

to de una prueba de detección del patógeno rápida, confiable y eficiente. Para lograr el objetivo mencionado se escogió la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa como la prueba ideal de detección.

## MATERIALES Y METODOS

### Recolección de muestras y extracción de ADN

Los ADNs de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. ovis* fueron extraídos de las bacterias inactivadas con calor y utilizadas como antígenos para las pruebas serológicas de diagnóstico. Las suspensiones bacterianas fueron centrifugadas brevemente a 6000 rpm y cada paquete celular resuspendido en 500  $\mu$ l de  $H_2O$  y precipitado por centrifugación nuevamente. Las bacterias fueron resuspendidas en 200  $\mu$ l de una solución conteniendo 2% Triton X, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 y mezclado con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). La suspensión se mezcló por 4 minutos, se le añadió 200  $\mu$ l de TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) y fué centrifugada a 10000 por 2 minutos. La fase acuosa fué extraída y el ADN precipitado por la adición de 2.5 vol de etanol salado (2 M CKI en 95% etanol) [Martínez-Soriano *et al.*, 1993]. El ADN fué posteriormente tratado con 3  $\mu$ l RNasa (10 mg/ml) en un volumen de 400  $\mu$ l.

El ADN de veinticinco vacas lecheras, radicadas en un rancho localizado en el municipio de Saltillo, Coahuila, fué extraído de muestras sanguíneas siguiendo la más comúnmente usada técnica basada en el uso de fenol-cloroformo [Herrman y Frischaut, 1987]. La concentración de los ADNs fué determinada por medio de lecturas al espectrofotómetro a una densidad óptica de 260 nm. Los ADNs extraídos fueron mantenidos a  $-20^{\circ}C$  hasta el momento de su procesamiento.

### Diseño de oligonucleótidos sintéticos

Con el objeto de determinar la secuencia nucleotídica de los iniciadores para ser usados en la prueba de RCP, fué necesario realizar una consulta electrónica en el Banco de genes GenBank versión 74 localizado en el International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (Trieste, Italia), utilizando la terminal electrónica de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) de la Facultad de Medicina de la UANL. Basándose en la secuencia obtenida de *Brucella abortus*, se diseñaron dos oligonucleótidos que fueron sintetizados y preparados por la compañía Biosynthesis, Inc.

### Reacción en cadena de la polimerasa

La RCP fué llevada a cabo en un volumen total de 50  $\mu$ l que contenía 250 ng de ADN, 25 pmol de cada iniciador, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 0.1% Triton-X 100, 3.0 mM  $MgCl_2$  y 200  $\mu$ M de cada uno de los cuatro deoxinucleótidos trifosfatados y 2.5 U de la polimerasa Taq (Promega, Inc.). Para prevenir la evaporación, la reacción fué cubierta por una capa de 50  $\mu$ l de aceite mineral estéril. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (MJ Research, Inc.) siguiendo un programa diseñado en nuestro laboratorio y denominado BRU-CELLA. Este programa dirigió una secuencia de eventos que se caracterizó por un paso a  $94^{\circ}C$  por 5 minutos seguido de 50 ciclos que consistían en  $94^{\circ}C$  por 1 minuto 30

segundos,  $60^{\circ}C$  por 45 segundos (en algunos experimentos la temperatura de anillamiento fué  $55^{\circ}C$  o  $50^{\circ}C$ ) y  $72^{\circ}C$  por 45 segundos. Una vez terminada la reacción, 5  $\mu$ l de cada una de las muestras fueron fraccionadas por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% preparado en TBE 1X (100 mM Tris-HCl, 90 mM ácido bórico, 1 mM  $Na_2EDTA$ ) que fué teñido con una solución de bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml). En algunas ocasiones fué necesario analizar los fragmentos producto de digestiones enzimáticas por medio de electroforesis en geles de 8% poliacrilamida conteniendo 8.3 M de urea.

### Análisis computacional de ADN

La determinación de las temperaturas medias de anillamiento de los iniciadores así como de los fragmentos esperados de la RCPs fué realizada utilizando el programa Amplify 1.0 para el sistema Macintosh [Engels, 1991]. Las comparaciones y alineamientos de ADN, efectuadas en el GenBank 74.0 fueron llevadas a cabo en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando el servicio electrónico BLAST 1.3 [Altschul *et al.*, 1990]. Los análisis computacionales del ADN y determinación de mapas de restricción fueron determinados utilizando el programa DNA Strider 1.01 [Marck, 1988] para el sistema Macintosh. La determinación del número de pares de bases de los fragmentos producto de las digestiones por enzimas de restricción fué obtenida utilizando el programa GelFragSizer para el sistema Macintosh [Gilbert, 1989].

## RESULTADOS Y DISCUSION

De las secuencias obtenidas del Banco de genes GenBank 74.0 para la especie *Brucella abortus*, se escogió un gen que codifica para una proteína de la membrana. Basándose en la región codificante de dicho gen, se escogieron dos áreas que al fungir como iniciadores en la RCP podrían amplificar un fragmento de ADN de 720 pares de bases.

En un experimento inicial se probaron los iniciadores descritos en RCPs enfocadas a detectar el fragmento de 720 pb en los genomas de *B. abortus* (cepa 19), *B. melitensis* y *B. ovis* determinándose que solamente el fragmento fué amplificado de *B. abortus* (ver figura 1). Tampoco fué observada ningún tipo de amplificación cuando se usaron ADNs de humano y *E. coli* como moldes. Lo anterior demuestra la especificidad de los iniciadores para *B. abortus*.

Con el objeto de determinar fácilmente la identidad de la región amplificada, ésta se analizó con el programa de cómputo DNA Strider 1.01 (para el sistema Macintosh), determinándose el mapa de restricción correspondiente que se muestra en la figura 1. Al utilizar el ADN amplificado como sustrato para las enzimas de restricción *EcoR* I, *Bgl* I, *Hinf* I, *Kpn* I, *Pvu* II, se encontró que el patrón electroforético de los fragmentos resultantes (figura 1) corroboraban el análisis determinado por el programa DNA Strider 1.01.

El análisis de restricción, la amplificación específica con *B. abortus* y la no amplificación con testigos negativos, con ADN de humanos, bovinos, *B. melitensis*, *B. ovis* y *Escherichia coli* demuestran, casi conclusivamente,