

CLONAJE DE FRAGMENTOS DE ADN DE *Plasmodium falciparum* Y SU POSIBLE USO EN EL DIAGNOSTICO DE LA MALARIA*

por

Fernando Angel-Sánchez, Ana Elizabeth López-Salazar
y Hernán Acosta-Díaz

Resumen

Angel, F., López, A. & H. Acosta: Clonaje de fragmentos de ADN de *Plasmodium falciparum* y su posible uso en el diagnóstico de la malaria. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 17 (66): 531-541, 1990. ISSN 0370-3908.

Se establece la biblioteca genómica de ADN total en la cepa FCB-1, plásmido pUC 18 mediante clonación de fragmentos. El máximo nivel de detección obtenido es de 0.1 ng equivalente a 1 000 parásitos por muestra de sangre infectada; dicho nivel permite su utilización como herramienta en el desarrollo de métodos para el diagnóstico de la malaria en Colombia.

Introducción

A pesar de las grandes medidas de control que han sido tomadas, la malaria continúa siendo una enfermedad de alta incidencia en el mundo (1). El incremento en la resistencia a las drogas por parte del parásito y a los insecticidas por parte del insecto transmisor han contribuido al crecimiento de la enfermedad, la cual afecta entre 200 y 400 millones de personas, matando por lo menos a un millón de ellas anualmente (2).

En los países tropicales en desarrollo, la malaria representa uno de los mayores problemas de salud, ya que el 30% de sus habitantes viven en zonas de riesgo y por consiguiente con posibilidades de adquirir la enfermedad (3). En Colombia la enfer-

medad tiene alta incidencia en los Llanos Orientales y parte de la Amazonia; en el occidente la región más afectada es el Chocó y en el sur el Putumayo, todas éstas regiones caracterizadas por clima cálido y húmedo. En la actualidad el diagnóstico es de unos cien mil casos al año, siendo una valoración baja debido al subregistro en el sistema nacional de salud (4).

Actualmente en todo el mundo se llevan a cabo inmensos esfuerzos para tratar de desarrollar vacunas usando proteínas nativas del parásito (5-10) y péptidos sintéticos (11-16), involucradas posiblemente en protección inmune y que inicialmente fueron localizadas e identificadas por medio de anticuerpos monoclonales (17-23). Un camino promisorio para lograrlo ha sido el uso de la tecnología del ADN recombinante, que nos permite clonar y expresar genes del parásito en *Escherichia coli* u otro organismo fácil de cultivar (24-28).

Otra de las aplicaciones prometedoras en cuanto al uso de la tecnología del ADN recombinante se

* Trabajo ganador del "Premio Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 1988", convocado en el área de Biotecnología. La investigación fue realizada en el Instituto Nacional de Salud bajo la dirección del Dr. Moisés Wasserman L.

relaciona con el diagnóstico de la enfermedad. Desde que Laveran descubrió el parásito causante de la malaria, el diagnóstico se ha realizado por examen directo de muestras de sangre en el microscopio; este método aunque laborioso es sensible y específico, ya que mediante su uso es posible diferenciar las distintas especies de *Plasmodium*, parásito causante de la enfermedad.

Recientemente se han desarrollado métodos inmunológicos de diagnóstico como el ELISA, el cual detecta los anticuerpos dirigidos contra el parásito (29). Sin embargo, este método no diferencia entre infecciones presentes y posinfecciones, debido a que detecta los anticuerpos circulantes dirigidos contra el parásito, los cuales, persisten a pesar de la desaparición de parásitos en la sangre.

También ha sido desarrollado otro método, el cual detecta el antígeno del parásito; dicho método es útil para detectar infecciones presentes pero los anticuerpos presentes debido, a una infección pasada interfieren con el ensayo (30).

Como se dijo antes, por más de un siglo el diagnóstico de la malaria se ha realizado por examen directo de muestras de sangre en el microscopio. Sin embargo, esta técnica es laboriosa e ineficiente cuando se quieren realizar investigaciones epidemiológicas a gran escala en zonas endémicas y más cuando el número de parásitos presentes en la sangre es muy bajo. Por ejemplo, para detectar una parasitemia de 0,001% ó 50 parásitos por microlitro (asumiendo 5×10^6 eritrocitos/ul), un microscopista debe rutinariamente gastar 30 minutos leyendo un extendido (31). Este nivel de sensibilidad puede ser mejorado a una parasitemia de 0,0002% (10 parásitos/ul) examinando 100 campos de una gota gruesa, con el inconveniente de que se puede perder durante la preparación hasta el 20% de los parásitos (31, 32). Además, los análisis directos de muestras de sangre en el microscopio son subjetivos, ya que dependen en gran parte de la laboriosidad y experiencia del técnico o microscopista que examina la muestra (33).

La tecnología del ADN recombinante proporciona alternativas para el diagnóstico de la malaria y su uso permitiría procesar muchas muestras provenientes del campo y de zonas rurales apartadas, posibilitando llevar a cabo estudios epidemiológicos y evaluaciones de los programas de control de la enfermedad. Este método se basa en la detección directa del ADN del parásito por hibridación molecular. Recientemente varios grupos de investigadores usando como sonda fragmentos de ADN del parásito, han llegado a niveles de detección comparables a los obtenidos mediante la gota gruesa (34-37).

Con el fin de desarrollar en un futuro cercano dicho método de diagnóstico en Colombia, se construyó una biblioteca genómica de una cepa colombiana de *Plasmodium falciparum* especie que ha resultado la más letal y la que causa mayor morbilidad en el hombre, razón por la cual la lucha contra la enfermedad se ha centrado principalmente en él.

La biblioteca genómica del parásito fue construida en el plásmido pUC18 y las bacterias recombinantes se seleccionaron inicialmente por su diferente actividad beta-galactosidasa. Posteriormente, los fragmentos clonados se seleccionaron por hibridación y ocho de los que hibridaron más fuertemente fueron escogidos y analizados por electroforesis e hibridación en "dot-blot" y en "Southern". El nivel de detección de cada fragmento analizado fue evaluado por hibridación con ADN puro del parásito.

Los fragmentos clonados, podrán ser en un futuro cercano ensayados para determinar su uso en el diagnóstico tanto en muestras de sangre, como en mosquitos infectados, además de convertirse en un material muy útil para llevar a cabo estudios sobre la biología molecular del parásito.

Los fragmentos clonados, podrán ser en un futuro cercano ensayados para determinar su uso en el diagnóstico tanto en muestras de sangre, como en mosquitos infectados, además de convertirse en un material muy útil para llevar a cabo estudios sobre la biología molecular del parásito.

Materiales y Métodos

Cultivo in vitro del *Plasmodium falciparum*

La cepa colombiana FCB-1 de *Plasmodium falciparum* (38, 39) se cultivó según el método establecido por Trager y Jensen (40, 41) en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero humano tipo O (+), tampón hepes 25 mM pH 7, 4, NaHCO_3 32 mM, hipoxantina 0,2 mM, glutatión reducido 1 ug/ml y gentamicina 50 ug/ml. Una suspensión de eritrocitos humanos O (+) fue agregada a una concentración final de 5% (V/V); los leucocitos fueron eliminados mediante lavados sucesivos con ficoll-paque (Pharmacia). El crecimiento fue iniciado por inoculación de eritrocitos parasitados con una parasitemia final del 1% y el cultivo se mantuvo a 37°C en cámaras de incubación herméticas bajo una atmósfera de CO_2 5%, O_2 5%, N_2 90%. La parasitemia se evaluó por conteo de los parásitos en 10.000 eritrocitos en extendidos coloreados con Giemsa y se expresó como porcentaje. El medio de cultivo fue cambiado diariamente hasta que se obtuvieron altas parasitemias (10%); el recuento de leucocitos mostró menos de 1 leucocito por 150.000 eritrocitos parasitados.

Preparación de parásitos libres

Las células fueron lavadas tres veces con SSC (NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M), suspendidas en 20 volúmenes de una solución estéril de SSC contenido 0,1% de saponina e incubadas durante 20 min. a 4°C. Los parásitos libres y las células no lisadas fueron recuperadas por centrifugación y tratadas una vez más con saponina. El precipitado final

obtenido que contiene los parásitos libres fue lavado tres veces con SSC y guardado a -70°C .

Extracción del ADN de *Plasmodium falciparum*

Los parásitos libres fueron lisados en un tampón 10 mM Tris-HCl pH 8,0 conteniendo EDTA 0,1 M y SDS 1% (P/V) a 65°C durante 5 min. El lisado fue digerido por una hora a 37°C con RNasa A en una concentración final de 50 ug/ml y posteriormente con Proteinasa K (Merck Co.) en una concentración final de 100 ug/ml durante una hora a 50°C . El ADN fue extraído dos veces con un vol. de fenol, una vez con una mezcla fenol-cloroformo y finalmente una vez con un vol. de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, v/v). El ADN fue precipitado con dos vol. de etanol absoluto a -20°C . durante una noche. Posteriormente el ADN fue recuperado por centrifugación a 10.000 xg durante 30 min. a 4°C y el precipitado obtenido se dejó secar y se disolvió en TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4; EDTA 1mM). La cantidad final obtenida de ADN fue evaluada por lectura a 260 nm en un espectrofotómetro Shimadzu U.V. 260.

Extracción del ADN humano

Para la extracción del ADN humano se siguió el método anteriormente descrito (42). Los leucocitos fueron inicialmente lisados a 4°C en un tampón 10mM Tris-HCl pH 7,5 conteniendo sucrosa 0,35 M, MgCl_2 5 mM y Tritón X-100 1%. Los núcleos fueron recuperados por centrifugación a 1.000 xg durante 10 min. y disueltos en un tampón que contiene NaCl 0,075 M, EDTA 0,024 M, SDS 5% adicionado con Proteinasa K (conc. final 2mg/ml). Los núcleos fueron lisados a 37°C durante 12 horas y posteriormente el ADN fue extraído una vez con fenol y dos veces con cloroformo-alcohol isoamílico. La fase acuosa fue recuperada y precipitada con dos vol. de etanol. El ADN se recuperó por centrifugación y la cantidad obtenida fue evaluada de la misma forma que el ADN del parásito.

Extracción y purificación del plásmido pUC 18

El plásmido pUC18 es un vector de clonación de 2686 pb que se caracteriza principalmente por poseer un gen que le confiere resistencia al antibiótico ampicilina, además de los genes de la región reguladora (promotor y operador) y el gen lac z del operon LAC, genes necesarios para la síntesis de la enzima beta-galactosidasa (43). La región reguladora y el gen lac z, están separados por el sitio de clonaje múltiple del bacteriófago M13mp18, el cual presenta una secuencia de 51 pb que le confiere trece sitios de corte únicos para trece diferentes enzimas de restricción (44, 45).

El plásmido pUC18 fue extraído de la bacteria *Escherichia coli* JM83 (46), usando el método de lisis alcalina (47, 48). La bacteria fue cultivada en el medio TB suplementado con ampicilina (25

ug/ml) (49), a 37°C con una agitación de 220 rpm; una vez la densidad óptica del cultivo a 600 nm llegó a 0,8 el plásmido fue amplificado con cloranfenicol (conc. final 200 ug/ml) durante 14 horas. Las bacterias fueron centrifugadas a 500 xg durante 20 min. a 4°C y el precipitado resultante se disolvió en un tampón de lisis (25mM Tris-HCl pH 8,0; EDTA 10mM, glucosa 50 mM) suplementado con lizozima (conc. final 2 mg/ml). Las bacterias fueron incubadas a 4°C durante 30 min con agitación suave y posteriormente se adicionó una solución compuesta de NaOH 0,2N, SDS 1% y se agitó enérgicamente durante 5 min. El ADN bacteriano fue eliminado en gran parte por adición de tampón acetato de potasio 3M pH 4,8 frío y por incubación a 4°C durante 60 min. El lisado se centrifugó a 1.000 x g durante 30 min. a 4°C y el sobrenadante que contiene el ADN plasmídico fue recuperado y precipitado con 0,6 vol. de isopropanol a temp. ambiente durante 15 min; el ADN extraído fue centrifugado a 5.500 xg durante 30 min a 4°C y disuelto en TE. Finalmente, el ADN plasmídico fue purificado mediante un gradiente de cloruro de cesio (densidad inicial: 1,5846 g/cm³) a 20°C en un rotor 65 Ti Beckman a 45000 rpm durante 14 horas (50).

Clonación

El ADN plasmídico y el ADN del parásito fueron digeridos con la enzima de restricción Eco RI (Pharmacia) a 37°C . Una vez linearizado el plásmido, 5 ug fueron defosforilados con 0,05 unidades de la enzima fosfatasa alcalina a 37°C durante una hora, en presencia del tampón recomendado (0,5 M Tris-HCl pH 8,0; MgCl_2 10 mM, ZnCl_2 1 mM espermidina 10mM)(51-52). Las enzimas fueron eliminadas mediante extracciones con fenol-cloroformo y cloroformo. Los fragmentos de ADN del parásito obtenidos por digestión con la enzima Eco RI fueron ligados al plásmido mediante la acción de la enzima ADN ligasa del fago T4; la reacción de ligación se llevó a cabo a una concentración de 50 ug/ml de ADN a ligar en un tampón (0,5 M Tris-HCl pH 7,4; MgCl_2 0.1 M, ditiotreitol 0,1 M, espermidina 10 mM, ATP 10 mM, BSÁ 1 mg/ml) durante 16 horas a 12°C ; 0,1 unidades de la enzima ADN ligasa fueron usadas para ligar 1 ug de ADN.

El ADN recombinado obtenido por ligación se purificó por extracción fenólica y se utilizó para transformar células competentes *Escherichia coli*, cepa JM83, las cuales habían sido preparadas siguiendo el procedimiento descrito por Hanahan (53). 10 ng de ADN recombinante fueron usados para llevar a cabo cada ensayo de transformación.

Selección de las células transformadas

La expresión del operon LAC en un medio de cultivo se mide mediante el uso de indicadores. El indicador más sensitivo para medir la síntesis de la beta-galactosidasa en un medio sólido es el sustrato cromogénico X-gal (5-bromo-4-cloro-indolil-beta-D-

galactósido). Este compuesto incoloro forma un color azul insoluble cuando es hidrolizado, de tal forma que en un medio con agar que contenga X-gal, las bacterias que expresan beta-galactosidasa forman colonias azules, mientras que bacterias que contengan el gen lac z sin sentido o una fase de lectura del gen desplazado producen colonias incoloras (44). De esta forma es posible distinguir entre células transformadas con plásmido recombinante (colonias incoloras) y células transformadas con plásmido no recombinante (colonias azules).

Volúmenes de 0,1 ml de células transformadas fueron sembradas en placas de agar LB adicionado con ampicilina, IPTG como inductor y X-gal (44). Las colonias blancas fueron seleccionadas y sembradas en LB con ampicilina. Una vez crecidas, las colonias seleccionadas fueron transferidas sobre un filtro de nylon Hybond-N (Amersham), lisadas y su ADN denaturado con una solución NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M, neutralizadas en una solución 0,5 M Tris-HCl pH 7,2 NaCl 1,5 M, lavadas con 2xSSC y finalmente el ADN liberado fue fijado al filtro para posteriores hibridaciones "in situ" (54, 55).

Electroforesis y transferencia sobre filtro

Los plásmidos recombinados fueron extraídos y purificados por el método de lisis alcalina como se describió anteriormente. Cada plásmido recombinante fue digerido con la enzima Eco RI y los fragmentos generados por la digestión fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Los fragmentos separados fueron transferidos sobre filtro de nylon Hybond-N según el método de Southern (56). El ADN fue desnaturalizado, neutralizado, transferido y fijado sobre el filtro.

Igualmente los plásmidos recombinantes sin digerir fueron sembrados sobre filtro de nylon y tratados para posteriores hibridaciones en "dot-blot" (57, 58).

Hibridación

El ADN de las colonias bacterianas, como el de los plásmidos recombinantes sin digerir y digeridos, fueron hibridados con ADN total del parásito y con ADN humano marcados radiactivamente según el método descrito (59). El ADN usado como sonda, fue marcado con 32 PdATP (actv. especific. 3 000 Ci/mmol; Amersham) obteniendo ADN marcado con una alta actividad específica (3×10^8 cpm/ug). Los filtros fueron prehibridados y posteriormente hibridados a 65°C durante 16 horas en una solución 6xSSC -5xDenhardt- 0,5% SDS. Los filtros fueron lavados 2 veces durante un min. con 6xSSC -0,1% SDS y tres veces durante 15 min. con 2xSSC -0,1% SDS, secados y puestos en contacto con una película fotográfica (Hyperfilm-MP, Amersham).

Resultados

Una biblioteca genómica de ADN total del parásito *Plasmodium falciparum*, cepa colombiana FCB-1, fue construida. Los parásitos fueron cultivados "in vitro" y el ADN del parásito fue extraído, purificado y usado para construir la biblioteca; el ADN fue digerido con la enzima Eco RI y clonado mediante el plásmido pUC18 en la bacteria *E. coli*, cepa JM83.

Ensayos de transformación

Las células competentes fueron transformadas con diferentes ADNs recombinados y con ADNs no recombinados, los cuales fueron usados como control. El conjunto de resultados obtenidos se muestra en la siguiente Tabla.

TABLA 1

| ADN transformante | células/ug de ADN β -gal (+) β -gal (-) | | porcentaje de β -gal (-) |
|-------------------------------|--|-------------------|-----------------------------------|
| plásmido pUC18 | $1,0 \times 10^8$ | — | |
| vector cortado | $2,0 \times 10^3$ | — | |
| vector religado | $1,0 \times 10^6$ | — | |
| vector defosforilado | $1,4 \times 10^3$ | — | |
| vector defosforilado religado | $4,4 \times 10^4$ | $0,2 \times 10^3$ | 4,3% |
| Recombinados | | | |
| vector: inserto | | | |
| 2: 1 | $2,2 \times 10^4$ | $1,2 \times 10^4$ | 35,3% |
| 1: 1 | $1,7 \times 10^4$ | $2,5 \times 10^4$ | 59,5% |
| 1*: 2 | $1,8 \times 10^4$ | $3,4 \times 10^4$ | 65,4% |
| 1: 4 | $1,4 \times 10^4$ | $2,2 \times 10^4$ | 61,1% |
| 1: 8 | $1,2 \times 10^4$ | $1,7 \times 10^4$ | 58,6% |

El título de las células competentes con el plásmido pUC18 fue de 1×10^8 células transformadas por micrograma de ADN. Los controles de transformación usando vector cortado, vector cortado-religado, vector defosforilado y vector defosforilado-religado dieron los resultados esperados.

Se ensayaron cinco proporciones diferentes entre vector e inserto de recombinados, con el fin de evaluar cinco grupos independientes de ADN recombinante; los cinco recombinantes se usaron para transformación y se determinó el número de células beta-galactosidasa (-) y beta-galactosidasa (+).

El ADN recombinante que produjo mayor número de células recombinantes beta-galactosidasa (-) fue el recombinante en el cual se usó el doble de cantidad de inserto que de vector (vector 1: inserto 2). Usando dicho recombinante se obtuvieron 65,4% de bacterias recombinantes (Tabla 1). Con 10 ng de ADN recombinante usados para transformación, se obtuvieron $3,4 \times 10^2$ bacterias recombinantes lo cual corresponde a $3,4 \times 10^4$ bacterias recombinantes por micrograma de ADN recombinante. Con base en los resultados obtenidos se decidió

usar dicho recombinante el cual produjo el más alto porcentaje de bacterias recombinantes (Tabla 1).

Selección por hibridación de las bacterias recombinantes

Con el fin de verificar si las bacterias beta-galactosidasa (-) poseen un plásmido recombinante, fueron hibridadas con ADN total del parásito. Mil colonias independientes fueron transferidas sobre un filtro de nylon, tratadas como se describió anteriormente e hibridadas a 65°C con ADN del parásito marcado radiactivamente. Todas las colonias dieron señal positiva pero la intensidad de hibridación fue diferente; mientras que unas colonias mostraron señales tenues de hibridación, otras hibridaron fuertemente (Fig. 1).

Ocho de las colonias que hibridaron fuertemente fueron escogidas para realizar estudios posteriores.



Figura 1. Autoradiografía donde se señalan algunas de las colonias recombinantes seleccionadas para realizar estudios posteriores. Las colonias fueron escogidas con base en su fuerte hibridación con ADN del parásito marcado radiactivamente.

Análisis de los plásmidos recombinantes

El plásmido no recombinado y los plásmidos recombinantes de las ocho colonias escogidas fueron extraídos por el método de lisis alcalina y finalmente purificados en gradiente de cloruro de cesio. El gradiente de cloruro de cesio nos permitió separar el ADN plasmídico del ADN bacteriano y del ARN (Fig. 2).

La banda correspondiente al ADN plasmídico fue recuperada y posteriormente el plásmido fue digerido con la enzima de restricción Eco RI. La pureza del plásmido no recombinado, su peso molecular y la eficiencia de la digestión fueron verificados mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Fig. 3).

Los resultados mostraron que el plásmido obtenido por el método usado está libre de contami-

nación de ADN bacteriano y ARN demostrando su alta pureza. Como se esperaba, los ensayos de digestión indicaron que el peso molecular del plásmido linearizado es de 2,7 kb demostrando la integridad del plásmido. Una hora de digestión fue suficiente para digerir un microgramo del plásmido puro con 10 unidades de la enzima Eco RI, mientras que 5 horas de digestión bajo las condiciones usadas no degradaron el ADN plasmídico (Fig. 3).

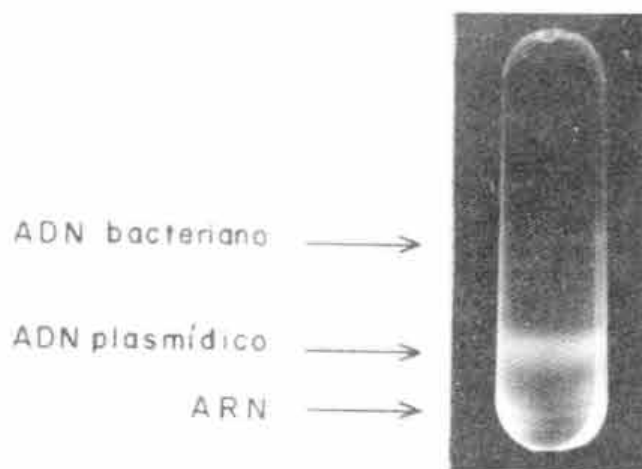


Figura 2. Gradiente de cloruro de cesio visualizado bajo luz ultravioleta. Se observan las bandas correspondientes al ADN plasmídico y al ADN bacteriano. El ARN se localiza en el fondo del gradiente.

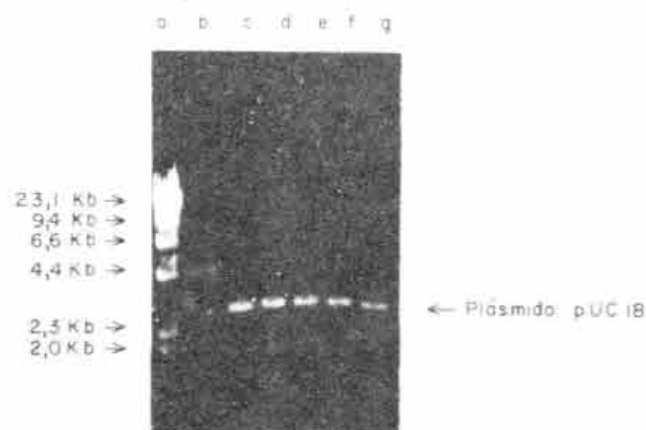


Figura 3. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% del plásmido pUC18 purificado en gradiente de cloruro de cesio. El plásmido fue digerido con la enzima Eco RI.

- ADN de lambda digerido con Hind III usado como marcador de peso molecular.
- pUC18 sin digerir.
- pUC18 digerido durante una hora.
- pUC18 digerido durante dos horas.
- pUC18 digerido durante tres horas.
- pUC18 digerido durante cuatro horas.
- pUC18 digerido durante cinco horas.

Los pesos moleculares son expresados en kilobases (10^3 bases).

De la misma forma, fueron analizados los ocho plásmidos recombinantes antes y después de la di-

gestión (Fig. 4). Los plásmidos fueron digeridos con la enzima Eco RI y los fragmentos generados por la digestión fueron resueltos por electroforesis (Figura 4b).

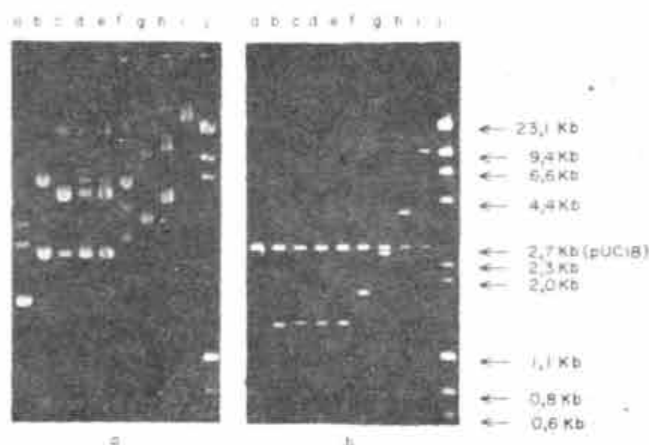


Figura 4. Electroforesis de los plásmidos recombinantes sin digerir a); y digeridos b).

- a: plásmidos sin digerir donde se observan los diferentes grados de enrollamiento.
- b: plasmidos digeridos con la enzima Eco RI donde se observan el plásmido pUC18 y el inserto correspondiente.
- a. pUC18
- b. clon 8R
- c. clon 38R
- d. clon 174B
- e. clon 79B
- f. clon 1R
- g. clon 6R
- h. clon 25R
- i. clon 4R
- j. marcador de peso molecular (lambda-HindIII/0X174-Hinc II).

Cada uno de los recombinantes presentó un inserto, los cuales mostraron diferentes tamaños oscilando entre 1,3 kb y 10 kb. Cuatro de ellos mostraron un tamaño similar (Fig. 4b, carriles b, c, d, e). El inserto más grande (carril i) es de aproximadamente 10 kb mientras que el más pequeño mide 1,3 kb, observándose además insertos de 1,8 kb, (carril f), 2,5 kb (carril g) y 4,2 kb (carril h).

En conclusión cada uno de los ocho plásmidos analizados poseé inserto el cual puede ser separado del plásmido por digestión por enzima Eco RI.

Determinación de la especificidad de los fragmentos clonados por hibridación en punto "Dot-blot"

Una vez comprobado por electroforesis en gels de agarosa que cada uno de los plásmidos procedentes de los clones seleccionados posee inserto, se determinó su especificidad por la técnica de "dot-blot" hibridando cada plásmido recombinante con ADN del parásito y con ADN humano.

Cien ng de cada plásmido recombinante fueron desnaturalizados, neutralizados e hibridados con ADN total de *P. falciparum* y con ADN huma-

no. Los resultados de hibridación usando la técnica de "dot-blot" mostraron que los ocho plásmidos recombinantes hibridan con ADN total del parásito (Fig. 5a), pero no lo hacen con ADN humano (Fig. 5b), lo que indica que los fragmentos clonados son específicos del parásito. Las señales de hibridación del plásmido pUC18 y del ADN del fago lambda fueron negativas con ambas sondas.

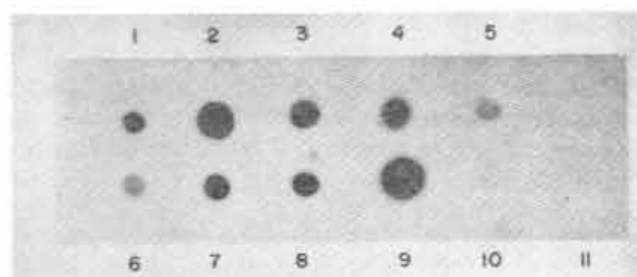


Figura 5a. Hibridación en punto "dot-blot" de los ocho plásmidos recombinantes con ADN total del parásito. 1) 1R, 2) 4R, 3) 25R, 4) 38R, 5) 6R, 6) 8R, 7) 174B, 8) 79B, 9) ADN del parásito usado como control, 10) pUC18, 11) ADN de lambda. Los ocho plásmidos recombinantes y el ADN del parásito dieron señal positiva de hibridación.

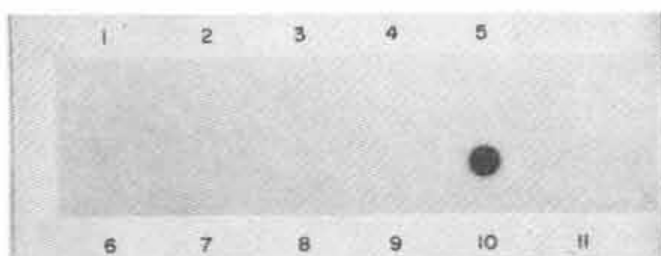


Figura 5B. Hibridación en punto "dot-blot" de los ocho plásmidos recombinantes con ADN humano. 1) 1R, 2) 4R, 3) 25R, 4) 38R, 5) 6R, 6) 8R, 7) 174B, 8) 79B, 9) pUC18 10) ADN humano usado como control, 11) ADN de lambda. Ninguno de los plásmidos recombinantes hibridó con ADN humano.

Caracterización de los fragmentos clonados hibridación en "Southern"

Con el fin de verificar la especificidad de los fragmentos clonados, los plásmidos recombinantes fueron digeridos con la enzima de restricción Eco RI, transferidos sobre filtro de nylon e hibridados siguiendo la técnica descrita por Southern.

La eficiencia de cada transferencia se verificó por tinción del gel con bromuro de etidio antes y después de la transferencia (Fig. 6). Los resultados mostraron la diferente intensidad de las bandas de ADN, demostrando que la mayoría de ADN presente en el gel fue transferida sobre el filtro.

Los fragmentos clonados transferidos sobre filtro de nylon fueron hibridados con ADN del parásito y con ADN humano marcados radiativamente. Los resultados de hibridación indicaron que ninguno de los insertos hibridó con ADN humano, mientras que los ocho insertos hibridaron con ADN del parásito (Fig. 7), siendo la intensidad de la hi-

bridación variable, ya que unos fragmentos mostraron fuerte hibridación (Fig. 7, carriles c', g', h', i') mientras que otros hibridaron levemente (Fig. 7, carriles a', b', d', f').

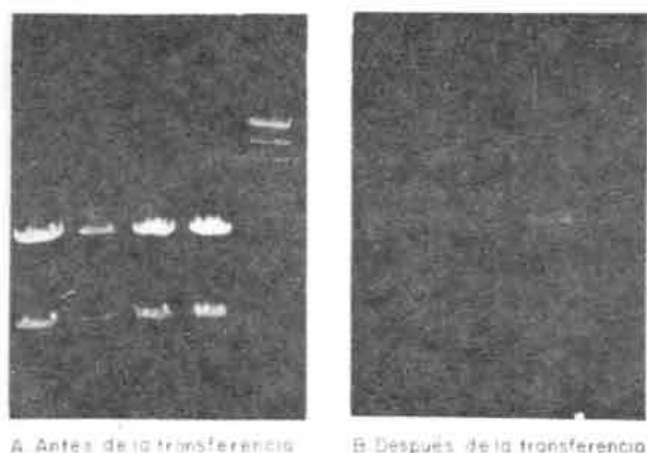


Figura 6. Geles de agarosa fotografiados bajo luz ultravioleta antes y después de ser transferidos sobre filtro de nylon. La disminución en la intensidad de las bandas muestra la eficiencia de la transferencia.

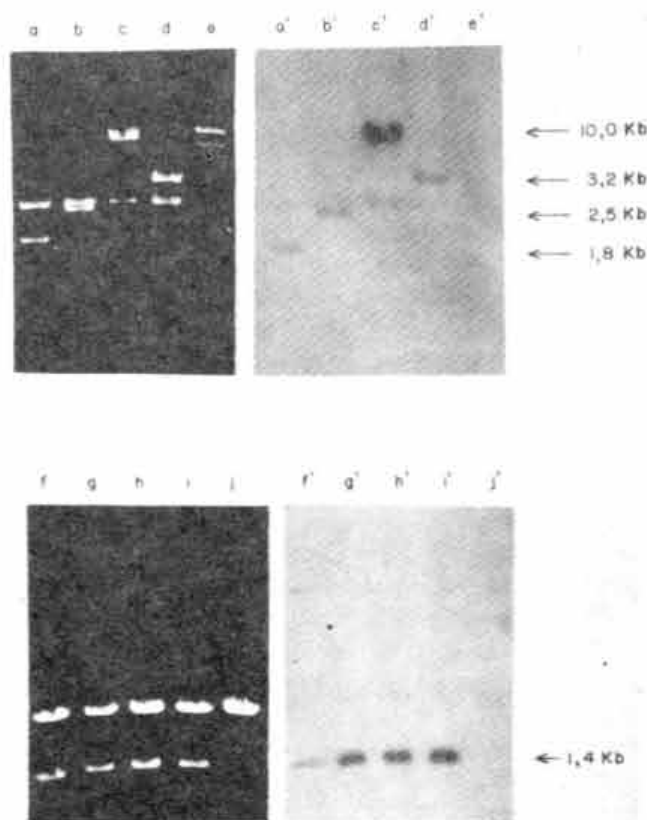


Figura 7. Electroforesis e hibridación de los fragmentos clonados con ADN total del parásito. a) 1R, b) 6R, c) 4R, d) 25R, e) ADN de lambda, f) 8R, g) 38R, h) 174B, i) 79B, j) pUC18. Los ocho insertos presentaron hibridación como se aprecia en los carriles a' - d' y f' - i'. Los mismos filtros fueron hibridados con ADN humano; ninguno de los fragmentos hibridó con ADN humano.

Cuatro de los fragmentos clonados mostraron siempre tamaños similares en las electroforesis

(Figs. 4 y 7), siendo imposible diferenciarlos por análisis en geles de agarosa. Con el fin de saber si los cuatro fragmentos clonados de tamaño similar son diferentes, uno de ellos fue marcado y usado como sonda, con el fin de hibridarlo con los cuatro fragmentos de tamaño similar y también con los otros cuatro fragmentos clonados. Los resultados mostraron que de los ocho fragmentos, tres hibridaron con la sonda mientras que los otros cinco no lo hicieron (Fig. 8). La sonda radioactiva hibridó con el mismo fragmento usado como control (Fig. 8, carril b') además de hibridar con otros dos fragmentos (Fig. 8, carriles c', d') indicando que tres de los fragmentos son iguales (Fig. 8, carriles b', c', d') mientras que los cinco restantes (Fig. 8, carriles a', e', f', g', h', i') no poseen secuencias homólogas a las presentes en el fragmento usado como sonda.

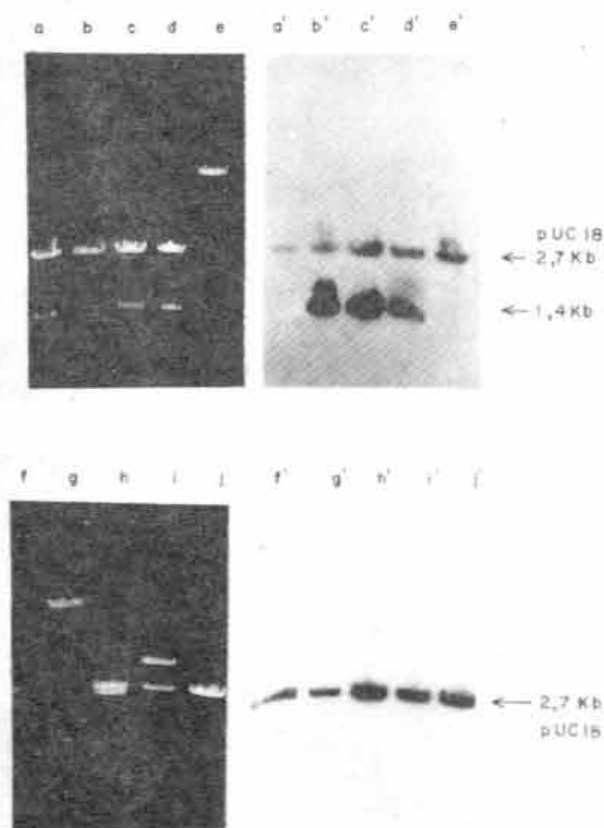


Figura 8. Electroforesis e hibridación de los fragmentos clonados con el plásmido recombinante 38R, el cual fue usado como sonda. a) 8R, b) 38R, c) 174B, d) 79B, e) 4R, f) 1R, g) 4R, h) 6R, i) 25R, j) pUC18. Tres de los insertos hibridaron con la sonda como se aprecia en los carriles b', c' y d'. Ninguno de los otros insertos mostró hibridación.

Evaluación del nivel de detección

Para evaluar el nivel de detección de los fragmentos clonados, se usó la técnica de hibridación en "dot-blot". Diferentes cantidades de ADN puro del parásito fueron colocados sobre filtro de nylon e hibridados con plásmidos recombinantes marcados radioactivamente, con una actividad específica de 3×10^8 cpm/ug.

Los niveles de detección obtenidos fueron diferentes según la sonda utilizada (Fig. 9), siendo el máximo nivel obtenido de 0,1 ng (Fig. 9, 1C) y el mínimo de 10 ng (Fig. 9, 7A) después de 24 horas de exposición, notándose diferentes intensidades en las señales de hibridación. Cinco de los siete fragmentos evaluados detectaron hasta 0,1 ng (Fig. 9, 1C-5C) mostrando uno de ellos una señal más fuerte que los otros cuatro fragmentos (Fig. 9, 1C), mientras que un fragmento detectó 1 ng y el restante solamente 10 ng, todos bajo las mismas condiciones experimentales. En conclusión, el máximo nivel de detección obtenido con los fragmentos evaluados fue de 0,1 ng, lo que correspondería a detectar 1 000 parásitos en una muestra.

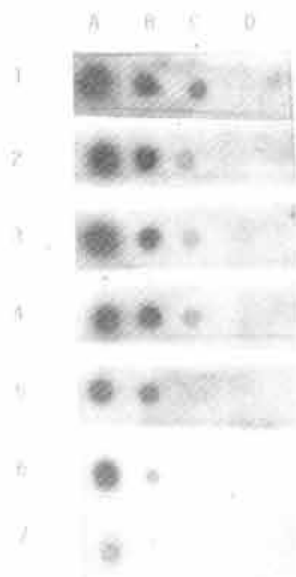


Figura 9. Hibridación en "dot-blot" de siete fragmentos clonados (1-7) con diferentes cantidades de ADN del parásito (A: 10 ng - B: 1 ng - C: 0,1 ng - D: 0,01 ng).

El máximo nivel de detección obtenido fue de 0,1 ng (1C, 2C, 3C, 4C y 5C) con diferencias en la intensidad de la señal de hibridación.

Discusión

En los últimos años el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante ha tomado diversas vías, siendo una de ellas el uso de sondas de ADN altamente específicas en el diagnóstico de diversas infecciones producidas por virus, bacterias y parásitos. Esto se ha logrado construyendo bibliotecas genómicas del agente infectante y seleccionando los clones recombinantes que muestran la más fuerte señal de hibridación, localizando de ésta forma secuencias repetitivas presentes en el genoma en cuestión. Cuando son usadas dichas secuencias repetitivas como sondas, proporcionan una alta sensibilidad debido a que son copias múltiples, presentes varias veces a lo largo del genoma total.

Recientemente se han clonado e identificado varios fragmentos de ADN de *P. falciparum* que contienen secuencias repetitivas, las cuales al ser usadas como sondas son capaces de detectar parásitos en muestras de sangre infectada (34-37). Algunos de ellos han sido secuenciados y descritos en detalle, mostrando grupos de secuencias imperfectas de 21 pb repetidas varias veces. Dos de ellos, a

pesar de su diferente origen (uno proviene de un aislado de Tanzania y el otro de un aislado de Gambia) tienen los mismos grupos de secuencias repetitivas (34, 60). Los otros fragmentos no han sido caracterizados en detalle, aunque análisis preliminares sugieren que poseen también repeticiones internas.

Con el fin de disponer de fragmentos clonados de ADN del parásito *P. falciparum* para ser usados como sondas, se construyó una biblioteca genómica de un aislado colombiano, cepa FCB-1. La biblioteca fue construida en el plásmido pUC18, el cual fue escogido debido a las ventajas que ofrece clonar una secuencia determinada en dicho plásmido (44-46). Las bacterias recombinantes fueron seleccionadas por ausencia de la actividad beta-galactosidasa y posteriormente por hibridación con ADN total del parásito.

Varias proporciones de recombinados entre vector e inserto fueron ensayadas, obteniendo 3400 colonias independientes con 10 ng de uno de los recombinados probados (vector 1: inserto 2). Dicha proporción fue escogida para construir la biblioteca genómica del parásito (Tabla 1). Otros tres recombinados en los cuales siempre se usó más cantidad de inserto que de vector, dieron un alto porcentaje de bacterias recombinantes. El título de las bacterias competentes usadas fue alto (1×10^8 células/ μ g ADN) y los controles dieron los resultados esperados (Tabla 1).

Para construir los recombinados, el vector fue defosforilado con el fin de evitar su recircularización, aumentando de ésta forma el número de bacterias recombinantes obtenidas. Varios ensayos de recombinación y transformación sin defosforilar el vector fueron realizados (resultados no mostrados) obteniendo un número bajo de células recombinantes, lo que nos indicó la importancia de defosforilar el vector con el fin de aumentar la eficiencia de la recombinación y por consiguiente el número de bacterias recombinantes.

Usando 10 ng del ADN recombinado, 3400 colonias independientes recombinantes fueron obtenidas. Un análisis del recombinante total nos mostró que el tamaño promedio de los fragmentos clonados es de 3 kb, lo que concuerda con el tamaño promedio de los ocho fragmentos caracterizados en el presente trabajo.

Teniendo estos dos datos comprobados y asumiendo el tamaño del genoma total del parásito en 1×10^7 pb como ha sido descrito por varios grupos (61, 62), para alcanzar una probabilidad del 99% de tener una secuencia de ADN representada en nuestra biblioteca, es necesario obtener 15.300 bacterias recombinantes independientes, lo que se logra haciendo menos de cinco transformaciones independientes, cada una con 10 ng de recombinado (63). Este análisis nos indica que la biblioteca construida es altamente representativa y que teóricamente to-

das las secuencias presentes en el genoma del parásito están representadas.

Tanto el plásmido sin recombinar como los plásmidos recombinantes fueron extraídos por el método de lisis alcalina (47, 48), método que nos permitió obtener el ADN plasmídico con un alto grado de pureza, la cual fue verificada por electroforesis. La pureza del plásmido fue evidente, ya que nunca se observó ni ADN bacteriano ni ARN (Figs. 3 y 4). Además, el gradiente de cloruro de cesio realizado bajo las condiciones descritas, separó eficientemente las bandas correspondientes al ADN bacteriano y al ADN plasmídico lo que facilitó enormemente la extracción de la banda correspondiente al plásmido (Fig. 2).

Ocho de las colonias recombinantes que hibridaron más fuertemente, fueron analizadas y el análisis de los insertos presentes en cada una mostró que sus tamaños oscilan entre 10 kb y 1,3 kb. La especificidad de los insertos fue determinada por hibridación en "dot-blot" y en "Southern", demostrando que los fragmentos clonados son específicos del parásito ya que hibridaron con ADN del parásito pero no con ADN humano.

La hibridación en "Southern" mostró además que tres de los ocho fragmentos analizados son el mismo (38R: 174B: 79B), mientras que uno de ellos (8R), el cual mostró siempre un tamaño similar a estos tres fragmentos, resultó ser diferente (Fig. 8). El fragmento altamente representado fue hibridado con 200 colonias independientes que previamente habían dado fuerte hibridación con ADN total del parásito. De las 200 colonias, 36 dieron señal positiva (resultados no mostrados), lo cual indica que secuencias presentes en dicho fragmento se encontrarían también en varios de los fragmentos clonados, o que éste fragmento estaría clonado varias veces y correspondería a una secuencia altamente repetitiva en el genoma del parásito. Sin embargo, ninguno de los otros cinco fragmentos estudiados hibridó con dicha sonda, demostrando que ninguno de ellos posee secuencias homólogas a las presentes en el fragmento 38R (Fig. 8).

Siete fragmentos clonados fueron evaluados por hibridación en "dot-blot", con el fin de determinar el nivel de detección de ADN del parásito de cada uno. Cinco de ellos detectaron 0,1 ng, el cual fue el máximo nivel de detección obtenido, lo que corresponde a detectar 1000 parásitos en una muestra infectada. Este nivel de detección corresponde a una parasitemia de 0,002% en 10 ul de sangre, o una parasitemia de 0,0004% en 50 ul de sangre, nivel que estaría por debajo de los métodos más sensibles (64), pero por encima de los métodos usados en controles de vigilancia epidemiológica (33).

Varios grupos de investigadores han ensayado el método de diagnóstico enunciado, tratando las muestras de sangre de una forma sencilla (65). Es

necesario adoptar un método eficiente que puede ser similar a los ya descritos, para tratar las muestras de sangre infectadas y evaluar los fragmentos que hemos clonado, con el fin de adaptar éste tipo de diagnóstico en Colombia. De una forma similar, estos fragmentos también podrían ser usados para detectar poblaciones de mosquitos infectados. La adaptación de éste método de diagnóstico nos permitiría llevar a cabo estudios epidemiológicos en zonas rurales, donde se tomarían las muestras de sangre que serían procesadas en un laboratorio equipado adecuadamente, permitiendo de ésta forma realizar controles de vigilancia en poblaciones numerosas localizadas en zonas de alto riesgo. Se ha calculado que un buen microscopista puede leer 60 muestras por día, mientras que un técnico puede procesar 1 000 muestras en un día (35), lo que confirma la importancia de este tipo de diagnóstico.

Los fragmentos genómicos clonados se podrían usar para tratar de diferenciar por hibridación, entre cepas del parásito resistentes y sensitivas a diferentes drogas; al igual que determinar cuáles son específicas de *P. falciparum*, es decir cuáles están presentes en *P. falciparum* pero no en *P. vivax*, disponiendo de esta forma de fragmentos que contengan secuencias específicas de especie y poder diferenciar entre infecciones por *P. vivax* e infecciones por *P. falciparum*, las dos especies de *Plasmodium* más comunes en Colombia. Esto sería más viable si se dispone además de una biblioteca genómica de *P. vivax*.

Algo que facilitaría bastante el uso de éste método de diagnóstico, sería el remplazo del uso del material radioactivo, el cual es difícil de adquirir e incómodo de manipular. Usando biotina en vez de ³²P para marcar el ADN (66), hemos llegado a detectar 1 ng de ADN puro del parásito, nivel más bajo que el obtenido con ³²P, pero que se podría mejorar haciendo algunas variaciones a las técnicas de hibridación utilizadas hasta ahora.

Igualmente sería interesante hacer mezclas de sondas altamente sensitivas, con el fin de amplificar la señal de hibridación y por consiguiente aumentar el nivel de detección.

La biblioteca genómica construida, además de convertirse primordialmente en una herramienta indispensable para desarrollar un método de diagnóstico de la malaria en Colombia por hibridación molecular, es un material disponible muy importante para llevar a cabo estudios sobre la biología molecular del parásito.

Abreviaturas utilizadas

| | |
|------|---------------------------|
| ADN: | ácido desoxirribonucleico |
| ARN: | ácido ribonucleico |
| cpm: | cuentas por minuto |
| Ci: | curios |

dATP: deoxi-adenosin-trifosfato
 EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético
 IPTG: isopropiltiogalactósido
 kb: kilobases
 LB: Luria Bertani
 ug: microgramo
 mg: miligramo
 mmol: milimol

ng: nanogramo
 pb: pares de bases
 RNasa: ribonucleasa
 SDS: dodecil-sulfato de sodio
 TB: "terrific broth"
 X-gal: 5-bromo-4-cloro-indolil-beta-D-galactósido

BIBLIOGRAFIA

1. CHAPIN G., WASSERSTROM R. 1981. Agricultural production and malaria resurgence in Central America and India. *Nature* 293: 181.
2. SPENCER H. C., STRICKLAND G.T. 1984. Malaria. In: Strickland G.T. ed. *Hunter's Tropical Medicine*. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders: 516.
3. DRAPER C. C., VOLLER A., CARPENTER R.G. 1972. The epidemiologic interpretation of serologic data in malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 21 (5): 696.
4. S.E.M. Ministerio de Salud DCD (Colombia) 1987. Cuestionario Internacional O.P.S.
5. GOOD M.F., et al. 1986. Genetic control of the immune response in mice to a *P. falciparum* sporozoite vaccine. *J. Exp. Med.* 164: 655.
6. COLLINS W. E., et al. 1986. Immunization of Aotus monkeys with recombinant proteins of an erythrocyte surface antigen of *P. falciparum*. *Nature* 323: 259.
7. BALLOU W.R., et al. 1987. Safety and efficacy of a recombinant DNA *p. falciparum* sporozoite vaccine. *Lancet* i: 1277.
8. EGAN, J.E. et al. 1987. Efficacy of murine malaria sporozoite vaccines: implications for human vaccine development. *Science* 236: 453.
9. KLOTZ F.W., et al. 1987. Vaccination induced variation in the 140Kd merozoite surface antigen of *P. knowlesi* malaria. *J. Exp. Med.* 165: 368.
10. PERLMANN H., et al. 1987. Antibodies in human immune sera to amino acid repeats in Pf 155, a potential vaccine candidate antigen of the human malaria parasite *P. falciparum*. *Scand. J. Immunol.* 26: 325.
11. HERRINGTON D.A., et al. 1987. Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *P. falciparum* sporozoite. *Nature* 328: 527.
12. GOOD M. F., et al. 1987. Construction of synthetic immunogen: use of a new T-helper epitope on malaria circumsporozoite protein. *Science* 235: 1059.
13. ASLUND L., et al. 1987. Synthetic gene construct expressing a repeated and highly immunogenic epitope of the *P. falciparum* antigen Pf 155. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 1399.
14. PATARROYO M.E., et al. 1987. Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. *Nature* 328: 629.
15. ———, et al., 1988. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *P. falciparum* malaria. *Nature* 322: 158.
16. RUANGJIRACHUPORN W., et al. 1988. Monoclonal antibodies to a synthetic peptide corresponding to a repeated sequence in the *P. falciparum* antigen Pf 155. *Mol. Biochem. Parasitol.* (in press).
17. FREEMAN R.R., TREDJOSIEWICZ A.J., CROSS G.A.M. 1980. Protective monoclonal antibodies recognising stage-specific merozoite antigens of a rodent malaria parasite. *Nature* 284: 366.
18. PERRIN L.H., et al. 1981. Inhibition of *P. falciparum* growth in human erythrocytes by monoclonal antibodies. *Nature* 289: 301.
19. PERLMANN H., et al. 1984. Antibodies in malarial sera to parasite antigens in the membrane of erythrocytes infected with early asexual stages of *P. falciparum*. *J. Exp. Med.* 159: 1686.
20. WAHGIN B., et al. 1984. Human antibodies to a Mr 150 000 *P. falciparum* antigen efficiently inhibit merozoite invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 7912.
21. WALHGREN M., et al. 1986. Anti-*P. falciparum* antibodies acquired by residents in a holoendemic area of Liberia during development of clinical immunity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 22.
22. BERZINS K., et al. 1986. Rabbit and human antibodies to a repeated sequence of a *P. falciparum* antigen (Pf 155) react with the native protein and inhibit merozoite invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 1065.
23. DELORON P., et al. 1987. Antibodies to Pf 155 antigen of *P. falciparum*: measurement by cell-E-LISA and correlation with expected immune protection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37: 22.
24. ELLIS J., et al. 1983. Cloning and expression in *E. coli* of the malaria sporozoite surface antigen gene from *P. knowlesi*. *Nature* 302: 536.
25. ENEA V., et al. 1984. DNA cloning of *P. falciparum* circumsporozoite gene: amino acid sequence of a repetitive epitope. *Science* 225: 628.
26. YOUNG J.F., et al. 1985. Expression of *P. falciparum* circumsporozoite proteins in *E. coli* for potential use in human malaria vaccine. *Science* 228: 958.
27. MILLER L. H., et al. 1986. Research toward malaria vaccines. *Science* 234: 1349.
28. ANDERS R. F., et al. 1988. Antigen with repeated amino acid sequences from the asexual blood stages of *P. falciparum*. *Prog. Allergy* 41: 148.

29. AVRAHAM H., et al. 1982. A highly sensitive solid-phase radioimmunoassay for the assay of *P. falciparum* antigens and antibodies. *J. Immunol. Methods* 53: 61.
30. MACKEY L., MCGREGOR I.A., LAMBERT P.H. 1980. Diagnosis of *P. falciparum* infection using a solid phase radioimmunoassay for the detection of malaria antigens. *Bull. W.H.O.* 58: 439.
31. WILCOX A. 1960. Manual for the microscopical diagnosis of malaria in man. Publication no. PHS796. Washington, DC: U.S. Department of Health, education and welfare: 7-11.
32. BRUCE-CHWATT L. J. 1985. Diagnostic methods in malaria. In: Bruce Chwat L J, ed. *Essential mariology*. 2nd ed. London: William Heinemann Medical: 112-115.
33. MOLINEAUX L., GRAMICCIA G. 1980. The Garki project: research on the epidemiology and control of malaria in Sudan savanna of West Africa. Geneva. World Health Organization.
34. FRANZEN L., et al. (1984). Analysis of clinical specimens by hybridisation with probe containing repetitive DNA from *P. falciparum*. A novel approach to malaria diagnosis. *Lancet* i: 525.
35. BARKER R. H., et al. 1986. Specific DNA probe for the diagnosis of *P. falciparum* malaria. *Science* 231: 1434.
36. ENEA V., 1986. Sensitive and specific DNA for detection of *P. falciparum*. *Moll. Cell. Biology* 6: 321.
37. ZOLG J.W., ANDRADE L.E., SCOTT E.D. 1987. Detection of *P. falciparum* DNA using repetitive DNA clones as species specific probes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 22: 145.
38. ESPINAL C.A., et al. 1982. Aislamiento y caracterización de cepas colombianas de *P. falciparum*. *Biomédica* 2: 118.
39. ———, et al. 1984. Suceptibility of different populations of Colombian Aotus monkeys to the FCB-1 strain of *P. falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33: 777.
40. TRAGER W., JENSEN J.B. 1977. *P. falciparum* in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. *J. Parasitol.* 63: 883.
41. ———. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193: 673.
42. BELL J.I., KARAM J. M., RUTTER W. J. 1981. Polimorphic DNA region adjacent to the 5' end of the human insuline gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 5759.
43. JACOB F., et al. 1960. L' opéron: groupe de genes a expresion coordonnée par un operateur. *C. R. Acad. Sci.* 250: 1727.
44. VIEIRA J., MESSING J. 1982. The pUC plasmids, an M13 mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 259.
45. MESSING, J. 1983. New M13 vectors for cloning. In: *Methods in Enzymology* (Wu R., Grossman L., Modave K. eds) Vol. 101: 20. Academic Press, New York.
46. YANISCH-PERRON C., VIEIRA J., MESSING J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103.
47. BIRBOIM H. C., DOLY J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513.
48. ISH-HOROWICZ D., BURKE J. F. 1981. Rapid and efficient cosmid vector cloning. *Nucleic Acids Res.* 9: 2989.
49. TARTOF K. D., HOBBS C.A. 1987. Improved media for growing plasmid and closmid clones. *Focus. B. R. L.* 9 (2): 12.
50. RICKWOOD D., CHAMBERS J.A. 1984. Centrifugal methods for characterising macromolecules and their interactions. In: *Centrifugation* (ed. Rickwood D. 2nd edition) IRL Press, Oxford-washington D. C.: 95-122.
51. MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J. 1982. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Sprig Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
52. CHACONA G., VAN DER SANDE J.H. 1980. 5' 32P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods Enzimol.* 65: 75.
53. HANNAHAN D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J. Moll. Biol.* 166: 557.
54. GRUNSTEIN M., HOEGNESS D. 1975. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 3961.
55. BENTON W. D., DAVIS R.W. 1977. Screening lambdabt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* 196: 180.
56. SOUTHERN E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Moll. Biol.* 98: 503.
57. BRANDSMA J., MILLER G. 1980. Nucleic acid spot hybridization: rapid quantitative screening of lymphoid cell lines for Epstein-Barr viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 6851.
58. CHOW S., MERIGAN T.C. 1983. Rapid detection and quantitation of human cytomegalovirus in urine through DNA hybridization. *N. Engl. J. Med.* 308: 921.
59. RIGBY P. W. J. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerasa I. *J. Moll. Biol.* 113: 237.
60. OQUENDO P., et al. 1986. Characterisation of a repetitive DNA sequence from the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Bioch. Parasitol.* 18: 89.
61. ODINK K.G., et al. 1984. Cloning of malaria genes coding for high molecular weight antigens: isolation of fragments of *P. falciparum* genes coding for proteins of 14500 molecular weight. *Mol. Bioch. Parasitol.* 10: 55.
62. VAN DER PLOEG L. H. T., et al. 1985. Chromosome sized DNA molecules of *P. falciparum*. *Science* 299: 658.
63. CLARKE L., CARBON J. 1976. A colony bank containing synthetic colE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9: 91.
64. BRUCE-CHWATT L.J., 1984. DNA probes for malaria diagnosis. *Lancet* i: 795.
65. DRAPER C.C., et al., 1986. The use of DNA probes for malaria diagnosis: Memorandum from a WHO meeting. *Bull. W. H.O.* 64: 641.
66. GEBEYEU G., et al. 1987. Novel biotinylated nucleotide-analogs for labeling and colorimetric detection of DNA. *Nucleic Acids Res.* 15: 4513.