T3 (774 bp) con las 3 secuencias de mayor similitud encontradas en Blastx. 42
- Figura 18.** Mapa representativo del genoma de *H. pylori* cepa J99. Los círculos numerados representan las posiciones relativas de los genes con los que se encontró homología con las secuencias obtenidas en el presente estudio (denotados en el recuadro). 44
- Figura 19.** Electrotransferencia de gel de poliacrilamida a membrana PVDF 60

Lista de tablas	Página
Tabla I. Microorganismos con afinidad por receptores de tipo proteoglicano en células eucariotes	15
Tabla II. Programa utilizado para la amplificación de las secuencias.	22
Tabla III. Secuencia de aminoácidos de péptidos internos de la proteína HSBP71.5 de <i>H. pylori</i> 25	28
Tabla IV. Secuencia de nucleótidos de los oligos diseñados a partir de peptidos internos de la proteína HSBP71.5 de <i>H. pylori</i> 25	29
Tabla V. Resumen de análisis de alineamiento de la secuencia CCHP1-T3.	38
Tabla VI. Resumen de análisis de alineamiento de la secuencia CCHP2-T3.	41

GLOSARIO

Adhesina. Proteína presente en células eucariotes o procariotes que tiene afinidad por secuencias de aminoácidos o carbohidratos de otras macromoléculas.

ADN. Ácido desoxirribonucleico, molécula con una estructura en doble hélice y que representa el soporte químico de la herencia: Está presente en los cromosomas, así como en las mitocondrias y en los cloroplastos.

Clonación. Clonar consiste en producir un elevado número de copias de una misma cosa, en nuestro caso, genes, o sea, pedazos de ADN. Por lo tanto, cuando hablamos de clonación de genes estamos hablando de aislar genes y multiplicar el ADN que los codifica.

Gen. Los genes son las unidades estructurales y funcionales de la herencia, transmitidas de padres a hijos a través de los gametos. Constituyen la base física de la herencia. Molecularmente, un gen es un fragmento de ADN que contiene información para la síntesis de una cadena polipeptídica (proteína). Corresponde a lo que Mendel denominó factor hereditario.

Hibridación *in situ*. Localización de un gen mediante adición de sondas marcadas específicas y detección del marcado sobre el cromosoma tras la hibridación.

Ingeniería genética. Es una disciplina de la biología. Manipulación de la composición genética mediante la introducción o eliminación de genes específicos a través de técnicas modernas de biología molecular y ADN recombinante.

Librería genómica. Es una colección de clones de vectores que contienen fragmentos de DNA diseñada de tal manera que, mediante un determinado sistema de selección, se pueden llegar a separar los clones de interés.

Ortología. Divergencia de un gen ancestral en genes descendientes como resultado de la divergencia del taxón ancestral en taxones descendientes. Cuando la divergencia es ortóloga, el árbol de genes mostrará fidelidad al árbol de especies.

Plásmido. Molécula de ADN extracromosómico que se replica autónomamente.

Proteína. Sustancia química constituida por la unión de numerosos aminoácidos. Las proteínas son compuestos de elevado peso molecular y de estructura muy compleja. Son esenciales en la arquitectura y función de los seres vivos.

Sonda. Molécula utilizada para identificar a otra molécula. Su marcaje se basa en el uso de polimerasas que actúen con dNTPs modificados de alguna manera detectable. Se pueden usar dNTPs radiactivos, conjugados a moléculas detectables mediante anticuerpos o a moléculas fluorescentes, etc.

Sulfato de heparina. Proteoglicano sulfatado formado por una cadena polipeptídica y con ramificaciones de polisacáridos compuestas de unidades repetitivas de D-glucosamina y ácido D-glucurónico conteniendo sustituciones de radicales N-sulfato, O-sulfato en la G-glucosamina y en el ácido L-idurónico.

Tecnología de ADN recombinante. Es el proceso de cortar y recombinar fragmentos de ADN de diferentes fuentes como medio para el aislamiento de genes o para alterar su estructura o función.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción general.

En los últimos tiempos se ha incrementado la cantidad de investigaciones enfocadas a los estudios sobre proteomas, debido que se ha observado resistencia a antibióticos en un número de patógenos humanos. Estas investigaciones han facilitado el conocimiento de los cambios fisiológicos en un organismo que conducen a la patogenicidad, a la resistencia de antibióticos y/o a una inmuno-respuesta.

Helicobacter pylori es un importante patógeno gástrico del hombre ya que infecta a más de la mitad de la población a nivel mundial; éste patógeno es el responsable de algunos desórdenes gastrointestinales como gastritis crónica, úlcera péptica y cáncer gástrico (Queiroz *et al.*, 1995).

En investigaciones anteriores se ha concluido que *H. pylori* muestra un perfil de componentes moleculares que se unen al complejo de carbohidratos presentes en la mucosa del huésped y otros tejidos (Dwek, 1993; Wight *et al.*, 1992). Estas moléculas de adhesión son conocidas como adhesinas las cuales, junto con otras proteínas asociadas a membranas, son importantes blancos en el desarrollo de vacunas (Ljungh *et al.*, 1996). La identificación y caracterización de proteínas expresadas en la superficie celular de esta bacteria, es un pre-requisito para el desarrollo de futuras vacunas diseñadas para interferir en la colonización bacteriana de tejidos del huésped (Doig *et al.*, 1992).

En trabajos previos, realizados en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (Ruiz-Bustos *et al.*, 2001), se han identificado proteínas de *H. pylori* asociadas a membrana celular, entre las que se encuentra la proteína de 71.5 kDa (objeto del presente estudio) que reconoce sulfato de heparina (HSBP71.5) y ha sido identificada como una adhesina. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue clonar y caracterizar el gen que codifica la HSBP71.5 utilizando herramientas moleculares. Adicionalmente, en el Gen Bank están disponibles secuencias completas del genoma de dos cepas de *H. pylori* (26695 y J99 [NC_000915 y NC_000921]) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por lo que estos registros y los resultados de este estudio serán un instrumento efectivo para la identificación de factores patogénicos y antigénicos de potencial valor curativo como futuras vacunas genéticas.

1.2 Enfoque actual en el diseño de vacunas.

Durante más de dos siglos las vacunas tradicionales han consistido de microorganismos completos inactivados o atenuados; sin embargo, la biotecnología ha permitido proporcionar las herramientas necesarias para entender la virulencia y naturaleza de los inmunógenos microbianos, aportando de esta forma estrategias innovadoras para el desarrollo de nuevas vacunas y el mejoramiento de las ya existentes. Las vacunas pueden ser elaboradas a partir de los agentes mismos responsables de la enfermedad, de sus componentes o de

alguno de sus productos, siendo su finalidad la obtención de los inmunógenos deseados pero sin la virulencia natural (Plotkin y Orenstein, 1999).

Actualmente los nuevos enfoques para el diseño y producción de algunos tipos de vacunas son:

- a) Vacunas de microorganismos vivos: son preparaciones de bacterias o virus activos que han sido previamente atenuados y son capaces de multiplicarse. Los ejemplos más conocidos son las vacunas antipoliomielítica oral y antisarampión.
- b) Vacunas de microorganismos muertos o inactivados: Como su nombre lo indica, son preparaciones de microorganismos que han sido inactivados por medio de un procedimiento físico o químico, éstas no causan infección. El inconveniente que presenta este tipo de vacunas es que se requiere de una cantidad suficiente del agente para estimular al sistema inmune, por lo que se requiere la administración de varias dosis. Ejemplos de este tipo de vacunas son la antirrábica y la tifoídica.
- c) Toxoides: Son preparaciones derivadas de las toxinas secretadas por ciertas especies bacterianas, las cuales son tratadas con formalina para eliminar su toxicidad, sin afectar su acción inmunoestimulante específica. Ejemplos de ellas son las vacunas contra la difteria y el tétano.
- d) Vacunas de componentes celulares bacterianos: Son vacunas elaboradas con fracciones protéicas o polisacáridos bacterianos. Ejemplos de este tipo de vacunas son las preparaciones contra *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* tipo B.

- e) Vacunas de subunidades virales: Son vacunas cuyos componentes son antígenos importantes para la virulencia. Ejemplos de ellas son las vacunas contra la gripe (donde los antígenos importantes son la hemaglutinina y la neuraminidasa) y la vacuna contra la hepatitis B.
- f) Vacunas producidas por manipulación genética: Las técnicas de manipulación genética han sido aplicadas en la elaboración de vacunas, mediante el desarrollo de bacterias atenuadas por mutaciones en las que se modifica su metabolismo. Ejemplo de ello es: *Salmonella typhi* cepa Aro- que es incapaz de sintetizar aminoácidos aromáticos. En la vacuna de la hepatitis B recombinante, parte del gen que codifica para el antígeno de hepatitis B es insertado en un plásmido e introducido en una levadura.
- g) Vacunas en proceso de investigación: Actualmente las investigaciones se han enfocado al desarrollo de nuevas y mejores vacunas, algunas de cuyas estrategias son:
- 1) El desarrollo de vacunas con la introducción de material genético en diferentes células, como la expresión de proteínas en diferentes vectores.
 - 2) La mejora en el desarrollo de nuevos adyuvantes, como los derivados del muramil-dipéptido, liposomas o complejos inmunoestimulantes.
 - 3) Combinación de varios antígenos, como el DPT+Hbs Ag.
 - 4) Vacunas contra agentes específicos como el VIH, la hepatitis C, *H. pylori* y paludismo, entre otros.

1.3 Generalidades de *Helicobacter pylori*.

Durante la última década, *H. pylori* ha sido reconocido como uno de los patógenos más comunes en el humano, por lo que hoy en día es considerado como la principal causa de úlcera duodenal y gástrica, y como un factor de riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma y linfoma gástrico (Queiroz *et al.*, 1995).

H. pylori es una bacteria Gram negativa, microaerofílica, productora de ureasa y otras enzimas, de superficie lisa, curva o ligeramente espiral, con 4 a 6 flagelos unipolares (Figura 1). Se aisló por primera vez en 1982, de pacientes con gastritis y úlcera gástrica en Australia Occidental, por los médicos Barry Marshall y Robin Warren (Taylor y Blaser, 1991). Inicialmente recibió el nombre de *Campylobacter pylori*, sin embargo, los estudios genómicos modernos (especialmente el análisis de secuencias del gen 16S ribosomal –ARNr-), permitieron demostrar que *Campylobacter* y *Helicobacter* eran dos géneros diferentes (Moblely *et al.*, 2001; Ghiara *et al.*, 1995).

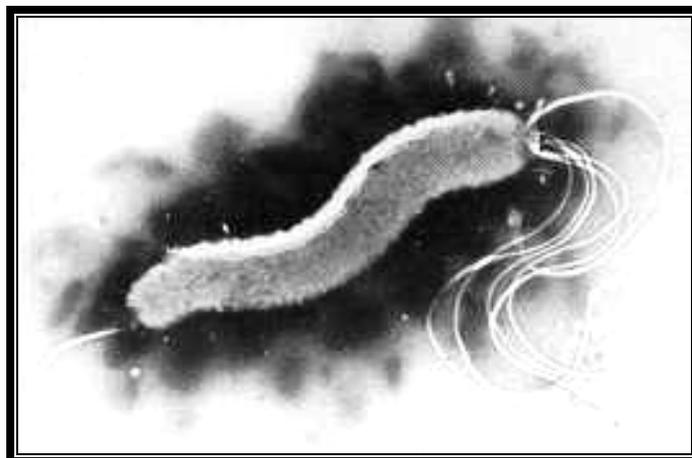


Figura 1. Microfotografía electrónica que muestra las características generales de *H. pylori* (www.google.com).

H. pylori puede ser cultivado tanto en medio sólido como líquido, siendo esenciales para su desarrollo condiciones microaerófilas (10% CO₂, 5% O₂ y 85% de N₂) y medios artificiales ricos en nutrientes como peptona, triptona, extracto de levadura, glucosa y sales como: cloruro de sodio y bisulfito de sodio, adicionados con sangre de caballo y suero fetal bovino (Moblely *et al.*, 2001). En cultivo *in vitro*, *H. pylori* es sensible a casi todos los antibióticos, con excepción de: ácido nalidíxico, trimetropin, sulfonamidas y vancomicina (Goodwin *et al.*, 1989; Goodwin y Worsley, 1993).

En la actualidad se han obtenido las secuencias completas del genoma de dos cepas de *H. pylori*: la cepa 26695 aislada en el Reino Unido en 1987 de un paciente con gastritis y la cepa J99 aislada en Estados Unidos en 1994 de un paciente con úlcera duodenal. El cromosoma circular de la cepa 26695 contiene 1,667.867 kb y el de la J99 1,643.831 kb, estos tamaños son similares al de *H. influenzae*. En ambos genomas el promedio del contenido de G+C es del 39%, sin embargo, 5 regiones en el genoma de la cepa 26695 y 9 en la J99 tienen diferente composición de G+C (Atherton^a, 1997). Ambos genomas contienen dos juegos de los genes 16S, 5S y 23S del ARN ribosomal, sin embargo, la cepa 26695 contiene un gen extra del 5S ARNr. La disposición de los genes ARNr de *H. pylori* no es continua en el cromosoma, sugiriendo que su regulación es más compleja que la observada en otros procariontes (Moblely *et al.*, 2001).

1.4 Epidemiología.

Los mecanismos específicos de transmisión de esta bacteria no han sido determinados. Debido a la frecuencia de la infección y a su amplia distribución, se postula que su transmisión ocurre de persona-persona, por las vías oral-oral y fecal-oral (Cave, 1997; Torres *et al.*, 1998). *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica permaneciendo por años, e incluso por décadas, sin mostrar sintomatología alguna. No obstante, en algunos casos se han mostrado cambios morfológicos importantes en la mucosa gástrica que van desde una inflamación leve hasta el desarrollo de gastritis que puede llegar a convertirse en úlcera, con lesiones atróficas que pueden terminar en metaplasia, displasia o hasta adenocarcinoma gástrico (Atherton^b *et al.*, 1997; Blaser *et al.*, 1995).

1.5 Factores de Patogenicidad.

1.5.1 Flagelinas

H. pylori posee forma espiral y se ha caracterizado por tener en uno de sus extremos de 4 a 6 flagelos que le ayudan a penetrar la capa mucoide que cubre el epitelio gástrico, debilitando el moco protector y haciendo a las células gástricas más susceptibles para su colonización (Moblely *et al.*, 2001). Estudios realizados con mutantes no-flagelados, han demostrado que la movilidad se correlaciona con virulencia y la capacidad de atravesar la capa de moco para llegar al epitelio gástrico. (Blaser, 1990; Taylor y Blaser, 1991).

1.5.2 Ureasa

Uno de los factores más importantes para la sobrevivencia de *H. pylori* en el estómago, es la producción en gran cantidad de ureasa (550 kDa). La enzima ureasa es un complejo de dos subunidades (UreA y UreB) asociadas en proporción 1:1, cuya función es hidrolizar la urea (produciendo amonio y bióxido de carbono) para lo cual requiere de dos iones de níquel (Ni^{2+}) que se fijan en su sitio activo. El amonio generado, funciona como agente neutralizante del ácido hidrociorhídrico del estómago, que ocasiona transitoriamente un pH gástrico neutro. Este proceso permite que *H. pylori* se mueva rápidamente y atraviese la capa de moco para llegar al epitelio gástrico (Marshall *et al.*, 1998). En modelos con cerdos gnotobióticos se demostró que cepas mutantes de *H. pylori*, incapaces de producir ureasa, pierden la habilidad de colonizar el estómago, lo que sugiere que la producción de ureasa participa en la colonización de la mucosa gástrica y en la sobrevivencia del microorganismo bajo las condiciones normales de pH ácido del estómago (Eaton *et al.*, 1992).

1.5.3 Adhesión

Los microorganismos reconocen receptores celulares que corresponden a diferentes familias de proteínas y compuestos, entre los cuales se encuentran los glicolípidos, las glicoproteínas y los proteoglicanos que facilitan la colonización y los procesos de invasión (Wizemann *et al.*, 1999). En algunos estudios se han tratado de identificar las adhesinas de *H. pylori*, como las proteínas enlazantes de

ácido siálico y N-acetil-neuraminil-lactosa ampliamente representadas entre las sialoproteínas, tanto de las células epiteliales, como sanguíneas (Borén *et al.*, 1993; Evans *et al.*, 1989).

También se ha observado que compuestos de ácido siálico pueden enmascarar los sitios de reconocimiento de las estructuras de carbohidratos subterminales o proteínas que pueden servir como determinantes antigénicos (Delgado *et al.*, 1992). Las selectinas intervienen en la adhesión de leucocitos a células por unión de sialoglicoproteínas, que corresponden a una familia de proteínas similares a las inmunoglobulinas, que se encuentran en tejidos del huésped y pueden estar presentes en algunos microorganismos, cuya función es mimetizar estructuras celulares para, de esa manera, eludir la respuesta inmune (Mukhopadhyay *et al.*, 1994).

1.5.4 Citotoxicidad

En filtrados de cultivos de *H. pylori*, se ha detectado un factor citotóxico capaz de producir efectos citopáticos no letales en líneas celulares de cultivo. Como respuesta a la acción de dicho factor, mediante estudios con microscopía electrónica, se ha revelado vacuolización intracelular y necrosis. La citotoxina vacuolizante corresponde a una fracción proteica de 87 kDa, cuyo genotipo ha sido clonado y denominado Vac A (Schmitt y Haas, 1993). Otra proteína, de 120 a 128 kDa, asociada a la expresión de la citotoxina, y codificada por el gen Cag A

(Citotoxin Associated Gene) no presenta toxicidad por si misma, aunque parece intervenir en la expresión de la toxina vacuolizante (Tummuru *et al.*, 1993).

1.6 Tratamientos.

1.6.1 Antibióticos

En todo tratamiento erradicador se deben observar normas tales como simplicidad, buena tolerancia, fácil cumplimiento y una eficacia de al menos un 80%. Con tratamientos de un sólo fármaco no se obtuvieron buenos resultados, por lo que fue necesaria la búsqueda de un régimen terapéutico con mayor porcentaje de erradicación. Hoy en día existe una variedad de agentes que han sido reportados como eficaces *in vitro* contra *H. pylori*, sin embargo, se ha observado que *in vivo* los resultados son deficientes (García *et al.*, 1998).

Debido a lo anterior, actualmente se están utilizando terapias combinadas que son una alternativa para aumentar los índices de erradicación de *H. pylori*. Por lo regular, estos tratamientos implican una combinación de antibióticos, supresores de producción de ácido y protectores del estomago. La terapia estándar es la triple, con subcitrato de bismuto, metronidazol, y tetraciclina o amoxicilina; este tratamiento suprime a *H. pylori* en un 80-95% de los casos, y previene la reaparición de la úlcera (Walsh y Peterson, 1995). En la búsqueda por mejorar las tasas de erradicación, se esta optando por cambiar las combinaciones de antibióticos como amoxicilina o metronidazol junto con claritromicina y

omeprazol (inhibidor de la bomba de protones), con las cuales se han obtenido tasas del 96 y 95% respectivamente (Moreno *et al.*, 1996).

Adicionalmente, se están considerando otras alternativas terapéuticas como la utilización de ebrotidina más dos antibióticos. La ebrotidina es un nuevo antisecretor tipo anti H2 (bloqueante de los receptores H2 de la histamina) que se caracteriza por tener propiedades citoprotectoras. Se ha demostrado una actividad directa de ésta sustancia frente a *H. pylori* mediante la inhibición de sus actividades proteolítica, mucolítica y ureasa. Así mismo, se ha demostrado que la ebrotidina disminuye la concentración mínima inhibitoria de los antibióticos frente a *H. pylori* (García *et al.*, 1998). Otro régimen erradicador en estudio es el uso de ranitidina (citrato de bismuto) más dos antibióticos. Con éste régimen se han obtenido tasas de efectividad del 90% (al igual que con la ebrotidina), sin embargo, aún se esperan nuevos estudios, más completos, pero no se descarta la posibilidad de tratarse de dos buenas alternativas (Piotrowski *et al.*, 1995).

Desafortunadamente, como cualquier otro tipo de tratamiento antimicrobiano, el uso de antibióticos, además de posibles alergias, presenta una serie de efectos secundarios adversos que pueden ser una causa importante de abandono del mismo y, por tanto, del fracaso de la erradicación (Mégraud y Lamouliatte, 1995). Los efectos adversos son frecuentes, especialmente en la terapia triple clásica, consistiendo de náuseas, vómito, diarrea, dolor de cabeza y, en algunos casos, la resistencia a algún antibiótico.

Actualmente, las úlceras pépticas son el único indicio para iniciar el tratamiento contra *H. pylori*, no obstante, existe la controversia de a qué pacientes tratar. Por lo tanto, a nivel mundial existe la necesidad de encontrar una terapia efectiva para reducir el impacto de la infección por *H. pylori*. Esto podría lograrse con el uso de antimicrobianos, sin embargo, hasta el momento el costo y el tiempo en los tratamiento lo han impedido. Una alternativa para el tratamiento efectivo sería la elaboración de una vacuna que resolviera o, incluso, previniera la infección con *H. pylori*, por lo que su uso podría ser la medida profiláctica más efectiva y prometedora en los últimos tiempos.

1.6.2 Vacunas.

Las vacunas dirigidas contra *H. pylori* aún se encuentran en fase experimental, por lo que es probable que transcurran todavía algunos años para disponer de alguna. La mayoría de los estudios están enfocados al aprovechamiento de los mecanismos inmunológicos naturales de la mucosa gástrica, buscando la técnica apropiada para la inmunización. Algunos estudios se han enfocado al uso de antígenos protectores como la ureasa de la bacteria en sus dos subunidades (A y B), la HspA (heat shock protein A) y el Vac (citotoxina) (Gómez-Duarte *et al.*, 1997; Mobley *et al.*, 2001). Los resultados han confirmado que la inmunización con vacunas puede ser profiláctica o terapéutica. Si se administran por vía oral en animales no infectados se obtiene un efecto profiláctico, mientras que si el estómago está previamente infectado, la vacuna puede tener un efecto curativo al ayudar a la eliminación de la bacteria mediante la

estimulación de la respuesta inmune del huésped (Marcheti *et al.*, 1995; Cuenca *et al.*, 1996).

En la búsqueda por encontrar un adyuvante idóneo que mejore la respuesta inmune en las mucosas, y al mismo tiempo sean clínicamente aceptables, han surgido diversos estudios, de los que los más prometedores (por su eficacia en los sistemas experimentales) han sido los que consideran a la toxina del cólera (CT) y la enterotoxina termolábil de *E. coli* (LT) previamente detoxificadas genéticamente. Así mismo, se ha observado eficiencia en la utilización de las subunidades β de cada toxina (Vyas y Sihorkar, 1999).

Estudios recientes se han enfocado al desarrollo y evaluación de la eficacia de vacunas orales *vivas* con cepas atenuadas de *Salmonella typhimurium*, que expresan antígenos externos, usando ratones como modelo experimental. Este enfoque implica la búsqueda de genes apropiados para la atenuación de *Salmonella*, así como la optimización de los antígenos con capacidad bactericida o protectora frente a *H. pylori* y *Neisseria meningitidis*. Resultados preliminares han demostrado la presencia de anticuerpos séricos en los ratones vacunados cuando se utiliza un antígeno del fragmento CagA (Opazo, *et al.*, 1999; Gómez-Duarte *et al.*, 1997).

Por otra parte, también existen estudios enfocados al uso de adhesinas o proteínas similares que pueden considerarse como excelentes candidatos a vacunas dada su mínima variación, lo que permitiría la estimulación del sistema

inmune contra varios microorganismos. Teóricamente, estas vacunas son las ideales ya que actuarían contra los microorganismos estimulando inmunidad a varios niveles, dentro de los que se incluye la colonización, bloqueando la infección y, por tanto, previniendo la enfermedad (Wizemann *et al.*, 1999).

Otros estudios se han enfocado a la clonación y caracterización de genes de *H. pylori*, utilizándolos para la obtención de proteínas recombinantes antigénicas, que se presentan como futuras vacunas genéticas contra infecciones causadas por esta bacteria (Yoshida *et al.*, 1999; Hocking *et al.*, 1999).

2. ANTECEDENTES

Diversos estudios han llegado a la conclusión de que los componentes de la matriz extracelular del hospedero son posibles sitios de unión de la bacteria (Höök *et al.*, 1988; Korhonen *et al.*, 1992), que se presenta como un complejo formado por una variedad de carbohidratos, glicoproteínas, proteínas y proteoglicanos, tales como laminina, fibronectina, colágena, vitronectina y sulfato de heparina, entre otros (Kleinman *et al.*, 1982; Paulsson, 1987; Ruoslahti, 1988; Beck *et al.*, 1990). Estos compuestos poseen estructuras complejas con cadenas múltiples, que intervienen en muchos de los procesos fundamentales de reconocimiento celular, que incluyen la adhesión célula-célula, célula-ECM, movilidad, crecimiento y señales de reconocimiento celular (Varki, 1993). Dada su amplia distribución en el cuerpo del hospedero, estos compuestos son los receptores ideales para que los microorganismos logren la colonización del huésped, observándose que muchos microorganismos patógenos han aprendido a usar glicoconjugados de la superficie celular como receptores para la adhesión (Tabla I), lo que facilita la colonización e invasión del tejido del huésped (Rostand y Esko, 1997).

Estudios realizados en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., han demostrado que *H. pylori* expresa adhesinas en su superficie celular, que tienen afinidad por sulfato de heparina (proteoglicano que se encuentra expuesto en las células epiteliales de la mucosa gástrica) (Ascencio *et al.*, 1993) y

por el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) dependiente de heparina (Ascencio *et al.*, 1995).

Tabla I. Microorganismos con afinidad por receptores de tipo proteoglicano en células eucariotes.

Bacterias Gram Negativas		
Microorganismo	Tejido afectado	Tipo de ensayo <i>in vitro</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	Epitelio ciliado en tracto respiratorio	• Adhesión de HS expuesto en células HeLa, células CHO.
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Tejido linfoide, ojos y tracto genital	• Adhesión de HS expuesto en células HeLa, células CHO, fibroblastos de ratón L929. • Adhesión a HS marcado con I ¹²⁵ .
<i>Helicobacter pylori</i>	Mucosa gástrica	• Adhesión a HS marcado con I ¹²⁵ .
<i>Haemophilus influenzae</i>	Epitelio respiratorio	• Adhesión de HS expuesto en células Hep-2, fibroblastos de ratón, fibroblastos humanos y células CHO.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Tracto genital	• Adhesión de HS expuesto en células Chang, células CHO.

Tomado de Rostand y Esko, 1997.

Así mismo, se ha observado que las uniones de *H. pylori* a sulfato de heparina de la mucosa gástrica son bloqueadas eficientemente por sulfato de heparina, oligosacáridos sintéticos de heparina (Ascencio *et al.*, 1993) y por carbohidratos sulfatados (Hirno *et al.*, 1995). En estudios recientes, se han aislado y caracterizado parcialmente proteínas extracelulares enlazantes de sulfato de heparina (HSBPs) de 71.5 y 66.2 kDa, y una proteína de la membrana externa de 47.2 kDa (HSBP-OMP) (Ruiz-Bustos *et al.*, 2001). La administración oral de estas tres proteínas, covalentemente conjugadas a la subunidad β de la toxina del cólera (CTB), incrementó significativamente la respuesta inmune, tanto local como sistémica, en ratones BALB/c. Además, dicha respuesta demostró ser

efectiva en la prevención de la colonización de *H. pylori* a ratones BALB/c, con una reducción significativa de la presencia de la bacteria, comparado con animales no vacunados (Ruiz-Bustos *et al.*, 2000).

Por otra parte, se han realizado ensayos donde se demuestra que las HSBPs juegan un papel importante en la promoción de la adhesión de *H. pylori* a líneas celulares de humanos HeLa S3 y Kato III. Se ha observado que la adhesión es promovida por la presencia de la proteína HSBP71.5, y que anticuerpos policlonales contra ésta pueden inhibir el proceso de adhesión de *H. pylori* (Guzmán-Murillo *et al.*, 2001).

Debido a que las HSBPs reconocen específicamente sulfato de heparina, se les ha considerado como excelentes candidatos para el desarrollo de vacunas contra enfermedades gastrointestinales asociadas a *H. pylori*. (Ruiz-Bustos *et al.*, 2000).

3. JUSTIFICACION

En el caso específico de *H. pylori*, se sabe que posee proteínas asociadas a su superficie que le confieren afinidad y adherencia por componentes de la mucosa intestinal del hospedero. Así mismo, se ha encontrado que éstas adhesinas son capaces de despertar respuesta y proporcionar protección inmunológica, por lo que la disponibilidad de herramientas moleculares nos permitirá explorar la posibilidad de desarrollar una vacuna genética, y evaluar a futuro su capacidad inmunoprotectora. Por lo pronto, la clonación del gen que codifica la proteína HSBP71.5 es el primer reto a vencer y el objeto del presente estudio. Además, el conocimiento del genoma completo de *H. pylori*, a través de los bancos de datos disponibles, nos permitirá estudiar los genes específicos que son esenciales para la colonización, patogenicidad y/o la supervivencia de la bacteria en el huésped.

4. OBJETIVOS

4.1 General:

Clonar y caracterizar la región génica que codifica para la HSBP71.5 de *H. pylori*.

4.2 Específicos:

- 4.2.1 Extracción, identificación y purificación parcial de la proteína HSBP71.5 de cultivos de *H. pylori*.
- 4.2.2 Construcción de una librería genómica de *H. pylori* cepa 25.
- 4.2.3 Caracterización de la secuencia nucleotídica del gen *hsbp71.5*

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Parte I. Purificación de la HSBP71.5.

La etapa inicial de esta investigación (objetivo 4.2.1) consistió en la identificación, aislamiento y purificación de la proteína HSBP71.5 de *H. pylori* cepa 25 (aislada de adenocarcinoma gástrico), donada por el profesor T. Wadström de la Universidad de Lund, Suecia. El primer reto consistió en purificar las proteínas extracelulares del sobrenadante de cultivo, para lo cual la bacteria se cultivo en medio sólido GAB-CAMP (BBL, Becton Dickinson), suplementado con 8.5% de sangre humana lisada (80°C, 20 min.), 10% de suero fetal bovino (GIBCO BRL), 0.05% hidrocloreuro de cisteína, 0.35% IsoVitalex (BBL, Becton Dickinson) y antibióticos como: vancomicina (6 µg/ml), ácido nalidixico (20 µg/ml), y ketoconazol (3 µg/ml), bajo condiciones microaerofilicas (10% CO₂, 5% O₂ y 85% de N₂), a 37°C por tres días (Kehler *et al.*, 1994). Posteriormente, la bacteria se inoculó en medio Brucella (DIFCO LAB.) libre de suero fetal conteniendo únicamente ciclodextrinas y antibióticos, incubándose bajo las mismas condiciones durante 3 días. Las células cultivadas en medio Brucella fueron recuperadas mediante centrifugación a 4,600 g a 4°C por 5 minutos y almacenadas a -20°C para la extracción de ADN (Sambrook *et al.*, 1989). Las proteínas del sobrenadante de cultivo fueron precipitadas con sulfato de amonio 80% (w/v) recuperadas por centrifugación (18 000 g, 30 min., 5°C) y dializadas contra una solución de bicarbonato de amonio 0.01M. Las proteínas parcialmente purificadas

fueron cuantificadas con el reactivo de Bio-Rad Protein Dye (Bio Rad Lab.), usando como estándar albúmina sérica bovina (SIGMA). La densidad óptica se midió a 595 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU 640). El fraccionamiento proteico fue visualizado en geles de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) bajo condiciones desnaturalizantes con la finalidad de disociar todas las proteínas en sus subunidades polipépticas individuales por el método de Laemmli (1970) usando el sistema Bio-Rad Mini Protean II (Bio Rad Lab.). Posteriormente, las proteínas se electrotransfirieron a membranas de polivinil-difluoruro (PVDF) (Millipore, Bedford), para identificar aquellas que reconocen sulfato de heparina (HS) utilizando HS-POD (HS marcada con peroxidasa de rábano). La proteína de 71.5 kDa fue identificada mediante su movilidad relativa (Mr) al comparar con estándares de peso molecular (Bio-Rad low y high range) y mediante el reconocimiento con HS-POD (Apéndice I). El fragmento identificado fue cortado de nuevos geles SDS-PAGE y enviado para su análisis al Servicio de Secuenciación de Peptidos del Institut de Genetique et de Biologie Molecularie et Cellulaire (IGBMC) de Estrasburgo, Francia. Los resultados obtenidos fueron analizados en el Gen Bank (NBCI /<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), a partir de los cuales se diseñaron juegos de oligos degenerados utilizando la tabla de uso de codones de *H. pylori* ([http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Helicobacter+pylori+J99+\[gbtct\]](http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Helicobacter+pylori+J99+[gbtct])). Estos oligos (Sigma Aldrich, México) fueron utilizados para la amplificación parcial del gen que codifica la HSBP71.5.

Parte II. Librería genómica.

La segunda etapa de este estudio (objetivo 4.2.2) consistió en la elaboración y tamizado de una librería genómica de *H. pylori* en el vector pBluescript II SK+, para contar con un conjunto de recombinantes que simplificara la búsqueda del gen *hsbp71.5*.

Como primer paso, se extrajo ADN genómico de las células de *H. pylori* mediante el método estándar aplicado a bacterias (Sambrook *et al.*, 1989). El ADN_g fue digerido parcialmente con *Sau* 3AI, seleccionándose fragmentos 2 a 8 kb para la construcción de la librería (Apéndice I). Los fragmentos fueron purificados y ligados al vector pBS-SK+ (Stratagene®) previamente linearizado con *Bam* HI y desfosforilado (Sambrook *et al.*, 1989) en proporción de 2.5:1 μ l. Con los fragmentos de ADN ligado se transformaron células competentes (método de CaCl₂) de *E. coli* DH5 α por el método de choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989) en proporción 5:50 μ l. Las células transformadas (100 μ l/caja) se plaquearon en medio LB (DIFCO LAB.) adicionado con ampicilina (20 μ g/ml) y conteniendo los sustratos cromogénicos X-Gal (20 mg/ml) e IPTG (200 mg/ml) para la selección de clonas recombinantes mediante alfa-complementación (Sambrook *et al.*, 1989). Se realizó el cálculo para determinar el número de clonas recombinantes necesarias para tener representado el genoma completo de *H. pylori* 25 utilizando la ecuación estadística de Poisson.

Parte III. Caracterización de secuencias parciales del gen *hsbp71.5*

La tercera etapa de este trabajo (objetivo 4.2.3) consistió en la caracterización de la secuencia nucleotídica (parcial) del gen *hsbp71.5*. Para ello, se realizaron amplificaciones mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando 4 combinaciones posibles de oligos (1. HP1F-HP2R, 2. HP2F-HP1R, 3. CHPIF-HP2RR, 4. HP2F-CHPIR). Las reacciones contenían 50 pmol de los oligonucleótidos diseñados previamente (sección de resultados, Tabla IV), 200 μ M de la mezcla de deoxinucleótidos trifosfatos, 2.5 μ l de buffer para PCR 10X, 200 ng de ADN y 1.5 U de *Taq polimerasa*. Las mezclas de reacción fueron amplificadas en un termociclador Gene-Amp (PCR System 2700), siguiendo el programa citado en la Tabla II.

Tabla II. Programa utilizado para la amplificación de las secuencias.

No.Ciclos	Temp.	Tiempo
1	95 °C	10'
35	94 °C	45''
	45 °C	30''
	72 °C	90''
1	72 °C	10'

Las amplificaciones fueron realizadas a distintas temperaturas de alineación ($T_m = 45, 47$ y 50°C) siguiendo el mismo número de ciclos y tiempos, con el fin de asegurar bandas específicas de amplificación. Los productos de PCR fueron

cortados de geles de agarosa (agarosa 1%-TAE 1X) y purificados con el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN). Los amplicones purificados se ligaron al vector pGem T-easy (Promega), usando una proporción inserto:vector de 2:1. Los productos ligados se usaron para transformar células de *E. coli* de acuerdo a los métodos mencionados anteriormente (Sambrook *et al.*, 1989). Las clonas positivas fueron seleccionadas para la extracción de ADN plasmídico (ADNp) por el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). El ADNp fue analizado en geles de agarosa al 1% (TAE 1X), seleccionándose para secuenciación aquellos que contenían inserto. La secuenciación se llevo a cabo en un equipo de tipo capilar ABI 310 (Applied Biosystems) en el Servicio de Secuenciación del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste y en la Compañía MacroGen, de Seúl Corea mediante un equipo ABI PRISM 3700. Las secuencias fueron analizadas utilizando la base de datos del Gen Bank del NCBI, realizando análisis de comparación de secuencias homologas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), y para la traducción a proteína se utilizo la herramienta del software Expasy (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>). En base a éstos resultados se eligió el fragmento nucleotídico para utilizarse como sonda, la cual fue marcada no radiactivamente (BioLabs) y posteriormente utilizada para el tamizado de la librería genómica construida anteriormente (Apéndice I).

Para estimar la sensibilidad y el grado de reconocimiento de la sonda marcada se realizó un Southern Blot (Sambrook *et al.*, 1989), hibridandola con fragmentos de ADN genómico generados mediante digestión con varias enzimas

de restricción (*Bgl* II, *Bam* HI, *Kpn* I, *Pst* I, *Eco* RI, *Bgl* I, *Eco* RV y *Hind* III). Los productos de las digestiones se separaron electroforéticamente y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para su detección con la sonda marcada (Apéndice I).

Para el tamizaje de la librería genómica, las colonias se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, que fueron hibridadas con el kit (HS-114F) High Efficiency Hybridization System (Molecular Research Center Inc.) previa desnaturalización, usando la sonda marcada. La detección se realizó mediante el uso de un kit no radiactivo Phototope-star detection (BioLabs) siguiendo las recomendaciones del fabricante, en película Kodak XAR-2. Los recombinantes positivos fueron cultivados en medio LB (DIFCO LAB) adicionado con ampicilina (20 µg/ml) para llevar a cabo nuevamente la extracción de ADNp por la técnica de lisis alcalina. Las nuevas preparaciones de ADNp fueron purificadas y enviadas a secuenciar (MacroGen) utilizando los primers universales T7 y T3 contenidos en el vector. La caracterización de las secuencias obtenidas se realizó mediante el uso del software DNAMAN y se comparó mediante los análisis del Blastx de la base de datos del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi?).

6. RESULTADOS

6.1 Identificación, aislamiento y purificación de la proteína de 71.5 kDa.

El sobrenadante de cultivo del medio Brucella fue recolectado después de 3 días de incubación, obteniéndose una concentración de 1.2 mg/ml de proteínas extracelulares. El sobrenadante fue analizado por SDS-PAGE observándose varias bandas de proteínas con distintos pesos moleculares, entre ellas las de 71.5, 66, 45, y 34 kDa (Figura 2).

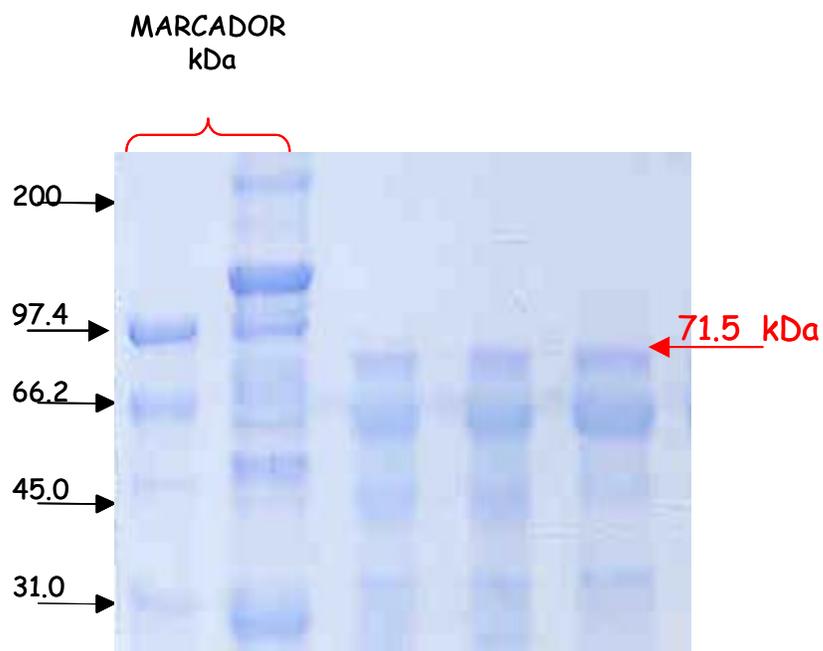


Figura 2. Perfil electroforético SDS-PAGE (12%) del sobrenadante de cultivos de *H. pylori* 25 cultivada en medio Brucella durante tres días. Técnica de tinción: CBB R-250.

Previamente a su aislamiento, se realizó un ensayo de electrotransferencia de proteínas a membranas de PVDF (Immobilon, Millipore), encontrándose el perfil mostrado en la Figura 3. Con el empleo de HS-POD como sonda, se demostró la presencia de tres proteínas con actividad enlazante a sulfato de heparina (HSBPs), con Mr de 71.5, 66 y 34 kDa. Comparando los perfiles de SDS-PAGE y del ensayo de reconocimiento específico de proteínas con HS-POD, se observa que efectivamente la proteína de interés (71.5 kDa) reconoce al sulfato de heparina.

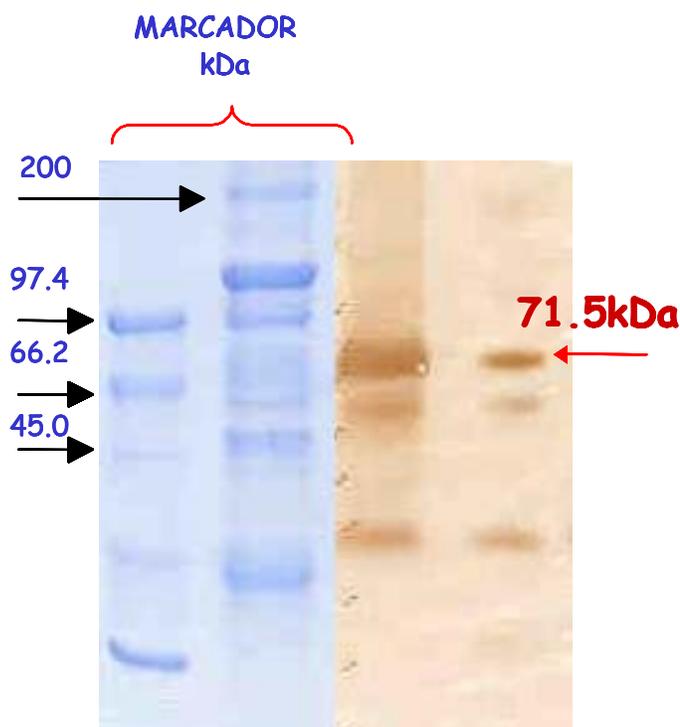


Figura 3. Detección específica de proteínas enlazantes de heparina mediante el uso de sulfato de heparina marcado con peroxidasa (HS-POD), a partir de proteínas inmovilizadas en membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore) mediante electrotransferencia.

La proteína de interés fue cortada de un gel preparativo SDS-PAGE al 12%, para su análisis en el Servicio de Secuenciación de Peptidos del Institut de Genetique et de Biologie Molecularie et Cellularie (IGBMC) de Estraburgo, Francia.

Los resultados obtenidos de la secuenciacion de aminoácidos de péptidos internos de la HSBP71.5 kDa, se muestran en la Tabla III.

Tabla III. Secuencia de aminoácidos de péptidos internos de la proteína HSBP71.5 de *H. pylori* 25.

Péptido	Sec. aminoácidos	No. residuos	Homología
1	- Y-Y-T-Y-T-G-A-F-R -	9	88% con Transferrina de Salmón (AAF03085) y 75% con Lactotransferrina de humano (AAA30610.1)
2	- E-L-G-Q-V-T-F-G-R -	9	60% con proteína de membrana (OMP21) <i>H. pylori</i> . (NP_207705.1)
3	-T-N-N- E-V-N-H-G-S-L-S-N-H -V-Q-	15	80% con Proteínas hipotéticas (NP_20686215) de <i>H. pylori</i> .

Nota: El sombreado y subrayado indica la homología localizada en las proteínas encontradas con los peptidos obtenidos de la proteína secuenciada.

El análisis de las tres secuencias obtenidas arrojó los siguientes resultados:

- El peptido de secuencia **YYTYTGAFR** mostró 88% de homología con transferrina de salmon (*Oncorhynchus tahawyscha*) (AAF03085.1), y un 75% con lactotransferrina de humano (AAA30610.1) por lo que se descartó este peptido, dado que pudo ser producto de contaminación del medio de cultivo.

- Con los otros dos peptidos (**ELGQVTFGR** y **TNNEVNHGSLSNHVQ**) no se encontró ninguna similitud con proteínas de este tipo, por lo que se realizaron búsquedas más selectivas en las bases de datos del NCBI (Blast), donde se encontró que ambas secuencias presentan entre 60 y 80% de similitud en algunas regiones de proteínas hipotéticas de membrana reportadas en *H. pylori* (NP_207705.1 y NP_206862).

Por lo tanto, estas secuencias de aminoácidos (Tabla III, péptidos 2 y 3) fueron tomadas como base para el diseño de oligos degenerados a utilizarse en las amplificaciones mediante PCR.

El diseño de oligos degenerados (Tabla IV) se realizó con base en las secuencias menos degeneradas (secuencias sombreadas), teniendo como base la tabla de uso de codones de *H. pylori*.

Tabla IV. Secuencia de nucleótidos de los oligos diseñados a partir de peptidos internos de la proteína HSBP71.5 de *H. pylori* 25.

Peptido	Oligo	Secuencia (5'→3')	Tm
ELGQVTFGR	HP1F	GGICARGTIACITTYGG	50.4
	HP1R	CCRAAIGTIACYTGICC	46.5
	<u>CHP1F</u>	GARYTNGGNCAAGTNCNTTYGG	60.3
TNNEVNHGSLSNHVQ	HP2F	ACIAAYAAYGARGTIAAYCAYGG	53.9
	HP2R	CCRTGRRTTIACYTCRTRTTIGT	57.2
	<u>HP2RR</u>	ACRTGRTRRSWYARRSWCCRTG	57.1

Nota: El sombreado en los peptidos denota las regiones menos degeneradas. El sombreado en verde indica el rango de aminoácidos tomados para el diseño de oligos HP1F y HP1R, mientras que el amarillo la región seleccionada para los oligos HP2F y HP2R. El subrayado denota la región utilizada para la construcción de los oligos CHP1F y HP2RR.

6.2 Construcción de una librería genómica de *H. pylori* 25.

Para la construcción de la librería de ADNg de *H. pylori* 25, se purificó el ADN mediante el kit QIAquick. El producto se analizó en un gel de agarosa-TAE al 1% preteñido con bromuro de etidio, cargando 75 ng/línea (Fig. 4). Posteriormente, el ADNg se digirió parcialmente con *Sau* 3AI, incubando las reacciones en tiempos alternados, para obtener fragmentos 2 a 8 kb. El tiempo óptimo de reacción para la obtención de ese intervalo de fragmentos fue de 10 minutos a una dilución 1:100 de la enzima (Fig. 5).



Figura 4. ADN genómico de *H. pylori* cepa 25. Electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1%, preteñido con EtBr, 75 ng/línea.

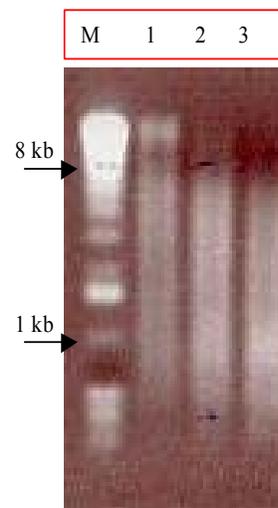


Figura 5. ADN genómico digerido con *Sau* 3AI. Gel agarosa-TAE al 1%, preteñido con EtBr. Los carriles 1, 2, 3 corresponden a 5, 10 y 15 minutos de incubación, respectivamente.

Los fragmentos esperados, fueron ligados en el vector pBluescript II-SK II (+); el vector se seleccionó debido a que contiene promotores para las ARN polimerasas T3 y T7, el promotor de lacZ, un sitio múltiple de clonación y como marcador de selección un gen que le confiere resistencia a la ampicilina (Fig. 6).

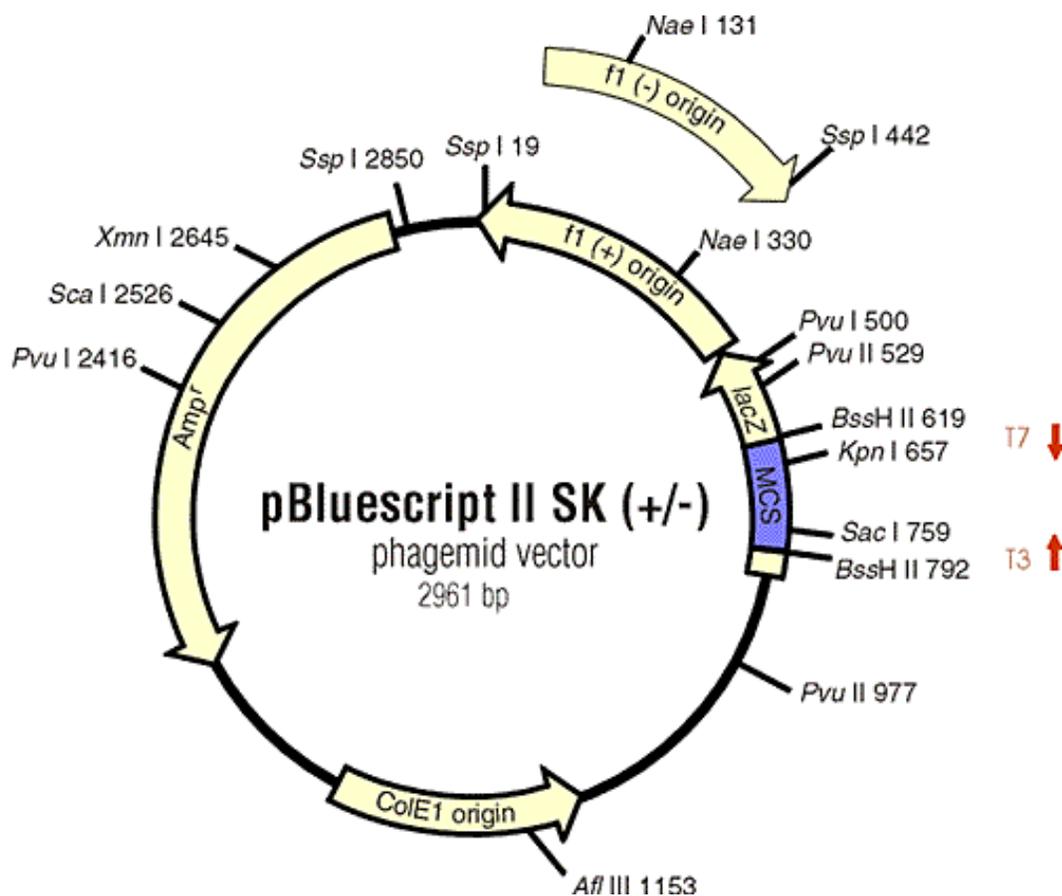


Figura 6. Vector de clonación pBluescript II-SK, (+/-).

La transformación en *E. coli* DH 5 α resultó en un 60-70% de colonias con inserto (por placa), de las que se seleccionaron 129 colonias, distribuyéndose en placas petri de medio LB-ampicilina.

Para tener representado el genoma completo de *H. pylori* cepa 25 en la librería, se consideró tener un número de clonas independientes (N), con una probabilidad (P) del 95% de encontrar alguna región particular en el genoma, mediante la siguiente fórmula:

$$N = \ln(1-P) / \ln[1 - (I/G)]$$

donde

I = Tamaño promedio del fragmento clonado = 4×10^3 pb

G = Tamaño del genoma = 1.6×10^6 pb

por lo que:

$$N = \ln(1-0.95) / \ln[1 - (4 \times 10^3 / 1.6 \times 10^6)] = \mathbf{1197 \text{ clonas}}$$

El número de recombinantes obtenido en esta librería fue de **1840**, las cuales se mantuvieron a 4°C hasta su utilización.

6.3 Caracterización de la secuencia nucleotídica del gen *hsbp71.5*.

Para la obtención y marcado de la sonda con la que se tamizó la librería, se realizaron una serie de amplificaciones mediante PCR usando como templado ADN_g, y la combinación de los oligos previamente diseñados (Tabla IV); solo dos combinaciones mostraron amplificaciones definidas: HP1F-HP2R y CHP1F-HP2RR (Fig. 7). El mismo análisis se realizó restringiendo la temperatura de alineamiento hasta 50°C (Fig. 8), no obstante, el resultado obtenido fue el mismo, dos bandas de peso molecular aproximado de 900 pb y 250 pb. Estas bandas se purificaron y se ligaron en el vector pGemT-easy, para posteriormente ser secuenciadas.

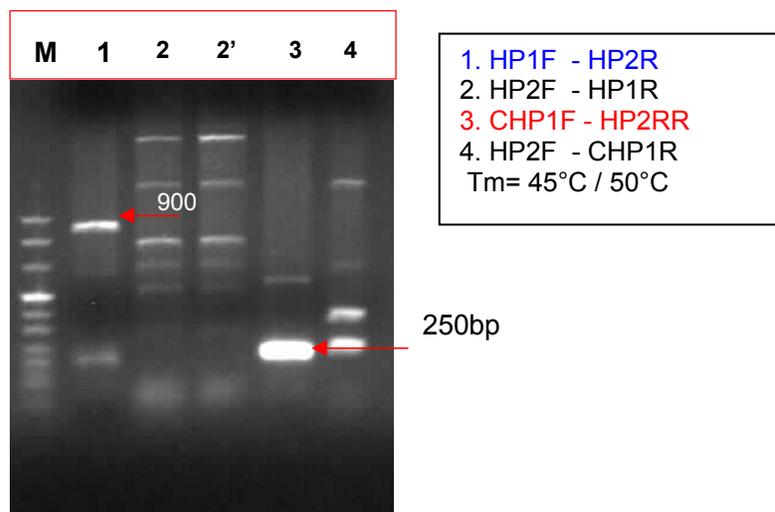


Figura 7. PCR de ADN_g de *H. pylori* cepa 25 utilizando diferentes juegos de oligos (T_m = 45°C).

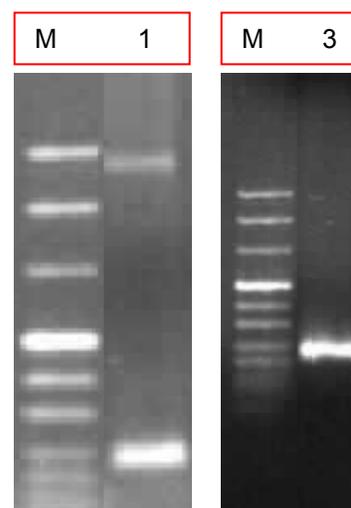


Figura 8. PCR de ADN_g de *H. pylori* cepa 25 utilizando diferentes juegos de oligos (T_m = 50°C).

Las secuencias obtenidas de 936 pb y 229 pb (Apéndice II), se confrontaron con la base de datos de NCBI (BLAST), y se analizaron con los programas Clustal, y Expasy. La secuencia de 229 pb mostro un 45% de homología con una proteína de membrana de *H. influenzae* (OMP P2, Q48221) y un 37% con una proteína putativa de membrana de *H. pylori* cepa J99 (OMP, NP_223299). El fragmento de 229 pb fue traducido a aminoácidos, cuya secuencia se muestra en la Figura 9, en donde se observa la amplificación de los peptidos correspondientes a la proteína de 71.5 kDa previamente secuenciada (región sombreada), a partir de los oligos diseñados CHP1F (flecha forward) y HP2RR (flecha reverse) ambos usados en la reacción de PCR. Por lo tanto, este producto fue usado como sonda en el tamizado de la librería genómica.

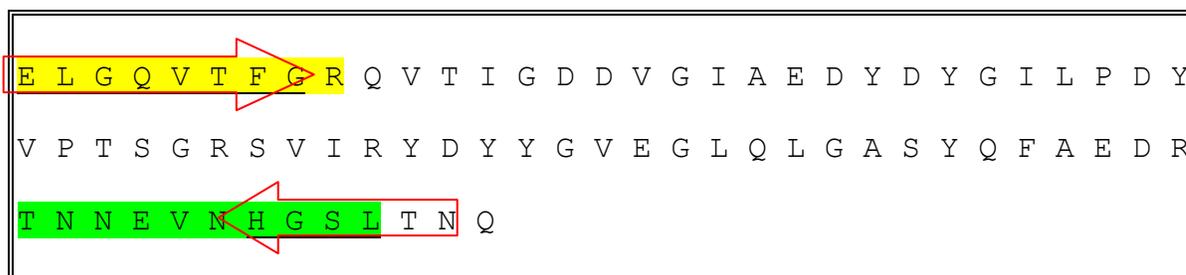


Figura 9. Secuencia de aminoácidos resultado de la traducción de la secuencia de nucleótidos del fragmento de 229 pb amplificado con los oligos CHP1F y HP2RR.

6.3.1 Southern Blot.

Para evaluar la sensibilidad y reconocimiento de la sonda se realizó un Southern Blot, hibridando ADN digerido con *Bgl* II, *Bam* HI, *Kpn* I, *Pst* I, *Eco* RI, *Bgl* I, *Eco* RV y *Hind* III. Se obtuvo una señal tenue en algunas de las digestiones con *Eco* RI, *Bgl* I, *Eco* RV y *Hind* III. Como control positivo se utilizó el mismo producto de 229 pb sin marcarse, con el que se obtuvo una señal fuerte con la sonda marcada (Fig.10).

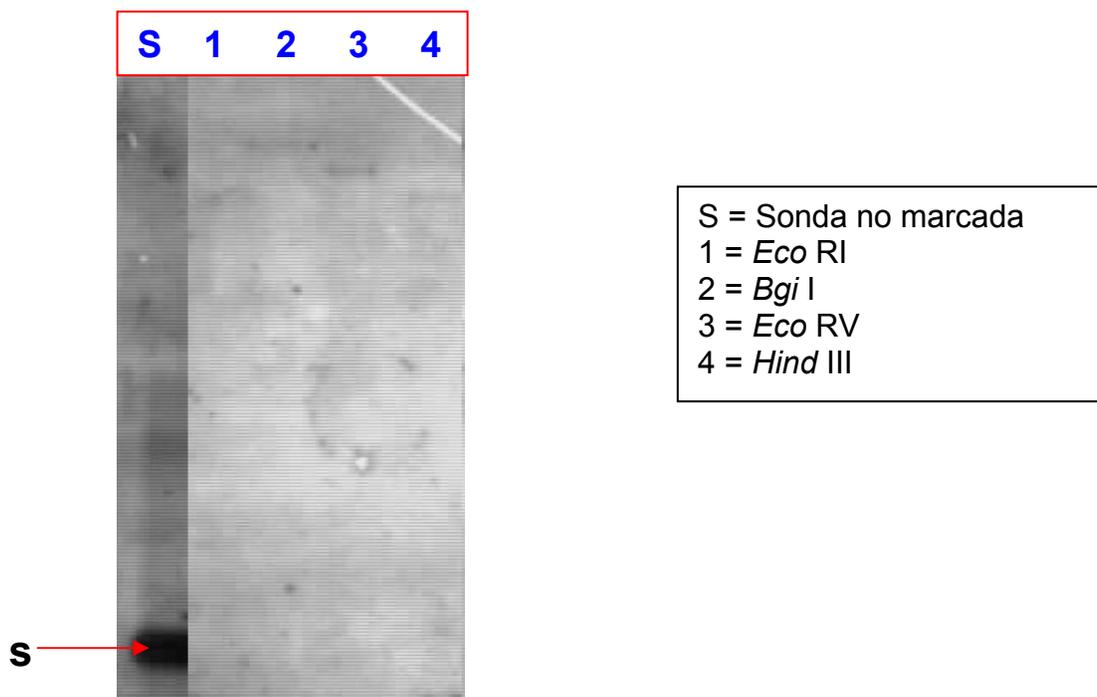


Figura 10. Sensibilidad y reconocimiento de la sonda por Southern blot,

6.3.2 Tamizaje de la librería.

Los resultados obtenidos del tamizaje de las tres primeras cajas mostraron un elevado reconocimiento de la sonda (Fig. 11). Para la validación de las recombinantes positivas se realizó un análisis, mediante PCR, para asegurar la presencia de la secuencia de 229 pb. Las clonas confirmadas fueron secuenciadas utilizando los primers universales T7 y T3 incluidos en el vector.

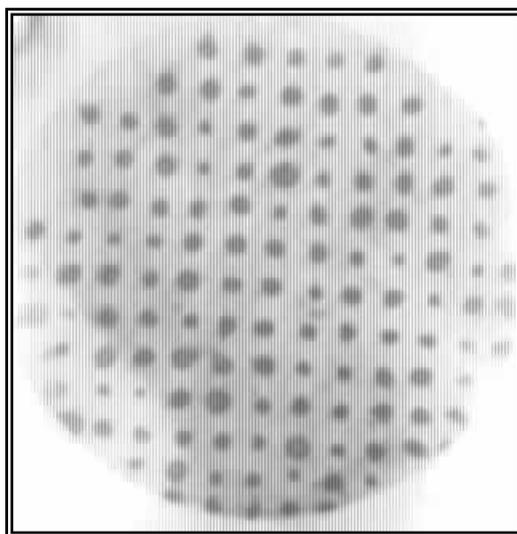


Figura 11. Identificación de colonias positivas obtenidas del tamizaje de la librería genómica de *H. pylori*.

6.4 Análisis de secuencias

De acuerdo al peso molecular calculado de la HSBP71.5 mediante SDS-PAGE (71.5 kDa) el tamaño hipotético de la secuencia codificante del gen *hsbp71.5* completo es de alrededor de 2.1 kb. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo fueron dos secuencias parciales con un marco abierto de lectura de 741 pb (CCHP1-T3) y 774 pb (CCHP2-T3).

El análisis realizado (BlastTX) a la primera secuencia CCHP1-T3 (741 pb) permitió identificar proteínas con regiones conservadas en los dominios MrcB (COG0744), MrcA (CO65009) y PbpC (CO64953), todas ellas correspondientes a carboxi-peptidasas de membrana (penicillin-binding protein). La Figura 12 muestra el resultado del análisis de alineamiento BlastTX. Las primeras cuatro franjas (rojas) corresponden a las 4 proteínas reportadas con las que se obtuvo mayor similitud (Tabla V). En éste mismo análisis se observa una menor similitud con proteínas reportadas de *H. pylori*, en la Figura 12 corresponden a las franjas de color verde y su mayor homología también pueden observarse en la Tabla V.

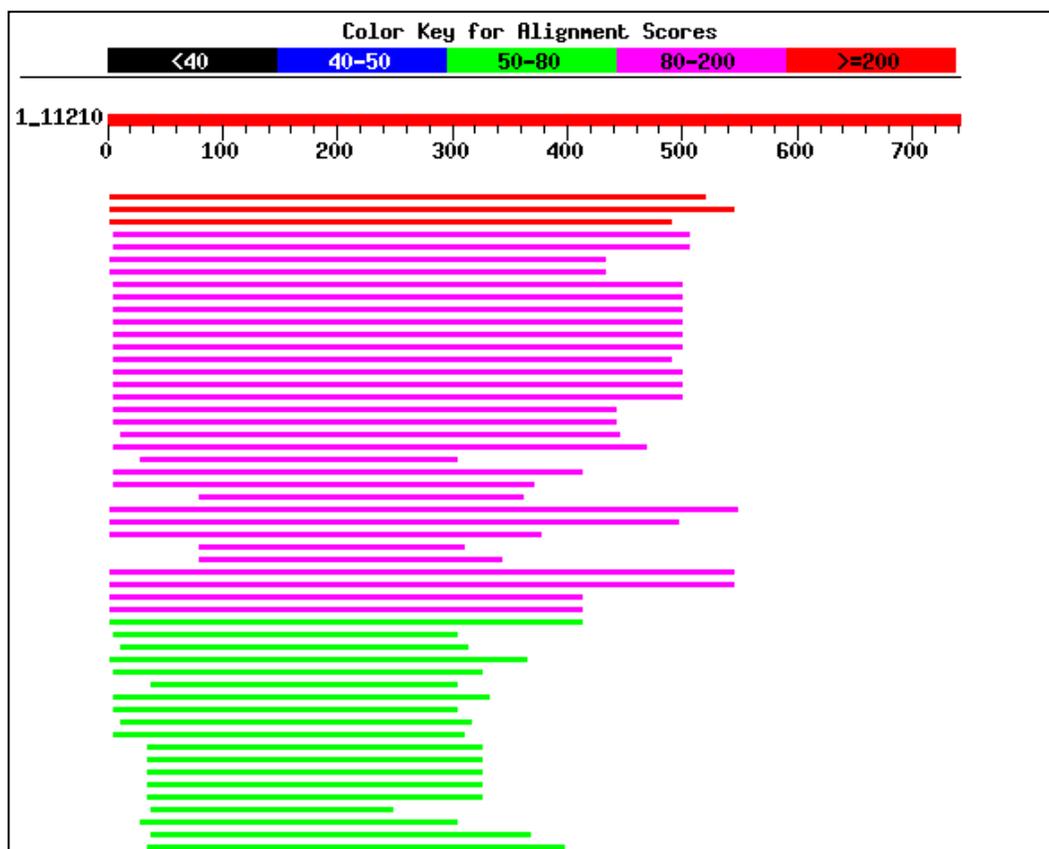


Figura 12. Análisis del alineamiento de la secuencia CCHP1-T3 mediante BLASTX.

Tabla V. Resumen de análisis de alineamiento de la secuencia CCHP1-T3.

Espece	Proteína	No. Acceso	Localización	Homología
<i>H. influenzae</i> Rd	Penicillin-binding protein 1B	AAC23371.1	601-775	74%
<i>Pasteurella multocida</i>	Pon B	AAK002540.1	596-768	63%
<i>H. somnus</i> 129 PT	Hypothetical protein	23466717	602-772	61%
<i>Yersinia pestis</i> C092	Penicillin-binding protein 1B	15981319	597-765	45%
<i>H. pylori</i> J99	Penicillin-binding protein	AAL84834.1	519-586	45%
<i>H. pylori</i>	Penicillin-binding protein 1A	AAL84835.1	518-609	36%
<i>H. pylori</i> 26695	Penicillin-binding protein 1A	E64594	518-609	36%
<i>H. pylori</i>	PBP1	AAK17126.1	518-609	37%

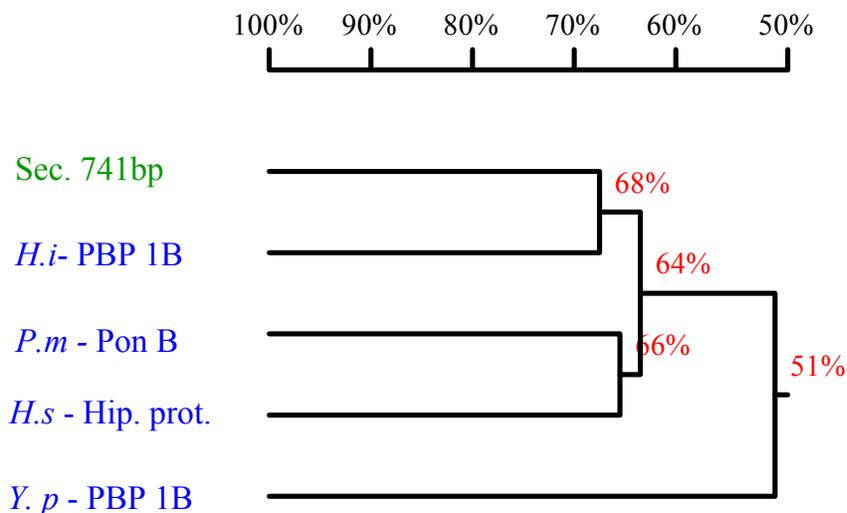


Figura 13. Dendrograma de homología obtenido del análisis de alineamiento de la secuencia CCHP1-T3 (741 pb) con las 4 secuencias de mayor similitud encontradas en Blastx (tabla V).

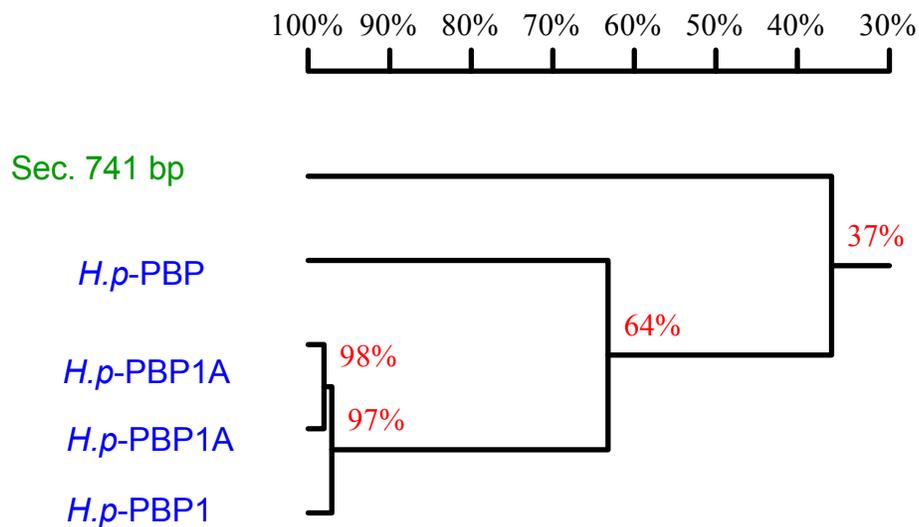


Figura 14. Dendrograma de homología obtenido del análisis de la secuencia CCHP1-T3 (741pb) con las 4 secuencias de mayor similitud encontradas en Blastx para *H. pylori* (tabla V).

La Figura 13 muestra un 68% de homología real con proteínas que reconocen a penicilina de *H. influenzae*, un 64% con una proteína Pon B de *Pasteurella multocida* y un 51% de homología con la PBP-1B de *Yersinia pestis*. La Figura 14 muestra el análisis parcial de homología (real) de la secuencia CCHP1-T3 completa (741 pb) con las proteínas homologas del Gen Bank, mostrando un 37% de identidad con proteínas que reconocen penicilina (PBP-1) en *H. pylori*.

El análisis de la secuencia CCHP2-T3 (774 pb) mostró homología con un dominio conservado de la ClpP (COG0740), que corresponde a una subunidad proteolítica *clp* de la proteasa dependiente de ATP; el análisis obtenido se muestra en la Figura 15 y el resumen de las proteínas con mayor homología en la Tabla

VI.

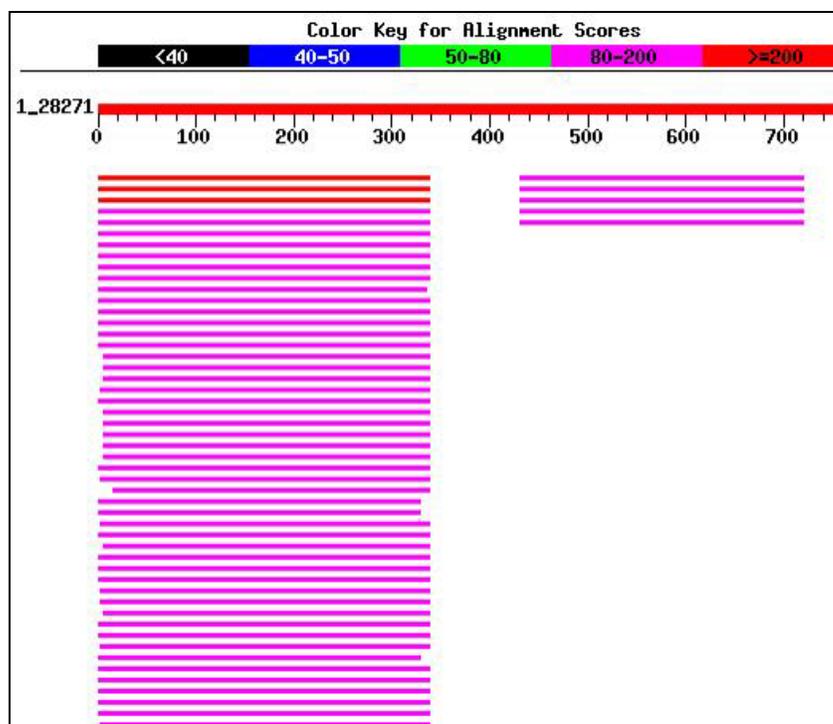


Figura 15. Análisis del alineamiento de la secuencia CCHP2-T3 mediante BLASTX.

Tabla VI. Resumen del análisis de alineamiento de la secuencia CCHP2-T3.

Especie	Proteína	No. Acceso	Localización	Homología
<i>H. influenzae</i>	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	P43867	55-167	97%
<i>H. influenzae</i>	Hypothetical protein	23467433	55-167	95%
<i>Pasteurella multocida</i>	Clp P	15603841	55-167	92%
<i>H. influenzae</i>	Predicted N6- adenine-specific DNA methylase	16273670	464-560	92%
<i>H. pylori</i> J99	ATP-dependent Clp protease proteolytic	AAD09579.1	19-129	63%
<i>H. pylori</i> J99	ATP-dependent protease, proteolytic	AAD06311	55-165	63%
<i>H. pylori</i> 26695	Endopeptidase Clp (EC 3.4.21.92)	B64619	56-166	63%

La Figura 16 muestra el análisis parcial de homología (real) de la secuencia CCHP2-T3 completa (774 pb) mostrando un 37% de identidad con la secuencia de la subunidad proteolítica Clp de la proteasa dependiente de ATP (Clp P) de *H. pylori*.

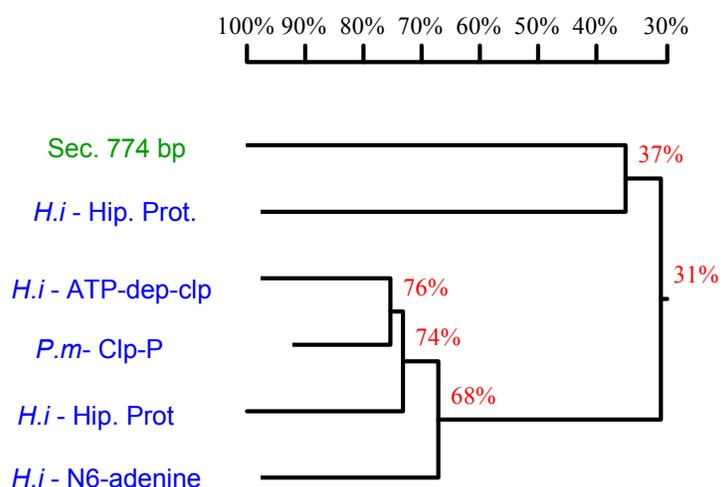


Figura 16. Dendrograma de homología obtenido del análisis de alineamiento de la secuencia CCHP2 T3 (774 pb) con las 5 secuencias de mayor similitud encontrada en Blastx.

Restringiendo la búsqueda a proteínas específicas de *H. pylori*, se observó una identidad del 63% con proteasas dependientes de ATP (Tabla VI). Los resultados mostrados en la Figura 17, denotan un 36% de similitud real de la secuencia CCHP2 T3 (774 pb) con estas proteínas reportadas para *H. pylori*.

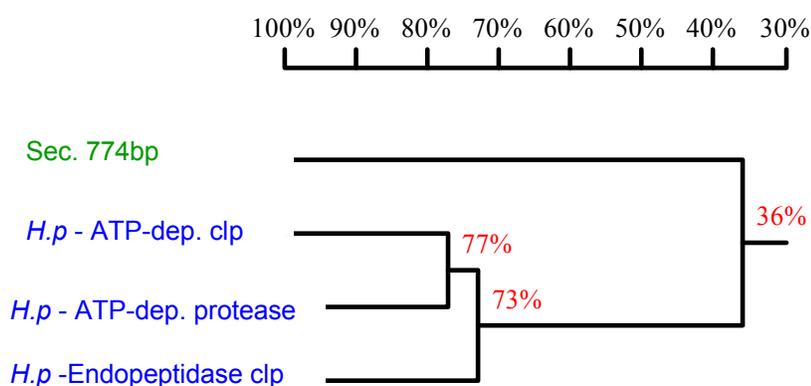


Figura 17. Dendrograma de homología obtenido del análisis de alineamiento de la secuencia CCHP2 T3 (774 pb) con las 3 secuencias de mayor similitud encontrada en Blastx.

6.4.1 Análisis de las secuencias CCHP1 T3 y CCHP2 T3 en el genoma de *H. pylori* en las cepas 26695 y J99.

Dada la baja homología encontrada en las secuencias obtenidas en el presente trabajo, se realizaron una serie de análisis para localizar la posible ubicación de estas proteínas dentro del genoma de *H. pylori* en cada una de las cepas reportadas en el Gen Bank (26695 y J99).

Existen proteínas que reconocen penicilina en todo el genoma de *H. pylori* cepa 26695 (Apéndice **IV**), sin embargo, la proteína que presento mayor homología a la secuencia obtenida de 741 pb (CCHP1-T3), se encuentra en el gen hp0597, localizado en la posición 630.204 - 632.237 kb. En la cepa J99 se encontró en el gen jhp0544, localizado entre los 590.783 - 592.916 kb (Fig. 18).

Aplicando el mismo tipo de análisis a la secuencia de 774 pb (CCHP2 T3) con homología a proteasas dependientes de ATP, se encontró que varias secuencias de este tipo se encuentran ubicadas indistintamente en los genomas de ambas cepas, sin embargo, la proteína con mayor homología a nuestra secuencia parcial se localiza en la cepa 26695, en el gen hp0794 ubicado entre los 850.281 - 852.414 kb. En el caso de la cepa J99, se encontró en el gen clpP localizado en la región 812.755 - 814.888 kb (Fig. 18).

Por último, se realizó el mismo tipo de análisis con el producto de PCR utilizado como sonda (229 pb), encontrándose la mayor homología con proteínas putativas de membrana, localizada en la cepa J99 en el gen *jp0663* en posición 742.866 - 744.999 kb (Fig. 18). Además, se encontró que no se conoce la función de las proteínas contenidas en este gen.

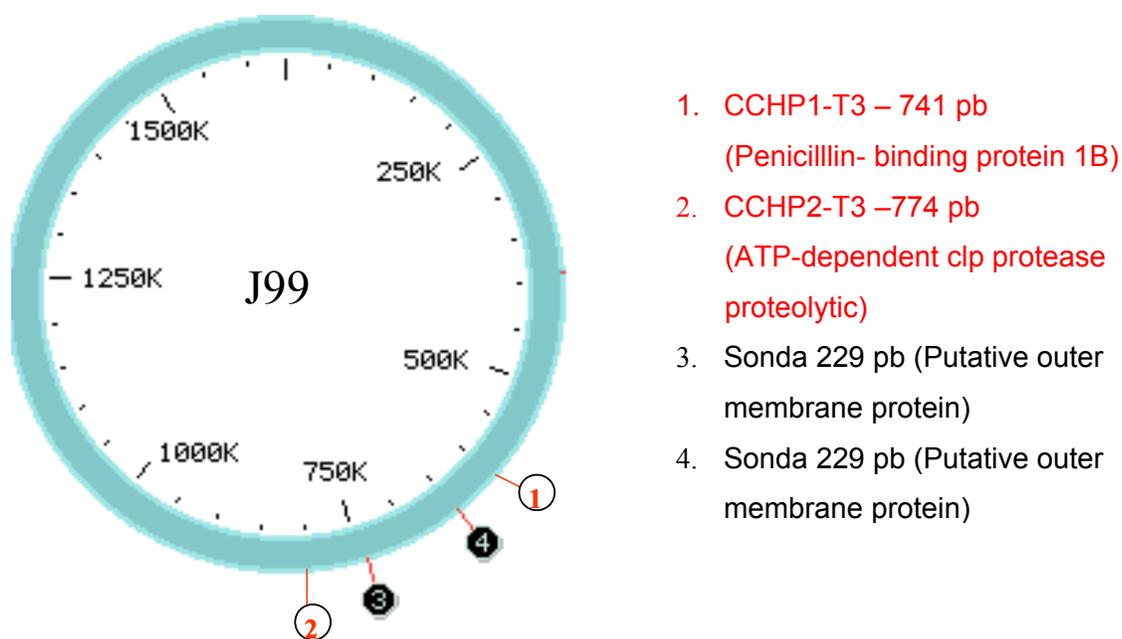


Figura 18. Mapa representativo del genoma de *H. pylori* cepa J99. Los círculos numerados representan las posiciones relativas de los genes con los que se encontró homología con las secuencias obtenidas en el presente estudio (denotados en el recuadro). Tomado del análisis sobre el genoma apéndice III. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi).

7. DISCUSION

A través de varios trabajos, en la última década se ha puesto de manifiesto en el área de biotecnología, la importancia que reviste la identificación, aislamiento y caracterización de los factores de adhesión que expresan microorganismos patógenos para colonizar a huéspedes potenciales. Tal vez, una de las aplicaciones con mayor impacto y actualidad en la industria biotecnológica y farmacológica de los factores de adhesión, es lo que se refiere al diseño y construcción de vacunas contra enfermedades infecciosas (Mukhopadhyay *et al.*, 1994; Rivas-Traverso *et al.*, 2000). Ejemplo de ello son las vacunas de lectinas CAM99, y otras de la superficie celular, de cepas enteropatogénicas de *E. coli*, mismas que han ofrecido perspectivas significativas en medicina veterinaria, y más recientemente, vacunas producidas con la hemaglutinina soluble de *B. pertussis* o de *Influenza A* y *B* (Wizemann *et al.*, 1999).

H. pylori se ha caracterizado por poseer una gran variedad de adhesinas, que reconocen de forma específica receptores de la mucosa gástrica, mediante la que coloniza al humano dando inicio al proceso infeccioso. Entre estas adhesinas, se incluyen aquellas localizadas en la superficie celular del patógeno, involucradas en la movilidad, transporte y adhesión a la mucosa gástrica (Doig y Trust, 1994).

De acuerdo a los resultados observados en la Figura 3, la proteína HSBP71.5 de *H. pylori*, previamente caracterizada en relación a su afinidad hacia

el proteoglicano sulfato de heparina (HS), comprueba lo observado por Ruiz-Bustos, *et al.*, (2001) que refiere que estas HSBP's forman parte del mecanismo de adhesión de la bacteria a la mucosa epitelial del tejido gastrointestinal. Así mismo se ha observado que al administrar oralmente (a ratones BALB/c) las HSBPs conjugadas covalentemente a la subunidad β de la toxina del cólera (CTB), se desencadena una respuesta y protección inmunológica en éstos modelos animales (Ruiz-Bustos *et al.*, 2000).

En virtud de lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo principal la caracterización molecular de la región génica que codifica la proteína antigénica HSBP71.5 de *H. pylori*, que tiene afinidad por los residuos de sulfato de heparina presentes en las células epiteliales de la mucosa gástrica, a fin de obtener resultados que permitan el diseño de futuras aplicaciones inmunoterapéuticas, particularmente en el desarrollo de vacunas genéticas contra infecciones producidas por *H. pylori*. Los resultados obtenidos de la secuenciación de péptidos internos de la proteína pura (Tabla III), permitieron generar herramientas para continuar con el proceso de caracterización molecular (PCR screening) de la región génica que codifica para la HSBP71.5 de *H. pylori*. La secuencia del primer péptido (con homología con la serotransferrina) se descarto, debido a que los resultados apuntan a una probable contaminación con los suplementos del medio de cultivo como suero o sangre. Las secuencias de los péptidos restantes, fueron analizadas en las bases de datos del NCBI Blast, sin encontrar relación alguna

con serotransferrina, pero si con proteínas reportadas como hipotéticas en *H. pylori* (NP_223407.1). Por lo tanto, a partir de ellos, se diseñaron y elaboraron una serie de oligonucleotidos para ser utilizados en las reacciones de PCR, combinando las regiones mas conservadas y la tabla de uso de codones de *H. pylori* (Tabla IV).

Se obtuvieron dos amplicones de 936 y 229 pb, mediante PCR, los que fueron secuenciados. La secuencia de 936 pb mostró tener homología con proteínas con actividad β -galactosidasa, por lo que se descartó algún tipo de relación con proteínas de membrana o adhesinas; en la secuencia de aminoácidos obtenida de la traducción de la secuencia de nucleótidos, solo se localizó la secuencia de uno de los iniciadores, por lo que este amplicón se descartó para posteriores estudios.

Contrariamente, la secuencia de 229 pb mostró homología con proteínas putativas de membrana (NP_223299), y su traducción a aminoácidos mostró la secuencia de los peptidos en los que se baso el diseño de los oligonucleotidos correspondientes (Tabla IV; Fig. 9). Este último amplicón se utilizó como sonda para realizar el tamizado de la librería genómica.

La librería utilizada fue construida con ADNg y el vector pBluescript II-Sk +. El titulo obtenido fue de 1840 clonas recombinantes, lo que de acuerdo al tamaño

del genoma de *H. pylori*, el tamaño de los insertos y la fórmula estadística de Poisson queda representado el genoma de esta bacteria.

Del tamizaje de la librería genómica resultaron dos secuencias nucleotídicas parciales de 741 pb y 774 pb, que hipotéticamente codifican para proteínas que unen penicilina y subunidades proteolíticas de proteasas dependientes de ATP, respectivamente. Además, se encontró que este tipo de proteínas ya se encuentran reportadas en Gene bank, para otras especies de bacterias.

El hecho de encontrar estas proteínas en otras bacterias puede explicarse en virtud de que se ha demostrado, mediante análisis realizados entre los genomas de distintas especies patógenas, que *H. pylori* posee genes ortólogos con *H. influenzae* y en *E. coli*, entre otras bacterias patógenas, que dentro de su set de proteínas poseen las mismas funciones (Huynen *et al.*, 1998)

Puesto que las regiones génicas clonadas y secuenciadas corresponden a dos segmentos parciales de otros genes, se realizó un análisis de restricción para establecer su ubicación dentro del genoma de *H. pylori* (cepas J99 y 26695) disponible en el NCBI. Se encontró que estas proteínas pueden localizarse en distintos sitios distribuidos en todo el genoma, y ser diferentes entre cepas (Apéndice IV). Sin embargo, el análisis de restricción ubicó los sitios en las proteínas con mayor homología las secuencias parciales obtenidas en este trabajo. Una posible explicación de estos resultados es que el gen que codifica la

proteína HSBP71.5 se encuentra ubicado entre estos dos genes (Fig.18) de acuerdo a los análisis realizados (Apéndice IV).

Estos resultados son el punto de partida para futuras estrategias de clonación del gen completo, para obtener su secuencia y caracterizarlo completamente. Una vez obtenida la secuencia completa del gen, se podrán realizar estudios mas avanzados para establecer el papel de esta proteína y su posible utilización en el desarrollo de vacunas.

El análisis del genoma de *H. pylori* cepas J99 y 26695, revela varios métodos por los que la expresión de las proteínas de membrana podría ser afectada. La expresión de varios genes puede ser regulada por una reparación de tipo “slipp-strand”, produciendo mono o dinucleotidos repetidos, que pueden jugar un papel preponderante en la variación antigénica y durante la virulencia (Tomb *et al.*, 1997). Este fenómeno fue observado en *H. pylori* cepa J99, con secuencias repetidas en clones individuales con diferentes sitios de repetición. Por ejemplo, los mismos 5 genes ortologos hop en ambas cepas poseen secuencias repetidas y, en algunos casos, dinucleotidos repetidos (CT) en diferentes posiciones en la secuencia señal, los que afectan el estado de predicción de la expresión. También se ha observado que la alteración de la ubicación y dirección transcripcional, con respecto al origen de replicación, puede también afectar la expresión de estas proteínas (Alm *et al.*, 1999).

La diferencia de organización y modificación de los genes que codifican las proteínas de membrana, observada en las cepas J99 y 26695 de *H. pylori*, también puede detectarse en otras cepas aisladas de *H. pylori*, lo que sugiere que este patógeno emplea un mecanismo sutil de regulación. La razón de los posibles mecanismos de regulación aún no se conoce, sin embargo, la habilidad y posible función de variación puede jugar un papel importante en cuanto a la evasión del sistema inmune del huésped, y podría ser un factor importante en la variación de secuencias entre genes ortólogos.

8. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron tres secuencias parciales 741, 774 y 239 pb.
2. Los análisis de secuencias realizados muestran proteínas cercanas a la región génica que codifica a la proteína HSBP71.5.
3. La región problema contiene proteínas cuya función se desconoce, por lo que se hace más interesante la búsqueda de sus genes.
4. Los resultados obtenidos permitirán la implementación de estrategias para la búsqueda del gen que codifica la HSBP71.5, diseñando nuevos juegos de oligos específicos para su posterior amplificación por PCR y caracterización de su secuencia nucleotídica.

9. PERSPECTIVAS

1. Comprobar que el gen que codifica la proteína HSBP71.5 se encuentra ubicado entre los dos genes de acuerdo a los resultados del presente trabajo.
2. Planear posibles estrategias con el fin de obtener la clonación del gen, su secuencia y caracterización completa.
 - a. Diseñar oligos de las secuencias obtenidas CCHP1-T3 (741pb) y CCHP2-T3 (774pb) como estrategia para la obtención del gen completo.
 - b. Seguir con los análisis sobre el genoma de *H. pylori* con el fin de identificar las proteínas hipotéticas de membrana así como su posible relación con la proteína de interés.
3. Una vez que se tenga el gen completo, se podrá continuar con estudios inherentes respecto al papel de esta proteína en el proceso infeccioso y su posible utilización para el desarrollo de una vacuna.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Alm, R.;** Ling L.; Moir D.; King B.; Brown E.; Doig P.; et al. 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **397**: 176 - 180.
- Ascencio, F.;** Fransson, L. and Wadström, T. 1993. Affinity of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* for the N-sulphated glycosaminoglycan heparan sulphate. *J. Med. Microbiol.***38**: 240-244.
- Ascencio, F.;** Hansson, H.; Larm, O. and Wadström, T. 1995. *Helicobacter pylori* interacts with heparin and heparin-dependent growth factors. *FEMS immunol. Med. Microbiol.* **12**: 265-272.
- Atherton^a, J.;** Peek R, Tham K.; Cover T. and Blaser M. 1997. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vac A, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.* **112**: 92-99.
- Atherton^b, J.;** Peek, R.; Tham, K.; Cover, T. and Blaser, M. 1997. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vac A, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.* **112** : 92-99.
- Beck, K.;** Hunter, I. and Engel, J. 1990. Structure and function of laminin anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB. J.* **4**: 148-160.
- Blaser, M.;** Perez-Perez, G.; Kleanthous, H.; Cover, T.; Peek, R.; Chyou, P.; Stemmermann, G. and Nomura, A. 1995. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cag A is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* **55**: 2111-2115.
- Blaser, M.**1990. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J. Infect. Dis.* **161**: 626-633.
- Borén, T.;** Falk, P.; Roth, K.; Larson, G. and Normark, S. 1993. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science.* **262**: 1892-1895.
- Cave D.** 1997 Epidemiology and transmission of *Helicobacter pylori*. *Infect. Gastroenterology.* **113**: S9-S14.
- Cuenca, R.;** Blanchard, T. and Czinn, S. 1996. Therapeutic immunization against *Helicobacter mustelae* in naturally infected ferrets. *Gastroenterology.* **110**: 1770-1775.

- Delgado, J.;** Rivera, F.; Rios, J. and Herrerías, J. 1992. Optical and electronic findings in *Helicobacter pylori* infection of the mucosa. En *Helicobacter pylori* and Gastroduodenal Pathology. Pp 82-89.
- Doig, P.** and Trust, T. 1994. Identification of surface-exposed outer membrane antigens of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **62**: 4526-4533.
- Doig, P.;** Austin, J.; Kostrynska, M. and Trust, T.J. 1992. Production of a conserved adhesin by the human gastroduodenal pathogen *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **174**: 2539-2547.
- Dwek, R.** 1993. Perspectives in glycobiology-glycobiology-concepts, technology and the future. *Protein engineering.* **6**: 97-130.
- Eaton, K.;** Morgan, D. and Krakowka, S. 1992. Motility as a factor in the colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* **37**: 123-127.
- Evans, D.;** Evans, J. and Graham, D. 1989. Receptor-mediated adherence of *Campylobacter pylori* to mouse Y-adrenal cell monolayers. *Infect. Immun.* **57**: 2272-2278.
- García, G.;** Pajares, J.; Gracia, A.; Lozano, R. and Mercadal, J. 1998. Efficacy of a new antagonist H2 with gastroprotective and anti-*Helicobacter* properties in the eradication of *H. pylori*. *Gastroenterology.* **4**:A 128-G0525.
- Ghiara, P.;** Marchetti, M.; Blaser, M.J.; Tummuru, M.K.R.; Cover, T.L.; Segal, E. D.; Tompkins, L.S. and Rappuoli, R. 1995. Role of the *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin, CagA, and urease in mouse model of disease. *infect. Immun.* **63**: 4154-4160.
- Gómez-Duarte, O.;** Yan, Z. and Lucas, B. 1997. Ureasa subunit A and strains protects mice against gastric colonization by *helicobacter pylori*. **41**(Supl.1): A59-60
- Goodwin, C.** and Worsley, B. 1993. Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol. Clin. N.* **22**: 5-19.
- Goodwin, C.;** Armstrong, J. and Peters, M. 1989. Microbiology of *Campylobacter pylori*. M.J., Blaser (ed). *Campylobacter pylori* in gastritis and peptic ulcer disease. New York. Pp 25-49.

- Guzmán-Murillo, M. A.;** Ruiz-Bustos, E. and Ascencio, F. 2001. Involvement of the heparan sulfate binding proteins of *Helicobacter pylori* in its adherence to HeLa S3 and Kato III cell lines. *J. Med. Microbiol.* **50**: 320-329.
- Hirno, S.;** Utt, M.; Ringer, M. and Wadstöm, T. 1995. Inhibition of heparan sulphate and other glycosaminoglycan binding to *Helicobacter pylori* by various polysulphated carbohydrates. *FEMS Immunol Med. Microbiol.* **10**: 301-306.
- Hocking, D.;** Webb, E.; Radcliff, F.; Rothel, L.; Taylor, S.; Pinczowe, G.; et al. 1999. Isolation of recombinant protective *Helicobacter pylori* antigens. *Infect. Immun.* **67**: 4713-4719.
- Höök, M.;** Switalski, L.; Wadström, T. and Lindberg, M. 1988. Interactions of pathogenic microorganisms with fibronectin. En: *Fibronectin*. D.E., Mosher (ed). Academic Press. New York. Pp. 295-308.
- Huynen, M.;** Dandekar T. and Bork, P. 1998. Differential genome analysis applied to the species-specific features of *Helicobacter pylori*. *FEBS Letters.* **426**: 1-5.
- Kehler, E.;** Midkiff, B. and Westblom, T. 1994. Evaluation of three commercially available blood culture systems for cultivation of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1597-1598.
- Kleinman, H.;** McGarvey, M.; Llotja, L.; Robert, P.; Tryggvason, K. and Martin, G. 1982. Isolation and characterization of type IV collagen, laminin, and heparin sulfate proteoglycan. *Biochemistry.* **21**: 6188 - 6193.
- Korhonen, T.;** Virkola, R.; Lahtenmaki, K.; Bjorkman, Y.; Kukkonen, M.; Raunio, T.; Tarkkanen, A. and Westerlund, B. 1992. Penetration of fimbriated enteric bacteria through basement membranes-A hypothesis. *FEMS Microbiol.* **100**: 307-312.
- Ljungh, A.;** Moran, A. P. and Wadström, T. 1996. Interaction of bacterial adhesins with extracellular matrix and plasma proteins: pathogenic implication and therapeutic possibilities. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* **16**: 117-126.
- Marchetti, M.;** Arico, B. and Burrone, D. 1995. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection which mimic human disease. *Science.* **267**: 1655-1658.
- Marshall, D.;** Dundon, W.; Beesley, S. and Smyth, C. 1998. *Helicobacter pylori* a Conundrum of Genetic Diversity. *Microbiol.* **144**: 2925-2939.
- Mégraud, F.** and Lamouliatte, H. 1995. Tratamiento de la infección por *H. pylori*. En: *H. pylori: Microbiología, clínica y tratamiento*. Ed. Doyma. Madrid. 241-258.

- Mobley, H.;** Mendz, G. and Hazell, S. 2001. *Helicobacter pylori* physiology and genetics. Ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C. Pp 608.
- Moreno, J.;** Pajares, J.; Santander, C.; Carpintero, P.; Hermida, C. and Lara S. 1996. Significant increase in eradication rates of *H. pylori* infection with two consecutive dual therapies (omeprazole and amoxicillin or omeprazole and clarithromycin). A randomized study in 450 Spanish patients. *J Gastroenterol.* **31** (Suppl IX): 48-52.
- Mukhopadhyay, C.;** Miller, K. and Bush, C. 1994. Conformation of the oligosaccharide receptor for E-selectin. *Biopolymers.* **34**: 21-29.
- Opazo, P.;** Muller, I.; Rollán, A.; Valenzuela, P.; Yudelevich, A.; Garcia-de la Guarda, R.; Urra, S. and Venegas, A. 1999. Serological response to *Helicobacter pylori* recombinant antigens in Chilean infected patients with duodenal ulcer, non-ulcer dyspepsia and gastric cancer. *APMIS.* **107**: 1069-1078.
- Paulsson, M.** 1987. Non-collagenous proteins of basement membranes. *Collagen. Rel. Res.* **7**: 443-461.
- Piotrowski, J.;** Piotrowski, E.; Slomiany, A. and Slomiany, B. 1995. Susceptibility of *H. pylori* to antimicrobial agents: Effect of ebrotidine and ranitidine. *J Physiol. Pharmacol.* **46**: 463-469.
- Plotkin, S.** and Orenstein W. 1999. *Vaccines.* Ed. 3th. Philadelphia, PA: WB Saunders Company.
- Queiroz, M.;** Rocha, G. and Mendez, E. 1995. Enfermedades Infecciosas y Microbiología. **15**(6) 424-429.
- Rivas-Traverso, F.** and Hernández, F. 2000. *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Rev. Biomed.* **11**: 187-205.
- Rostand, K.** and Esko, J. 1997. Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. *Infect. immun.* **65**: 1-5.
- Ruiz-Bustos, E.;** Ochoa, J.; Wadström, T. and Ascencio, F. 2001. Isolation and characterisation of putative adhesins from *Helicobacter pylori* with affinity for heparan sulphate protoglycan. *J. Med. Microbiol.* **50** (3): 215-222.

- Ruiz-Bustos, E.;** Sierra-Beltran, A.; Romero, M. J.; Rodriguez-Jaramillo, C. and Ascencio, F. 2000. Protection of BALB/c mice against experimental *Helicobacter pylori* infection by oral immunization with *H. pylori* heparan sulphate-binding proteins coupled to cholera toxin β -subunit. *J. Med. Microbiol.* **49** (6): 535-541.
- Ruoslahti, E.** 1988. Fibronectin and its receptors. *Ann. Rev. Biochem.* **57**: 375-413.
- Sambrook, J.;** Fritsch, E. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2da Ed. USA.
- Schmitt, W.** and Haas, R. 1993. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene. *Acta Gastroenterol. Belg.* **56** (suppl):105.
- Taylor, D.** and Blaser, M. 1991. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infections. *Epidemiol. Rev.* **13**: 42-49.
- Tomb, J.;** White, O.; Kerlavage, A.; Clayton, R.; Sutton, G. and Fleischmann, R. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* **388**: 539-547.
- Torres, J.;** Leal-Herrera, Y.; Perez-Perez, G.; Gómez, A.; Camorlinga-Ponce, M.; Cedillo-Rivera, R.; Tapia-Conyer, R. and Muñoz, O. 1998. A community-Based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in México. *J. Infect Dis.* **178**: 1089-1094.
- Tummuru, M.;** Cover, T. and Blaser, M. 1993. Cloning and expression of a high molecular mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect. Immun.* **61**: 1799-1809.
- Varki, A.** 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**: 97-130.
- Vyas, S.** and Sihorkar, V. 1999. Exploring novel vaccines against *Helicobacter pylori*: protective and therapeutic immunization. *Clin. Pharm. Ther.* **24**: 259-272.
- Walsh, J.,** and Peterson W. 1995. Drug therapy: The treatment of *Helicobacter pylori* infection in the management of peptic ulcer disease. *N. Eng. J. Med.* **333**: 984-991.
- Wight, T.;** Kinsella, M. and Qwarnstrom, E. 1992. The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**: 793-801.

Wizemann, T.; Adamaou, J. and Lagermann S. 1999. Adhesin as targets for vaccine development. *Emerg. Infect. Dis.* **5**(3): 395-403.

Yoshida, M.; Wakatsuki, Y. and Kobayashi, Y. 1999. Cloning and characterization of a novel membrane-associated antigenic protein of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **67**: 286-293.

APÉNDICE I

Parte I

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). (Sambrook *et al.*, 1989)

Las proteínas de membrana externa fueron desnaturalizadas previamente a la electroforesis por 7 min a 100°C en buffer de lisis (0.6 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% glicerol, 10% de SDS, 5% β-mercaptoetanol y 0.05% de azul de bromofenol). Las muestras conteniendo de 5 a 10 µg de proteína total, así como marcadores de peso molecular de alto y bajo rango (Bio-Rad), fueron cargadas en un gel de poliacrilamida discontinuo (4% gel de empaquetamiento y 12% gel de separación). La electroforesis se desarrollo a 80 V durante 2 horas, y los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

Electrotransferencia

Se realizó una nueva SDS-PAGE siguiendo el protocolo antes mencionado, haciendo excepción de la tinción con Coomassie. Se llevó a cabo una electrotransferencia a membranas de polivinil-difluoruro (PVDF), Immobilon-P, (Millipore, Bedford, USA) usando un electroblotter en sistema semiseco a 190 mA por 2 h (Fig. 19). Los marcadores de peso molecular fueron cortados y teñidos con azul de Coomassie. La membrana fue bloqueada con 3% BSA en buffer de fosfato (PBS), haciendo tres lavados por 15 minutos cada uno con PBS-0.05% Tween 20 (PBS-T), siguiendo con un lavado con acetato de sodio 0.1M pH 5.0. Se adicionó

la sonda de sulfato de heparina marcada con peroxidasa de rabano (HS-POD) y se incubó por 90 minutos; seguido por tres lavados con PBS-Tween 20 por 20 minutos cada uno, y otros dos con acetato de sodio por 5 minutos. Las proteínas que reconocieron a sulfato de heparina fueron reveladas con 2.5 mg diaminobenzidina y 2.5 μ l peroxido de hidrogeno en 10 ml de acetato de sodio 0.1M, pH 5.0. La reacción se detuvo con metabisulfito de sodio 0.1M.

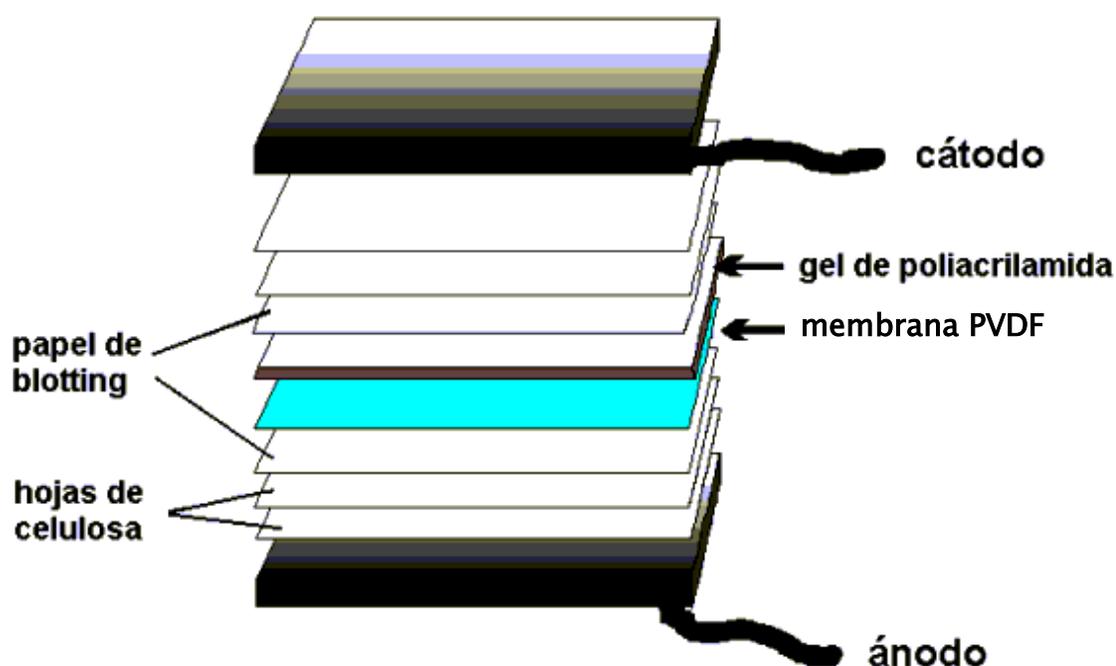


Figura 19. Electrotransferencia de gel de poliacrilamida a membrana PVDF.

Parte II

Digestión de ADN genómico con *Sau* 3AI.

Se digirió 1 μ l de ADNg con *Sau* 3AI en dilución 1:100 en tiempos alternados para obtener fragmentos de 2 a 8 kb, y generar extremos cohesivos. Esta enzima reconoce las secuencias 5' GATC 3', bajo las siguientes condiciones:

Reactivo	Volumen
ADNg	1.0 μ l
Agua mili-Q	7.0 μ l
Buffer 10X	1.0 μ l
<i>Sau</i> 3AI (1:100)	1.0 μ l
Volumen final	10 μ l
Incubar durante 5, 10, 15, 20, 45, 60 min. a 37°C	

Después del periodo de incubación, se verifico la digestión en un gel de agarosa-TAE al 1%, y se guardó a -20°C para ser ligado al vector pBS-SK

Digestión de pBS-SK con *Bam* HI y Desforilación por fosfatasa alcalina.

Se digirieron 20 μ l del plásmido pBS-SK+ con la enzima *Bam* HI en su región múltiple de clonación para linearizarlo y generar extremos cohesivos, bajo las siguientes condiciones:

Reactivo	Volumen
pBS-SK+	20 μ l
Agua mili-Q	28 μ l
Buffer 10X	6.0 μ l
BSA	2.0 μ l
<i>Bam</i> HI (10 U/ μ l)	4.0 μ l
Volumen final	60 μ l
Incubar 3 hrs. A 37°C	

Después del periodo de incubación, se verificó la digestión en un gel de agarosa-TAE al 1%. Posteriormente, el plásmido linearizado se desfosforiló bajo las siguientes condiciones (Sambrook *et al*, 1989):

Reactivo	Volumen
ADNp lineal	50 μ l
Agua mili-Q	37 μ l
Buffer 10X	10.0 μ l
<i>CIAP</i> (10 U/ μ l)	3.0 μ l
Volumen final	100 μ l
Incubar 16 hrs. A 37°C	

Ligación pBS-SK-inserto

El producto de ADN genómico de *H. pylori* digerido parcialmente con *Sau* 3A1 se ligo con el vector purificado pBS-SK (linearizado y desfosforilado), utilizando la enzima ligasa del fago T4. La proporción en base a concentración de inserto: vector fue de 2.5:1. Las condiciones se presentan a continuación.

Reactivo	Inserto A- vector T	Control de ligación
Inserto	1.0 µl	-----
pBS-SK/ <i>Bam</i> HI-P	2.5 µl	
PBS-SK/ <i>Bam</i> HI	-----	3.0 µl
Buffer ligación (10X)	2.0 µl	2.0 µl
T4 DNA ligasa (5 U/µl)	1.5 µl	2.0 µl
Agua mQ	13.0 µl	13.0 µl
Volumen final	20 µl	20 µl
Incubar 16-18 hrs a 4°C		

Los productos de ligación se utilizaron para transformar células de *E. coli*, competentes, las cuales fueron preparadas por la técnica de CaCl₂, siguiendo el procedimiento de Sambrook *et al.*, (1989).

Parte III

Ligación a vector pGem T-easy

Los productos de PCR de 900 y 250 pb purificados por medio del kit QIAquick (QIAGEN) se ligaron al vector pGemT-easy (Promega) utilizando la enzima ligasa del fago T4. La proporción en base a concentración de inserto:vector fue de 2:1. Las condiciones se presentan a continuación.

Reactivo	Inserto PCR-vector pGem-T easy	Control de ligación
Producto PCR	2.0 µl	-----
pGem-T easy (500ng)	1.0 µl	1.0 µl
2x Buffer ligación	5.0 µl	5.0 µl
T4 ADN ligasa (5 U/µl)	1.0 µl	1.0 µl
Agua mQ	1.0 µl	3.0 µl
Volumen final	10 µl	10 µl
Incubar 16-18 hrs a 4°C		

Los productos de ligación se utilizaron para transformar células de *E. coli*, competentes, las cuales fueron preparadas por la técnica de CaCl₂, siguiendo el procedimiento (Sambrook *et al.*, 1989).

Se analizaron el mayor número de colonias blancas posible, a las cuales se les extrajeron los plásmidos (pequeña escala) por la técnica de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Los plásmidos obtenidos se visualizaron en geles de agarosa 1%-TAE y se comparo su peso contra el del vector sin inserto, como una manera de identificar posibles plásmidos que poseen un inserto, esto es, observar si presentan un peso mayor.

Tamizaje por PCR

Los plásmidos que presentaron un peso mayor del vector sin inserto (3 Kb) se sometieron a PCR con los oligos con que se amplificó el fragmento insertado. Los plásmidos que generaron un producto de PCR de tamaño aproximado a 250 pb fueron seleccionados para determinar la secuencia nucleotídica del inserto.

Tamizaje con sonda de ADNg

Marcaje sonda

El marcaje se llevo a cabo por medio del kit Neblot-Phototope, bajo las especificaciones del fabricante (New England Biolabs, USA).

Se tomó un volumen de 34 μ l de templado (5-1 μ g). Se desnaturalizo por 5 minutos utilizando un baño de agua a 100°C. Inmediatamente se colocó en baño de hielo otros 5 minutos. Se dio un pulso en la microcentrifuga a 4°C y se adicionan los siguientes reactivos en orden de lista: 10 μ l de 5X labeling mix (conteniendo random biotinilizados), 5 μ l de dNTP mix y 1 μ l de klenow fragment (3' \rightarrow 5' exo'). Se incubó a 37°C durante toda la noche. Para detener la reacción se añade 5 μ l de LiCl 4M y 150 μ l de etanol absoluto. Incubando a -70°C por 1 hr. Posteriormente se centrifuga y se lava la pastilla con etanol 70% y se resuspende en 20 μ l de agua miliQ.

Southern Blot

Para ver la sensibilidad y reconocimiento de la sonda se llevo a cabo por medio de la técnica de Southern Blot (Sambrook *et al.*, 1989), donde primero se llevaron a cabo 8 digestiones individuales de ADN 1 μ l (1 μ g) con 2 μ l de cada enzima de restricción (*Bgl* II, *Bam* HI, *Kpn* I, *Pst* I, *Eco* RI, *BGI* I, *Eco* RV y *Hind* III), las cuales se llevaron a un volumen de 20 μ l, dejándolas a 37°C durante toda la noche. Dichos fragmentos fueron observados electroforéticamente en gel de agarosa 1%, utilizando como control el mismo producto de PCR elegido para marcar la sonda. Después de la electroforesis el gel fue tratado HCl 0.25M. por 30 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se enjuago con agua destilada y se trata con solución desnaturalizante (NaCl 1.5M/NaOH 0.5M) por 30 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se adiciono la solución neutralizante (NaCl 1.5M/Tris HCl 0.5M pH 7.0), se incubo a temperatura ambiente por 30 min.

Transferencia por difusión

La transferencia a membrana de nitrocelulosa fue por difusión llenando un recipiente con solución 20X SSC (NaCl 175.25gr, citrato de sodio 88.5 gr en 1L de agua destilada), colocando un vidrio ligeramente mas grande que el gel encima del recipiente haciendo un puente con papel whatman 3MM de tal manera de que ambos extremos queden sumergidos en la solución 20X SSC. Posteriormente se cortaron 2 piezas de papel whatman 3MM del mismo tamaño de gel y fueron colocados encima del puente de papel, procurando humedecerlos con 20X SSC.

Se colocó el gel sobre los papeles filtros sacando las burbujas con la ayuda de una pipeta y encima de esta la membrana de nitrocelulosa (immobilon N+) del mismo tamaño del gel (previamente hidratada con agua destilada por 10 min.). Se colocaron 3 hojas de papel whatman 3MM del mismo tamaño encima de la membrana colocando por último toallas de papel del mismo tamaño que la membrana hasta obtener una altura de 6cm. Posteriormente, se colocó una placa de vidrio sobre la torre de papel, y sobre de ella un peso de unos 500gr. Dejando toda la noche a temperatura ambiente. Después de ello se trató la membrana con solución 2X SSC y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana fue fijada por medio del UV "cross-linking".

Hibridación (Kit HS-114F)

Se colocó la membrana en el tubo de hibridación y se adicionaron 8 ml de solución de hibridación del kit HS-114F (High efficiency hybridization system) (de acuerdo al tamaño de la membrana) haciendo un precalentado a la temperatura de hibridación en (este caso fue de 42°C) según las indicaciones del kit. Se adicionó la sonda marcada y desnaturalizada (10 min. 100°C, enfriar en baño de hielo) a una dilución 1:10 μ l al fluido de hibridación. Continuando la incubación a 42°C por 16 a 18 hrs. Realizando después de ello 5 lavados con la solución 1X (washing y pre-Hyb) durante 10 min. cada uno.

Detección y Revelado (Kit de detección Phototope-Star)

Para la detección y revelado de la membrana se llevo a cabo mediante un kit de detección Phototope-Star. La membrana fue bloqueada añadiendo 0.1 ml por cm^2 de membrana de solución de bloqueo (5% SDS, soln. de fosfato pH 7.2 (17mM Na_2HPO_4 , 8mM NaHPO_4) 125 mM NaCl). Incubando por 5 min. a temperatura ambiente. Se incubo con estreptavidina con 0.05ml por cm^2 de membrana, 5 min a temp. ambiente. Se realizaron dos lavados con solución I (Dilución de 1 a 10 de solución de bloqueo) por 5 min. cada uno a temp. ambiente. Se realizo una incubación con fosfatasa alcalina biotinizada colocando 0.05 ml por cm^2 de membrana. Se lavo con solución de bloqueo por 5min. a temp. ambiente. Nuevamente se realizaron dos lavados con solución II (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM MgCl_2 , pH 9.5) por 5 min. Para la detección de ADN se diluyo 25X CPD-Star buffer con agua mQ a una conc. 1X y se le añadió 0.025 ml x cm^2 CDP-Star por 5 min. a temp. ambiente. La membrana fue revelada en películas Kodax XAR-2.

Screening de librería de *H. pylori* (Sambrook *et al.*, 1989)

Se coloco la membrana en la caja petri conteniendo las colonias y se dejo de 5 - 10 min. Por otra parte, se preparo papel 3MM de tamaño aproximado a las membranas y saturarlo por separado con cada una de las siguientes soluciones. a) 10%SDS, b) 0.5N NaOH –1.5M NaCl (desnaturalizante), c) 1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl pH 7.4 (neutralización), d) 2X SSC. Posteriormente se puso la membrana 5 min. sobre cada uno de los papeles 3MM saturados con las soluciones. Se dejo

secar la membrana entre papel whatman 3MM para ser fijados por UV "cross-linking". Posteriormente se colocó la membrana en solución 2X SSC por 5 min. para ser transferida a otra solución de pre-lavado (5X SSC, 0.5% SDS, 1mM EDTA pH 8.0), quitando con un scrape el exceso de bacteria incubando a 50°C por 30 min. para posteriormente ser sometidas al proceso de hibridación y revelado siguiendo los protocolos anteriores.

Secuenciación del gen *hsbp71.5*:

Las clonas que resultaron positivas se seleccionaron para determinar su secuencia nucleotídica utilizando los primers universales T7 y T3 .

APÉNDICE II

Secuencias

Secuencia 936pb

```

1   ACGAATAATG AGGTGAACCA CGGTTATGAT CATCATCACT ATACCAACGT GAATTACCCT
61  TTCCCTTTTG ATCCGCCTTA TGTGCCGATT GAAAATCCTT GTGGGCTTTA TCACCGCACT
121 TTTTACGCATT CGCCTAAACA AAATAAACGT TATTTACTCA ATTTTGAGGG CGTGGACAGC
181 TGTTTATTTG TGTATGTGAA TCATCAATTT GTGGGCTATA GTCAAATTAG CCATTGCACT
241 AGTGAAATTTG ATGTGAGTGA TTTTCTAAAA AACGGTGAAA ATCATCTTCA TGTGTAGTA
301 TTAATAATGGT GTGACGGCAG CTATTTGGAA GATCAGGATA AATCCGAAT GTCAGGCATT
361 TTTTCGTGATG TATATTTGCT TGAACGGGAA ACCATTCTTA CAGGATTTTT TTATTGCGAC
421 CGAACTGCGG ATGATCTAAA AAGGCGGTAT TTGGTGGAGG TTCTTTTATG GAAAGGGGGA
481 ACCGGGCGCA TCTTCGTGAA ATTGCAATGGC AACTTGACCG ATCCGCAAGG TGAAATTGCA
541 TGGCAACTGA CCGATCCGCA AGGTGAAATT TTGCTTTCTG CGGTACGGGA AAGCGGCTTC
601 CATTTTCACG TTGAATGAAA TCACCTTATG GAATGCGGAA AACCCACAA CTTTATACAC
661 TGCTATTTTCG CATATGGTTC GGAGGTGATT TGTCAAAAAA TTGGTTTGCG TAAAAATGAA
721 GTAAAAGATG GTGTGATGCT ATTTAATGGT GAAGCCATCA AATTTAAAGG CGTAAACCGC
781 CACGACAGCG ATCCCAAAC CGGTTATGTC ATTAATCACG AGCAAGCTTT ACAAGATTTA
841 CGCTTGATGA AAGAACATAA TTTCAACGCA ATTCGCACCG CACATTATCC TAATGCCCCG
901 TGATTCACCT CATTGTTCGT AATCACTAGT GAATTC

```

Secuencia 229pb (Sonda)

```

1   ATTGAGCTAG GTCAAGTGAC GTTTGGTTCG CAAGTAACTA TCGGCGATGA TGTCGGTATT
61  GCAGAAGACT ACGACTATGG TATTTTACCG GATTATGTAC CAACATCCGG TCGCTCTGTA
121 ATCCGTTATG ACTACTATGG TGTGAAGGT TTACAATTAG GTGCAAGCTA TCAATTTGCT
181 GAAGACCGTA CTAACAATGA AGTTAACCCAC GGCTCTCTAA CAAACCGT

```

Tamizaje librería

1.CCHP1-T3

```

1   AGCTGGNGNC TCCCCGCGGT GCGCGCCGCT CTAGAACTAG TGGATCTTGC TTTATATNAA
61  AGCACCATCG CACGTTTAGG TTTACGTTCG TAATTTTTAT TACGATAAAA AACAAATTTAG
121 CCTCAATTT TTGAGGGCTT TTTGTATCTA CGGTATCTTG AAATAGTTCG TTTTGTGTAC
181 CTGATACATA ATGCCGGAAA AAAATAAAAA GTGCGGTTCGA AATTAACCGC ACTTTTACTA
241 TTCGGGTTTT GCTTCTTCAA TGGGGATGTT ATCTAACACC TCCCATAAAGC TACCACTAGG
301 GGTTGATTGA TTAGTTGGGG AAAGAGAATC TGTCGCTGAA GACGAGCAAA AACTTTGTCC
361 TTTATTCGCC CAGACAGGAA TAATTCGGCT GCTGCCGCAA TCCCAACTGC CATATTGGCT
421 AATGCCAACC CATTTTATTG CGGCGGGCTT TTGCAGTTTT AATTTTTCAA TATAAACACG
481 GTTGAATAG TCTTTATAAA TTTGTAATGC GCCGAGGCT CCGGTGAGTT TAGTTTCTCC
541 GTTATCATCG CGTCCCAGCC AGATGGTTCG GACATTTTCG CCGTCAATTC CAACAAACCA
601 AGTATCTCGC GCATCATTTG TCGTTCCGGT TTTACCGGCA AGTTGAAGTC CGGCATAATC
661 ATTTTGTAGG CTGCGTGCCG TGCCGCGTTC GACTGTTTTT TGCATAGCAA ATAAAGTTTG
721 GAATGCCGCC TCTTGTGGCA CCACTTGTTC AGCGCTTTTA TCATGCTGAT AAAT

```

2.CCHP2-T3

```
1   AGCTGGNGNC TCCCCGCGGT GCGGCCGCT CTAGAACTAG TGGATCTTCC GCTGAAATGG
61  AGGGCAAAAA GTGGGTATTT TCTACCATCG TGTCGGTGGT GATCCAAAAA TAGCCCGGTG
121 TCCAAATAAT CCGTTAAATT TACCCAAAGT TGTGCGCCGT ATTCGTTCAC ATAAAAATAC
181 TCGCCTTTAT TGGCTAATTT TTCATATTGA TTCGTGCCTT TTTGTTTTTG GCGGACTTTT
241 AAAATCAGCT TGTGTTTTC TACGCCGGTC ACGTTTAACG TTGCCGTCAC CGTATCCAAT
301 AAACGTTGAC GTGCTTTATT TTCATCAATA TTTTtaggCG CAGCATATTC TTGTACCACA
361 ATATGATCGG CATAACGATC GGTGATACT GGGGGAGCGT TTTTtctatG GCATTTAAAT
421 AGGCACGGCT ATCGACATAA TCGAATTGGG CGATATGACG GAAATATTTT TCTTCAATAC
481 GATCCGACGA AAGACATTAA TATTTATATT AATTCGCCGG GCGGTTcagT CACTGCCGGT
541 ATGGCAATTT ACGATACGAT GCAATTTATC AAACCGGATA TACGAACGCT CTGTATTGGG
601 CAGGCATGCT CTATGGGAGC ATTCTTATTG GCAGGTGGTA CGGCGGGTAA ACGTGCGGCA
661 CTGCCGAATG CGCGTGTTAT GATTCACCAG CCGTTGGGCG GATTCCGTGG TCAAGCGTCG
721 GATATTCAGA TTCATGCGCA AGAAATTTTG AAAATTAAGC ACACCTTAAA TGAACGTTTA
781 GCCTTTCATA CAGGGCAAAG TATT
```

APÉNDICE III

Alineaciones

CCHP1-T3 (741pb)

RevComp_CCHP1-t3	GTCAAGGCAATTTGATTTATCAGCATGATAAAAAGCGCTAA	40
hp1-1CTCATTAT	8
hp1-2CTCATAGTAAT	11
hp1-3CTTAATTGT	9
hp1-4CTTAATTATTGT	12
hp1-5TCTAATAATTGT	12
Consensus		
RevComp_CCHP1-t3	ACAAAGTGGTGGCCACAAGAGGCGGCATTCCAAACTTTATTT	80
hp1-1	AGTGGGATTAAGTTCGCGGTGCTGGTCGCACAAGTCTGGGTC	48
hp1-2	GGGTTTATTAAGCGATTTTG...ATAGCCCAAGTATGGGTC	48
hp1-3	GATGGGCCATTAGCGATCTTGATAGCTCAGGTAATGGGTG	49
hp1-4	TGGACTCCTAGCGATTCTG...ATTGCACAAGTGTGGGTA	49
hp1-5	AGGACTCCTCGCTATTCTT...ATAGCCCAAGTCTGGGTC	49
Consensus	t ca t t	
RevComp_CCHP1-t3	GCTATGCCAAAAACAGTTCGAACGCCGCACGGCCACGCC	120
hp1-1	ACTACGGATAAAAGATATCGCCAAAATTAAAAGACTATCGCC	88
hp1-2	ACGACAGATAAAAGACATCGCGAAAATAAAAAGACTACAGAC	88
hp1-3	ACGACGGACAAGGACATTTGCCAAGATCAAAGATTACCGGC	89
hp1-4	ACCAACGGATAAAAGACATCGCCAAGATAAAGGATTACCGCC	89
hp1-5	AGTACCAACAAAAGACATTTGCCAAAATCAAAGACTATCGGC	89
Consensus	a a aa t g a g g c	
RevComp_CCHP1-t3	TACAAAATGATTATGCCGGACTTCAACTTGCCGGTAAAC	160
hp1-1	CATCCGTAGCCAGCCAGATCTTGGATAGGAAGGGAAGATT	128
hp1-2	CCGGAGTGGCTAGTCAGATTCCTCGATAGAAAGGGTCCGGCT	128
hp1-3	CAGGAGTTGCAAGCCAGATCTTAGACCATAAAGGCAGGTT	129
hp1-4	CTGGGTTCGCGTCCAAATAC TGGACAGAAAGGGACGTTT	129
hp1-5	CGAGTGTGGCTTTCACAGATAC TTAGCCGAAAAGGACGCC	129
Consensus	g t a gg	
RevComp_CCHP1-t3	CGGAACGCACAAATGATGCGCGAGTACTTGGTTTGTGGGA	200
hp1-1	GATTGCCAATATATACGACAAAGAGTTTCAGAT.....	160
hp1-2	TATAGCTAACATTTATGATAAAGAATTTTCGGT.....	160
hp1-3	GATTGCCAACATCTACGACAAAGAAATTTAGAT.....	161
hp1-4	AATCGCTAATATTTATGATAAAGAATTTTCGGT.....	161
hp1-5	AATCGCAATATTTATCGATAAAGAGTTTAGGT.....	161
Consensus	c a a a g aga g t	
RevComp_CCHP1-t3	ATTGACGGGCGAAATGTCAGCACCATCTGGCTGGGACGCG	240
hp1-1	160
hp1-2	160
hp1-3	161
hp1-4	161
hp1-5	161
Consensus		

RevComp_CCHP1-t3	ATGATAACGGAGAAACTAAACTCACCGGAGCCTCCGGCGC	280
hp1-1	160
hp1-2	160
hp1-3	161
hp1-4	161
hp1-5	161
Consensus		
RevComp_CCHP1-t3	ATTACAAATTTATAAAGACTATCTCAACCGTGTATATT	320
hp1-1	160
hp1-2	160
hp1-3	161
hp1-4	161
hp1-5	161
Consensus		
RevComp_CCHP1-t3	GAAAAATTTAAAAGCTGCAAAAAGCCCGCCGAATAAAATGGG	360
hp1-1	160
hp1-2	160
hp1-3	161
hp1-4	161
hp1-5	161
Consensus		
RevComp_CCHP1-t3	TTGGCATTAGCCAATATGGCAGTTGGGATTGCGGCAGCAG	400
hp1-1	160
hp1-2	160
hp1-3	161
hp1-4	161
hp1-5	161
Consensus		
RevComp_CCHP1-t3	CCGAATTATTCCTGTCTGGGCGAATAAAAGGACAAAAGTTTT	440
hp1-1TTTT	164
hp1-2TTTT	164
hp1-3TCTA	165
hp1-4TCTA	165
hp1-5TCTA	165
Consensus		t t
RevComp_CCHP1-t3	TGCTCGTCTTCAGCGACAGATTCTCTTTCCCAACTAATC	480
hp1-1	CGCCCGATTGAGGAAATACCAACCCGGTTCGTAG.....	199
hp1-2	TGCTCGTTTCGAGGAGATCCCGCCACGATTTATCG.....	199
hp1-3	CGCTCGATTGGAAGAAATACCAACCGCGATTCATTG.....	200
hp1-4	CGCAAGATTGAGGAGATCCCGCCTCGTTTTATAG.....	200
hp1-5	CGTGCGGTTGGAAGAGATCCCGCCAGATTCATAG.....	200
Consensus	g g t a c	

RevComp_CCHP1-t3	CATCCCCATTGAAGAAGCAAAACCCGAATAGTAAAAGTGC	560
hp1-1AGAGTTTGTT.	209
hp1-2AGTCGCTTCTT	210
hp1-3AGAGTTTACTG	211
hp1-4AGTCTCTTCTA	211
hp1-5AGTCGCTACTT	211
Consensus	ag	
RevComp_CCHP1-t3	GGTTAATTTTCGACCGCACCTTTTATTATTTTTTCGGCATT	600
hp1-1	209
hp1-2	GCGGTGGAAGATACTCTATTTTTTGAGCACGGCGGAATT.	249
hp1-3	GCGGTAGAGGACACGCTCTTTTTTGAGCATGGCGGGATC.	250
hp1-4	GCCGTGGAAGATACATTATTCTTCGAGCACGGAGGGATC.	250
hp1-5	GCAGTGGAGGATACACTCTTCTTCGAACACGGTGGCATT.	250
Consensus		
RevComp_CCHP1-t3	TGTATCAGGTACACAAAAACGACTATTTCAAGATACCGTA	640
hp1-1	209
hp1-2	249
hp1-3	250
hp1-4	250
hp1-5	250
Consensus		
RevComp_CCHP1-t3	GATACAAAAAGCCCTCAAAAATTGAGGGCTAAATTGTTTT	680
hp1-1	209
hp1-2	249
hp1-3	250
hp1-4	250
hp1-5	250
Consensus		
RevComp_CCHP1-t3	TTATCGTAATAAAAAATTAGCGACGTAAACCTAAACGTGCG	720
hp1-1	209
hp1-2AACCTAGACGCAAT	263
hp1-3AACTTAGATGCAAT	264
hp1-4AACCTTAGACGCAAT	264
hp1-5AACTTAGACGCAAT	264
Consensus		
RevComp_CCHP1-t3	ATGGTGCTTTATATAAAGCA	740
hp1-1	209
hp1-2	CATGAGAGCT.	273
hp1-3	TATGCGCGCTAT.	276
hp1-4	CATGCGCGCAAT.	276
hp1-5	CATGAGGGCGAT.	276
Consensus		

CCHP2-T3 (774pb)

Untitled	GTATTGAAGAGAAAATATTTCCGTCATATCGCCCAATTCGA	40
Hp2-1	0
Hp2-2	0
Hp2-3	0
Consensus		
Untitled	TTATGTCGATAGCCGTGCCATTTTAAATGCCATAGAAAA	80
Hp2-1	0
Hp2-2ATATAACCATACGTTATTGAAAAAT	23
Hp2-3GATACATTCCCTACGTTATTGAGAAC	27
Consensus	g acattccatacgttattgaaaa	
Untitled	ACGCTCCCCAGTATCAACCGATCGTTATGCCGATCATAT	120
Hp2-1	0
Hp2-2	ACGGAAAGAGGAGAGAGATCCTACGACATCTACTCTAGGT	63
Hp2-3	ACCGATAGAGGCCAACGTAGTTATGACATCTATTCACGCT	67
Consensus	acgga agagg ga cga c tacgacatcta tc ag t	
Untitled	TGTGGTACAAGAATATGCTGCGCC TAAAAATATTGATGAA	160
Hp2-1	0
Hp2-2	TATTAAGGATAGAATCGTGCTCC TAAAGTGG..TGAAATT	101
Hp2-3	TGCTAAAAGATCGGATTGTATTAC TCAAGTGG..GGAAATA	105
Consensus	tgtaa gatag at gtgctcctaagtgg tgaata	
Untitled	AATAAAGCACGTCAACGTTTATGGATACGGTGACGGCAA	200
Hp2-1AGTGTGCAAGCTCGATTGTCGCGCAACTTCTAT	34
Hp2-2	AATGATAGTGTGCCAAGTTCGATAGTAGCTCAACTGCTTT	141
Hp2-3	AATGACTCTGTGGCTTC TAGTATAGTAGCACAGTTACTGT	145
Consensus	aatga actgtggcaagttcgatagtagcgcaactgctat	
Untitled	CGTTAAACGTGACCGGC GTAGAAACCAACAAGCTGATTTT	240
Hp2-1	TTCTGGAGGCTGAGGACCCAGAA.....	57
Hp2-2	TTTLAGAAGCAGAAAGATCCTGAG.....	164
Hp2-3	TTCTCGAGGCTGAAGACCCTGAA.....	168
Consensus	ttctagaggctgaagaccagaa	
Untitled	AAAAAGTCGCCAAAAACAAAAAGGCACGAATCAATATGAA	280
Hp2-1	57
Hp2-2	164
Hp2-3	168
Consensus		

```

Untitled      AAATTAGCCAATAAAGGCGAGTATTTTATGTTGAAACGAAT      320
Hp2-1        ..... AAGGATATAGGGCTCTATATCAATTAC      85
Hp2-2        ..... AAAGACATTTGGTTTGTAATCAACTCCC      192
Hp2-3        ..... AAAGATATCGGCCTTTATATAAATTCCC      196
Consensus    aaagacat ggtctttatatcaactcac

```

```

Untitled      ACGGCCCAACTTTGGGTAAATTAAACGATATTTTGGGA      360
Hp2-1        CCGGAGGCGTGATTACATCCGGTTTAAACATCTACGACAC      125
Hp2-2        CCGGAGGAGTTATCACTAGTGGGCTGTCTGATTACGACAC      232
Hp2-3        CAGGGGGCGTCAATCACGTCGGTCTTTTCGATTATGATAC      236
Consensus    ccggaggagt atcacgtctggtctaacgatttacgacac

```

```

Untitled      CACCGGGCTATTTTGGATCACCAACGACACGATGGTAGA      400
Hp2-1        CATGAATTTTCATCAGACCAGACGTAAGTACTATATGCATT      165
Hp2-2        AATGAACTTCATTCGGCCGACGTCTCAACCATCTGTATC      272
Hp2-3        AATGAATTTTATCAGGCCAGATGTGAGTACTATATGTATA      276
Consensus    aatgaatttcatcaggccagacgtcagaaccatagtata

```

```

Untitled      AAATACCCACTTTTTGCCCTCCATTTACAGCGGAAG.....      435
Hp2-1        GGCCAGGCAAGCTCTATGGGAGCAATTTCTCTTAAGTTGTG      205
Hp2-2        GGGCAGGCTGCGTCGATGGGCGGTTTCTACTTAGCTGCG      312
Hp2-3        GGGCAAGCGGCAAGTATGGGGCAATTTCTATTATCATGCG      316
Consensus    gggcaggcagc tctatgggcgcaatttctattaag tgcg

```

```

Untitled      .....                                          435
Hp2-1        GGGCTAAGGGTAAGAGATTCTCGCTTCCTCACAGTAGAAT      245
Hp2-2        GTGC GAAAGGGAAAAGATTC.....                    332
Hp2-3        GTGC CAAGGGTAAAAGA.....                        333
Consensus    gtgc aagggtaaaagattc

```

APÉNDICE IV

Análisis de las secuencias en el genoma de *H. pylori* en ambas cepas 26695 y j99.

CCHP1-T3 Secuencia de 747pb

Proteína: Penicillin-binding protein 1A

Secuencia:

```

1 mlkkifygfi vlfliivgll avlvaqvwt tdkdiakikd yrpsvasqil drkgrliani
61 ydkefrfyar feeipprfve sllavedtlf fehgginlda vmramiknak sgryteggst
121 ltqqlvknmv ltrektltrk lkeaiisiri ekvlskeeil erylnqtf fg hgyygvktas
181 lgyfkkpldk ltlkeitmlv alprapsfyd ptknlefsls randilrrly slgwissnel
241 ksalnevpiv ynqtstqnia pyvdevlkq ldqldgltq gytikltidl dyqrlalesl
301 rfghqkilek iakekpktna sndkdednln asmivtetst gkilalvggi dykksafnra
361 tqakrqfgsa ikpfvyqiaf dngysttski pdtarnfeng nysknsvqnh awhpsnytrk
421 flglvtlqea lshslnlati nlsdqlgfek iyqslsdmgf knlpkdlsiv lgsfaispid
481 aaekyslfsn ygtmlkpml i esitnqqnev ktftpietkk itskeqafll lsalmdaven
541 gtgslarikg leiagktgts nnnidawfig ftptlqsviw fgrddntpig kgatggvvsa
601 pvysyfmrni laiepslkrk fdvpgklrke ivdkipyys pnsitptpkk tddseerllf
    
```

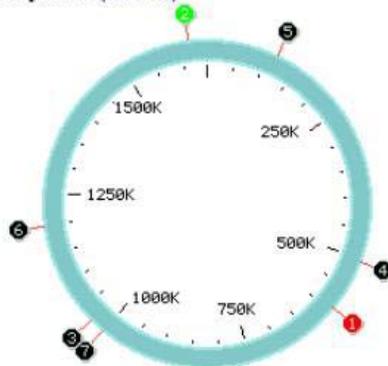
Helicobacter pylori J99 complete genome

Total Bases: 1643831 bp

Protein database: 1491 sequences

Updated: Mar 21, 2003.

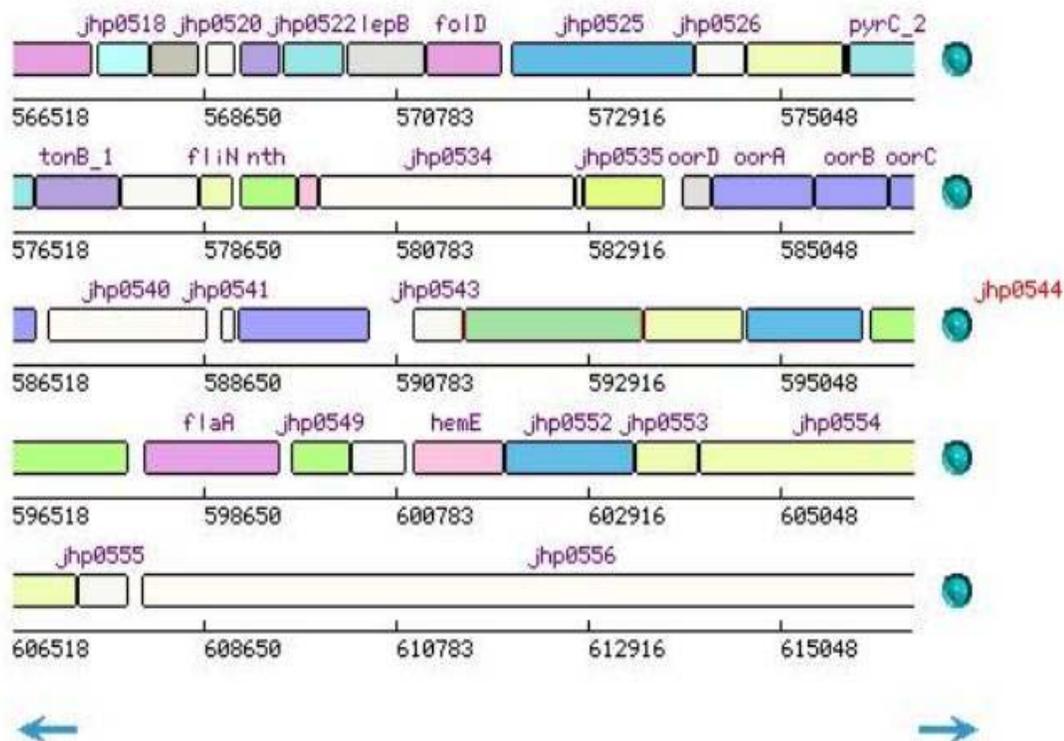
Query: new protein sequence (660 aa)



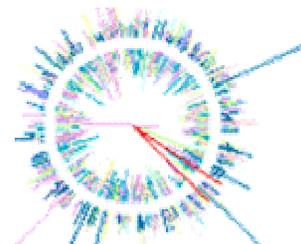
Helicobacter pylori J99 protein neighbors for new protein sequence: 7 hits found.

Hit	Protein GI	660	Score	E value	
1	15611611		1255	0.0	PENICILLIN-BINDING PROTEIN
2	15612529		64.7	1e-11	PENICILLIN-BINDING PROTEIN
3	15611993		34.3	0.020	putative
4	15611532		28.5	1.1	HEAT SHOCK PROTEIN
5	15611176		25.8	7.1	putative
6	15612145		25.8	7.1	VALYL-TRNA SYNTHETASE
7	15611972		25.8	7.1	putative

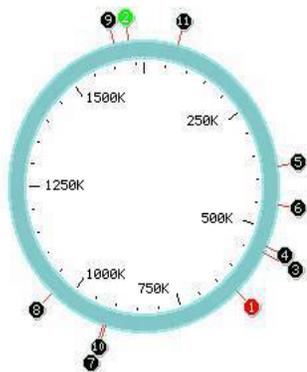
Helicobacter pylori, strain J99 complete genome - 566518..616517



- Translation, ribosomal structure and biogenesis
- Transcription
- DNA replication, recombination and repair
- Cell division and chromosome partitioning
- Posttranslational modification, protein turnover
- Cell envelope biogenesis, outer membrane
- Cell motility and secretion
- Inorganic ion transport and metabolism
- Signal transduction mechanisms
- Energy production and conversion
- Carbohydrate transport and metabolism
- Amino acid transport and metabolism
- Nucleotide transport and metabolism
- Coenzyme metabolism
- Lipid metabolism
- Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
- General function prediction only
- Function unknown
- No COG match



Helicobacter pylori cepa 26695

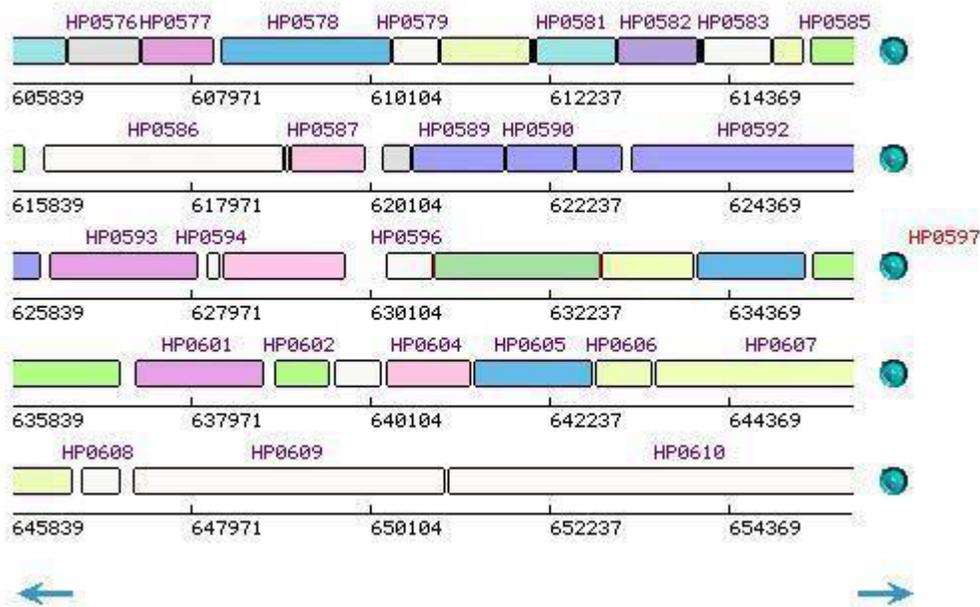


[Back to BL](#)

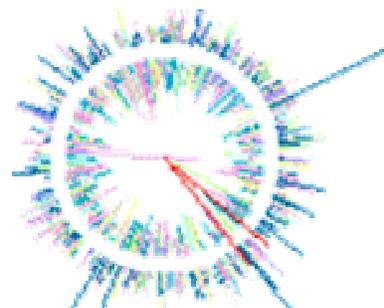
Helicobacter pylori 26695 protein neighbors for new protein sequence: 11 hits found.

Hit	Protein GI	660	Score	E value	
1	15645222		1228	0.0	penicillin-binding protein 1A (PBP-1A)
2	15646163		65.5	8e-12	cell division protein (ftsI)
3	15645143		29.3	0.64	heat shock protein (hslU) ORF1
4	15645132		27.3	2.4	hypothetical protein
5	15645001		26.6	4.1	conserved hypothetical protein
6	15645063		26.6	4.1	hypothetical protein
7	15645482		26.2	5.4	hypothetical protein
8	15645586		25.8	7.1	hypothetical protein
9	15646140		25.8	7.1	glucosamine fructose-6-phosphate aminotransferase (isomerizing) (glmS)
10	15645475		25.4	9.2	hypothetical protein
11	15644696		25.4	9.2	conserved hypothetical ATP-binding protein

Helicobacter pylori 26695, complete genome - 605839..655838



- Translation, ribosomal structure and biogenesis
- Transcription
- DNA replication, recombination and repair
- Cell division and chromosome partitioning
- Posttranslational modification, protein turnover
- Cell envelope biogenesis, outer membrane
- Cell motility and secretion
- Inorganic ion transport and metabolism
- Signal transduction mechanisms
- Energy production and conversion
- Carbohydrate transport and metabolism
- Amino acid transport and metabolism
- Nucleotide transport and metabolism
- Coenzyme metabolism
- Lipid metabolism
- Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
- General function prediction only
- Function unknown
- No COG match



CCHP2-T3 secuencia 774 pb

Proteína: ATP-dependent clp protease proteolytic component (clpP).

Secuencia:

```
1 mgyipyvien tergersydi ysrlkdriv llsgeindsv assivaqlf leaedpekdi
61 glyinspggv itsglsiydt mnfirpdvst icigqaasmg afliscgakg krfslphsri
121 mihqplggag qqasdieiis neilrlkglm nsilaqnsqg sleqiaktdt rdfymsakea
181 keyglidkvl qknvk
```

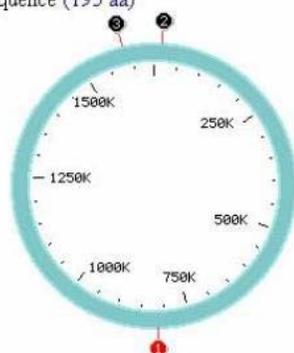
Helicobacter pylori J99 complete genome

Total Bases: 1643831 bp

Protein database: 1491 sequences

Updated: Mar 21, 2003.

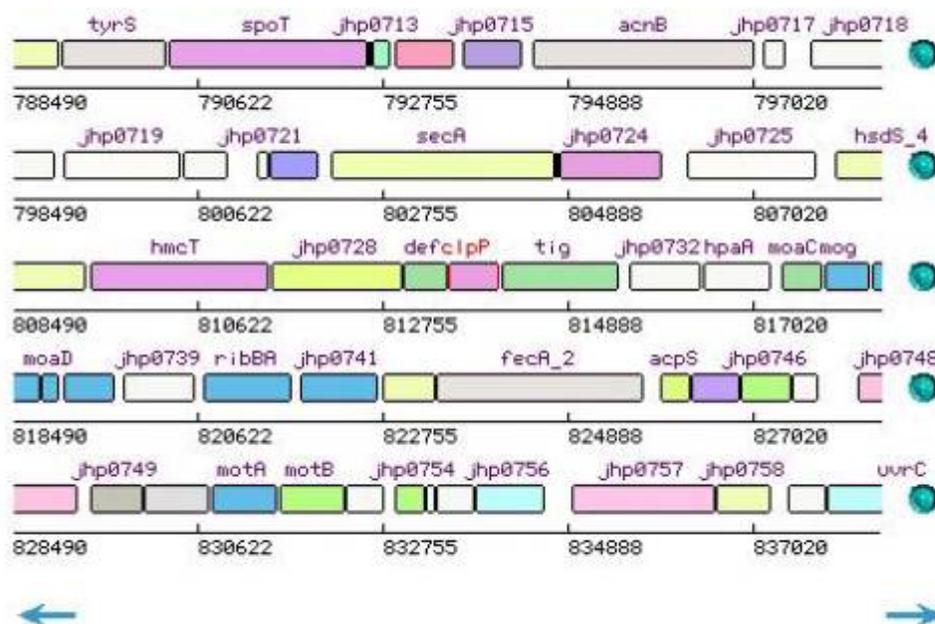
Query: new protein sequence (195 aa)



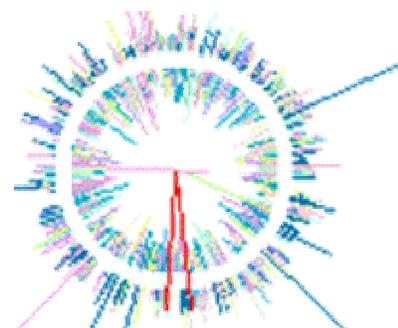
Helicobacter pylori J99 protein neighbors for new protein sequence: 3 hits found.

Hit	Protein GI	Score	E value	Description
1	15611797	380	2e-107	ATP-DEPENDENT PROTEASE, PROTEOLYTIC SUBUNIT
2	15611087	24.3	4.4	putative
3	15612502	23.5	7.5	putative

Helicobacter pylori, strain J99 complete genome - 788490..838489



- Translation, ribosomal structure and biogenesis
- Transcription
- DNA replication, recombination and repair
- Cell division and chromosome partitioning
- Posttranslational modification, protein turnover
- Cell envelope biogenesis, outer membrane
- Cell motility and secretion
- Inorganic ion transport and metabolism
- Signal transduction mechanisms
- Energy production and conversion
- Carbohydrate transport and metabolism
- Amino acid transport and metabolism
- Nucleotide transport and metabolism
- Coenzyme metabolism
- Lipid metabolism
- Secondary metabolites biosynthesis, transport and
- General function prediction only
- Function unknown
- No COG match



Helicobacter pylori cepa 26695

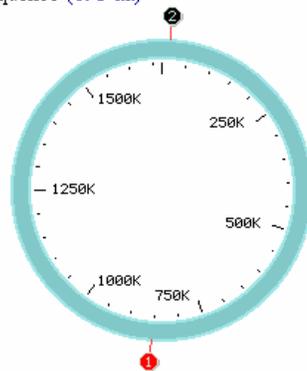
Helicobacter pylori 26695 complete genome

Total Bases: 1667867 bp

Protein database: 1553 sequences

Updated: Mar 21, 2003.

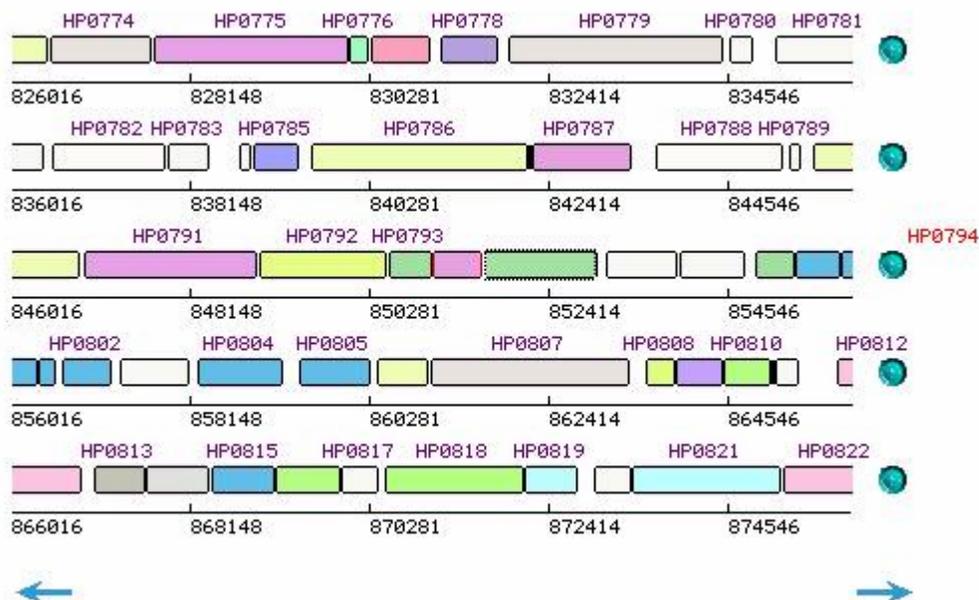
Query: new protein sequence (195 aa)



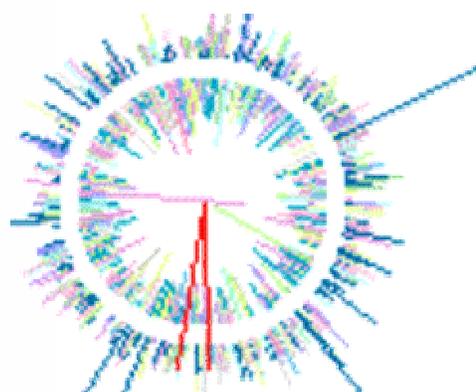
Helicobacter pylori 26695 protein neighbors for new protein sequence: 2 hits found.

Hit	Protein GI	Score	E value	Description
1	15645413	379	5e-107	ATP-dependent clp protease proteolytic component (clpP)
2	15644651	24.3	4.4	hypothetical protein

Helicobacter pylori 26695, complete genome – 826016...876015



- Translation, ribosomal structure and biogenesis
- Transcription
- DNA replication, recombination and repair
- Cell division and chromosome partitioning
- Posttranslational modification, protein turnover
- Cell envelope biogenesis, outer membrane
- Cell motility and secretion
- Inorganic ion transport and metabolism
- Signal transduction mechanisms
- Energy production and conversion
- Carbohydrate transport and metabolism
- Amino acid transport and metabolism
- Nucleotide transport and metabolism
- Coenzyme metabolism
- Lipid metabolism
- Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
- General function prediction only
- Function unknown
- No COG match



Sonda 229pb

Secuencia:

```

1  ATTGAGCTAG GTCAAGTGAC GTTTGGTCGC CAAGTAACTA TCGGCGATGA TGTCGGTATT
61 GCAGAAGACT ACGACTATGG TATTTTACCG GATTATGTAC CAACATCCGG TCGCTCTGTA
121 ATCCGTTATG ACTACTATGG TGTGAAGGT TTACAATTAG GTGCAAGCTA TCAATTTGCT
181 GAAGACCGTA CTAACAATGA AGTTAACCAC GGCTCTCTAA CAAACCAGT
    
```

Traducción proteína:

ELGQVTFGRQVTIGDDVGIAEDYDYGILPDYVPTSGRSVI
RYDYYGVEGLQLGASYQFAEDRTNNEVNHGSLTNQ

Helicobacter pylori J99 complete genome

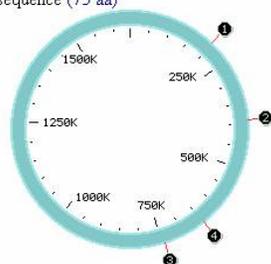
Total Bases: 1643831 bp

Protein database: 1491 sequences

Updated: Mar 21, 2003.

Query: new protein sequence (75 aa)

[New BLAST with](#)



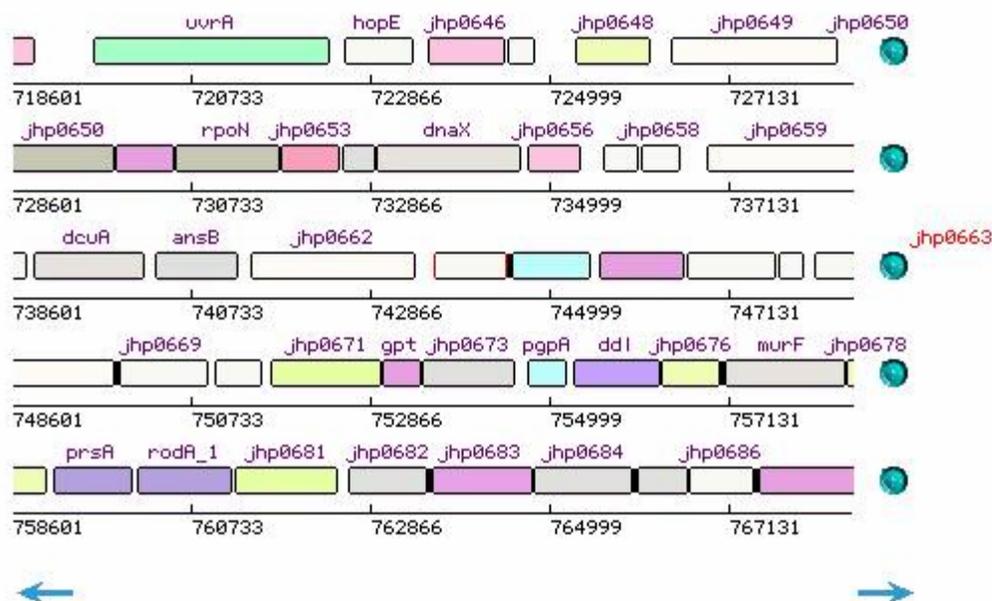
Cc

[Back to BLAS](#)

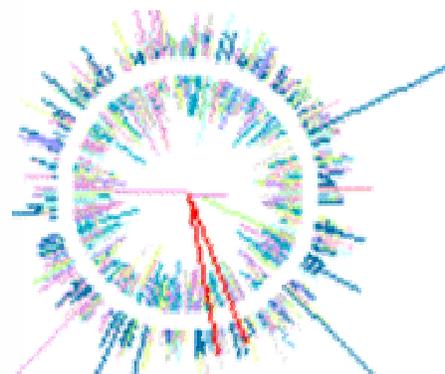
Helicobacter pylori J99 protein neighbors for new protein sequence: 4 hits found.

Hit	Protein GI	Score	E value	
1	15611252	23.5	1.7	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl
2	15611431	23.1	2.2	S-ADENOSYLMETHIONINE TRNA RIBOSYLTRANSFERASE-ISOMERASE
3	15611730	21.9	4.9	putative Outer membrane protein
4	15611648	21.9	4.9	putative Outer membrane protein

Helicobacter pylori, strain J99 complete genome - 718601..768600



- Translation, ribosomal structure and biogenesis
- Transcription
- DNA replication, recombination and repair
- Cell division and chromosome partitioning
- Posttranslational modification, protein turnover
- Cell envelope biogenesis, outer membrane
- Cell motility and secretion
- Inorganic ion transport and metabolism
- Signal transduction mechanisms
- Energy production and conversion
- Carbohydrate transport and metabolism
- Amino acid transport and metabolism
- Nucleotide transport and metabolism
- Coenzyme metabolism
- Lipid metabolism
- Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
- General function prediction only
- Function unknown
- No COG match



APÉNDICE V

Soluciones:

Acetato de Sodio 3 M (pH 6.3)

Acetato de sodio	4.085 g
Agua destilada	1000 ml

Buffer electroforesis de proteínas 1X

Tris-bas	3.75 g/l
Glicina	18 g/l
SDS	1.25 g/l

Buffer EDTA-salino

NaCl	0.088 g/l
EDTA	0.292 g/l
Agua destilada	10 ml

SDS 10%

SDS	10 g
Agua bidestilada cbp	100 ml

Buffer Tris 1.5M (pH 8.8)

Tris-Base	181.5 g/l
Agua destilada	1 Lt

Buffer Tris 1.5M (pH 6.8)

Tris-Base	121.1 g/l
Agua destilada	1 Lt

Agarosa

Buffer TAE 1x	100 ml
Agarosa	1 g
Bromuro de etidio	6 µl

RNAsa

Agua bidestilada	1 ml
RNAasa	10 mg

Buffer TAE 10X

Tris- base	48.4 g/l
Acido acético glacial	11.42 ml
EDTA 0.5M (pH 8.0)	20 ml

PBS 1X (pH 7.4)

NaCl	8 g/l
KCl	0.2 g/l
Na ₂ HPO ₄	1.44 g/l
KH ₂ PO ₄	0.24 g/l

Lisozima

Agua bidestilada cbp	1 ml
Lisozima	10 mg

Persulfato de amonio (APS) 10%

Agua bidestilada cbp	1 ml
APS	0.1 g

Solucion I (pH 8.0)

Glucosa	50 mM
Tris-base	25 mM
EDTA	10 mM

Solucion II

NaOH	0.2 N
SDS	1%

Solucion III

Acetato de potasio 5M	60 ml
Acido acético glacial	11.5 ml
Agua bidestilada	28.5 ml

Proteinasa K

Agua bidestilada	1 ml
Proteinasa K	10 mg

Etanol 70%

Etanol absoluto	70 ml
Agua destilada	30 ml

Solución CaCl₂ 0.1M

CaCl ₂	1.11 g
Agua destilada	100 ml

Solución de Tinción

Azul brillante R	2 g
Metanol	250 ml
Acido acético	50 ml
Agua destilada	200 ml

Solución de destinción

Metanol	100 ml
Acido acético	20 ml
Agua destilada	80 ml

Buffer desnaturalizante

Buffer tris 1M (pH 6.8)	2.5 ml
SDS 10%	4 ml
Glycerol	2 ml
β mercaptoetanol	1 ml
Azul de bromofenol	20 ml

Medios de cultivo

Caldo Luria Bertani (LB)

Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5.0 g/l
NaCl	10.0 g/l

Agar LB

Caldo LB	1000 ml
Agar bacteriologico	18.0 g