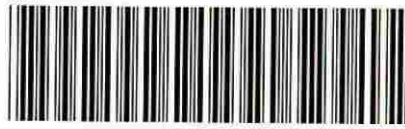


8

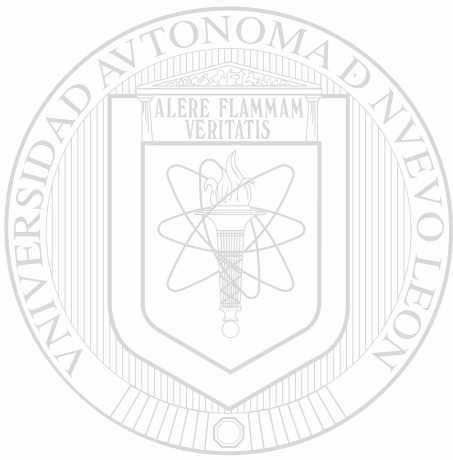


MONTELEONE

TM 2665
1988
A4



1020091571

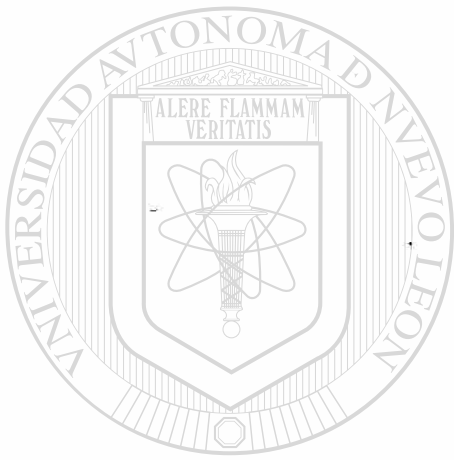


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Saco

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA

SUB-DIRECCION DE INVESTIGACION
Y ESTUDIOS DE POSTGRADO



OBTENCION DEL DNA COMPLEMENTARIO AL RNA MENSAJERO DE LA HORMONA
DE CRECIMIENTO BOVINA

UANL

TESIS

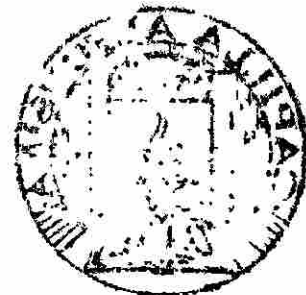
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA
DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

PRESENTA

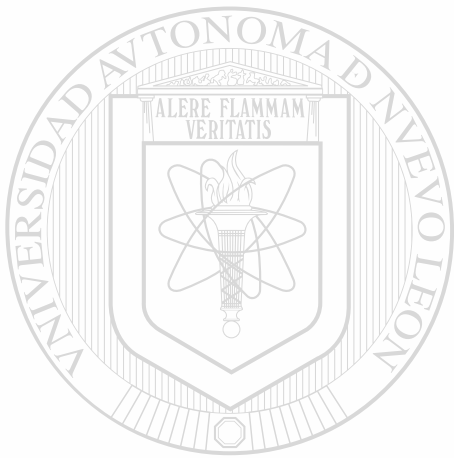
BIOL. FELIPE AMAYA MANZANARES

MONTERREY, N.L.

Abril de 1988



TM
2664
T.M.
108
A



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

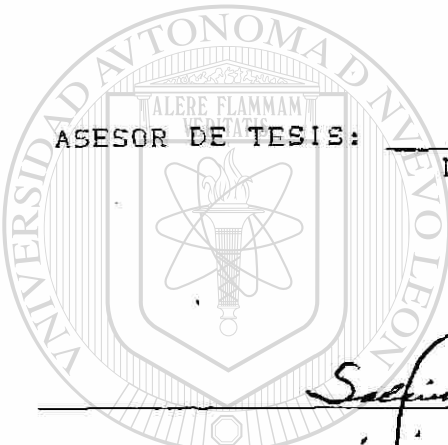
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FONDO
TESIS



153211

INTEGRANTES DE LA COMISION DE TESIS:
OBTENCION DEL DNA COMPLEMENTARIO AL RNA MENSAJERO
DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA



ASESOR DE TESIS:

H. g. B. S.

DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDANA

COMISION DE TESIS:

Salinas

DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA

Sepulveda

DR. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA

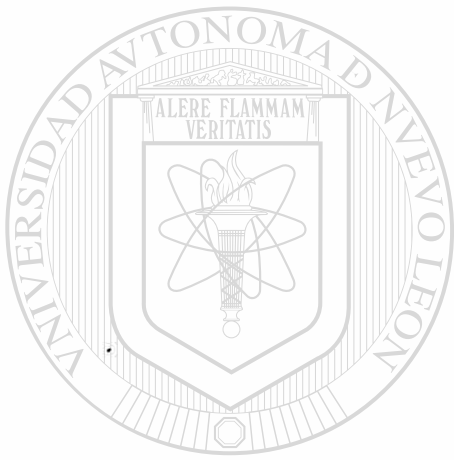
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Herminia

DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RDZ.

Diana

M.C. DIANA RESENDEZ PEREZ



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



FONDO
TESIS



El presente trabajo se realizó en la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. y se llevó a cabo bajo la asesoría del Dr. Hugo A Barrera Saldaña.

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE

	Página
i. INDICE.....	1
ii. LISTA DE ABREVIATURAS.....	2
iii. LISTA DE FIGURAS.....	3
I. INTRODUCCION.....	4
II. ANTECEDENTES.....	5
III. OBJETIVOS.....	9
IV. HIPOTESIS DE TRABAJO.....	10
V. MATERIALES Y METODOS.....	11
A. Origen de los Reactivos.....	11
B. Material Biológico.....	11
C. Métodos.....	12
VI. RESULTADOS.....	34
1. Extracción del RNA total de hipófisis bovinas.....	34
2. El DNAc de hPL hibridiza con el RNAm de bGH.....	34
3. Tamizajes del banco de DNAc.....	38
a). Almacenamiento del banco de DNAc.....	38
b). Hibridización de colonias <u>in situ</u>	40
c). Hibridización usando DNA de plásmidos en gota seca.....	40
4. Obtención y caracterización del plásmido posible portador del DNAc de bGH	42
5. Construcción del mapa de restricción de p63, plásmido portador del DNAc de bGH.....	48
VII. DISCUSION.....	54
VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	56
IX. RESUMEN.....	57
X. BIBLIOGRAFIA.....	58

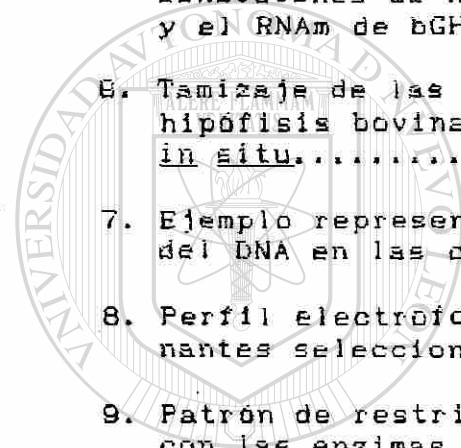
LISTA DE ABREVIATURAS

CaCl ₂	= Cloruro de Calcio
°C	= Grados centígrados
cpm	= Cuentas por minuto
dNTP's	= Desoxinucleósidos Trifosfato
g	= Gramos
dT	= Desoxitimidina
h	= Horas
l	= Litros
M	= Molar
mg	= Miligramos
min	= Minutos
mM	= Milimolar
m	= Milímetro
ng	= Nanogramos
nm	= Nanómetros
nt	= Nucleótidos
³² P	= Fósforo radiactivo
pb	= Pares de bases
pH	= Potencial de hidrogeniones
poli A	= Acido poliadenílico
rpm	= Revoluciones por minuto
RNA	= Acido ribonucleico
RNAasa	= Ribonucleasa
RNA _m	= RNA mensajero
S	= Unidades Svedberg (coeficiente de sedimentación)
s	= Segundos
SDS	= Dodecil-sulfato de sodio
SSC	= Solución salina de citrato
Tris	= Tris(hidroximetil)aminometano
µg	= Microgramo
µl	= Microlitros
x	= Número de veces la concentración con respecto a la solución de trabajo
xg	= Número de veces la fuerza de la gravedad

LISTA DE FIGURAS

Página

1. Secuencia nucleotídica del DNAC de bGH.....	4
2. Análisis electroforético de muestras de las diferentes etapas en la obtención de RNA total....	25
3. Análisis electroforético de los RNA's de hipófisis bovinas en geles de agarosa-urea-ácida..	28
4. Análisis comparativo entre secuencias génicas para las hormonas de crecimiento bovina y lactogénica placentaria humana.....	37
5. Experimento tipo "Northern" para establecer las condiciones de hibridización entre el DNAC de hPL y el RNAm de bGH.....	39
6. Tamizaje de las clonas en el banco de DNAC de hipófisis bovinas por hibridización de colonias <u>in situ</u>	41
7. Ejemplo representativo del tamizaje en gota seca del DNA en las clonas del banco de DNAC.....	43
8. Perfil electroforético de los plásmidos recombinantes seleccionados en el tamizaje.....	44
9. Patrón de restricción obtenido del plásmido p63 con las enzimas diagnósticas <u>Pvu</u> II y <u>Pst</u> I.....	46
<hr/>	
10. Representación esquemática de las posibles orientaciones del DNAC en pBR322.....	47
11. Determinación de la orientación del inserto de DNAC en el plasmido p63.....	49
12. Patrón de restricción del plásmido p63 con las enzimas <u>Rsa</u> I y <u>Pst</u> I.....	50
13. Análisis del patrón de restricción del plásmido p63 con las enzimas <u>Hae</u> II y <u>Alu</u> I.....	51
14. Mapa de restricción del inserto en p63 con enzimas que cortan una ó dos veces el DNAC de bGH.....	52
15. Mapa de restricción del inserto en p63 con enzimas que tienen sitios múltiples de reconocimiento en el DNAC de bGH.....	53



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



11. INTRODUCCION

Con el descubrimiento de Watson y Crick (32), en la década de los 50's, de la estructura de doble hélice de la molécula de DNA, empezó una gran cadena de experimentos y de nuevos descubrimientos encaminados a elucidar los procesos moleculares involucrados en la transmisión y regulación de la información genética (44).

El conocimiento de los principales mecanismos moleculares implicados en los eventos de transcripción, replicación y reparación del DNA, condujeron a su vez al aislamiento e identificación de varias enzimas tales como ligasas, polimerasas, topoisomerasas, etc. que participan en tales procesos.

Por otra parte, en el campo de la Microbiología, importantes avances habían logrado para finales de la década de los sesentas una mejor comprensión de los mecanismos de recombinación (10) y de propagación (17) de DNA foraneo en diversos microorganismos. Además se había logrado ya aislar, a partir de bacterias, enzimas de restricción y moléculas de DNA circulares de replicación autónoma llamadas plásmidos (32). Estos últimos adquirieron especial importancia pues se descubrió que portaban secuencias ó genes que conferían entre otras cosas, resistencia a antibióticos. Todos estos logros dieron origen, en la década de los 70's, a la creación de una serie de técnicas mediante las cuales se pudo unir ó recombinar, en el tubo de ensayo, moléculas de DNA de diferente origen. Así mismo, la incorporación de estas secuencias en plásmidos, y la introducción de estos a bacterias, permitió la propagación y amplificación de genes individuales. Estas técnicas se conjuntaron y se transformaron en una nueva herramienta denominada Ingeniería Genética, Clonación molecular ó Tecnología del DNA recombinante (32).

Actualmente, la Ingeniería Genética, constituye una de las herramientas biotecnológicas y de investigación experimental más poderosas. Con ella, es posible manipular los genes a fin de modificar ó transformar la información genética que regula ó codifica el desarrollo de los eventos fisiológicos más importantes en un organismo, que pueden ser usados para determinar la utilidad y el aprovechamiento de productos biológicos, de origen tanto animal como vegetal. Así mismo, la Ingeniería Genética constituye una valiosa herramienta para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la expresión genética, que aún no se han logrado esclarecer del todo.

III. ANTECEDENTES

La hormona de crecimiento (GH) de mamíferos es una proteína con un peso molecular de alrededor de 22,000 Kilodaltones (Kd) sintetizada en la hipófisis anterior. Es responsable del crecimiento lineal corporal y participa en la regulación de una variedad de procesos metabólicos, incluyendo el metabolismo del nitrógeno, lípidos, minerales y carbohidratos. Ensayos *in vitro* con el tejido adiposo muestran que la GH está involucrada en la incorporación celular de glucosa y su conversión a bióxido de carbono, lípidos, liberación de glicerol y la incorporación de aminoácidos en la síntesis protéica (19).

Junto con GH, la prolactina (Prl) y el lactógeno placentario (PL), constituyen una familia de hormonas polipeptídicas que están relacionadas funcional, inmunoquímica y estructuralmente. A pesar de sus similitudes, estas hormonas son sintetizadas de una manera tejido específica. GH y Prl son producidas en la hipófisis anterior, mientras que el lactógeno placentario es producido por el sincitiotrofoblasto de la placenta. Las tres hormonas poseen actividad lactogénica, aunque la actividad promotora del crecimiento es un atributo casi exclusivo de las GH's. La GH es requerida para el crecimiento postnatal y el mantenimiento de los procesos metabólicos, mencionados arriba. Prl está involucrada en la iniciación y mantenimiento del período de lactancia. Se piensa que PL puede proveer actividades parecidas a GH durante el desarrollo del feto, aunque no parece ser una hormona esencial (28).

Las tres hormonas tienen un tamaño y una estructura protéica similares. Cada hormona tiene un residuo único de triptófano (GH y PL en el locus 85 y Prl en la posición 91) y dos enlaces disulfuro. Las tres hormonas también contienen, dentro de sí, cuatro regiones de homología interna, las cuales se presentan en cada una de ellas. Basados en estas observaciones y en la secuencia de aminoácidos, Niall y cols. postularon en 1971 que las tres hormonas surgieron por duplicación de un gen ancestral común (28).

El reciente desarrollo de la tecnología del DNA recombinante, ha permitido la determinación de las estructuras tanto del gen como de la molécula de RNA mensajero (RNAm) de estas tres hormonas. El análisis de la estructura primaria de estas proteínas y de las secuencias génicas que las codifican ha permitido una reconsideración de la hipótesis de Niall y cols. y también sugiere que el precursor de esta familia génica se formó por duplicación y divergencia de un gen ancestral más pequeño (28).

La ingeniería genética ó tecnología del DNA recombinante, aparte de su gran utilidad como herramienta para el análisis de la estructura y evolución de los genes, también ha demostrado ser una poderosa herramienta para la obtención de proteínas de

importancia biomédica. Esto se ha logrado a través de la síntesis y clonación de los DNA complementarios (DNAc) a los RNAm y su incorporación posterior a bacterias Escherichia coli para que, por fermentación se produzcan cantidades prácticamente ilimitadas de la proteína en cuestión. Así se han logrado producir y comercializar varias proteínas de importancia biomédica, entre las que destacan la insulina y la hormona del crecimiento humana (26).

La hormona de crecimiento bovina (bGH) madura, consta de 191 aminoácidos, aunque es sintetizada como un precursor con una extensión de 26 residuos de aminoácidos en el extremo amino-terminal. Esta extensión se conoce como péptido señal y es responsable de dirigir la molécula hacia el exterior de la célula. Sin embargo durante el proceso de secreción, al pasar la molécula a través de la membrana, se elimina el péptido señal siendo la proteína madura la que entra al torrente circulatorio para después ejercer su función en los órganos blanco.

Al igual que otras GH, el principal papel fisiológico de bGH es el de estimular el crecimiento corporal; además bGH posee una marcada actividad lactogénica (31).

De gran importancia e interés resultan las recientes observaciones efectuadas al administrar bGH al ganado bovino, que demuestran claramente que un incremento en el nivel de hormona del crecimiento en animales productores de carne, aumenta la velocidad de crecimiento y la eficiencia de la conversión alimenticia. Además, en animales lecheros, la administración exógena de bGH incrementa también la producción de leche. Los efectos sobre la velocidad de crecimiento, de la bGH exógenamente administrada, han sido conocidos desde hace más de 50 años desde los estudios originales de Evans y Simpson (11) y Lee y Schaffer (20). Estos investigadores demostraron que extractos de glándulas pituitarias causan incrementos dramáticos en las velocidades de crecimiento de animales experimentales. Además, también se ha demostrado, primero por Machlin (21) y más tarde por Peel y cols (33) que la hormona del crecimiento incrementa la producción de leche en el ganado lechero desde el 15 %, en el período de lactación primario, hasta el 40 % en el período de lactación tardío, cuando se administra a vacas adultas. Interesantemente, la administración de hormona del crecimiento a éstos animales adultos, a través de todo el período de lactación, no mostró efectos adversos sobre el crecimiento óseo ó cualquier otro aspecto de la fisiología del animal (31).

Por estas razones, la demanda de hormonas de crecimiento animal con posible aplicación en la industria pecuaria ha despertado gran interés en numerosos grupos de investigación y en compañías biotecnológicas privadas. Desde hace algunos años, estos grupos han invertido grandes recursos y esfuerzos encaminados a desarrollar y aplicar la ingeniería genética con el fin de obtener los genes que codifican para la síntesis de GHs en las principales especies de vertebrados de interés comercial.

Como resultado de este esfuerzo ya se han logrado clonar los genes para las GHs de varias especies que incluyen: humano (26), rata (35), bovino (36), porcino (36), salmón (39), trucha (1) y pollo (41).

Así, mediante el uso de ingeniería genética, se ha logrado obtener el DNAc de la bGH, el cual consiste de una molécula de aproximadamente 800 nucleótidos de longitud que codifica para el precursor de la hormona (fig. 1). Esta molécula de DNAc ha sido clonada en vectores de expresión y posteriormente introducidos a bacterias para que, por fermentación, estas produzcan hormona del crecimiento bovina recombinante (bGHR) (14).

Estudios efectuados con bGHR, han demostrado que ésta posee las mismas propiedades biológicas que la forma nativa, obtenida de hipófisis bovinas por los métodos bioquímicos tradicionales (14).

La administración de bGHR a ganado bovino, demostró que al igual que con su forma natural, la forma recombinante conserva las propiedades fisiológicas de esta hormona, es decir estimula el crecimiento y la producción de leche (31).

Sin embargo, todavía más interesantes y posiblemente de mayor importancia en productividad animal son los sorprendentes resultados observados al administrar bGHR a peces (15). La administración exógena de bGHR a salmones juveniles del Pacífico (*Onchorhynchus kisutch*), resultó en un incremento considerable de la velocidad de crecimiento, acompañado por un aumento en el apetito y una más alta eficiencia en el aprovechamiento del alimento (15). Además, estudios comparativos en los que se utilizó bGH natural, metil-testosterona (esteroide anabólico) y la hormona tiroxina, mostraron que bGH induce el mayor incremento en la velocidad de crecimiento y que la respuesta a varias combinaciones hormonales es aditiva (15). Estas características de un crecimiento más rápido, así como una mejor eficiencia de conversión de alimentos a proteína animal, beneficiarían enormemente a la acuacultura.

Basados en estos últimos resultados y tomando en cuenta que la cosecha piscícola mundial a partir de las reservas naturales ha alcanzado ya su máximo (aproximadamente 70 millones de toneladas métricas), y que además es necesario incrementar la producción de carne y leche, es necesario iniciar en nuestro país programas de investigación y desarrollo en productividad animal, que tengan como prioridad la aplicación de la ingeniería genética. Con este propósito, el presente trabajo constituye la primera fase de un proyecto a largo plazo cuyo principal objetivo es la producción de bGH recombinante, en cantidad y calidad suficientes para su explotación en la industria de producción de alimentos de origen animal.

```

CAGGGTCCCTCTCTGACACAGCTCAACACAGCT      met  met  ala  ala  gly  pro  arg  thr  ser  leu  leu  leu  ala  phe  ala  leu
ATG   ATG   GCT  GCA  GGC  CCC  CGG  ACC  TCC  CTG  CTC  CTG  GCT  TTC  GGC  CTG

leu  cys  leu  pro  trp  thr  gln  val  val  gly  ala  phe  pro  ala  met  ser  leu  ser  gly  leu  phe
CTC  TSC  CTG  GCC  TGG  ACT  CAG  GTG  GTG  GGC  GGC  TTC  CCA  GGC  ATG  TCC  TTG  TCC  GGC  CTG  TTT
-10  -10  -10  -10  -10  -10  -10  -10  -10  -10  -10  -10  -10  -10  -10  -10  -10  -10  -10  -10  -10

ala  asn  ala  val  leu  arg  ala  gln  his  leu  his  gln  leu  ala  ala  asp  thr  phe  lys  glu  phe
GCC  AAC  GCT  GTG  CTC  CGG  GCT  CAG  CAC  CTG  CAT  CAG  CTG  GCT  GCT  GAC  ACC  TTC  AAA  GAG  GAG  TTT
20  20  20  20  20  20  20  20  20  20  20  20  20  20  20  20  20  20  20  20  20  20

glu  arg  thr  tyr  ile  pro  glu  gly  gln  arg  tyr  ser  ile  gln  asn  thr  gln  val  ala  phe  cys
GAG  GGC  ACC  TAC  ATC  CCG  GAG  GGA  CAG  AGA  TAC  TCC  ATC  CAG  AAC  ACC  CAG  GTT  GCC  TTC  TGC
40  40  40  40  40  40  40  40  40  40  40  40  40  40  40  40  40  40  40  40  40  40

phe  ser  glu  thr  ile  pro  ala  pro  thr  gly  lys  asn  glu  ala  gln  gln  lys  ser  asp  leu  glu
TTC  TCT  GAA  ACC  ATC  CCG  GCC  CCC  ACG  GGC  AAG  AAT  GAG  GCC  CAG  CAG  AAA  TCA  GAC  TTC  TTC  GAG
60  60  60  60  60  60  60  60  60  60  60  60  60  60  60  60  60  60  60  60  60  60

leu  leu  arg  ile  ser  leu  leu  leu  ile  gln  ser  trp  ley  gly  pro  leu  gln  phe  leu  ser  arg
CTG  CTT  CGC  ATC  TCA  CTG  CTC  CTC  ATC  CAG  TCG  TGG  CTC  GGG  CCC  CTG  CAG  TTC  CTC  AGC  AGA
80  80  80  80  80  80  80  80  80  80  80  80  80  80  80  80  80  80  80  80  80  80

val  phe  thr  asn  ser  leu  val  phe  gly  thr  ser  asp  arg  val  tyr  glu  lys  leu  lys  asp  leu
GTC  TTC  ACC  AAC  ATC  TTG  GTG  TTT  GGC  ACC  TCG  GAC  CGT  GTC  TAT  GAG  AAG  CTG  AAG  GAC  GAC  CTG

glu  gly  gly  ile  leu  ala  leu  met  arg  glu  leu  glu  asp  gly  thr  pro  arg  ala  gly  gln  ile
GAG  GAA  GGC  ATC  CTG  GCC  CTG  ATG  CGG  GAG  CTG  GAA  GAT  GGC  ACC  CCC  CGG  GCT  GGC  CAG  CAG  ATC
120 120 120 120 120 120 120 120 120 120 120 120 120 120 120 120 120 120 120 120 120 120

leu  lys  gln  thr  tyr  asp  lys  phe  asp  thr  asn  met  arg  ser  asp  asp  ala  leu  leu  lys  asn
CTC  AAG  CAG  ACC  TAT  GAC  AAA  TTT  GAC  ACA  AAC  ATG  CGC  AGT  GAC  CAC  GCG  CTG  CTC  AAG  AAC
140 140 140 140 140 140 140 140 140 140 140 140 140 140 140 140 140 140 140 140 140 140

tyr  gly  leu  leu  ser  cys  phe  arg  lys  asp  leu  his  lys  thr  glu  thr  tyr  leu  arg  val  met
TAC  GGT  CTG  CTC  TCC  TCC  TTC  CGG  AAG  GAC  CTG  CAT  AAG  ACG  GAG  ACG  TAC  CTG  AGG  GTG  ATG
160 160 160 160 160 160 160 160 160 160 160 160 160 160 160 160 160 160 160 160 160 160

lys  cys  arg  arg  phe  gly  glu  ala  ser  cys  ala  phe  C,T,
AAG  TGC  CGC  CGC  TTC  GGG  GAG  GCC  AGC  TGC  GCC  TTC  TAG
180 180 180 180 180 180 180 180 180 180 180 180 180

CCTGCAAGGTGOCACITCCACITGTCCTTTCCIAATAAATGAGCAAAATTGCATGGCA
FOLI A

```

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

fig. 1 Estructura primaria del DNAc de bGH y la proteína[®] codificada por dicha secuencia. Los codones correspondientes al péptido señalador aparecen con numeración negativa, se muestra la secuencia ó señal de poliadenilación subrayada. Los codones que llevan la información para la hormonas madura aparecen con numeración positiva. Tomado de Seeburg y cols., 1983 (22).

Nuestro esfuerzo en el presente estudio se abocó principalmente a obtener las secuencias estructurales del gen de la hormona de crecimiento bovina, por metodologías de DNA recombinante.

IV. OBJETIVOS

Tomando en cuenta la importancia que tiene para la industria productora de alimentos del país la producción de bGH recombinante en cantidad y calidad suficiente, es de esperarse que su utilización contribuya a resolver el problema de suministro de proteínas de origen animal para el consumo humano. Por ello, nos propusimos implementar y desarrollar la tecnología para la obtención del DNAc al RNAm que codifica para la bGH, como primer paso para que en un proyecto a largo plazo, esta secuencia pueda ser posteriormente expresada en Escherichia coli y mediante fermentación obtener una fuente virtualmente inagotable de bGH biosintética ó recombinante.

Los objetivos que nos planteamos para alcanzar estas metas fueron los siguientes:

- ~~1) Obtener los RNAm's de hipófisis bovinas para ser utilizados en la construcción de un banco de DNA complementarios.~~
- 2) Aíslar a partir de éste banco el DNAc de bGH. ®
- 3) Construir un mapa de restricción del inserto de DNAc del plásmido portador de secuencias para bGH.

V. HIPÓTESIS DE TRABAJO

bGH posee, al igual que el lactógeno placentario humano (hPL), una marcada actividad lactogénica. Esta observación nos motivó a determinar si ésta similitud de funciones reflejaba una conservación de secuencias, que fuera el resultado a su vez, de un origen evolutivo común. Decidimos comparar las secuencias nucleotídicas de los RNAm para bGH y hPL. Nos percatamos que en una porción central de aproximadamente 550 pb del DNAc para hPL se aprecia una similitud del 72 % con aquellas secuencias correspondientes del gen para bGH (ver fig. 4). Por lo tanto basamos nuestro trabajo en la siguiente hipótesis:

Es factible utilizar el DNAc de hPL, marcado radiactivamente, como sonda para detectar por hibridación molecular el DNAc de bGH, presente en un banco de DNAc de hipófisis bovinas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

VI. MATERIALES Y METODOS

A. Origen de los reactivos.

Las enzimas de restricción y otras para modificar ácidos nucleicos fueron obtenidas de varias casas comerciales (Sigma, Bethesda Research Laboratories, New England Biolabs, Amersham,) usándose de acuerdo a las indicaciones de las mismas.

Los reactivos empleados en la elaboración de buffers, soluciones y medios de cultivo, también fueron obtenidas de distintas casas comerciales como son: Sigma, Merck, Aldrich y Casa Rocas.

B. Material Biológico

Procesamos 69 cabezas de ganado bovino que obtuvimos del Rastro Municipal de la ciudad de Monterrey, N.L. Las hipófisis se recuperaron de animales recién sacrificados, las cuales fueron inmediatamente congeladas en bióxido de carbono sólido y almacenadas en nitrógeno líquido hasta su uso.

Se utilizó Escherichia coli cepa RR 1 para la propagación de plásmidos y construcción del banco de DNAs. Tanto los plásmidos (pBR322, phPL815) como las cepas bacterianas provienen de la colección de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG). También se recibieron donativos de otros laboratorios del país y del extranjero.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

C. Métodos

Aislamiento de RNA total celular de Hipófisis bovinas por el método de fenol-sarkosil-Proteínasa K

El método que utilizamos es una modificación a la técnica descrita por: Frazier y cols. en 1983 (13)

Soluciones y Materiales.- Para eliminar las RNAasas, todo el material que lo permitió se sometió a lavado con NaOH 1 N por 5 min. Posteriormente se enjuagó exhaustivamente con agua bidestilada y se esterilizó en el autoclave a 15 lbs/pulg² por 15 min, ó si era material de vidrio, entonces se horneó a 250°C por 4 h.

Las soluciones en los incisos a hasta d fueron tratadas con dietilpirocarbonato (DEP) al 0.1% por al menos 12 hrs a 37°C y luego esterilizadas en el autoclave. El DEP no se usó para tratar soluciones conteniendo Tris, ya que es altamente inestable en su presencia y se descompone rápidamente en etanol y bióxido de carbono.

a).- Solución I. (Sarkosil al 0.5%. NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, Tris 10 mM pH 8.0). Se preparó un litro con agua bidestilada y tratada con DEP se le ajustó el pH a 8.0 con NaOH. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 15 lb/pulg² por 15 min.

b).- 50 ml de NaCl 5M.- se disolvieron 14.25 g de NaCl en 50 ml de agua estéril, se trató con DEP y se esterilizó en autoclave.

c).- 1000 ml de agua bidestilada

d).- 200 ml de acetato de sodio 4.5 M pH 6.0 (se usó ácido acético glacial concentrado para ajustar el pH)

e).- Solución Sevage: Se preparó mezclando cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción de 24:1, respectivamente.

f).- Destilación de fenol: El fenol que había sido previamente fundido en baño María a 60°C (p.f. = 55°C) fué redestilado en un aparato para destilación con enfriador sin serpentín y sin circulación de agua. Se comenzó a coleccionar el fenol cuando la temperatura alcanzó los 180°C. Posteriormente se cubrió el frasco conteniendo el fenol redestilado con aluminio y se almacenó a -20°C hasta su uso. Antes de usarlo se fundió en baño María a 60°C.

g).- Solución II: (fenol saturado con solución I). Se mezclaron dos volúmenes de fenol con un volumen de solución I, se agitó vigorosamente y se dejó reposar en la obscuridad hasta la separación de fases (usualmente toda la noche). Se

descartó la fase acuosa y se le ajustó a la fase del fenol el pH a 8.0 con NaOH 10 N. Se cubrió con aluminio para proteger de la luz y se utilizó de inmediato ó se almacenó a 4°C hasta una semana.

h).- **Proteinasas K.** Se prepararon alícuotas de 500 µl a una concentración de 10 mg/ ml en agua bidestilada tratada con DEP.

Procedimiento:

Todo el proceso se llevó a cabo a 0°C; a menos que se especifique otra temperatura.

1).- El tejido fué colocado sobre hielo seco inmediatamente después de sacarse del Nitrógeno líquido. Se pesaron alícuotas de 5 g para ser procesadas tan rápido como fué posible para evitar cualquier descongelamiento.

2).- Se homogenizaron 5 g de tejido en 88 ml de Solución I y 112 ml de Solución II en una licuadora. Se mezcló a alta velocidad durante 2 minutos, encendiendo y apagando cada 20 s para permitir que los trozos que quedaban en la superficie bajaran y fueran alcanzados por las espas.

3).- El homogenizado se vació en botellas corex de 150 ml, se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 10 min usando un rotor JA-10 de una centrifuga J2-21 de Beckman. A menos que se especifique otra cosa, en los siguientes procesos de centrifugación se utilizó el mismo tipo de rotor y la misma centrifuga.

4).- Al terminar la centrifugación se recuperó la fase acuosa utilizando una jeringa de 20 ml de vidrio y se vació en un frasco de 500 ml y al que se la había agregado 1 ml de la solución de proteinasa K. Se incubó la fase acuosa con la proteinasa K a 37°C por 45 min.

5).- Enseguida se añadieron 50 ml de Solución II y se agitó vigorosamente por 5 min, luego se añadieron 50 ml de Sevage y se repitió la agitación por otros 5 min, se vació la mezcla en botellas de centrifuga corex de 150 ml y se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 20 min. Este paso se repitió una vez más.

6).- Se colectó la fase acuosa como en el paso 5 y se añadió un volumen de Sevage, se agitó vigorosamente durante 5 min, luego se centrifugó en botellas corex de 150 ml a 5000 r.p.m. durante 20 min.

7).- Se colectó la fase acuosa y se colocó en una botella corex de 150 ml, enseguida se añadió NaCl a una concentración final de 0.2 M. y Etanol al 95% (que se hallaba a -20°C antes de usarse). La mezcla se incubó toda la noche a -20°C

- 8).- Se centrifugó a 5000 r.p.m. por 20 min, se descartó el etanol y se permitió escurrir las pastilla a 4°C con el tubo en posición invertida.
- 9).- La pastilla se disolvió en 7 ml de agua-DEP y se transfirió a un tubo corex de 30 ml, enseguida se añadieron 2 volúmenes de Acetato de Sodio 4.5 M, pH 6.0 y la mezcla se mantuvo a -20°C por un mínimo de 4 h.
- 10).- La mezcla se centrifugó a 10,000 r.p.m. usando un rotor HB-4 de ángulo fijo en una centrífuga IEC y se descartó el sobrenadante.
- 11).- Se repitieron los pasos 9 y 10 dos veces más.
- 12).- La pastilla final se lavó con etanol al 70% helado y se secó a 4°C con el tubo en posición invertida.
- 13).- Finalmente, la pastilla se disolvió en 5 ml de H₂O-DEP y se tomó una pequeña alícuota para efectuar lecturas en el espectrofotómetro a 230, 260 y 280 nm, posteriormente se añadieron NaCl a una concentración final de 0.3 M y dos volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se guardó a -20°C hasta su uso.

Electroforésis en gel de Agarosa-Urea-Acido

Se utilizó el método descrito en su forma original por Rosen y cols. en 1975 (34)

Soluciones y Reactivos:

- a).- Agua tratada con DEP
- b).- Urea 10 M. Se pesaron 60 g de urea y se disolvieron en 100 ml de agua-DEP.
- c).- Buffer* de Citrato de Sodio 0.25 M, pH 3.5. Se pesaron 49 g de ácido cítrico y se disolvieron en 900 ml de agua estéril; se añadieron 10 g de NaOH para ajustar el pH a 3.5 y se aforó a 1 l. Se trató con DEP al 0.1 % a 37° C por 12 h y se esterilizó a 15 lb/pul²/15 min.
- d).- Buffer de Citrato de Sodio 0.025 M, pH 3.5. 100 ml de buffer citratos 0.25 M se aforaron a 1 l., con agua-DEP y se volvió a esterilizar en el autoclave.

* Buffer = Amortiguador ó solución tampon

- e).- Agarosa al 1.5 % (ver inciso 1 del procedimiento)
- f).- Buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.6.- 25 ml de tris-HCl 1 M, pH 8.0 se disolvieron en 400 ml de agua-DEP, enseguida se le ajustó el pH a 7.5 con HCl concentrado luego se aforó a 500 ml y se esterilizó en el autoclave
- g).- Solución de Bromuro de Etidio a 10 mg/ml.

Procedimiento:

- 1).- Preparación del gel de agarosa 1.5% :
Se pesaron 1.5 g de agarosa, y se añadieron a 60 ml de Urea 10 M y 30 ml de H₂O-DEP. La mezcla se calentó en baño María hasta disolver la agarosa. Se dejó enfriar hasta aproximadamente 60°C y luego se añadieron 10 ml de buffer de citratos 0.25 M, pH 3.5. Posteriormente se vació en el molde para el gel (preferentemente en placa vertical) y se mantuvo a 4°C por varias horas para que se solidificara.
- 2).- Preparación de la muestra:
10 µl del RNA (1 µg/µl)
10 µl de H₂O-DEP
30 µl de Urea 10 M
1 µl de Azul de bromofenol al 0.5%
- 3).- Electroforesis:
Las muestras se aplicaron en las casillas del gel y éste se sometió a electroforesis a 80 volts por 3 a 4 h a temperatura ambiente. Al término de la electroforesis, el gel se colocó en una solución de 200 ml de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.6 conteniendo 1 µg/ml de bromuro de etidio durante 20 a 30 minutos. Después se destiñó el gel durante 5 minutos en agua y se analizó bajo la luz ultravioleta. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Criterios para establecer cantidad, pureza e integridad del RNA extraído

Para determinar la concentración del RNA se tomó en cuenta que una absorbancia de 1.0 a 260 nm equivale a 40 µg/ml de RNA por lo que se multiplica la absorbancia obtenida por 40 y por el factor de dilución; por ejemplo: Si tenemos una solución de RNA que originalmente tenía un volumen de 10 µl y se diluyó en 1 ml de agua bidestilada para dar un volumen final de 1010 µl a los que se les midió la absorbancia y dió una lectura de 0.277 se obtiene primero el factor de dilución dividiendo el volumen final entre el volumen inicial o sea 1010/10 lo que da un factor de 101. Ahora si multiplicamos 40 x 0.277 x 101 nos da una concentración de 1.119 mg de RNA/ml.

Para determinar la pureza del RNA, generalmente se obtiene la

razón de la absorbancia a 260 nm UV entre la absorbancia a 280 nm UV. Una razón de 1.8 ó mayor indica que la preparación es aceptablemente pura.

Para establecer la integridad de las moléculas de RNA obtenidas, se visualiza el gel de agarosa, en el que se sometieron a electroforesis las preparaciones y el cual fué teñido con bromuro de etidio. Debe observarse una relación en el patrón de fluorescencia de 2:1 entre las bandas 28 y 18 S (respectivamente) de los RNA ribosomales. Aunque éstos son sintetizados en cantidades equimoleculares en la célula ya que son derivados a partir de un precursor común, el RNAr 28 S es aproximadamente dos veces mayor en longitud que el RNAr 18 S por lo que atrapa dos veces más la cantidad de bromuro de etidio y por ello presentará una fluorescencia de mayor intensidad.

Electroforesis de RNA en condiciones desnaturalizantes con Glixal

Utilizamos una modificación a la técnica descrita por Mc. Master en 1979 (27)

Reactivos y Soluciones

- a). - Agua-DEP
- b). - Glixal 6 M. Se preparó una solución al 40 % (6 M), debido a que se oxida fácilmente al aire, la solución de glixal fué desionizada pasándola a través de una columna de resina (Bio-Rad AG 501-X8) hasta que el pH fué neutro, luego se dispuso en alícuotas y se almacenaron a -20° C.
- c). - Dimetilsulfóxido (DMSO)
- d). - Agarosa al 1.2 %
- e). - Buffer de NaH_2PO_4 0.1 M y 10 mM. Se disolvieron 10.7 g en el mínimo volumen de agua, se ajustó el pH a 7.0 con ácido fosfórico, se aforó a 1 l y se esterilizó en autoclave
- f). - NaOH 50 mM
- g). - Azul de Bromofenol al 0.25 %

Preparación de la muestra:

- 1.- Se ajustó la concentración de RNA a aproximadamente 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de RNA poli A⁺ y 15 μg de RNA total de placenta humana
- 2.- Las muestras se trataron con glixal mediante la siguiente mezcla de reacción :

RNA	10.00 μ l
Agua bidestilada-DEP	3.75 μ l
Buffer de NaH_2PO_4 0.1 M	5.00 μ l
DMSO	25.00 μ l
Glioxal	6.25 μ l
	<hr/>
	50.00 μ l

- 3.- La mezcla se incubó a 50°C durante 1 h.
- 4.- Se agregaron 12.5 μ l de jugo azul 5x y se sometieron a electroforesis 2 μ g de RNA poli A⁺ por carril ó 10 μ g por carril de RNA total.

Preparación del gel

- 1.- Se preparó un gel vertical de agarosa al 1.2% con buffer de fosfatos 10 mM, se dejó solidificar a temperatura ambiente
- 2.- Se mantuvo el gel vertical en la cámara de electroforesis y se acopló un sistema de recirculación del buffer (buffer fosfatos 10 mM)
- 3.- Se aplicó la corriente eléctrica (60 volts) y una vez que el azul de bromofenol entró al gel se encendió el sistema de recirculación.
- 4.- Se permitió que el azul de bromofenol migrara aproximadamente un 60 % de la longitud total del gel.
- 5.- El gel se colocó en una solución de NaOH 50 mM durante 15 minutos

Transferencia del RNA a papel filtro de Nitrocelulosa

Utilizamos una modificación a la técnica descrita por Thomas en 1980 (42).

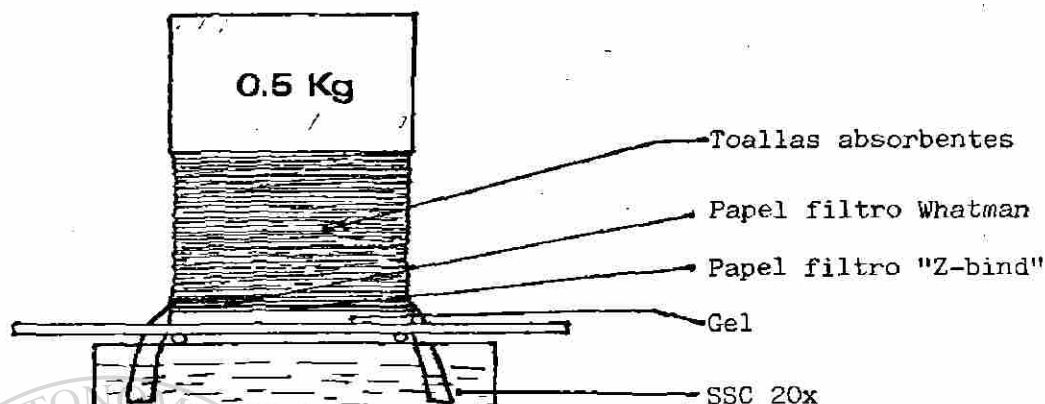
Soluciones y Reactivos:

- a).- Solución salina de citratos SSC 20x. Se disolvieron 175 .3 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio en 800 ml de agua . Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10 N. Se aforó a 1 l., y se esterilizó en autoclave (15 lb/pul²/15 min).
- b).- Agua tridestilada y esterilizada a 15 lb/pul²/15 min..

Procedimiento:

- 1.- Se hizo un puente sumergiendo en SSC 20x ambos extremos de

un papel Whatman 3 MM colocado sobre un rectángulo de vidrio ó lucita en la parte superior (ver fig.abajo) de un recipiente que contiene el SSC 20x.



- 2.- Se colocó el gel sobre papel Whatman 3 MM
- 3.- Sobre el gel se colocó una membrana de nylon "Z-bind" previa y brevemente humedecida en agua tridestilada estéril y en SSC 20x durante 5 minutos.
- 4.- Se colocaron dos tiras de papel filtro Whatman sobre el papel filtro "Z-bind", que habían sido previamente humedecidas con SSC 20x
- 5.- Se cortaron cuidadosamente todos los extremos ó excesos de papel y se eliminaron todas las burbujas entre cada filtro que se adicionó y el gel
- 6.- Se cortó un trozo del gel, así como de los filtros, en la parte superior izquierda; lo que sirvió como referencia de la posición de la primera muestra.
- 7.- Después se adicionaron aproximadamente 100 servilletas ó toallas absorbentes.
- 8.- Enseguida se colocaron 0.5 Kg de peso distribuido homogéneamente.
- 9.- La transferencia se llevó a cabo durante 20 h a temperatura ambiente. Se hicieron dos cambios de toallas absorbentes humedecidas, por toallas secas.
- 10.- Al término del tiempo, se retiró la mambrana "Z-bind" ya con las muestras transferidas y se colocó entre 2 tiras de papel Whatman 3 MM.
- 11.- Posteriormente, el filtro se dejó secar a temperatura ambiente.

Hibridización tipo "Northern"

Utilizamos una modificación a la técnica descrita por Thomas en 1980 (42).

Soluciones:

a).- Solución de prehibridización: Se mezcló en agua estéril lo siguiente: SSC 5x, solución Denhardt (Ficoll 0.02 %, polivinilpirrolidona 0.02% y BSA 0.02%) 10x, NaH_2PO_4 0.05 M, pH 6.7, dextrán sulfato al 5%, formamida al 20%, agua estéril.

b).- Solución de hibridización: SSC 5x, Denhardt 1x, NaH_2PO_4 0.02 M, pH 6.7, dextrán sulfato al 10%, formamida al 20%, DNAc de hPL, marcado radiactivamente con ^{32}P (2×10^4 cpm).

c).- Solución SSC 2x + SDS 0.1%. Se disolvieron 100 ml de SSC 20x y 10 ml de SDS al 10 % en 800 ml de agua-DEP y luego se aforó a 1 l. De la misma manera se prepararon las siguientes soluciones:

d).- SSC 1x + SDS 0.1%

e).- SSC 0.5x + SDS 0.1%

f).- SDS 0.2% + SDS 0.1%

Procedimiento:

1.- El filtro de la transferencia se sumergió en agua bidestilada durante 10 min a temperatura ambiente.

2.- Se transfirió a una bolsa de plástico conteniendo la solución de prehibridización hasta cubrir el filtro, se eliminaron las burbujas y posteriormente se selló la bolsa cuidadosamente. Se incubó a temperatura ambiente con agitación lenta por 4 h.

3.- Se eliminó la solución de prehibridización de la bolsa y se reemplazó por la solución de hibridización.

4.- Se selló la bolsa y se incubó a temperatura ambiente toda la noche con agitación suave.

5.- Se eliminó la solución de hibridización y el filtro se sometió a tres lavados con una solución que contenía diferentes concentraciones de SSC (2x, 1x, 0.5x y 0.2x) y SDS al 0.1%, cada lavado se llevó a cabo a temperatura ambiente, con agitación suave durante 15 min.

6.- Finalmente, el filtro se dejó secar al aire y se expuso a una película para rayos X, en un cartucho que fué almacenado a 70°C por 20 h.

Hibridización en gota seca ("Dot Blot")

Utilizamos la técnica descrita por Maniatis y cols. en 1982 (24)

Soluciones y Reactivos:

- a).- Solución de prehibridización: Se preparó en agua estéril SSC 5x, solución Denhardt 10x, NaH_2PO_4 0.05 M, pH 6.7, dextrán sulfato al 5%, formamida al 20%, agua bidestilada estéril.
- b).- Solución de hibridización: Se preparó en agua lo siguiente SSC 5x, solución Denhardt 10x, NaH_2PO_4 0.05 M, pH 6.7, dextrán sulfato al 5%, formamida al 20%, DNAC de hPL marcado radiactivamente con ^{32}P (10^4 cpm).
- c).- NaOH 0.2 N. 4.0 g de NaOH se disolvieron en 500 ml de agua-DEP
- d).- Tris 0.5 M, pH 7.5 Se disolvieron 30.25 g de Trizma base en 400 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 7.5 con HCl concentrado y se afioró a 500 ml con agua bidestilada
- e).- Agua bidestilada estéril

Procedimiento:

A los DNA de los plásmidos recombinantes de las clonas del primer tamizaje se les hizo un ensayo de hibridización utilizando el DNAC de hPL marcado radiactivamente con ^{32}P de la siguiente manera:

- 1.- Se aplicaron 2 μl de DNA de los plásmidos sobre una tira rectangular de papel filtro "Z-bind" sobre un cuadrículado 0.5 cm^2 ; se dejaron secar las muestras a temperatura ambiente sobre una fuente luminosa (para ayudar a secar rápidamente).
- 2.- El filtro conteniendo las muestras se colocó sobre una tira de papel Whatman 3 MM empapado con una solución de NaOH 0.2 N durante 5 minutos.
- 3.- El filtro se transfirió a una tira de papel Whatman 3 MM empapado con una solución de Tris 0.5 M pH 7.5 durante 5 minutos.
- 4.- El filtro se transfirió finalmente, durante 5 minutos, a una tira de papel Whatman 3 MM con agua esterilizada durante 5 minutos.
- 5.- Se permitió secar al aire libre.

- 6.- El filtro se colocó en una bolsa de plástico y se le adicionó la solución de prehibridización. Se selló la bolsa evitando dejar burbujas de aire y se incubó a temperatura ambiente con agitación suave por 4 h.
- 7.- Se desechó la solución de prehibridización y en su lugar se añadió solución de hibridización, se selló nuevamente la bolsa evitando dejar burbujas. Se incubó a temperatura ambiente con agitación suave por 20 h.
- 8.- Se desechó la solución de hibridización y el filtro se transfirió a una charola conteniendo SSC 2x donde se lavó muy brevemente.
- 9.- Inmediatamente, se transfirió el filtro a una solución conteniendo SSC 1x y SDS 0.1%. Se lavó suavemente durante 15 min. Se hicieron dos lavados más.
- 10.- Finalmente el filtro se dejó secar al aire y se expuso a una película para rayos X a -70°C por al menos 18 h.

Hibridización de colonias in situ

Se siguió el procedimiento descrito por Hanahan y Meselson en 1980 (18).

Soluciones y Reactivos:

- a).- Medio Luria-Bertani (LB): Se preparó disolviendo en agua lo siguiente: Bactotriptona 1%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, se ajustó el pH a 7.5 con NaOH 10 N y se esterilizó en autoclave a 15 lb/pul²/15 min cuando la temperatura bajó a 50°C se le añadió 15 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina ó 500 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol.
- b).- Medio LB-Agar. Se preparó de igual manera que el medio LB pero a éste además se le añadió agar al 1.5 %. Se esterilizó en el autoclave a 15 lb/pul²/15 min y cuando la temperatura bajó a 50°C se le añadió 15 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina ó 500 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol.
- c).- Glicerol 80%. 80 ml de glicerol se mezclaron con 10 ml de agua bidestilada, se agitó bien y se esterilizó en el autoclave

Soluciones para el lisado de bacterias:

- d).- NaOH 0.5 M . se disolvieron 10 g de NaOH en 500 ml de agua
- e).- Tris 1 M, pH 8.0 . 60.5 g de trizma base se disolvieron en 400 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 8.0 con HCl concentrado y se aforó a 500 ml con agua bidestilada

- f).- Tris 1 M, pH 8.0 + NaCl 1.5 M . 60.5 gr de trizma base se disolvieron en 150 ml de agua y se le ajustó el pH a 8.0 con HCl concentrado, luego se le añadieron 312.5 ml de NaCl 2 M y se aforó a 500 ml con agua bidestilada.
- g).- Solución de lavado: Se preparó en agua bidestilada estéril Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 1M, y EDTA 1 mM
- h).- Solución de prehibridización: consta de SSC 6x, Solución Denhardt 5x, SDS al 0.2% y EDTA 1 mM, pH 8
- i).- Solución de hibridización: consistió de lo siguiente SSC 6x, Denhardt 5x, SDS al 0.2%, EDTA 0.1 mM, pH 8 y DNac de hPL marcado radiactivamente con ^{32}P (2×10^4 cpm/ filtro)

Antes de llevar a cabo la hibridización in situ se hizo lo siguiente:

Almacenamiento del banco de DNac

Cada una de las colonias bacterianas obtenidas de la transformación con los plásmidos portadores de las moléculas de DNac, se inocularon en viales conteniendo caldo LB complementado con tetraciclina a 15 µg/ml debidamente etiquetados y numerados. El proceso fue el siguiente:

- 1.- Utilizando palillos de madera estériles, se levantaron cuidadosamente una por una las colonias bacterianas de las cajas de Petri y se inocularon en los tubos con caldo LB-tetraciclina.
- 2.- Todos los tubos ya inoculados se incubaron a 37°C por 12 h con agitación continua.
- 3.- A cada vial se le añadieron, posteriormente, 2 volúmenes de glicerol estéril al 80%, se mezcló bien y se almacenaron a -20°C

Hibridización de colonias in situ

Procedimiento:

a). Replicación

- 1.- Se recortaron filtros de Nitrocelulosa para placas de Petri de aproximadamente 100 mm de diámetro, los filtros se sumergieron en agua, cuando estuvieron bien empapados se colocaron entre dos trozos de papel Whatman 3 MM y se envolvieron en aluminio. Posteriormente fueron esterilizados en autoclave a 15 lb/pul²/10 min.
- 2.- Los filtros de nitrocelulosa se colocaron sobre placas de

Petri conteniendo medio LB-Agar-Tetraciclina (15 µg/ml) que habían sido preparadas un día antes.

- 3.- Cada una de las colonias se transfirieron al papel filtro de nitrocelulosa sobre el medio LB-Agar guardando una distancia de aproximadamente 1 cm entre ellas para evitar mezclas de colonias.
- 4.- Las colonias se dejaron crecer a 37°C hasta que alcanzaron un tamaño de 2.0 mm de diámetro aproximadamente

b). Amplificación

- 1.- Los filtros conteniendo las colonias bacterianas, fueron transferidas a placas LB-Agar conteniendo cloranfenicol (500 µg/ml) y se incubaron a 37°C por 24 h.
- 2.- Posteriormente los filtros fueron colocados sobre una hoja de papel Whatman 3 MM empapada con NaOH 0.5 N donde permanecieron durante 20 min.
- 2.- Se colocaron los filtros sobre papel Whatman 3 MM seco durante 5 min. y se volvieron a repetir los pasos 2 y 3 una vez más.
- 4.- Los filtros ya secos se pasaron ahora a una hoja de papel Whatman 3 MM empapada con Tris 1 M, pH 8.0 y se dejaron reposar durante 20 min. Luego se dejaron secar al aire por 5 a 10 min. Este paso se repitió una vez más.
- 5.- Posteriormente los filtros se colocaron sobre una tira de papel Whatman 3 MM empapado con Tris 1 M, pH 8.0 y NaCl 1.5 M, luego se dejaron secar al aire libre.
- 6.- Los filtros ya secos se hornearon al vacío a 80°C durante 2 h.

c). Hibridización

- 1.- Los filtros se lavaron con la solución de lavado por 2 hrs. a 38°C en una charola (50 ml/filtro).
- 2.- Posteriormente cada uno de los filtros fueron colocados en bolsas de plástico conteniendo la solución de prehibridización e incubados a 38°C por 4 h con agitación suave.
- 3.- Los filtros se introdujeron a una bolsa de plástico y se les añadió la solución de hibridización, se incubaron a 38°C por 12 h con agitación suave.

- 4.- Posteriormente se desechó la solución de hibridización y a los filtros se les hicieron tres lavados sucesivos de 2 h cada uno con SSC 6x y SDS 0.1% a 38°C con agitación suave.
- 5.- Finalmente se les hizo un lavado a los filtros con SSC 6x.
- 6.- Se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se expusieron a una película para rayos X y se almacenaron a -70°C por 12 h.

Minipreparaciones de plásmidos

Se empleó la técnica descrita por Birnboim y Doly (5), con algunas modificaciones introducidas por el Dr. Hugo A. Barrera.

Soluciones:

- a).- Solución I (solución de Lisozima), se mezclaron Lisozima 2mg/ml, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0. Se preparó inmediatamente antes de usarse y se almacenó a 0°C.
- b).- Solución II (solución alcalina-SDS). NaOH 0.2 N, SDS 1 %, para 1 ml se mezcló lo siguiente: 100 µl de agua bidestilada, 100 µl de SDS al 10 % y 20 µl de NaOH 10 N en 780 µl de agua. Se almacenó a temperatura ambiente donde es estable hasta por una semana.
- c).- Solución III (solución de alta concentración de sales) acetato de potasio 3 M, acetato de sodio 2 M. Se prepararon 100 ml disolviendo 29.4 g de acetato de potasio y 11.3 ml de ácido acético glacial en 50 ml de agua bidestilada y finalmente se aforó a 100 ml.
- d).- Solución IV. acetato de Sodio 0.1 M y Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 . 1.3 g de acetato de sodio se disolvieron en 50 ml de agua bidestilada, después se añadieron 5 ml de Tris-HCl 1 M, pH 8.0 y se aforó a 100 ml.
- e).- Solución de RNAasa RNAasa libre de DNAasa . se disolvió RNAasa pancreática (RNAasa A) a una concentración de 10 mg/ml en Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 y NaCl 15 mM. Se calentó a ebullición en baño María durante 15 min y se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente . Se distribuyó en alícuotas y se almacenó a -20°C.

- f).- Fenol saturado. El fenol se saturó varias veces con un volumen igual de buffer de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0 y β -mercaptoetanol, hasta que el pH de la fase acuosa fué >7.5. La solución del fenol equilibrado con buffer se almacenó a 4° C por periodos de hasta un mes.
- g).- Solución Sevage cloroformo-alcohol isomílico, 24:1.
- h).- Alcohol etílico al 70% y absoluto
- i).- Buffer de Tris-EDTA (TE= Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM). 2 ml de EDTA y 10 ml de Tris-HCl 1 M se disolvieron a 1 l de agua y se esterilizó en autoclave.
- j).- Medio LB conteniendo 15 μ g/ml de tetraciclina

Procedimiento:

- 1.- Cada una de las clonas de interés se crecieron en 4 ml de medio LB conteniendo tetraciclina (15 μ g/ml) durante 18 hrs a 37° C con agitación continua.
- 2.- Se transfirieron 3 ml de cultivo de cada clona a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml mediante dos centrifugaciones sucesivas (un min en cada una) en una microcentrífuga. Se decantó el sobrenadante conservando la pastilla. El resto de cada cultivo se almacenó a -20° C, después de la adición de glicerol a una concentración final de 40%.
- 3.- Congelamos las pastillas por 30 min a -20° C. Posteriormente se descongelaron a temperatura ambiente, y se colocaron en hielo.
- 4.- Cada pastilla bacteriana se resuspendió en 100 μ l de solución I y se incubó a 0° C por 30 min.
- 5.- Se añadieron 200 μ l de solución II al tubo, se agitó suavemente y se incubó a 0° C por 5 min.
- 6.- Después se añadieron 150 μ l de solución III, se mezcló el contenido suavemente por inversión durante unos segundos y luego se incubó a 0° C por 1 h.
- 7.- El tubo conteniendo la mezcla se centrifugó por 5 min. y 400 μ l del sobrenadante se transfirieron a otro tubo.

- 8.- Al sobrenadante se le añadieron 200 μ l de fenol (saturado con Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0) se agitó en vortex, luego se le añadieron 200 μ l de Sevage, se volvió a agitar, se centrifugó durante un minuto en la microcentrífuga y se colectaron de 380 a 400 μ l de la fase acuosa (capa superior).
- 9.- A éste, se le añadió 1 ml de etanol absoluto y se dejó precipitar durante ~2 min a temperatura ambiente.
- 10.- Se colectó el precipitado mediante centrifugación por 2 min y se descartó el sobrenadante.
- 11.- La pastilla se disolvió en 100 μ l de solución IV y se volvió a precipitar con 2 volúmenes de etanol y se volvió a descartar el sobrenadante.
- 12.- La pastilla se lavó bien con 1 ml de etanol al 70 % a temperatura ambiente.
- 13.- Finalmente la pastilla se disolvió en 48 μ l de TE y 2 μ l de la solución de RNAasa. Se incubó a 37° C por 30 min.

Preparación de plásmidos a gran escala

El método que utilizamos es una modificación a la técnica descrita por Maniatis y cols. en 1980 (24)

Reactivos y Soluciones:

- a).- Tris-HCl 1 M. 12.1 g de trizma base se disolvieron en 50 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH al valor deseado con HCl concentrado.
- b).- EDTA 0.5 M, pH 8.0. se disolvieron 18.6 g de EDTA en 50 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 8.0 con NaOH 10 N y se aforó a 100 ml.
- c).- NaCl 5 M. 29.22 g de NaCl se disolvieron en 70 ml de agua y se aforó a 100 ml, se distribuyó en alícuotas y se esterilizó en autoclave.
- d).- Acetato de Sodio (NaOAc) 0.3 M, pH 5.2. se disolvieron 4.08 g de acetato de sodio trihidratado en 50 ml de agua destilada, se le ajustó el pH a 5.2 con ácido acético glacial y se aforó a 1 l. Se esterilizó en autoclave.
- e).- SDS al 10 %. 10 g de SDS se disolvieron en 100 ml de agua bidestilada la solución se calentó a 65° C para facilitar su disolución.

f).- Bromuro de Etidio (10 mg/ml). se añadió 1 g de bromuro de etidio a 100 ml de agua bidestilada. La solución se agitó por varias horas hasta que el colorante se disolvió.

g).- Buffer TE (ver inciso i pág. 25)

h).- Solución Salina M9 10x.

Se disolvieron en el siguiente orden

Para 1 l:

NaH ₂ PO ₄	70 g.
KH ₂ PO ₄	30 g.
NaCl	5 g.
NH ₄ Cl	10 g.

Se mezclaron perfectamente en 800 ml de agua destilada y se aforó a 1 l. Se esterilizó en autoclave.

i).- CaCl₂ 0.01 M. 1.11 g de CaCl₂ se disolvieron en 800 ml de agua bidestilada, se aforó a 1 l, luego se dispuso en alícuotas y se esterilizó en autoclave.

j).- MgSO₄ 0.1 M, se disolvieron 21.65 g de MgSO₄ 7H₂O en 800 ml de agua bidestilada y se aforó a 1 l. Se esterilizó en autoclave

k).- Glucosa al 20 %. 20 g de glucosa se disolvieron en 80 ml de agua destilada caliente y se aforó a 100 ml. Se esterilizó por filtración 6 en autoclave y se almacenó a 4° C.

l).- Casaminoácidos al 20 %. 25 g de casaminoácidos se disolvieron en 150 ml de agua destilada, se esterilizó en autoclave y se almacenó a 4° C.

m).- Vitamina B₁ (tiamina) 2 mg/ml, 0.2 g de tiamina se disolvieron en 100 ml de agua bidestilada, se esterilizó por filtración y se almacenó a 4° C.

n).- Medio de cultivo M9. Se preparó como sigue:

Para 1 l de cultivo

840 ml de agua bidestilada
100 ml de solución salina M9 10x

Se esterilizó en autoclave y se agregaron después las siguientes soluciones*:

10.0	ml de CaCl ₂ 0.01 M
10.0	ml de MgSO ₄ 0.1 M
20.0	ml de glucosa al 20 %
20.0	ml de casaminoácidos al 20 %
0.2	ml de tiamina (2mg/ml)

* cada una de éstas soluciones se esterilizaron por separado.

o).- Solución de sacarosa al 25 %. 25 g de sacarosa se disolvieron en 100 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8.0. Se esterilizó por filtración y se almacenó a 4° C.

p).- Solución de lisozima (2 mg/ml), se preparó fresca de la

siguiente manera: Se disolvieron 2 mg de lisozima por ml de la solución de sacarosa al 25 % en Tris-HCl 50 mM, pH 8.0

Procedimiento:

a). Crecimiento de bacterias

- 1.- Se inocularon 20 ml de medio LB (con tetraciclina a 15 µg/ml) con una sola colonia bacteriana portando el plásmido recombinante y se dejó crecer toda la noche con agitación continua (200 rpm) a 37° C.
 - 2.- Se transfirieron los 20 ml de cultivo a un litro de medio M9 (con tetraciclina) en un matraz de 2 litros.
 - 3.- Se tomaron 5 ml del medio inoculado para usarse como blanco ajustando a cero de absorbancia en el espectrofotómetro
 - 4.- El medio inoculado se agitó a 230 rpm a 37° C y se registró la absorbancia a 600 nm a una, 1.5 y 2 h. hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica entre 0.3 y 0.4.
 - 5.- Cuando el cultivo alcanzó la absorbancia de 0.3 se le agregaron 250 mg de cloranfenicol y se continuó la agitación a 37° C por 12 h.
- De aquí en adelante, se mantuvo todo en hielo y no se excedieron los tiempos especificados
- 6.- Se realizaron centrifugaciones sucesivas del medio de cultivo en una centrifuga refrigerada DAMON IEC B-20A a 7,500xg (en un rotor IEC No. 872 de ángulo fijo) durante 10 min a 4° C, de esta forma se colectaron las bacterias en forma de pastilla.

7.- El sobrenadante se descartó por decantación, tratando de eliminarlo completamente usando una pipeta Pasteur.

8.- La pastilla se congeló a -20° C durante 30 min.

b.) Preparación de un lisado claro (a partir de un litro de cultivo).

- 1.- Se descongeló la pastilla a temperatura ambiente y luego se colocó nuevamente sobre hielo.
- 2.- A dicha pastilla, se le añadieron 6.25 ml de la solución de sacarosa al 25% y se resuspendieron perfectamente las células usando una pipeta de 10 ml.
- 3.- Enseguida se añadieron 1.5 ml de solución de lisozima 2 mg/ml a la suspensión. Se agitó continua y suavemente en un baño con hielo por 5 min.

- 4.- Se añadieron 1.25 ml de EDTA 0.5 M . y se agitó en un baño con hielo por 2 min.
- 5.- Posteriormente se añadieron 10 ml de solución de tritón X-100 a la suspensión, mientras se estaba agitando y sin dejar de hacerlo. Se mezcló perfectamente en un baño con hielo durante 15 min, (la suspensión se tornó de lechosa a translúcida).
- 6.- El lisado celular, se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman L5-50E por 30 min a 30,000 rpm (94,000 xg) en botellas de policarbonato de 30 ml en un rotor 60 Ti.
- 7.- Se descartó el sobrenadante cuidadosamente, evitando transferir el DNA cromosómico (porción gelatinosa de la pastilla). Se dejó algo de líquido cerca de la pastilla, para reducir la contaminación con el DNA de Escherichia coli.

g) Aislamiento del plásmido

- 1.- Al lisado se le agregó buffer TE 1x el volumen suficiente para completar 20 ml, en caso de ser necesario.
- 2.- Se añadieron 0.95 g de CsCl/ml de lisado (19 g/20 ml). Se disolvió el CsCl con agitación suave.
- 3.- Enseguida se añadió 1 ml de solución de bromuro de etidio en buffer TE y la mezcla se transfirió a un tubo de polipropileno de sellado rápido al calor "Quick-seal" para rotor vertical VTi 50 (Beckman). Los tubos se llenaron completamente y se sellaron por calor. Se utilizó aceite mineral para el llenado total.
- 4.- Se centrifugó por 12 h. a 25° C en un rotor VTi 50, en una ultracentrífuga Beckman L5-50E a 48,000 rpm (230,000 xg).
- 5.- Al término de la centrifugación se observaron los tubos con una lámpara de luz ultravioleta de onda larga a fin de detectar las bandas de DNA tanto del plásmido como del cromosómico. Se colectó el DNA del plásmido (banda inferior), con una jeringa de 5 ml. portando una aguja ancha.
- 6.- La solución extraída se colocó en un tubo graduado de 15 ml (cubierto con papel aluminio). Se eliminó el bromuro de etidio de la solución de DNA mediante extracción con 1 volumen de alcohol isoamílico, agitando muy bien y repitiendo las extracciones hasta eliminar el bromuro de etidio de la solución.
- 7.- A la solución se le hizo diálisis por 2 h contra 2 l de TE,

enseguida se le hizo un tratamiento con RNAasa (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a 37° C por 30 min y un tratamiento con Proteinasa K (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en presencia de SDS al 0.2 % por 1 h a 37° C. Enseguida, se le hizo una extracción con 1/2 volumen de fenol y 1/2 volumen de Sevage, agitando bien durante 1 min, después de la adición de cada volumen. Posteriormente se centrifugó por 5 min en una centrífuga clínica y se colectó la fase acuosa (superior) en otro tubo. Enseguida, se le hizo una extracción con 1 volumen de Sevage durante 1 min, se volvió a centrifugar y la fase acuosa se colectó en otro tubo, descartando la fase orgánica.

8.- A la fase acuosa se le añadió NaCl a una concentración final de 0.2 M y se precipitó en frío añadiendo 2.5 volúmenes de etanol al 100% (2 h a -20° C). Se colectó el DNA precipitado mediante centrifugación a 8000 g durante 1 h (en un rotor IEC No. 870 de ángulo fijo equivale a 10,000 rpm) en una centrífuga refrigerada DAMON IEC B-20A.

9.- La pastilla se resuspendió en 0.4 ml de acetato de sodio 0.3 M pH 5 y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Enseguida se añadió 1 ml de etanol absoluto para precipitar el DNA como en el paso anterior.

10.- Se colectó el DNA por centrifugación durante 5 min en la microcentrífuga. Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70 %. Se volvió a centrifugar unos segundos, se descartó el sobrenadante y se eliminaron las trazas de alcohol por desecación mediante centrifugación al vacío por 2 min en el evaporador centrífugo al vacío, SAVANT.

11.- El DNA se resuspendió en 0.5 ml de buffer TE.

12.- Se determinó la concentración del DNA mediante la absorbancia a 260 nm (1 D.O.₂₆₀ = 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Digestiones del DNA con enzimas de restricción

En general se siguieron las instrucciones descritas por Maniatis y cols. en 1982 (24)

Soluciones y Reactivos:

a).- Al realizar digestiones se tomó en cuenta que cada enzima de restricción tiene una serie de condiciones de reacción óptima. Las principales variables son la temperatura de incubación y la composición del buffer, aunque las condiciones de temperatura son bastante estrictas, la composición del buffer pueden variar en algunas enzimas así, algunas pueden funcionar en distintos buffers. La principal diferencia en estos es la fuerza iónica ó concentración de

sales por lo que se pueden llevar a cabo reacciones de digestión simultánea con dos enzimas en el buffer de alguna de ellas siempre y cuando la otra pueda funcionar a las mismas condiciones. En general utilizamos, de acuerdo con cada enzima, alguno de los siguientes buffers:

Buffer	NaCl	Tris-HCl (pH7.5)	MgCl ₂	Ditiotreitol
bajo	0	10 mM	10 mM	1 mM
medio	50 mM	10 mM	10 mM	1 mM
alto	100 mM	50 mM	10 mM	1 mM

b).- Agua ultrapurificada estéril

c).- Se utilizaron las siguientes enzimas de restricción: Eco RI, Hae II, Hae III, Hinf I, Pvu II, Sma I, Rsa I, Pst I y Aiu I.

d).- Buffer tipo III (azul de bromofenol al 0.25 %, xilene cianol al 0.25 %, glicerol al 30 % y EDTA 60 mM), se utilizó para detener las reacciones enzimáticas. Además también se utiliza como colorante de referencia durante las electroforesis en gel de agarosa ó poliacrilamida.

Procedimiento:

Al realizar digestiones se hizo lo siguiente:

- 1).- ~~No se excedió de un quinto el volúmen de la enzima en relación con el volúmen de la reacción, ya que las enzimas vienen en un 50 % de glicerol para conservarse.~~
- 2).- Se utilizó de 1 a 2 unidades* de enzima por µg de DNA, durante periodos de 1 a 2 h ó bien menor cantidad de enzima por periodos mayores de tiempo.
- 3).- Al realizar las mezclas de reacción se procedió a colocar los reactivos en el siguiente orden:
 - a). agua
 - b). buffer
 - c). DNA
 - c). enzima (debe mantenerse siempre en frío)
- 4).- Al finalizar el tiempo se detuvo la reacción añadiéndole buffer tipo III 6x a una concentración final 1x.
- 5).- Cuando se necesitó digerir varias muestras de DNA con la misma enzima, se colocaron los DNA's primero en cada uno de los tubos, luego se agregó una mezcla, hecha inmediatamente antes de usarse, de : agua, buffer y enzima.

* 1 unidad = digiere 1 μ g de DNA en 1 h a 37° C.

Electroforesis en geles de agarosa ó poliacrilamida

Utilizamos los métodos descritos por Cab Barrera en 1986 (8)

Soluciones y Reactivos:

Electroforesis en gel de agarosa

- a).- Buffer Tris-acetato (TAE) 50x (Tris-acetato 2.0 M y EDTA 0.1 M), 242 g de trizma base, 57.1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0.5 M se disolvieron en 600 ml de agua bidestilada y se aforó a 1 l. Se esterilizó en autoclave.
- b).- Solución TAE 1x. Se mezclaron 20 ml de TAE 50x con 980 ml de agua destilada. Solución que fué empleada para preparar los geles de agarosa, así como también para buffer de corrimiento.
- c).- Gel de agarosa. se utilizaron varias concentraciones (1, 1.5 y 2 %) para un gel de agarosa 1 %: se disolvieron 1 g de agarosa en 100 ml de buffer TAE 1x, se calentó la solución hasta que ésta empezó a abullir. Una vez que la solución se enfrió a 45° C se vació en la placa destinada para preparar el gel y se esperó unos minutos para que el gel solidificara.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

- d).- Buffer Tris-boratos (TBE) 10x (Tris-boratos 0.89 M, ácido bórico 0.89 M y EDTA 0.02 M). 108 g de trizma base 55 g de ácido bórico y 40 ml de EDTA 0.5 M, pH 8.0 se disolvieron en 600 ml de agua destilada se aforó a 1 l y se esterilizó en autoclave. La solución TBE 10x se utilizó para preparar el buffer, para el corrimiento de la electroforesis se utilizó a 1x.
- e).- Acrilamida al 30 %-bisacrilamida al 0.8 %. Se disolvieron 60 g de acrilamida y 1.6 g de bisacrilamida en 100 ml de agua destilada y se aforó a 200 ml.
- f).- Persulfato de amonio al 12.5 %. Se disolvieron 0.125 g de persulfato de amonio en 1 ml de agua destilada. Se mezcló perfectamente.
- g).- Gel de poliacrilamida. se utilizaron geles de 5 y 6 % para un gel de poliacrilamida al 6 % se mezcló lo siguiente:

Agua	23.075	ml
TAE 50x	0.600	ml
Acrilamida 30 %-bisacrilamida 0.8%	6.0	ml
Persulfato de amonio 12.5 %	0.022	ml
TEMED	0.100	ml
	<u>30.00</u>	ml

Procedimiento:

- 1).- Se preparó el gel de agarosa ó poliacrilamida de acuerdo como se describió más arriba, a la concentración adecuada de acuerdo al tamaño del DNA ó fragmento que se quería separar.
- 2).- Una vez solidificado el gel, se adaptó a la cámara de electroforesis ya fuera horizontal (de agarosa) ó vertical (de poliacrilamida).
- 3).- Se agregó el buffer a la cámara hasta que cubrió el gel en el caso del gel horizontal ó bien hasta que cubrió la parte superior en el caso del gel vertical.
- 4).- Enseguida se colocaron las muestras de DNA (utilizando una jeringa Hamilton de 50 µl). Las muestras se colocaron hacia el lado del gel que se encontraba en el cátodo ya que el DNA está cargado negativamente y por lo tanto migrará hacia el ánodo.
- 5).- Se conectó la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se sometió a electroforesis el gel, primeramente a 35 volts hasta que las muestras salieron de las casillas que las contenían y entraron completamente a el gel. ~~Posteriormente se aumento la corriente de 80 a 100 volts.~~
- 6).- El colorante de referencia sirvió para seguir la migración de las muestras, permitiendonos parar el corrimiento de las muestras cuando se deseaba.
- 7).- Una vez terminado el corrimiento, se sometió el gel a tinción en una solución de bromuro de etidio (2 µg/ml) durante 15 min.
- 8).- Se lavó el gel con agua de la llave y se observó colocándolo sobre un transiluminador de luz ultravioleta.

El volumen de estos reactivos puede variar según el volumen final que desee preparar, y esto de acuerdo a el tamaño de la placa que contendrá a el gel ó bien el grosor de los separadores que utilice para montar la placa.

VII. RESULTADOS

1. Extracción de RNA total de hipófisis bovinas.

Procesamos 68 cabezas de ganado bovino que obtuvimos del Rastro Municipal de la ciudad de Monterrey N.L. de las cuales obtuvimos 72 g. de hipófisis bovinas.

El presente trabajo, requirió solamente 30 g. de tejido hipofisiario, cantidad que procesamos en alícuotas de 5 g., efectuando seis extracciones de RNA de acuerdo al método de fenol-sarkosil-Proteínasa K (15) tal y como se describe en la sección de materiales y métodos.

Una vez que se llevó a cabo la homogenización del tejido y la obtención de los ácidos nucleicos totales (DNA y RNA), la separación del RNA la hicimos por precipitaciones selectivas en frío con Acetato de Sodio 3 M. (fig. 2). Obtuvimos un total de 33 mg de RNA total.

En cada una de las seis extracciones, efectuadas obtuvimos índices de pureza aceptables cuyos valores oscilaron desde 1.6 hasta 1.85 (Un buen índice de pureza se considera a un valor de 1.8).

Los RNA's que extrajimos no presentan signos de degradación, y de este RNA total obtenido, el Dr. Hugo A. Barrera separó mediante columnas de cromatografía de afinidad de celulosa oligo-dT los RNA mensajeros, logrando recuperar como RNAm poli A⁺, después de dos ciclos de cromatografía, aproximadamente 300 µg.

Al someter a electroforesis alícuotas del RNA total, así como de la fracción poli A⁺ de éste, el perfil de ambos RNA's reflejó una buena integridad observándose además en el carril de los RNAm poli A⁺ un par de bandas que oscilan entre los 700 y 900 nucleótidos y que muy probablemente corresponden a los RNAm de prolactina y hormona de crecimiento bovina, siendo estos los mensajeros más abundantes en este tejido (fig. 3).

2. El DNAc de hPL hibridiza con el RNAm de bGH.

Al hacer la comparación de las secuencias ya conocidas del DNAc de hPL (31) y las recientemente publicadas para bGH (22), encontramos que había similitud entre ambas secuencias, encontrándose entre el fragmento Hae III de 550 pb del DNAc de hPL y su porción correspondiente en el DNAc de bGH, una similitud equivalente al 73% (fig 4). El resultado de este análisis nos alentó a utilizar el DNAc de hPL para detectar por hibridizaciones moleculares la presencia de secuencias nucleotídicas para bGH. Basados en esta similitud, determinamos las condiciones a las que ambas secuencias podrían hibridizar e hicimos los siguientes experimentos:

Preparamos 8 µg de RNAm poli A⁺ para su análisis por

ANALISIS ELECTROFORETICO DE MUESTRAS OBTENIDAS DURANTE EL PROCESO DE OBTENCION DEL RNA

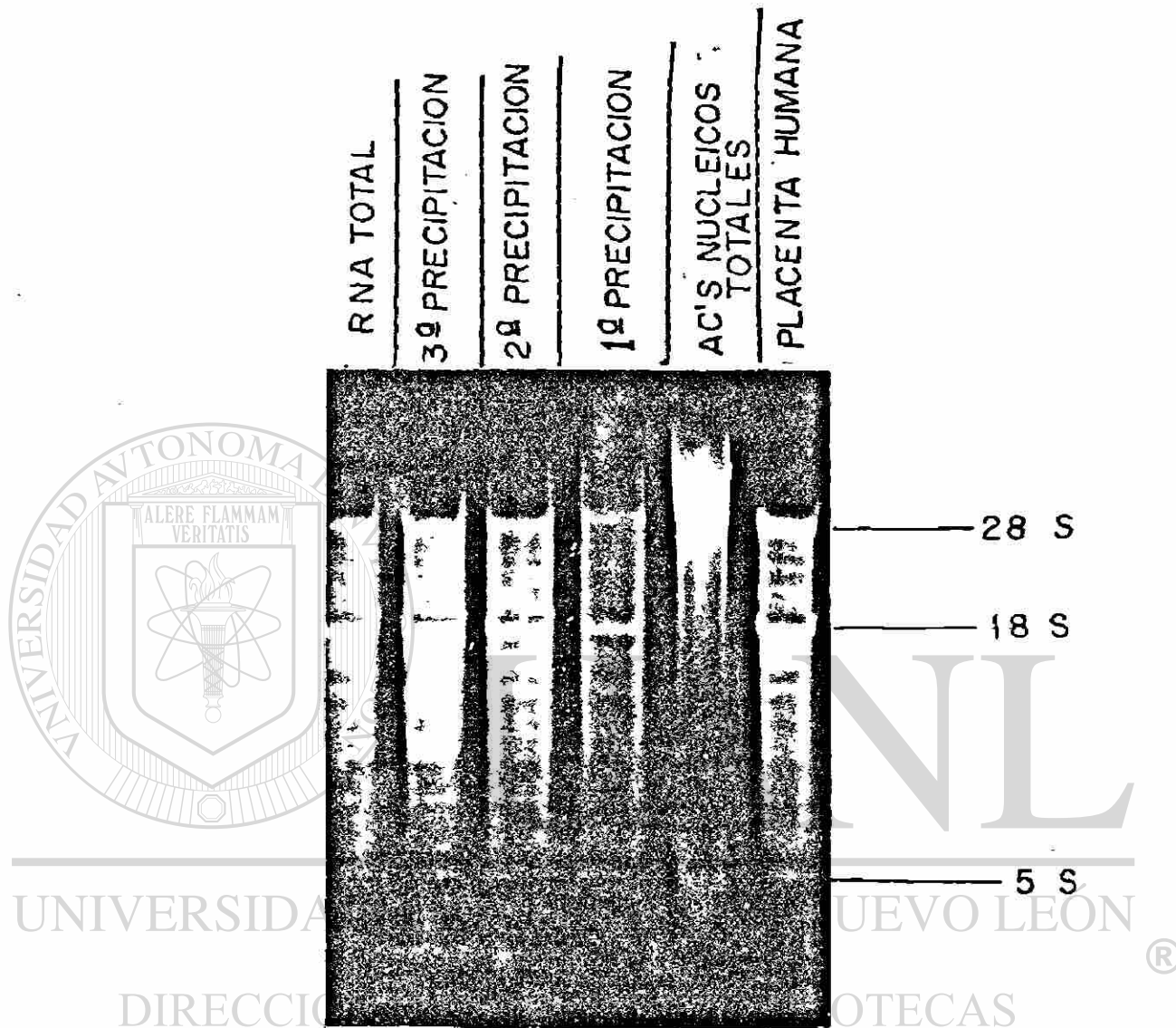


Fig 2 Electroforesis en gel de agarosa-urea-ácido al 1.5%. Se muestra la obtención del RNA total. Primero se obtuvieron los ácidos nucleicos totales (DNA y RNA) donde es más visible el DNA dada su mayor abundancia. Los siguientes carriles de derecha a izquierda, muestran la eliminación de DNA por tres precipitaciones sucesivas con Acetato de Sodio 3 M pH6.0, lo cual se puede apreciar por la disminución de la fluorescencia en la región por encima de la banda correspondiente al RNA ribosomal 28 S. El gel fué teñido con bromuro de etidio (5 µg/ml) y visualizado por iluminación con luz ultravioleta. A la derecha se indica la posición de las especies de RNA más abundantes, señaladas de acuerdo a su coeficiente de sedimentación (S).

ANALISIS ELECTROFORETICO DE LOS RNA'S DE HIPOFISIS BOVINAS EN
GELES DE AGAROSA-UREA-ACIDO

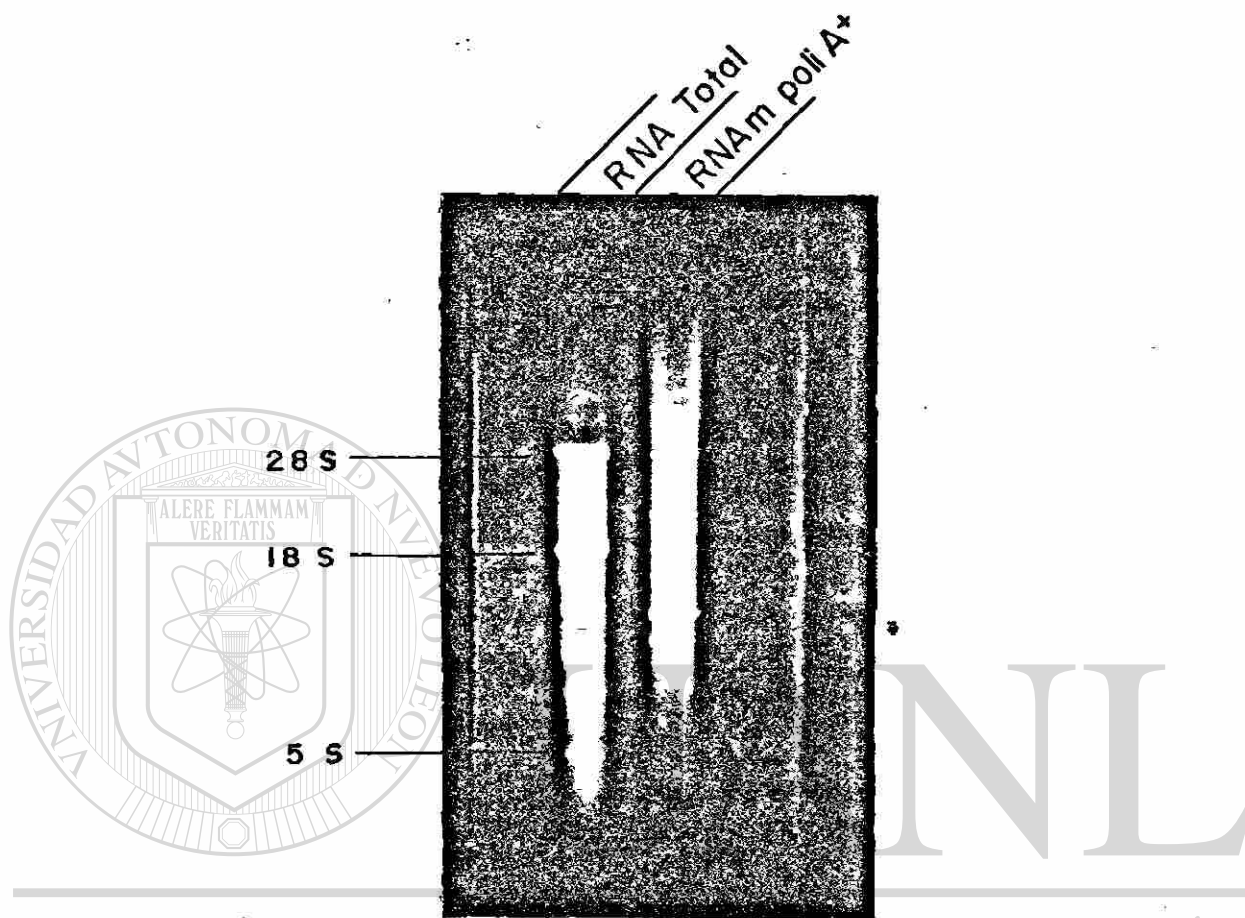


fig. 3 Comparación entre el RNA total aislado de hipófisis bovinas y su fracción correspondiente a RNAm poli A⁺ obtenido por cromatografía de afinidad en una columna de celulosa oligo (dT).

Se puede observar la buena integridad del RNA total y además en el carril del RNAm se aprecian un par de bandas enriquecidas (en el rango de 700 a 900 nt) correspondiendo muy probablemente a los RNAm de prolactina y bGH que son los más abundantes en el tejido hipofisiario. El gel fué de agarosa al 1.5 %, teñido con bromuro de etidio (5 µg/ml) y visualizado al ser iluminado con luz ultravioleta.

ANALISIS COMPARATIVO ENTRE SECUENCIAS GENICAS PARA LAS HORMONAS BOVINA Y LACTOGENICA PLACENTARIA HUMANA

CTGCTGACACCTTCAAAGAGTTTGAGCGCACCTACATCCCGGAGGGACAGAGATACTCCATC---CA
 -GAT-----A-C-G-----AGAA-----T-----AA--AC--AG--T--GT--CTG--

GAACACCCAGGTTGCCTTCTGCTTCTCTGAAACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAGCAG
 TG--T-----ACCT-----A--CT-T--T--A-A--T-CAA--T-G-G--AA-G-A---

AAATCAGACTTGGAGCTGCTTCGCATCTCACTGCTCCTCATCCAGTCGTGGCTTGGGCCCTGCAGTTCC
 ---CA-TC-A-----C-----C-----G-----G-----G-A--G--G-----

TCAGCAGAGTCTTACCAACAGCTTGGTGTGTTGGCACCTCGGACCG---TGTCTATGAGAAGCTGAAGGA
 ---G-TA-G--G-----A-C-----A-A-----A-CGA--A---C-CCTC--A-----

CCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGAGCTGGAAGATGGCACCCCCGGGCTGGGCAGATCCTC
 -A-----AAA-G-----G-AG-----C--G-G--A-----

AAGCAGACCTATGACAAAATTTGACACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTCAAGAACTACGGTCTGC
 -----CAG--G-----TC-A-ACC-T--A-----G-----

TCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCATAAGACGGAGACGTACCTGAGGGTCATGAAGTGCCGCGCTTCGG
 -A-----A-----A-G-C--GTC--A-T--C-CA-GG-C-----CT-T

GGAGGCCAGCTGTGCCTTCTAGTTGCC---AGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTTGA
 -G-----G-----G-----CGAGT--ATC--GA-----A-----CT-C-G

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS SIMILITUD = 73%

fig.4 Se muestra el análisis comparativo realizado entre las secuencias del DNAc de bGH y aquellas de hPL. En esta figura se incluyen sólo las secuencias comprendidas en el fragmento Hae III de 550 pb del DNAc de hPL. La línea superior corresponde al DNAc de bGH, mientras que en la inferior se representa la secuencia del DNAc de hPL. En ésta última, sólo se indican los nucleótidos en que difieren éstas dos secuencias. Las regiones idénticas se representan por la línea discontinua.

electroforesis en geles de agarosa en presencia de glioxal, tal y como se describe en la sección de materiales y métodos.

Colocamos en cada carril del gel 2 μg de RNAm de hipófisis bovinas alternando en el siguiente carril con 10 μg de RNA total de placenta humana (utilizado como testigo positivo). Después de la electroforesis, los RNA's se transfirieron por capilaridad de acuerdo con el método llamado "Northern" (17), del gel a un filtro de Nylon (Z-bind). El filtro lo recortamos en tiras de modo que cada tira contenía un carril de RNA total de placenta humana y un carril de RNAm poli A⁺ de hipófisis bovinas. Las tiras las sometimos a hibridización utilizando como sonda preparada por el Dr. Barrera, consistente de un fragmento de 550 pb del DNAc de hPL marcado con ³²P por la técnica de marcaje al azar con oligonucleótidos (27). Los lavados de cada filtro los hicimos con soluciones de diferentes concentraciones de sales (una tira con 0.3 M, otra con 0.15 M, otra con 0.075 M y la última con 0.03 M de NaCl). De acuerdo con los resultados que se ilustran en la figura 5, encontramos como buenas condiciones para los lavados aquellas en las que se usó una concentración de 0.15 M de NaCl.

2. Tamizaje del banco de DNAc.

a) Almacenamiento del banco de DNAc. La clonación del DNA complementario al RNAm de hipófisis bovinas, la realizó el Dr Barrera utilizando el método descrito por Gubler y Hoffman (8). El método consiste brevemente en lo siguiente: la síntesis del DNAc se hace por un proceso enzimático en dos etapas, en la primera se utiliza: RNAm de hipófisis bovinas y transcriptasa reversa. La reacción se hace en un amortiguador en presencia de dNTP's y se utiliza como cebador un oligonucleótido de desoxitimidinas (oligo-dT). De esta manera se sintetiza la primera cadena del DNAc. La segunda etapa consiste en la síntesis de la segunda cadena, también por un proceso enzimático utilizando esta vez RNAasa H y DNA polimerasa de Escherichia coli

A los DNAc bicatenarios sintetizados, se les añadió en sus extremos 3' homopolímeros de ácido desoxicitidílico con la enzima transferasa terminal. Con el fin de clonar estas moléculas de DNAc, se utilizó el plásmido pBR322 linearizado en su sitio Pst I y, portando en sus extremos 3' homopolímeros de ácido desoxiguanidílico. Tanto el vector linearizado como los DNAc's fueron mezclados para que se aparearan por complementariedad de sus extremos y la mezcla fué utilizada para transformar células de Escherichia coli, a las cuales se les había inducido previamente la capacidad de incorporar DNA foraneo por tratamiento en frío con CaCl₂. Las bacterias transformadas se sembraron en cajas de Petri que contenían LB-agar-tetraciclina (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$), como medio selectivo. Este antibiótico permitió el crecimiento de únicamente aquellas bacterias que adquirieron plásmidos. De ésta manera, se estableció el banco de DNAc a los RNAm de hipófisis bovinas.

EXPERIMENTO TIPO "NORTHERN" PARA ESTABLECER LAS CONDICIONES DE
HIBRIDIZACION ENTRE EL DNAC DE hPL Y EL RNAm DE bGH

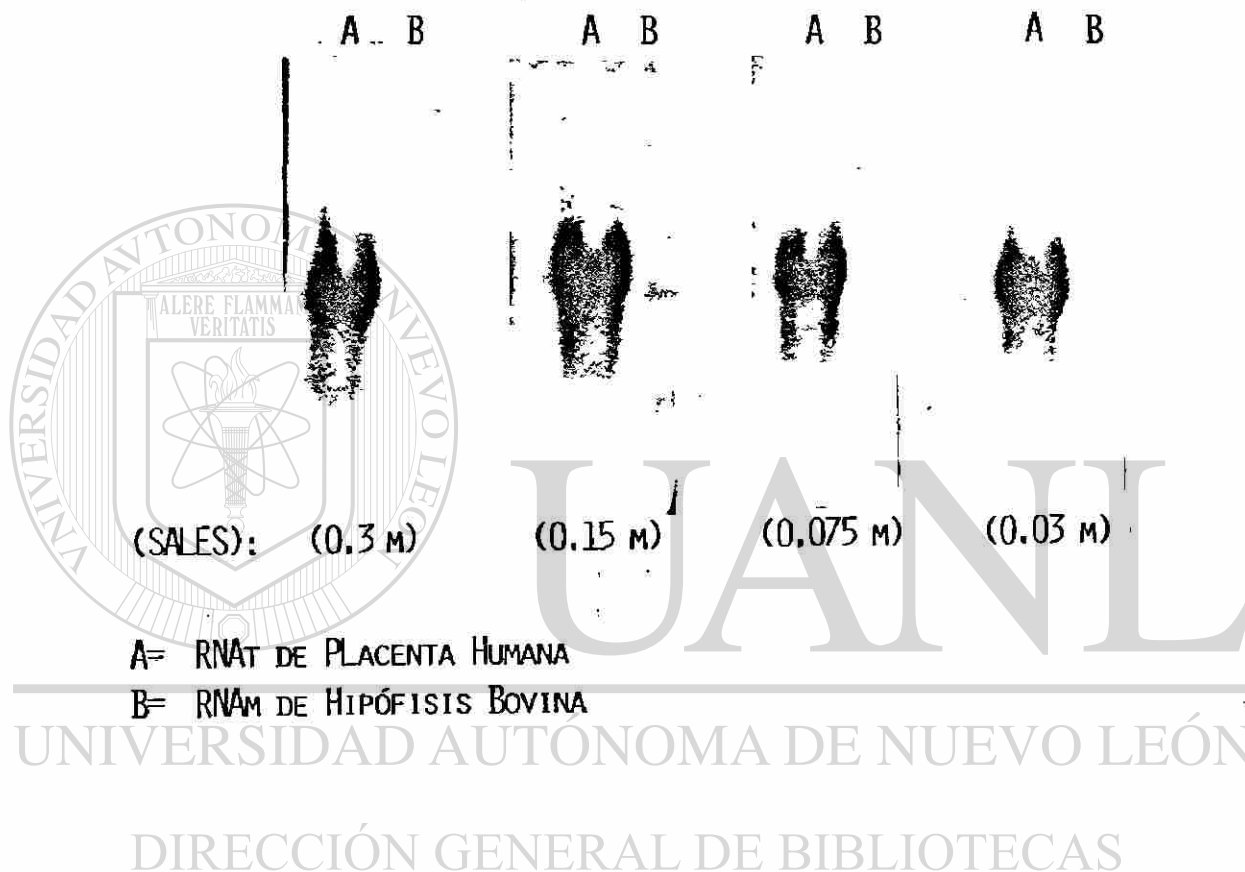


fig.5 Autorradiograma que muestra el análisis comparativo realizado para determinar la concentración de sales adecuada para una mejor capacidad de hibridización entre el DNAC de hPL y el RNAm de bGH. Como se indica, el carril A contiene RNA total de placenta humana y el B RNAm de hipófisis bovina. Abajo de cada carril se indica, entre paréntesis, la concentración de sales (NaCl principalmente) de la solución con que se lavó cada par de tiras.

De las cajas de Petri conteniendo las colonias del banco de DNAC, tomamos 1000 colonias bacterianas, utilizando para ello palillos de madera esterilizados.

Cada colonia la inoculamos en frascos estériles conteniendo 3 ml de caldo LB-tetraciclina (15 µg/ml), y las dejamos crecer a 37° C toda la noche. A cada frasco le agregamos posteriormente 1.5 ml. de glicerol al 80 %, mezclamos bien y los almacenamos a -70° C.

b) Hibridización de colonias in situ. Transferimos alícuotas de las 1000 clonas almacenadas a un papel filtro de nitrocelulosa, previamente esterilizado a 15 lb/pul²/10 min. Este papel filtro se colocó sobre medio LB-agar-tetraciclina en cajas de Petri, e incubamos a 37° C hasta que las colonias crecieron y alcanzaron un diámetro de aproximadamente 2 mm.

Los filtros conteniendo las colonias bacterianas los procesamos de acuerdo con la técnica de hibridización de colonias in situ, descrita en la sección de materiales y métodos. Tal procedimiento nos permitió liberar el DNA de las células bacterianas, que por un tratamiento alcalino se desnaturalizó y fijó al papel filtro de nitrocelulosa. Los DNA's unidos a los filtros los hibridizamos contra la sonda radiactiva del fragmento Hae III de 550 pares de bases del DNAC de hPL. Utilizamos como testigo positivo bacterias Escherichia coli transformadas con el plásmido phPL815 (38) que porta el DNAC de hPL. Finalmente, los filtros los expusimos a una película para rayos X y practicamos autorradiografía a -70° C por períodos desde 20 h. hasta varios días.

De las 1000 clonas hibridizadas, seleccionamos 192 colonias por la intensidad de sus señales en el autorradiograma al compararlas con la de los testigos (fig. 6). Con éstas 192 colonias efectuamos un segundo proceso de hibridización en gota seca. ®

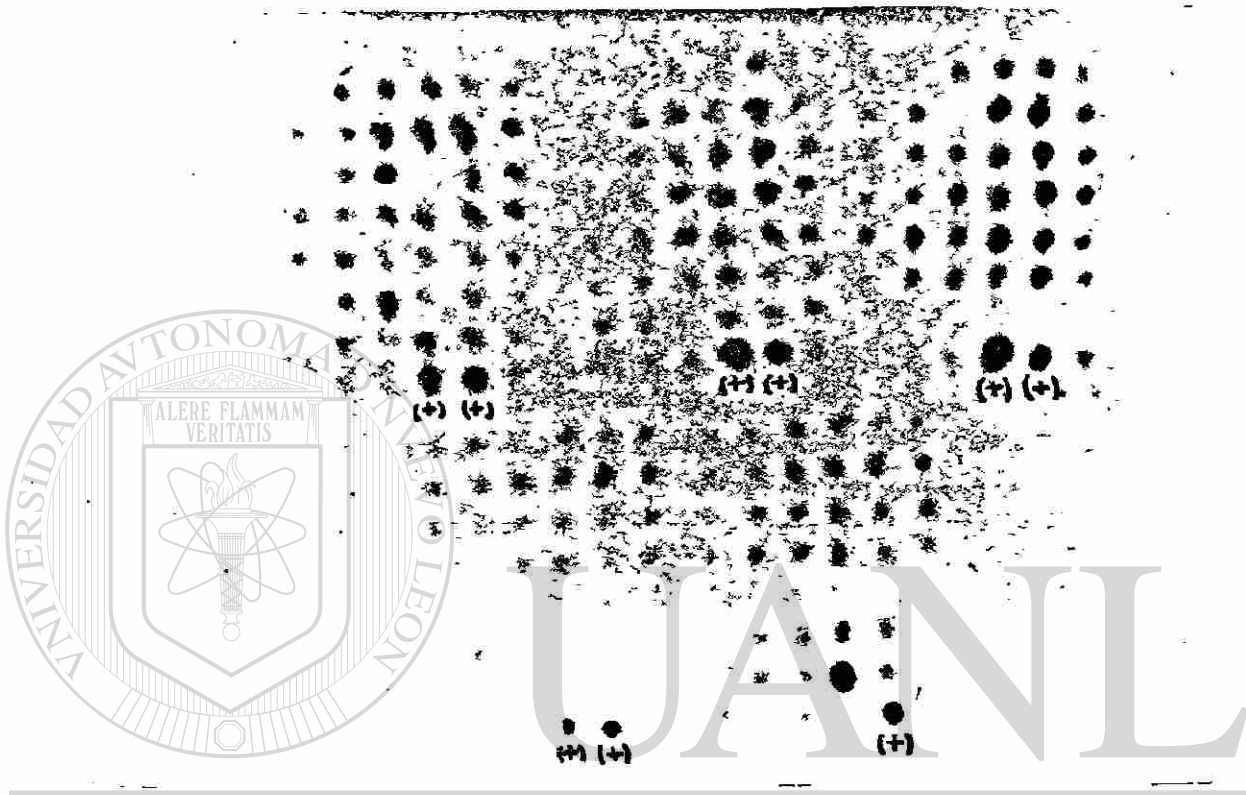
c) Hibridización usando DNA de plásmidos en gota seca. De cada una de las 192 colonias seleccionadas del primer tamizaje obtuvimos los plásmidos por la técnica de Birnboim y Dolly (28), con las modificaciones descritas en la sección de materiales y métodos.

De los plásmidos obtenidos de cada clona, tomamos 2 µl de cada uno y los dispusimos en arreglos ordenados sobre un filtro de nylon (Z-bind), posteriormente los hibridizamos contra el fragmento Hae III de 550 pares de bases del DNAC de hPL marcado con ³²P (ver hibridización en gota seca en materiales y métodos).

Utilizamos las condiciones de hibridización y lavado determinadas anteriormente en el experimento de hibridización tipo Northern (sección resultados de la pág.34), entre el RNAm poli A⁺ de hipófisis bovinas y el DNAC de hPL.

Después de analizar el autorradiograma seleccionamos 15 clonas, por la intensidad de su señal. Nuevamente incluimos

TAMIZAJE DE LAS CLONAS EN EL BANCO DE DNAc DE HIPOFISIS BOVINAS
POR HIBRIDIZACION DE COLONIAS in situ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Fig. 6 Autorradiograma que muestra las 192 clonas seleccionadas del primer tamizaje y que volvimos a crecer sobre papel filtro de nitrocelulosa y rehibridizamos contra el DNAc radiactivo de hPL. La autorradiografía de ésta última rehibridización es la que se muestra aquí. Las cruces entre paréntesis indican la posición del testigo positivo.

testigos tanto positivos como negativos, siendo éstos los plásmidos pHLB15 y pBR322, respectivamente (fig. 7).

Cada uno de los DNA de los plásmidos recombinantes los sometimos a electroforesis en geles de agarosa al 1% para inferir, en base al perfil electroforético, el tamaño del inserto. Encontramos, que la mayoría tenía insertos no muy grandes (fig. 8) pues su movilidad a través del gel no era grandemente afectada, sin embargo la clona 63 parecía contener el inserto de mayor longitud. Todos los DNA's de éstos plásmidos los sometimos a digestiones con Pst I y los analizamos por electroforesis en gel.

El plásmido de la clona 63 (p63) dió el patrón de restricción esperado (ver más abajo).

4. Obtención y caracterización del plásmido posible portador del DNAC para bGH.

Con el fin de obtener suficiente cantidad del plásmido p63 para llevar a cabo todas las caracterizaciones posibles con enzimas de restricción, lo preparamos a partir de un cultivo a gran escala como se describe en materiales y métodos. Obtuvimos 1.121 mg de DNA del plásmido p63 por 2 l. de cultivo.

El DNA purificado de p63 lo cortamos con las enzimas diagnósticas Pst I, Pvu II y Sma I y los patrones de restricción obtenidos los analizamos en geles de agarosa y poliacrilamida, posteriormente comparamos los patrones obtenidos con los esperados (ver tabla 1). Pst I liberó dos fragmentos muy similares en tamaño con longitudes estimadas entre 300 y 400 pb. La enzima Pvu II liberó un fragmento de aproximadamente 500 pb y Sma I linearizó el plásmido recombinante (fig. 9).

Para analizar e interpretar los patrones electroforéticos obtenidos con otras enzimas, decidimos determinar la orientación del inserto del plásmido p63. Sabiendo que éste se hallaba clonado en el sitio único Pst I, dentro del gen que confiere resistencia a la ampicilina, diseñamos la estrategia esquematizada en la figura 10, para determinar si el inserto se hallaba en el mismo sentido que el de la transcripción del gen para la resistencia a ampicilina ó alternativamente en sentido opuesto a éste .

Eco RI es un sitio fijo en el vector (pBR322), mientras que la posición del sitio Sma I depende de la orientación del inserto, como se indica en la figura 10. Al realizar dobles digestiones con las enzimas Eco RI y Sma I observamos que el tamaño del fragmento menor liberado era aproximadamente de 1200 pb, lo que

EJEMPLO REPRESENTATIVO DEL TAMIZAJE EN GOTA SECA DEL DNA EN LAS CLONAS DEL BANCO DE DNAC

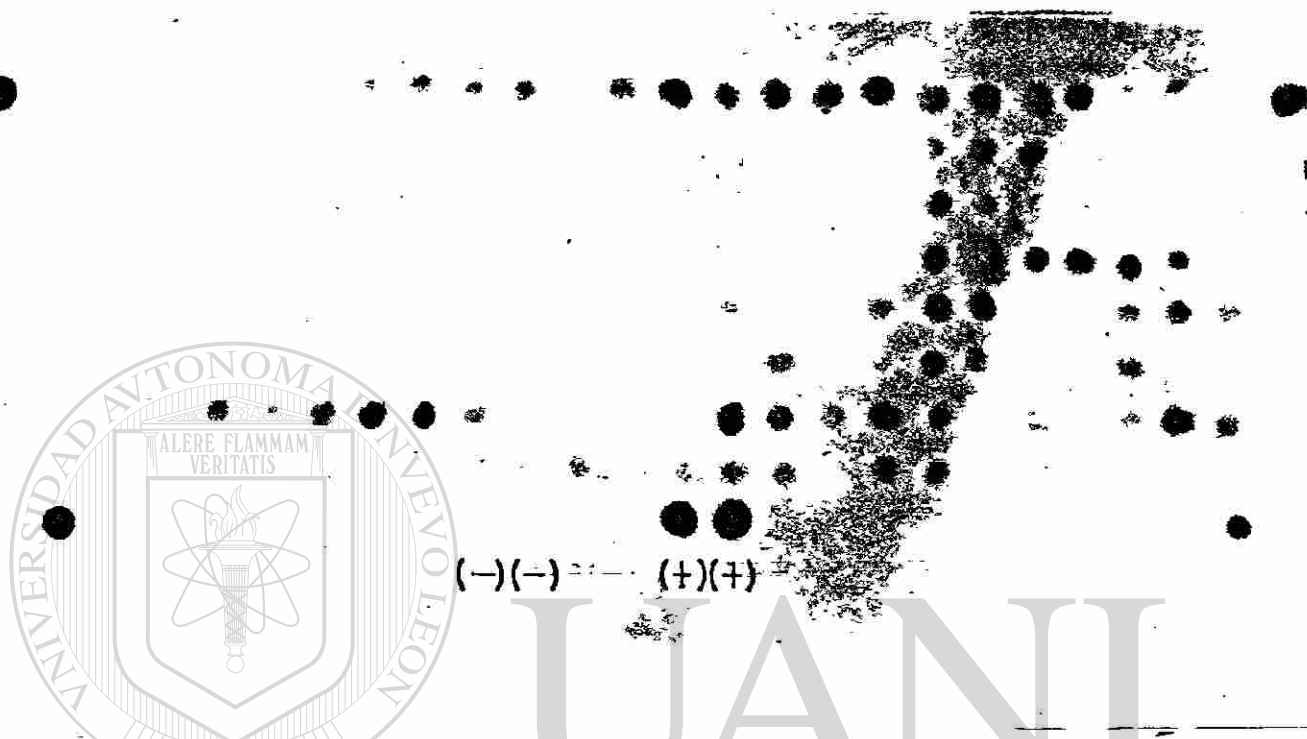


Fig. 7 Autorradiograma del tamizaje en gota seca. Se muestra la señal obtenida al hibridizar el DNA de los 192 plásmidos, contra el fragmento del DNAC de hPL macado radiactivamente. En las esquinas se colocaron muestras del testigo positivo (cruces dentro del paréntesis) por duplicado, como se observa al centro de la línea inferior del autorradiograma. A la izquierda de las dos muestras del testigo positivo, se colocaron muestras del DNA del testigo negativo (pBR322), el cual no muestra señal alguna.

PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES
SELECCIONADOS EN EL TAMIZAJE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Fig. 8 Análisis electroforético de plásmidos recombinantes. La fotografía muestra el perfil electroforético de diez plásmidos recombinantes seleccionados en los tamizajes, su movilidad se compara contra aquella del vector plasmídico pBR322 (carriles A y B). El carril No. 6 corresponde al plásmido de la clona 63 que resultó poseedor del inserto de mayor longitud y al cual se le hicieron caracterizaciones con enzimas de restricción diagnósticas para el DNAC de bGH. El gel fué de poliacrilamida al 6%, teñido con bromuro de etidio (2 µg/ml), y visualizado por iluminación con luz ultravioleta.

TABLA 1. FRAGMENTOS ESPERADOS AL CORTAR CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN EL DNAC DE bGH

Enzima de Restricción	Tamaño del fragmento(s) en pares de bases (pb)
<u>Pst</u> I	37, 337, 450
<u>Pvu</u> II	216, 490, 77
<u>Pst</u> I- <u>Pvu</u> II*	37, 137, 200, 291, 115
<u>Rsa</u> I	627, 173
<u>Rsa</u> I- <u>Pst</u> I*	37, 338, 250, 223
<u>Hinf</u> I	90, 299, 394
<u>Sma</u> I	502, 281
<u>Eco</u> RI*	-----
<u>Sma</u> I- <u>Eco</u> RI*	502, 281
<u>Alu</u> I	16, 8, 149, 153, 277, 37, 42, 185, 116
<u>Hae</u> III	195, 100, 65, 21, 143, 90

El tamaño de los fragmentos son los obtenidos al alimentar una computadora, y obtener un patrón de restricción, con la secuencia tomada de Seeburg y cols en 1983.

* Digestion simultánea con ambas enzimas.

+ No hay sitios de reconocimiento para ésta enzima en el DNAC de bGH

PATRON DE RESTRICCIÓN OBTENIDO DEL PLASMIDO p63 CON LAS ENZIMAS DIAGNOSTICAS Pvu II y Pst I

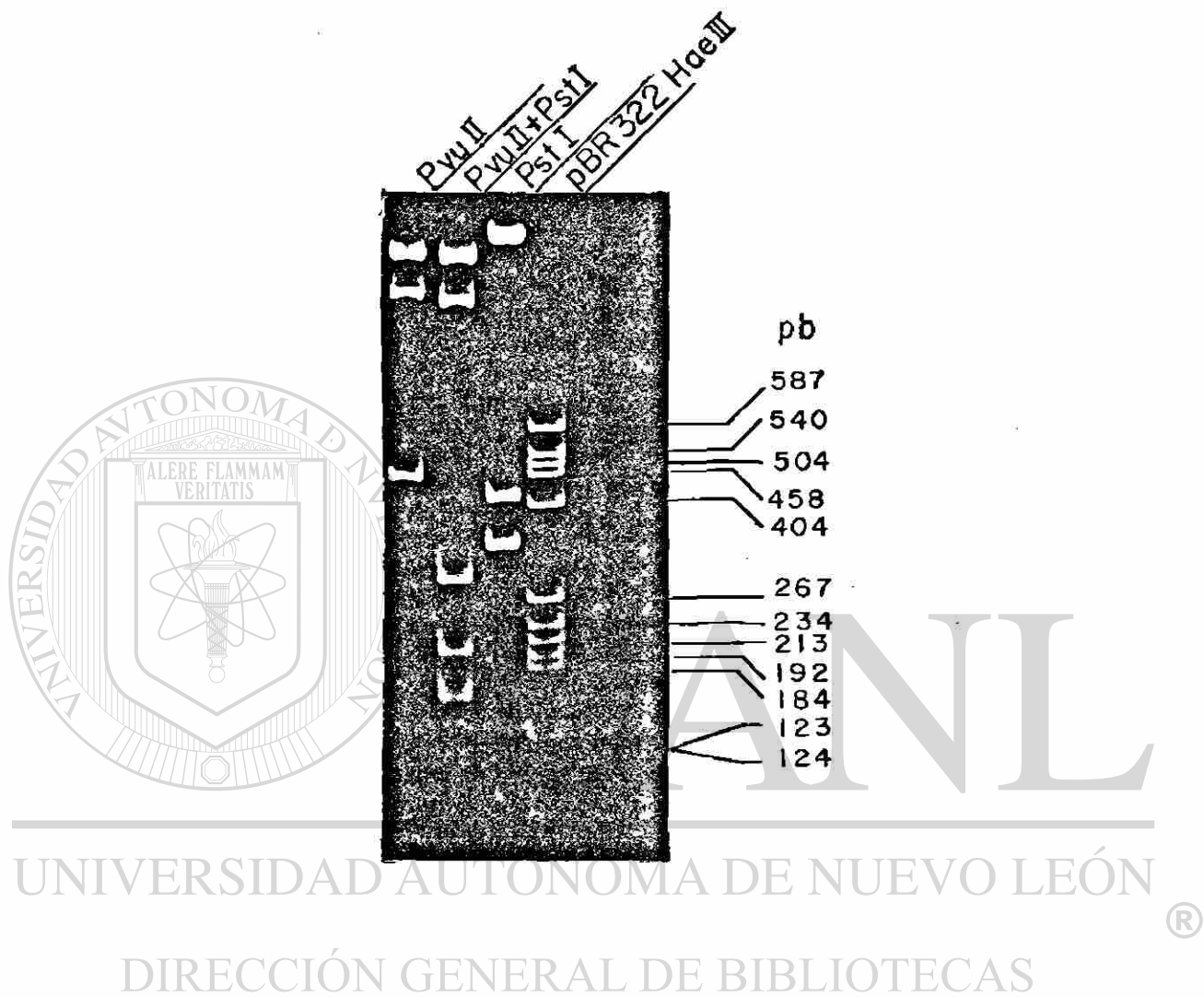
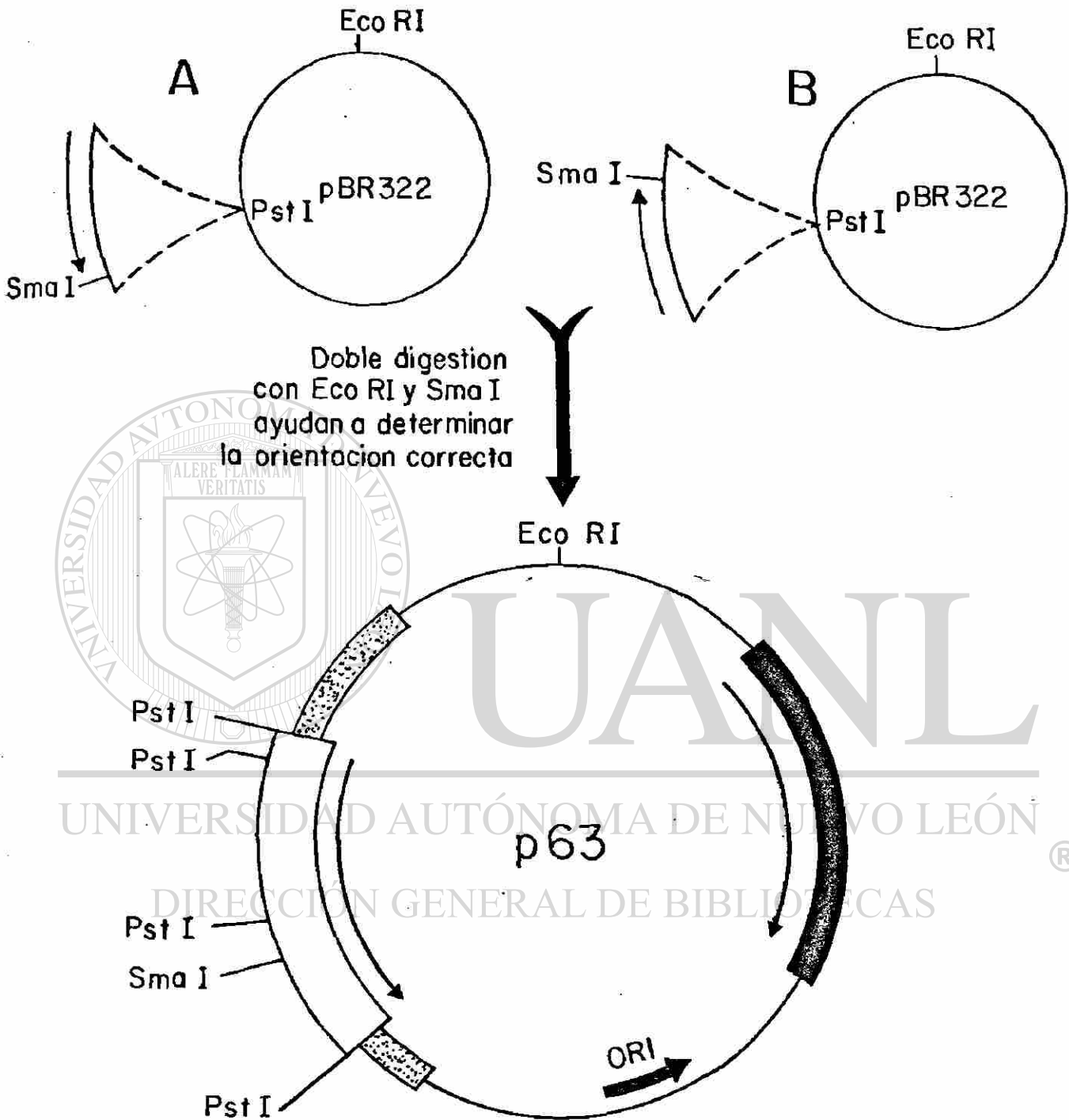


Fig. 9 Digestiones analíticas de p63 con Pvu II y Pst I. Se muestra el análisis electroforético de los fragmentos obtenidos al digerir el plásmido p63 con varias enzimas de restricción. Pst I liberó dos fragmentos menores, uno de ~300 y el otro de ~400 pb. Por su parte Pvu II liberó un fragmento menor de ~500pb. El carril de la doble digestión con Pvu II y Pst I muestra que además de los fragmentos mayores (portando secuencias del vector), se liberaron fragmentos de 137, 200, 291 y 115 pb.. El gel fué de poliacrilamida al 6 %, teñido con bromuro de etidio (2 µg/ml) y visualizado al ser iluminado con luz ultravioleta.

CLONACION DEL DNAc EN pBR322



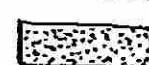

El inserto en sus dos posibles orientaciones



Doble digestion con Eco RI y Sma I ayudan a determinar la orientación correcta

Anatomía molecular del plasmido p63

Fig. 10 Representación esquemática de las posibles orientaciones del DNAc en pBR322.

-  p BR 322
-  inserto
-  gen de resistencia a ampicilina
-  gen de resistencia a tetraciclina

nos indicó que la orientación del inserto (ubicación de los extremos 5' y 3' de la secuencia del DNAC) coincidía con la dirección de la transcripción del gen para la resistencia a ampicilina (fig. 11).

Una vez que conocimos la orientación del inserto hicimos digestiones con otras enzimas de restricción diagnósticas. Los patrones de restricción obtenidos coincidieron con los esperados. Rsa I liberó un fragmento de aproximadamente 860 pb. Por su parte, Hae II liberó dos fragmentos de aproximadamente 1587 y 850 pb (figs. 12 y 13). Como también existen sitios de reconocimiento para estas enzimas en el vector, la longitud de los fragmentos de restricción tanto esperados como obtenidos son la suma del fragmento correspondiente al DNAC de bGH y el fragmento adyacente a este, proveniente del DNA del vector.

Los tamaños de éstos fragmentos nos volvieron a corroborar tanto la orientación como la identidad del inserto de DNAC de bGH. Además hicimos digestiones con enzimas que tienen como sitio de reconocimiento solo cuatro pares de bases en lugar de seis y que por lo tanto poseen aún más sitios de reconocimiento, tanto en el DNAC de bGH, como en el vector. Los patrones de restricción obtenidos también coincidieron con los esperados (figs. 11 y 13). Las enzimas que utilizamos fueron: Alu I, Hae III y Hinf I.

5. Construcción de un mapa de Restricción

Con la información que obtuvimos al analizar los patrones electroforéticos resultantes de los cortes con enzimas de restricción, construimos mapas físicos de la ubicación de los sitios de reconocimiento para tales enzimas; a éstas representaciones se les conoce como mapas de restricción (figs. 14 y 15).

Estos mapas los comparamos con aquellos obtenidos al alimentar una microcomputadora con las secuencias ya publicadas (secuencia de la pág. 8) para el DNAC de bGH. Se utilizó para éste análisis el paquete de programas computacionales PCS desarrollado por John E. Donelson de la Universidad de Iowa, E.U.A.

Ambos mapas coincidieron perfectamente por lo que pudimos concluir que el plásmido p63 portaba la secuencia casi completa del DNAC de bGH.

DETERMINACION DE LA ORIENTACION DEL INSERTO EN EL PLASMIDO p63

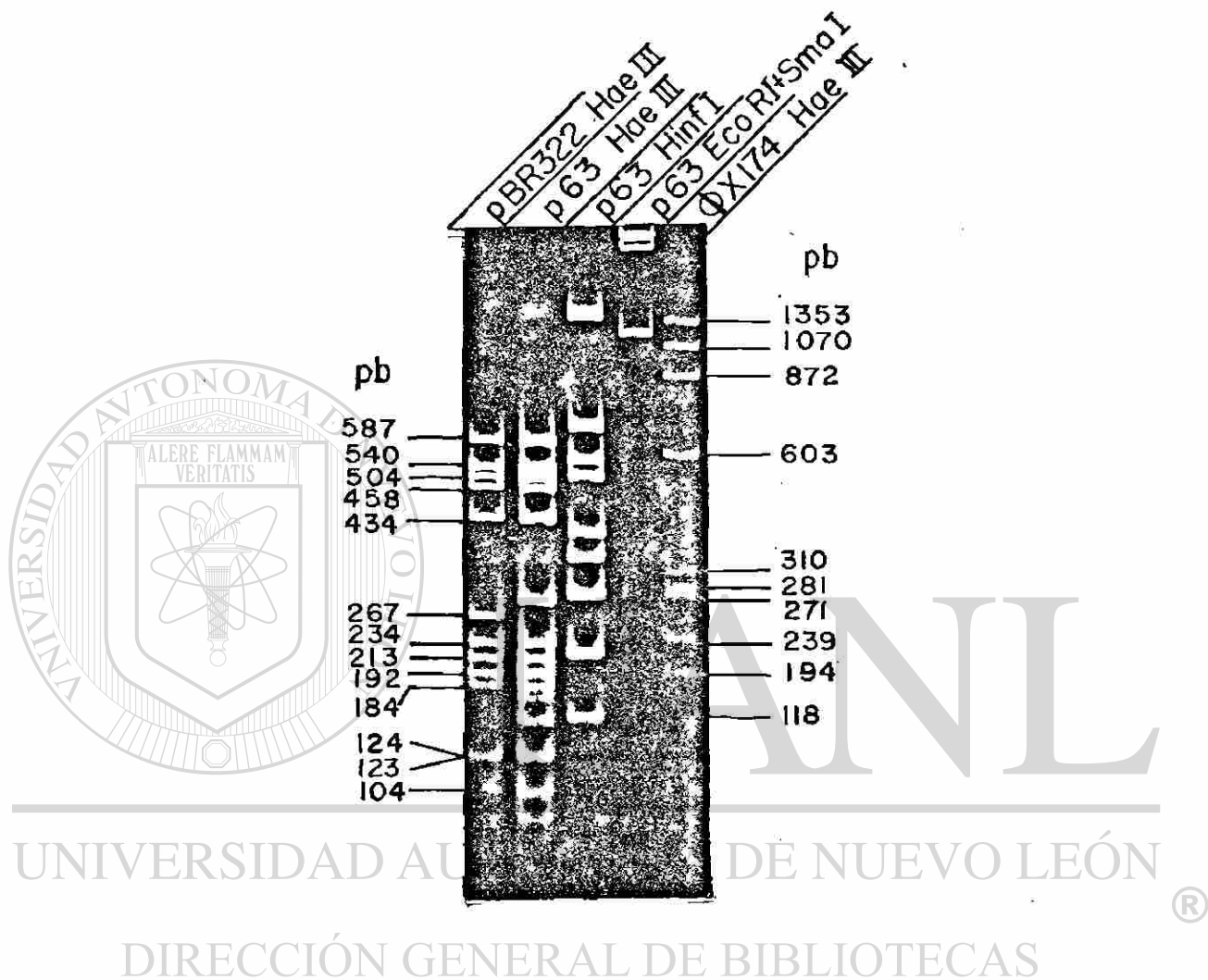


fig. 11 Orientación del inserto en p63 y su caracterización parcial. Se muestran varias digestiones con enzimas de restricción del DNA de p63. La digestión doble con Eco RI y Sma I liberó un fragmento de ~1200 pb, lo que ayudó a determinar la orientación del inserto (especificado en la fig. 10). El DNA de OX174 digerido con Hae III se usó como marcador de tamaño de fragmento en pb.

Los otros carriles muestran la estrategia para el análisis del patrón de restricción de p63, al compararlo con el patrón obtenido del vector plasmídico, pBR322. Hinf I liberó dos fragmentos de ~1470 y 670 pb. Por su parte Hae III liberó varios fragmentos. El gel fué de poliacrilamida -al 6 %, teñido con bromuro de etidio (2 µg/ml) y visualizado al ser iluminado por luz ultravioleta.

PATRÓN DE RESTRICCIÓN DEL PLÁSMIDO p63 CON LAS ENZIMAS Rsa I y Pst I

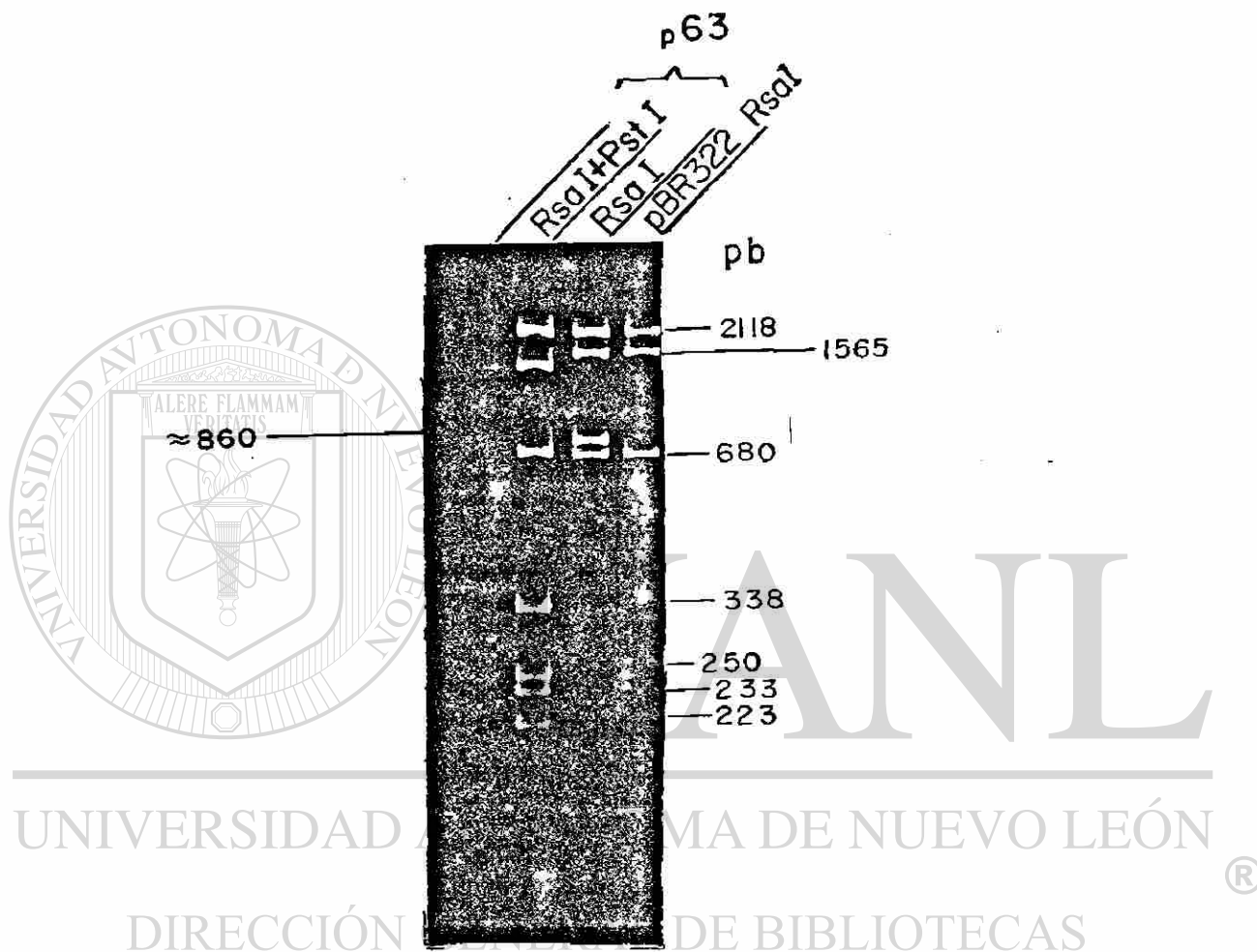


fig. 12 Digestiones analíticas del plásmido p63 con Rsa I y Pst I. Al digerir el DNA de p63 con Rsa I se liberaaron dos bandas: una de ~860 pb y otra de ~1300 pb. La digestión doble con Rsa I y Pst I liberó fragmentos de 338, 250, 233 y 223 pb. El gel fué de poliacrilamida al 6 %, teñido con bromuro de etidio (2 µg/ml) y visualizado al ser iluminado con luz ultravioleta.

ANALISIS DEL PATRON DE RESTRICCIÓN DEL PLASMIDO p63 CON LAS ENZIMAS Hae II y Alu I

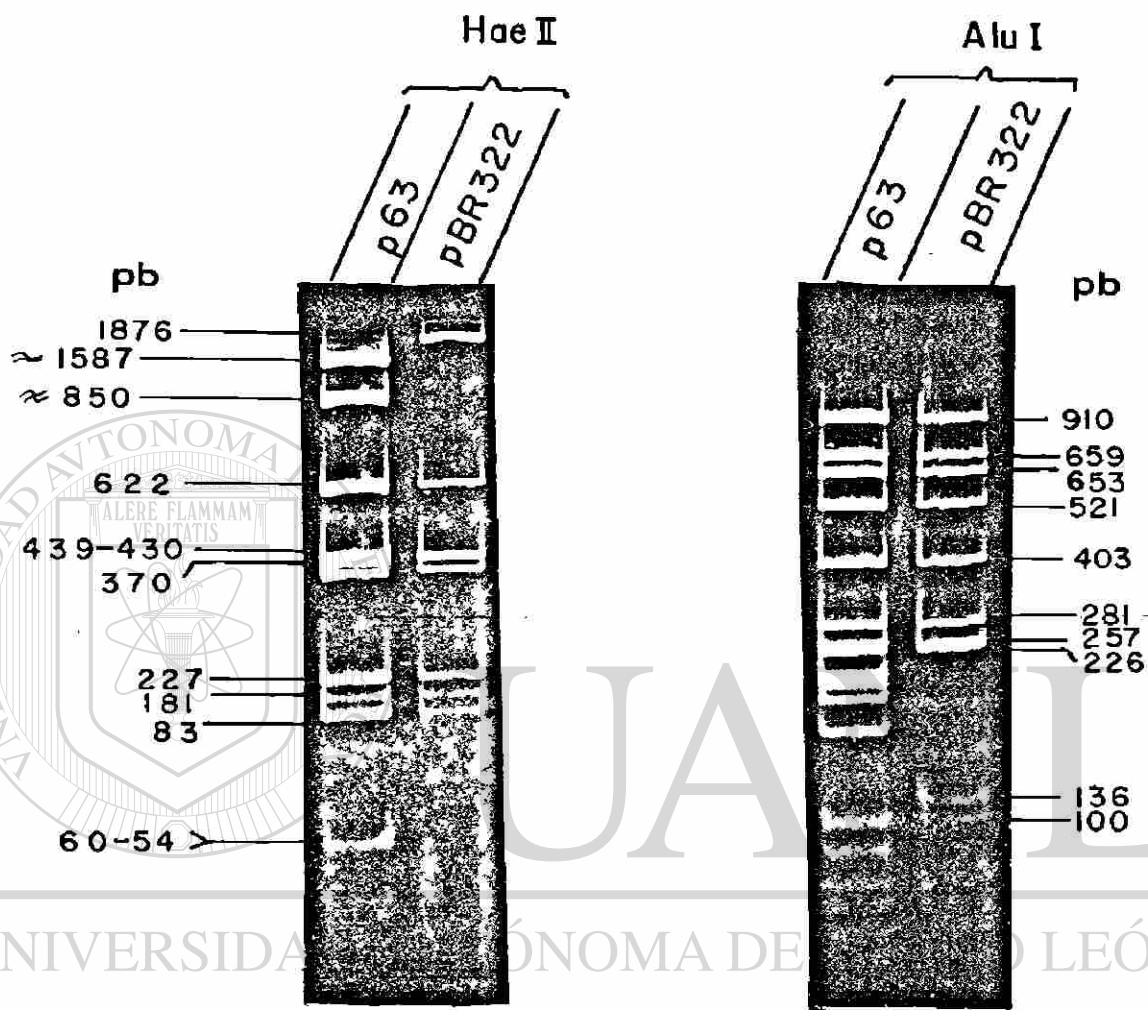


fig. 13 Digestiones de p63 y pBR322 con enzimas de restricción que reconocen cuatro pares de bases. Al digerir el plásmido p63 con Hae II se liberaron dos fragmentos de ~1587 y 850 pb, los cuales son resultado de la combinación de regiones del DNAc de bGH y de pBR322. Se observa en el carril de p63 la desaparición de la banda de pBR322 de 1876 pb. Por otra parte, la digestión con Alu I mostró, en el carril de p63, la aparición de bandas ausentes en el carril de pBR322 y que corresponden al DNAc de bGH. El gel es de poliacrilamida al 6 %, teñido con bromuro de etidio (2 µg/ml) y visualizado al ser iluminado con luz ultravioleta. Se señalan los tamaños en pares de bases de algunas bandas.

1020091571

0091571

MAPA DE RESTRICCIÓN DEL INSERTO EN p63 CON ENZIMAS QUE TIENEN
SITIOS MÚLTIPLES DE RECONOCIMIENTO EN EL DNAC DE bGH

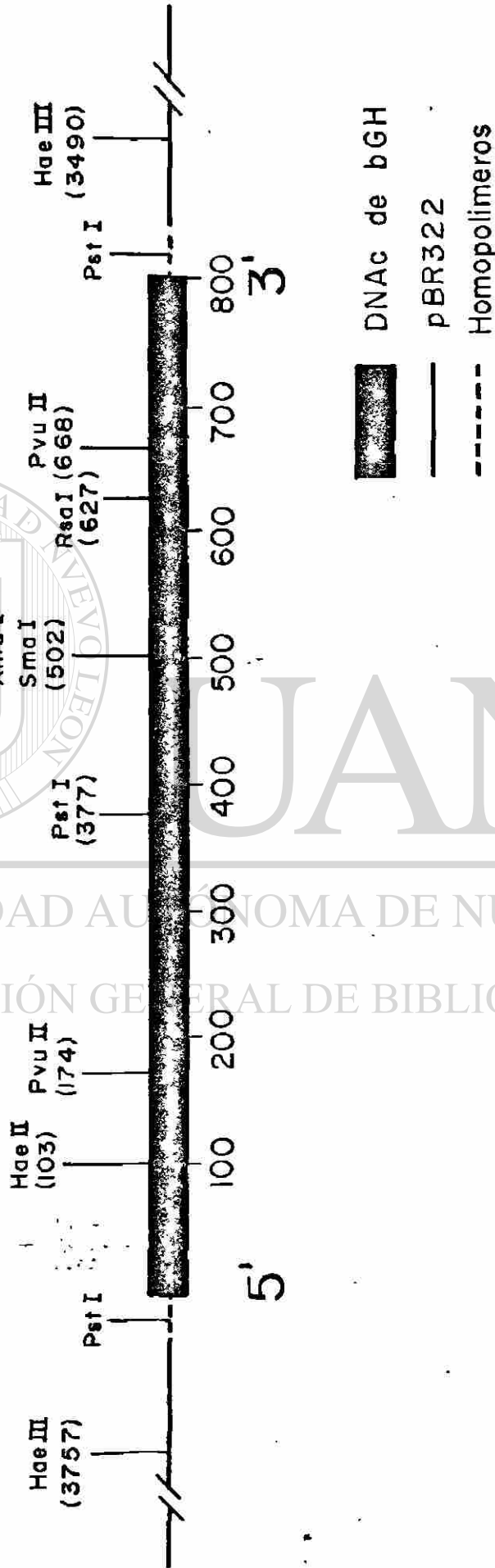


fig. 15 Mapa de restricción del inserto en p63 con enzimas que tienen sitios múltiples de reconocimiento en el DNAC de bGH. La información obtenida utilizando enzimas de restricción que tienen sitios múltiples de reconocimiento, fué usada para construir éste mapa. La orientación del inserto dentro del vector está indicada por los números bajo los sitios Hae III que representan el número del nucleótido en el vector, al contar en dirección hacia el gen de resistencia a tetraciclina a partir del centro de reconocimiento único para Eco RI presente en pBR322.

MAPA DE RESTRICCIÓN DEL INSERTO EN p63 CON ENZIMAS QUE CORTAN UNA O DOS VECES EL DNAC DE bGH

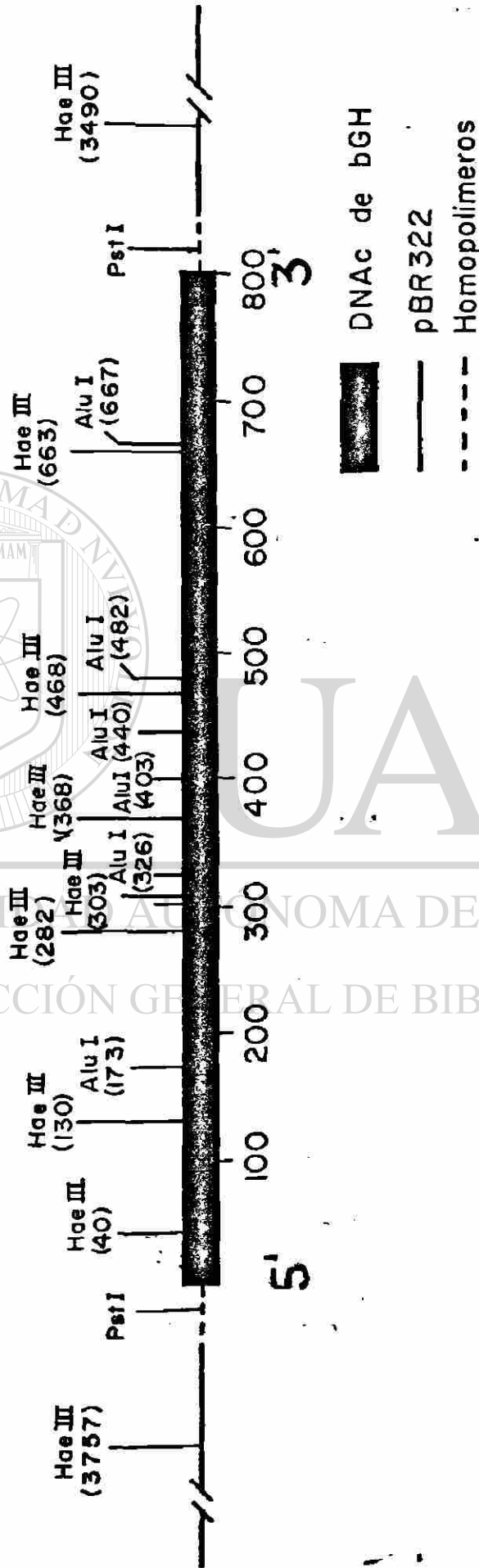


fig. 14 Mapa de restricción del inserto en p63 con enzimas que cortan una ó dos veces el DNAC de bGH. La información obtenida al digerir el DNA de p63 con enzimas de restricción que tienen uno ó dos sitios de reconocimiento en el DNAC de bGH, fué usada para construir este mapa. La orientación del inserto dentro del vector está indicada por los números bajo los sitios Hae III, que representan el número del nucleótido en el vector, al contar en dirección al gen de resistencia a tetraciclina a partir del centro de reconocimiento único para Eco RI presente en pBR322.

VIII. DISCUSION

La pureza del RNA que obtuvimos fué buena ya que si consideramos que un buen índice de pureza corresponde a una relación de A_{260}/A_{280} de 1.8, nuestras preparaciones de RNA mostraron buena pureza, reflejada por valores promedio de 1.7 .

En cuanto a la integridad de las moléculas de RNA obtenidas, pudimos concluir que fué excelente ya que todas las preparaciones al ser sometidas a electroforesis, en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes, mostraron un patrón de fluorescencia para las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 28 S y 18 S cercano a 2:1 respectivamente. Esta conclusión, la basamos en la explicación que acerca de la integridad de las moléculas de RNA obtenidas se dió en la sección de materiales y métodos (pág.16).

Así mismo podemos decir que en los experimentos de recuperación de la fracción poli A⁺ a partir de los RNA totales, y de la síntesis de DNAc (datos no incluidos en el presente trabajo), se obtuvieron valores óptimos de rendimiento si los comparamos con aquellos reportados en la literatura.

Los resultados de nuestros experimentos de hibridización tipo "Northern" entre el fragmento Hae III de 550 pb del DNAc de hPL, marcado radiactivamente, (utilizado como sonda) y los RNA mensajeros de hipófisis bovinas, comprobaron nuestra hipótesis de trabajo. En ella postulábamos que, basados en la similitud de secuencias nucleotídicas entre los genes para hPL y bGH era factible usar el DNAc de hPL como sonda ó rastreador molecular para localizar, por hibridización molecular, el DNAc de bGH a partir de un banco de DNAc's. Por otra parte, también determinamos las condiciones de hibridización a las que tal reconocimiento por apareamiento debería de ocurrir. Estas condiciones correspondieron a una concentración de formamida del 20%, una temperatura de hibridización y lavado de 25° C, y a una concentración de sales en la solución de lavado de 0.15 M de NaCl.

Es importante destacar que hicimos dos experimentos de hibridización contra colonias bacterianas. En el primer experimento efectuado con las bacterias crecidas en filtros de nitrocelulosa la señal autorradiográfica que se obtuvo no fué muy satisfactoria, por lo que se decidió efectuar otro experimento de hibridización. En éste segundo se incluyó una incubación adicional de las colonias que habían sido crecidas en LB-agar-tetraciclina, en un segundo medio conteniendo cloranfenicol (500 µg/ml), con ello permitimos la replicación del DNA del plásmido pero no el de la bacteria. Esto resultó en una amplificación considerable del número de copias por bacteria de los plásmidos, lo que se tradujo en una mejor señal de hibridización.

El análisis electroforético de algunos plásmidos recombinantes nos mostró que sus insertos de DNAC eran pequeños, como consecuencia probablemente de interrupciones del proceso de copiado del RNAM a DNAC. Estos DNAC pequeños son más abundantes que los DNAC de tamaños igual ó mayor que 800 pb región de longitud a la que pertenece el DNAC completo de bGH. Encontramos sin embargo que la clona 63, a cuyo plásmido se le asignó inicialmente el nombre arbitrario de p63, y que siempre dió señal fuertemente positiva en los diferentes tamizajes, contenía un inserto de aproximadamente 700 pb.

Los experimentos efectuados con enzimas de restricción del DNA de p63 nos corroboraron, al analizar los patrones de restricción en geles de poliacrilamida, que éste plásmido portaba el DNAC de bGH. Siempre los patrones de restricción obtenidos con el DNA de éste plásmido, coincidieron perfectamente con los esperados, de acuerdo con la secuencia ya publicada (22). Sin embargo, no pudimos localizar un fragmento de aproximadamente 50 pb que correspondería a una secuencia hacia el extremo 5' del DNAC de bGH delimitado por sitios Pst I, y que abarcaría desde el homopolimero en el extremo 5' del RNAM, hasta los primeros dos ó tres codones que codifican para los primeros aminoácidos del péptido señalador de bGH. Por otra parte, la digestión con Hae III nos indicó que la secuencia que codifica para la hormona madura hacia el extremo 5' estaba completa, ya que hay un sitio de corte para esta enzima a una distancia de tres codones del extremo amino-terminal dentro del péptido señalador, antes de la región que codifica para el extremo aminoterminal de la hormona madura.

Con toda la información obtenida, y después de construir los mapas de restricción, pudimos concluir que el plásmido p63 contenía todos los nucleótidos que codifican para la hormona madura así como una buena parte de las secuencias correspondientes al péptido señalador, además de la mayor parte de las secuencias nucleotídicas hacia el extremo 3'.

DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

IX. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El presente trabajo muestra la aplicación, al campo de la productividad animal, de los conocimientos generados en nuestro grupo por investigaciones básicas previas, realizadas con el sistema génico del lactógeno placentario humano (3).

Tomando en cuenta que el suministro de proteínas de origen animal para el consumo humano es ya insuficiente, decidimos demostrar que la ingeniería genética y la biotecnología pueden ofrecer soluciones al problema de incrementar la productividad animal. Para lograr tal objetivo, nos propusimos clonar molecularmente la región estructural (DNAC) del gen de la hormona de crecimiento bovina (bGH).

La estrategia experimental que diseñamos es una contribución original del presente trabajo. Otros investigadores optaron por utilizar como rastreador molecular genes de otras hormonas de crecimiento (de rata, por ejemplo) para aislar regiones estructurales del gen de bGH. Sin embargo, aislar el DNAC para el lactógeno placentario humano es mucho más fácil que aislar aquel de cualquier hormona de crecimiento animal. Esto se debe a la mayor disponibilidad del tejido placentario que hipofisiario, y a la mayor abundancia del RNAm para hPL (5%) en placenta, en comparación con el RNAm para GH (1% en el caso del bovino).

Utilizando técnicas de ingeniería genética y nuestra estrategia experimental; hemos logrado aislar a partir de un banco de DNAC de hipófisis bovinas, el DNAC de bGH. Al caracterizar por técnicas estándares de ingeniería genética, el plásmido recombinante presente en la clona que resultó seleccionada por múltiples tamizajes, comprobamos que su inserto contiene la mayor parte de las secuencias del RNAm para bGH.

Por otra parte, nuestros exitosos resultados de hibridización entre las secuencias de bGH y hPL, refuerzan la hipótesis de que el gen para hPL comparte un gen ancestro común con los genes para hormona de crecimiento humana (hGH) a partir del cual se originó por un evento de duplicación génica y divergencia.

Los resultados del presente trabajo concluyen la primera fase de un proyecto que, a mediano plazo, pretende lograr producir hormona de crecimiento bovina recombinante (bGHR). Esto último podrá lograrse al cultivar bacterias programadas por ingeniería genética para expresar, bajo señales génicas regulatorias apropiadas, la información que ya poseemos en nuestro plásmido recombinante p63.

La disponibilidad de bGHR en calidad y cantidad necesaria será de gran importancia para las investigaciones encaminadas a su uso en los campos pecuario y piscícola, cuyos resultados podrán traducirse en grandes beneficios para la industria alimentaria del país.

IX. RESUMEN

La Ingeniería Genética es un conjunto de técnicas con las cuales se puede recombinar y manipular los genes de cualquier especie animal ó vegetal en el tubo de ensayo.

Una de las técnicas que más ha evolucionado desde su establecimiento y primeras aplicaciones es la síntesis y clonación del DNA complementario (DNAc) al RNA mensajero (RNAm). Su uso ha permitido sintetizar, clonar y expresar en células de Escherichia coli, los DNAc de muchas proteínas de importancia biomédica, entre las que se encuentran: insulina, interferón, y hormona de crecimiento humana.

Recientemente se ha logrado clonar, el DNAc al RNAm de la hormona de crecimiento bovina (bGH). Desde hace ya algunos años se sabe que la administración exógena de esta hormona (tanto aquella obtenida a partir de hipófisis bovinas como la obtenida por ingeniería genética) al ganado bovino, incrementa la velocidad de crecimiento de los animales así como la producción de leche (hasta en un 40 %). Además de sus efectos en el ganado lechero, también se ha demostrado que bGH incrementa la velocidad de crecimiento y la eficiencia de conversión alimenticia en el salmón del pacífico (Oncorhynchus kisutch).

Hemos aislado y caracterizado los RNAm de hipófisis bovinas los cuales fueron utilizados para construir un banco de DNAc. A partir de este y aprovechando la similitud estructural entre las secuencias del RNAm de bGH y el del RNAm del lactógeno placentario humano (hPL), logramos aislar el plásmido recombinante portador de las secuencias del DNAc de bGH. La confirmación de la identidad de esta secuencia se hizo por análisis de los patrones de restricción. Con esta información construimos un mapa de restricción el cual, al ser comparado con los mapas deducidos de las secuencias publicadas para el DNAc de bGH, coincidieron perfectamente. Con lo anterior podemos concluir que hemos logrado aislar y caracterizar prácticamente la totalidad de la longitud del DNAc que codifica para bGH.

X. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Agellon, L.B. y T.C. Chen. (1986) Rainbow trout growth hormone: Molecular cloning of cDNA and expression in Escherichia coli. DNA 5:463
- 2.- Barrera Saldaña, H.A. (1982) Expression of the human placental lactogen gene. Ph.D. Thesis. The University of Texas Health Science Center of Houston.
- 3.- Barrera Saldaña, H.A., P.H. Seeburg y G.F. Saunders (1983) Two structurally different genes produce the same secreted human lactogen hormone. J. Biol. Chem. 258:3787
- 4.- Becker, G.W. y H.M. Hsiung (1986) Expression, secretion and folding of human growth hormone in Escherichia coli. FEBS 204:1
- 5.- Birnboim, H.C. y J. Doly. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7:1513
- 6.- Cab Barrera, E.L., Tesis. pUANL: un nuevo vehículo molecular para clonación y expresión de genes eucarióticos. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. 1987
- 7.- Cathala, G., J.F. Savouret, B. Mendez, B.L. West, M. Klarin, J.A. Martial y J.D. Baxter. (1983) A method for isolation of intact, translationally active ribonucleic acid. DNA. 2:4
- 8.- Chen, T.L., L.B. Agellon y R.V. Beneden. (1986) Genetic engineering of fish. EIFAC/FAO. Symposium on selection, hybridization and genetic engineering in aquaculture of fish and shellfish for consumption and stocking. Bordeaux, France
- 9.- Chirgwin, J.M., A.E. Przybyla, R.J. MacDonald y W.J. Rutter (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochem. 56:113-122.
- 10.- Davis. B.D., R. Dulbecco, H.N. Eisen y H.S. Ginsberg. (1980). Microbiology. Harper & Row, Publishers, Philadelphia.
- 11.- Evans, H.M. y M.E. Simpson (1937). Hormones of the anterior Hypophysis. Am. J. Physiol. 98:511-546.
- 12.- Feinberg, A.P. y B. Fogelstein (1987). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Analytical Biochem. (in Press)
- 13.- Frazier, M.L., W. Mars, D.L. Florine, R.A. Montagna, y G.F. Saunders (1983) Efficient extraction of RNA from mammalian tissue. Molecular and Cellular Biochem. 56:113-122

14.- George, H.J., J.J. L'italien, W. P. Pilacinski, D.L. Glassman y R.A. Krzyzek. (1985) High-level expression in Escherichia coli of biologically active bovine growth hormone. DNA 2:273-281.

15.- Gill, G.A., J.P. Sumpter, E.M. Donaldson, H.M. Dye, L. Souza, T. Berg, J Wypych y K Langley. (1985) Recombinant chicken and bovine growth hormones acelerate growth in aquacultured juvenile pacific salmon Onchorhynchus kisutch. Biotechnology. 3:643

16.- Gubler, U. y B.J. Hoffman (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene.25

17.- Hackett. P.B.,J.A. Fuchs y J.N. Messing. (1984). An Introduction to recombinant DNA techniques. Basic experiments in gene manipulation. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

18.- Hanahan, D. y M. Meselson (1980) Plasmid screening at high colony density. Gene 10:63-67

19.- Kopchick, J.J., R.H. Malavarca, T,J. Livelli y F.C. Leung (1985) Use of avian-retroviral-bovine growth hormone DNA recombinants to direct expression of biologically active growth hormone by culture fibroblasts. DNA 4:1

20.- Lee. M.O. y N.K. Schaffer. (1934). Anterior pituitary growth hormone and the composition of growth. J. Nutr. 7:337-363.

21.- Machlin. L.J. (1973). Effect of growth hormones on milk production and feed utilization in dairy cows. J. Dairy Sci. 56 (5): 575-580

22.- MacLean, N., D. Penman y Z. Zhu (1987) Introduction of novel genes into fish. Biotechnology. 5:257

23.- Mandel, M. y A. Higa (1970). Calcium dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53:154

24.- Maniatis, T., E.F. Frish y J Sambrook. (1982) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory

25.- Maniatis T, R.C. Hardison, E Lacy, J. Laver, D. O'Connell, D. Quow, D.K Sim y A Efstriatiadis (1978) The isolation of structural genes from libraries of eukaryotic DNA. Cell 15:687

26.- Martial, J.A, R.A. Hallewell, J.D. Baxter y H.M. Goodman (1979). Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. Science 205:10

27.- McMaster, G.K. y G.G. Carmichael. (1977). Analysis of single and double-stranded nucleic acids on poliacrilamide and agarose

gels by using glyoxal and acridine orange. Proc. Natl. Acad. Sci. 74:4835.

28.- Miller, W.L. y N.L. Eberhardt. (1983) Structure and evolution of growth hormone gene family. Endocrine Reviews. 4:2

29.- Miller, W.L., J.A. Martial y J.D. Baxter (1980) Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. J. Biol. Chem. 255:16

30.- Norgard, M.V., M.J. Tocci y J.J. Monahan (1980) On the cloning of eukaryotic total-poli (A)-RNA populations in *Escherichia coli*. The Journal of Biol. Chem. 255:16

31.- Olson, S. (1986) Biotechnology: An industry comes of age. National Academy Press. Washington D.C.

32.- Ondarza, R.N. (1983). Biología moderna. Ed. Trillas. México pp 316-432

33.- Peel, C.J., T.J. Frank, D.E. Bauman y R.C. Gorewit. (1983). Effect of exogenous growth hormone in early and late lactation on lactational performance of dairy cows. J. Dairy Sci. 66(4):776-782

34.- Rosen, J.M., S.L.C. Woo, J.W. Holder, A.R. Means y B.W. O'Mally. (1975). Preparation and preliminary characterization of purified ovalbumin messenger RNA from the hen oviduct. Biochemistry. 14: 69-78.

35.- Seeburg, P.H., J. Shine, J.A. Martial, J.D. Baxter y H.M. Goodman. (1977) Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone. Nature. 270:486

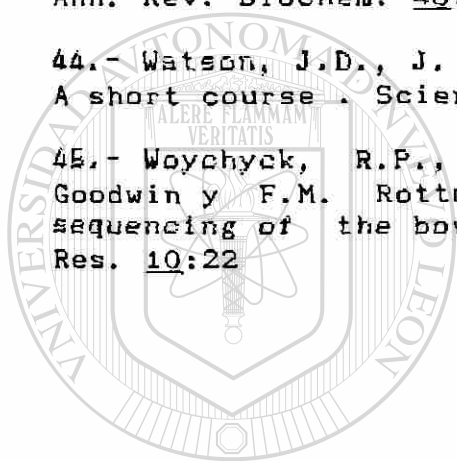
36.- Seeburg, P.H., S. Stacey, J. Adelman, H.A. de Boer, J. Hyflick, P. Jhurani, D.V. Goeddel y H.L. Heynecker (1983) Efficient bacterial expression of bovine and porcine growth hormones. DNA 2:37

37.- Seeburg, P.H. (1982) The human growth hormone gene family: nucleotide sequences show recent divergence and predict a new polipeptid hormone. DNA 1:3.

38.- Seeburg, P.H., J. Shine, J.A. Martial, A. Ullrich, J.D. Baxter y H.M. Goodman (1977) Nucleotide sequence of part of the gene for human chorionic somatomammotropin: purification of DNA complementary to predominant mRNA species. Cell 18:157-165

39.- Sekine, S., T. Mizukami, T. Nishi, Y. Kuwana, A. Saito, M. Sata, S. Itoh y H. Kawauchi. (1985) Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:4306

- 40.- Shine, J., P.H. Seeburg, J.A. Martial, J.D. Baxter, y H.M. Goodman. (1977) Construction and analysis of recombinant DNA for human chorionic somatomammotropin. *Nature* 270:8
- 41.- Souza, L.M, T.C. Borne, D. Mardock, K. Langley, J. Wypych, D. Fenton, S. Jhonson, P.H. Lai, R. Everett, R.Y. Hsu y R. Bosselman. (1984). Application of recombinant technologies to studies on chicken growth hormone. *The Journal of Experimental Zoology*. 232:465
- 42.- Thomas, P.S. (1980) Hybridization of denatured RNA and small fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71:4579
- 43.- Tylor, J.M. (1979) The isolation of eukaryotic messenger RNA. *Ann. Rev. Biochem.* 48:681-717
- 44.- Watson, J.D., J. Tooze y D.T. Kurtz. (1983) Recombinant DNA. A short course. Scientific American Books.
- 45.- Woychyck, R.P., S.A. Camper, R.H. Lyons, S. Horowitz, E.C. Goodwin y F.M. Rottman (1982) Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. *Nucleic Acids Res.* 10:22



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

