



PROTOCOLO DE IDENTIFICACIÓN DE SIMBIONTES *Trichomonasvirus (Tvv) en Trichomonas vaginalis*

Cerda-López, E.E.¹, Granados-Rodríguez, J.D.¹, Hernández-Ocampo, A.C.¹, Herrera-Guzmán, K.², Landín-Padilla, M.G.², Rodríguez-Díaz, M.E.² y Alva-Murillo, P.N.²

¹Lic. Químico Farmacéutico Biólogo, Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.

²Lic. en Biología Experimental, Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato. Tel. 473-732-0006 Ext. 8199 pn.alva@ugto.mx

A. Extracción de RNA (partiendo de un cultivo celular en suspensión), el procedimiento se hará para obtener 4 tubos de RNA en total.

1. Rescatar 1 mL de cultivo en cada uno de los 4 tubos para microcentrífuga.
2. Centrifugar a 1100 x g por 7 min a temperatura ambiente.
3. Remover el medio por aspiración y resuspender el pellet en 1 mL de PBS frío.
4. Centrifugar nuevamente (conservando los parámetros previamente establecidos). Remover el PBS por aspiración.
5. Añadir 0.7 mL de solución D.
6. Homogenizar las células con un vórtex durante 15 a 30 s a temperatura ambiente.
7. Agregar 0.1 mL de acetato de sodio 2 M (pH = 4.0), 1 mL de fenol y 0.2 mL de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1). Mezclar el contenido del tubo delicadamente por inversión.

MATERIALES Y REACTIVOS:

- ✓ Tubos para microcentrífuga estériles de 2 mL
- ✓ Micropipetas
- ✓ Puntas estériles para micropipeta
- ✓ Cloroformo:alcohol isamílico (49:1)
- ✓ Etanol absoluto
- ✓ Isopropanol
- ✓ Fenol
- ✓ Tampón fosfato salino (PBS)
- ✓ Acetato de sodio (2 M, pH = 4)
- ✓ Solución D: 4 M tiocianato de guanidino, 25 mM citrato de sodio hidratado, lauril sarcosinato de sodio al 0.5% (p/v).



8. Llevar a vórtex durante 10 ss cada uno. Luego incubar por 15 min en hielo (para permitir la disociación completa de complejos núcleo-proteicos).
9. Centrifugar los tubos a 10,000 x g por 20 min a 4°C y luego transferir la fase acuosa a otra serie de tubos (esta fase contiene el RNA). Para evitar contaminación por DNA, es importante evitar tomar producto de la parte inferior de la fase acuosa.
10. Añadir 1 mL de isopropanol. Mezclar la solución por inversión y reposar la solución por 1 h a -20°C para que el RNA precipite.
11. Colectar el precipitado por centrifugación a 10,000 x g por 30 min a 4°C.
12. Decantar cuidadosamente el isopropanol y disolver la pastilla de RNA en 0.2 mL de solución D.
13. Mezclar en vórtex y nuevamente añadir 1 mL de isopropanol. Dejar reposar por 1 h a -20°C.
14. Colectar el precipitado nuevamente por centrifugación a máxima velocidad durante 10 min a 4°C. Lavar la pastilla dos veces con etanol al 75% (en agua con inhibidor de RNAsa o DEPC); centrifugar nuevamente por 5 min y remover el etanol remanente con una micropipeta. Dejar el tubo abierto por unos segundos hasta que el etanol se evapore completamente.
15. Añadir 100 µL de agua desionizada tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y almacenar a -70°C.



B. Determinación del ARN vírico por RT-PCR (empleando el kit RT-PCR de Promega).

1. En 9 tubos para microcentrífuga estériles de 0.5 mL previamente rotulados, montar la siguiente reacción en hielo:

Componente	Volumen
Agua libre de nucleasas	30 μ L
Buffer de reacción AMV/ <i>Tfl</i> 5X	10 μ L
dNTPs (10 mM cada dNTP)	1 μ L
Oligo directo para TVV I-4 / 1 μ M (ANEXO 1)	1.5 μ L
Oligo reverso para TVV I-4 / 1 μ M (ANEXO 1)	1.5 μ L
MgSO 25 mM	2 μ L

2. Mezclar suavemente con la micropipeta y luego añadir 1 μ L de la transcriptasa reversa AMV (0.5 μ M) y 1 μ L de DNA polimerasa *Tfl* (0.5 μ M) .
3. Mezclar en vórtex por 10 s. Se recomienda que todo se lleve a cabo en un sistema frío y que se utilicen puntas de pipeta diferentes para cada uno de los 4 tubos, de manera tal que se disminuya el riesgo de contaminación cruzada.
4. Añadir, 2 μ L del templado de RNA (100 ng/mL) previamente obtenido en los tubos 5 a 8. Los tubos 1 a 4 serán los controles, positivos por lo que se agregará el RNA previamente aislado e identificado como parte de TVV I- 4, mientras que el tubo 9 será el control negativo, al cual se le agregará 1 μ L de agua estéril.
5. Sellar la reacción con una o dos gotas de aceite mineral libre de nucleasas para prevenir la condensación y evaporación.
6. Efectuar la reacción de amplificación bajo las siguientes condiciones:



Ciclo	Tiempo	Temperatura	Fenómeno
1	45 minutos	45°C	Transcripción reversa
1	2 minutos	94°C	Inactivación de retrotranscriptasa y desnaturalización del primer

Una vez obtenido el cDNA, se lleva a cabo el procedimiento de una PCR convencional, se describe el procedimiento con el Kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase (M829).

7. En tubos para microcentrífuga de 0.25 mL montar la siguiente reacción, en hielo:

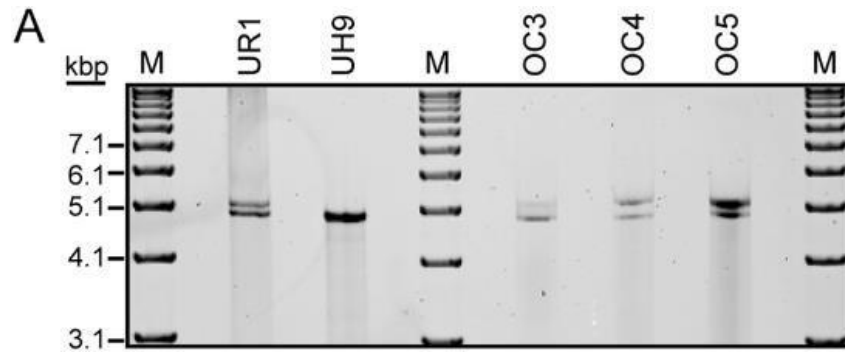
Componente	Volumen
GoTaq® Flexi Buffer	10 µL
Solución de MgCL ₂ 25mM	3.5 µL
Deoxi-NTPs (0.2 mM cada dNTP)	5 µL
Oligo directo para TVV I – 4 / 1 µM (ANEXO 2)	1 µL
Oligo reverso para TVV I – 4 / 1 µM (ANEXO 2)	1 µL
Buffer 10X Vent DNA pol	5 µL
GoTaq® DNA polimerasa (5 U/µL)	0.5 µL
cDNA	1 µL
Agua estéril libre de nucleasas	23 µL



8. Efectuar la reacción de amplificación bajo las siguientes condiciones:

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	40 s	35 ciclos
Alineamiento	70°C	40 s	
Extensión	72°C	110 s	
Final de la extensión	72°C	5 min	1 ciclo
Almacenaje	4°C	Indefinido	1 ciclo

9. Separar los productos de la PCR en un gel de agarosa al 1% durante toda la noche, luego teñir con bromuro de etidio y visualizar.



B

TVV1:	+	+	+	+	+
TVV2:	+	-	+	-	+
TVV3:	+	-	+	-	+
TVV4:	-	-	+	+	+

En la imagen (A) se observan las bandas de RNA en 5 muestras distintas de *T. vaginalis*; M es el marcador de ADN (TrackIt 1-kb ladder de Invitrogen). En la imagen B se resumen los resultados del gel (Goodman, et al. 2011).



Referencias.

- ✓ Green, M. R., Hughes, H., Sambrook, J., & MacCallum, P. (2012). Molecular cloning: a laboratory manual. In Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 1 (Protocol 1, 7.4).
- ✓ Jehee, I., van der Veer, C., Himschoot, M., Hermans, M., & Bruisten, S. (2017). Direct detection of *Trichomonas vaginalis* virus in *Trichomonas vaginalis* positive clinical samples from the Netherlands. *Journal of virological methods*, 250, 1-5.
- ✓ Goodman, R. P., Freret, T. S., Kula, T., Geller, A. M., Talkington, M. W., Tang-Fernandez, V., ... & Nibert, M. L. (2011). Clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* concurrently infected by strains of up to four *Trichomonasvirus* species (Family Totiviridae). *Journal of virology*, 85(9), 4258-4270.

PROTOCOLO DE IDENTIFICACIÓN DE SIMBIONTES *Mycoplasma hominis* en *Trichomonas vaginalis*

Partiendo de un cultivo de *T. vaginalis* en agar diamond, se realiza el siguiente procedimiento para la identificación de *M. hominis* (simbionte de *T. vaginalis*; reside dentro del protozoo)

1. Tomar 1 mL del medio de cultivo Diamond inoculado previamente con *T. vaginalis*.
2. Centrifugar a 350 x g durante 15 min.
3. Filtrar el sobrenadante a través de una membrana de 0.45 μm de nitrato de celulosa.
4. Inocular en caldo SP4 (Agar para micoplasma/ureaplasma).
5. Incubar a 37°C hasta observar la aparición de colonias detectables en la superficie del agar (de 3 a 4 días).

MATERIALES Y REACTIVOS:

- ✓ Tubos para microcentrífuga estériles de 2 mL
- ✓ Micropipetas
- ✓ Puntas estériles para micropipeta
- ✓ Asa microbiológica.
- ✓ Agar diamond
- ✓ Agar SP4
- ✓ Microscopio estereoscópico.



ANEXOS

Anexo 1. Oligonucleótidos directos y reversos para TVV I – 4 en RT-PCR.

Identificación	Tamaño de genoma	Primer	Secuencia 5' - 3'	Posición del gen en 5'	Tamaño del amplicón (pb)
TTV – 1	4657	Directo	ATTAGCGGTGTTTGTGATGCA	2824	592
		Reverso	CYCCTGGTGACAYTATTGCT	3415	
TTV – 2	4674	Directo	TTCCAGATGGCGATGAGC	1762	517
		Reverso	CGAGGATGTGGCACGAATA	2278	
TTV – 3	4842	Directo	GCAAAATTAATCAACACCTCCTG	55	443
		Reverso	TTGCAGATCACTTTGTGTGTC	497	
TTV – 4	4944	Directo	CTCTCGCTCCTCCAATACT	1162	772
		Reverso	TCGAGGAGTTGGTGTCTT	1933	

Tomado de: Jehée, I., van der Veer, C., Himschoot, M., Hermans, M., & Bruisten, S. (2017). Direct detection of Trichomonas vaginalis virus in Trichomonas vaginalis positive clinical samples from the Netherlands. *Journal of virological methods*, 250, 1-5.

Anexo 2. Oligonucleótidos directos y reversos para TVV I – 4 en PCR.

Identificación	Tamaño de genoma	Primer	Secuencia 5' - 3'	Posición del gen en 5'	Tamaño del amplicón (pb)
TTV – 1	4657	Directo	GCAARCTRGARCACGGCAAG	3284	99
		Reverso	CCATCCTGWCTCGAAGAGCTT	3384	
TTV – 2	4674	Directo	TCAACCGCTTCCAYGATCC	1931	291
		Reverso	TCTCATCGAGTGGAGCATC	2221	
TTV – 3	4842	Directo	TAGCGTGAGCTCAGCACGTT	215	154
		Reverso	AGCTGACATACCGTTGCACG	368	
TTV – 4	4944	Directo	AAGCCTCACGCAATGTC	1591	262
		Reverso	ATTCCCAATAGTTATCAGG	1852	

Tomado de: Jehée, I., van der Veer, C., Himschoot, M., Hermans, M., & Bruisten, S. (2017). Direct detection of Trichomonas vaginalis virus in Trichomonas vaginalis positive clinical samples from the Netherlands. *Journal of virological methods*, 250, 1-5.