



DETECCIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN *tdh* DE *V. parahaemolyticus*

Zamora Pantoja Diana Ruth², Francisco José Fernández Perrino², Humberto González Márquez², Diana Báez Herrera¹, Elsa Irma Quiñones Ramírez¹ y Carlos Vázquez Salinas². ¹Microbiología Sanitaria, ENCB-IPN. Prolongación Carpio s/n, Col. Casco de Santo Tomás, México, D.F. ²División de Ciencias Biológicas y de la Salud. U.A.M. Unidad Iztapalapa. Michoacán y Purísima s/n Col. Vicentina 09340 México, D.F. Tel. 58044724

cvs@xanum.uam.mx

Palabras clave: *tdh*, clonación, expresión

Introducción. Los principales factores de virulencia de *Vibrio parahaemolyticus* son la TDH y la TRH, las cuales se encuentran codificadas por los genes *tdh* y *trh*, respectivamente. Se trabajaron 60 cepas enviadas por la CCAyAC, SSA en el 2004, recolectadas en el sistema lagunar Huizache-Caimanero en el Edo. de Sinaloa, y 6 cepas del CIAD, Mazatlán. Se extrajo el DNA mediante el kit Dneasy de Qiagen®. Se estandarizó la técnica de la PCR para el gen *tdh*, se diseñaron los iniciadores, se amplificó, se secuenció, clonó y expresó el gen *tdh* en el vector pET 100/D-TOPO. Se verificó que el gen se insertara en el sentido correcto por medio de enzimas de restricción y secuenciación; finalmente, se realizó una electroforesis desnaturizante para detectar la presencia de la proteína. No se encontró el gen *tdh* en las cepas provenientes del Sistema Lagunar. En las 6 cepas de origen clínico el gen *tdh* fue secuenciado; clonado y expresado. El objetivo de este trabajo fue detectar el gen *tdh*, así como amplificar, clonar y expresar dicho gen.

Metodología. Se analizaron 60 cepas de *V. parahaemolyticus* (provenientes de agua y camarón) enviadas por la CCAyAC en el año 2004, recolectadas en el sistema lagunar Huizache – Caimanero en el estado de Sinaloa, además de 6 cepas de la CAIM del CIAD Mazatlán. La extracción de DNA se llevó a cabo con el kit Dneasy de Qiagen®. Se diseñaron los iniciadores (Fw-TTATTGTTGATGTTTACATTCAAAAAAC y Rv-CACCATGAAGTACCGATATTTTG, 20 nM). Se estandarizó la técnica para la amplificación del gen completo: regulador 1x, 3mM de MgCl, 0.5 mM dNTP y 1.5 U/ml de Taq polimerasa, inició con temperatura de 94°C/1 min; 35 ciclos de 94°C/40s, 48°C/40s y 72°C/40s. Se secuenció el gen, se clonó y expresó en el vector pET 100/D-TOPO®. Se hizo SDS-PAGE a una concentración de 10% (p/v) a una corriente de 200 V por dos horas. Las muestras fueron calentadas a 100°C por 5 min en regulador de muestra 2X (0.5M Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 4% β-mercaptoetanol, 0.2% azul de bromofenol y 4% de SDS). Finalmente se hizo tinción con nitrato de plata.

Resultados y discusión. En ninguna de las cepas provenientes del sistema lagunar Huizache-Caimanero se detectó el gen *tdh*. El 90% de las cepas de origen clínico poseen el gen *tdh*. La probabilidad de encontrar este gen en cepas ambientales es menos del 10% (De

Paola *et al.*, 2003). Cabanillas-Beltrán (2005) no identificó al gen en las cepas aisladas de alimentos involucrados en el brote de 2004, sin embargo, si lo amplificó en cepas de origen clínico, lo cual coincide con nuestros resultados, ya que en las cepas de origen clínico provenientes del CAIM fue detectado el gen *tdh*. Se purificó el producto de PCR para su secuenciación; corroborándose la identidad del gen *tdh* por medio de un análisis informático (BLAST). La construcción se efectuó en el vector pET 100 y se transformó en *E. coli* TOP 10. Se seleccionaron 13 transformantes en agar LB+ampicilina; a las cuáles les fue extraído el plásmido. Se efectuó un corte con SacI para linealizar el plásmido y se eligieron cuatro plásmidos cuyo peso molecular fue de 6339 pb (5764pb del plásmido + 575 del inserto). Para verificar que el sentido en el que se insertó el gen era el correcto, se utilizó la enzima de restricción NdeI, la cual tiene un solo sitio de corte en el plásmido y uno en el gen *tdh*. El tamaño de los 2 fragmentos resultantes si el gen se inserta de la manera correcta es 603 pb y de 5736 pb; si esta insertado de manera incorrecto el tamaño es de 196 pb y 6143pb. Para corroborar los resultados obtenidos se realizó PCR con los iniciadores de T7 para amplificar la región del polilinker y posteriormente secuenciar (amplificado de 634 pb), con lo cual se verificó que el gen se insertó correctamente. Posteriormente se efectuó la transformación de células de *E.coli* BL21 utilizando el plásmido construido e IPTG como inductor y posteriormente se llevó a cabo una electroforesis (SDS-PAGE) para visualizar la proteína recombinante cuyo peso molecular es de 46 kDa.

Conclusiones. Se establecieron las condiciones de amplificación del gen *tdh* por medio de PCR. En ninguna de las cepas de *V. parahaemolyticus* de origen ambiental fue identificado el gen *tdh*, en las cepas de origen clínico si fue amplificado. Se corroboró la identidad del gen por medio de secuenciación y se clonó y expresó en el vector pET 100/D-TOPO

Bibliografía.

- Cabanillas-Beltrán, H., A. García y B. Gómez. 2005. Estudio de un Brote Epidemiológico de Gastroenteritis en Sur del Edo. de Sinaloa, México. Boletín Epid. CIAD. 14 (2)
- De Paola, A., J.L. Nordstrom, J.C. Bowers and D.W. Cook. 2003. Seasonal Abundance of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama Oysters. App. Environ. Microbiol. 69: 1521-1526.