

COLABORACIONES E IMPLEMENTACION DE METODOLOGIAS

En el tiempo transcurrido desde la creación de la U.L.I.E.G. al presente, hemos mantenido colaboraciones con diferentes laboratorios de investigación tanto nacionales como extranjeros. Los responsables de los grupos con los que hemos colaborado, así como las acciones colaborativas se describen a continuación:

Dra. Isaura Meza
Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN

Implementación de técnicas de ingeniería genética

Dr. Patricio Gariglio
Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN

Implementación de técnicas de ingeniería genética y Estudios de la biología molecular del oncogen c-myc

Dr. Federico Sánchez Andrade
Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM

Biología y evolución moleculares de genes para uricasa

Dr. Scott A. Wattkins
Departamento de Biología, Universidad de Indiana
Estudios sobre la transcripción *in vitro* de los genes hPL

Drs. Francisco Bolívar Zapata y Xavier Soberón
Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y
Biotecnología

Síntesis de oligonucleótidos y adaptadores necesarios en el
proyecto sobre la producción de la hormona de crecimiento
bovina recombinante

Dr. Antonio Velázquez A.
Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.

Asesorías y entrenamiento para el programa Errores Innatos
del Metabolismo

Dr. Alejandro Ruiz L. y Dr. Francisco J. Sánchez A.
Laboratorios Clínicos de Puebla

Visitas y conferencias a nuestros estudiantes como parte de
asesorías y entrenamiento en el programa Errores Innatos
del Metabolismo

Dr. Tien Kuo
Laboratorio de Patología Molecular, Hospital M.D. Anderson,
Houston, Texas

Experimentos de transfecciones en células COS para el
desarrollo del proyecto ¿Es el gen humano hPL-1
un pseudogen?

Dr. Pierre Chambon y Dr. Hans Matthes
Laboratorio de Genética Molecular de Eucariotes, Centro
Nacional de la Investigación Científica (CNRS),
Estrasburgo, Francia

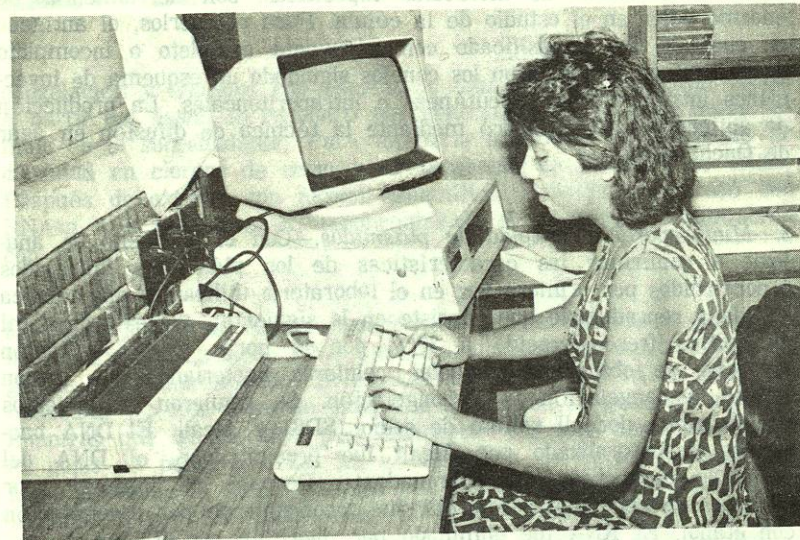
Síntesis de oligonucleótidos necesarios en el proyecto
Hormona de crecimiento bovina recombinante

Dra. Marsha Frazier
Departamento de Oncología Gastrointestinal, Hospital M.D.
Anderson, Houston, Texas

Elaboración de bancos DNA complementario (DNAc)
y estandarización de la metodología para la síntesis de DNAc.

Dr. Walid Kuri Harcuch
Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN

Asesoría y apoyo experimental en el manejo del sistema de
diferenciación celular de fibroblastos 3T3 a adipocitos
que formará parte de la estrategia experimental
del proyecto Localización de las regiones funcionales
en la hormona de crecimiento humana.



Para apoyar dichas colaboraciones, ejecutar las estrategias
experimentales de nuestros proyectos de investigación y como res-
ponsabilidad de nuestra colaboración con los grupos arriba mencio-
nados, una buena parte de nuestro esfuerzo en los últimos años se
ha concentrado en la implementación, desarrollo y transferencia de

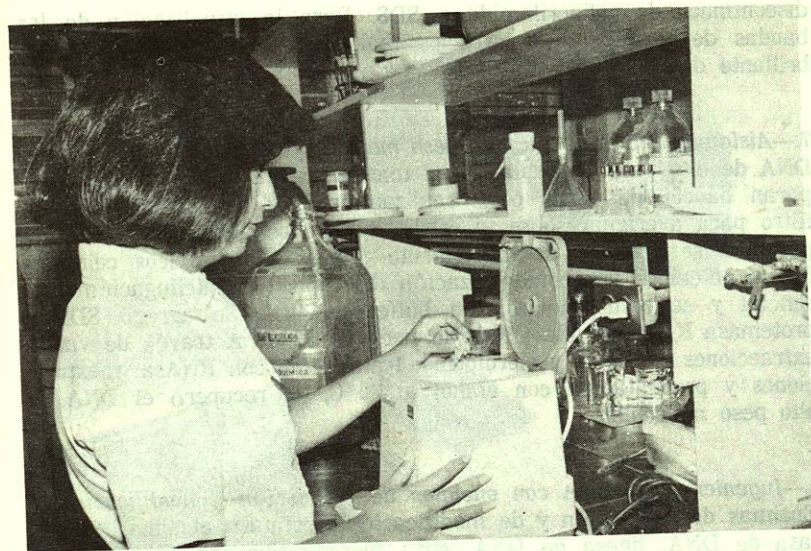
técnicas de ingeniería genética. La siguiente es una lista y breve descripción de las metodologías implementadas.

1.—*Aislamiento de RNAs mensajeros de tejidos.*—Solo una fracción del genoma se expresa en cada tejido o tipo celular. La población de RNA mensajeros (RNAm) de una célula representa esa fracción del genoma siendo transcrita activamente en la célula o tejido en estudio. Para aislar los RNAm se procedió de la siguiente manera: Los ácidos nucleicos totales se obtuvieron homogenizando el tejido en presencia de fenol y sarcosil, digiriendo con proteinasa K, extrayendo con fenol y cloroformo y finalmente precipitando con etanol a -20°C . Los RNAs de alto peso molecular se precipitaron selectivamente con acetato de sodio 3M. Los RNA mensajeros (poli A⁺) se seleccionaron por cromatografía de afinidad en oligo-(dT)-celulosa.

2.—*Producción de anticuerpos.*—Los anticuerpos, a manera de rastreadores o detectores de moléculas específicas, son herramientas de enorme valor en el estudio de la célula. Para obtenerlos, el antígeno en cuestión fue emulsificado con adyuvante completo o incompleto de Freund. Se inmunizaron los conejos siguiendo un esquema de inyecciones intradérmicas, subcutáneas e intraperitoneales. La producción de anticuerpos se demostró mediante la técnica de difusión en agar de Ouchterlony.

3.—*Minipreparación rápida de plásmidos.*—Con el propósito de analizar o confirmar las características de los plásmidos manejados o contruidos por primera vez en el laboratorio utilizamos una técnica rápida y reproducible que consiste en lo siguiente: A partir de 4 ml de cultivo fresco crecido a 37°C por 18 horas y con agitación vigorosa, se obtuvieron paquetes celulares bacterianos que fueron sujetos a congelación y descongelación. Se siguieron tratamientos con lisozima, dodecil sulfato de sodio (SDS) y álcali. El DNA bacteriano desnaturalizado por álcali fue precipitado y el DNA del plásmido recuperado del sobrenadante. Después de limpiarlo por extracciones con fenol-cloroformo, fue reconcentrado por precipitación con etanol. El RNA fue eliminado por digestión con RNasa A.

4.—*Preparación a gran escala de DNA de plásmidos.*—Una vez confirmada la identidad de los plásmidos, se procedió a prepararlos en gran escala y con mayor pureza. Los paquetes celulares obtenidos a partir de un litro de cultivo fueron sujetos a congelación y des-



congelación y tratados con lisozima y una solución de tritón X-100. A partir del lisado se recuperó por centrifugación el DNA del plásmido en el sobrenadante. Para limpiarlo se corrió un gradiente de densidad en cloruro de cesio y en presencia de bromuro de etidio. Después de extraer con alcohol isoamílico y dializar, se trató con RNasa A y proteinasa K, reconcentrando el DNA por precipitación con etanol.

5.—*Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa o poliacrilamida.*—Las muestras de RNA fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa-urea-ácido cítrico. Las muestras de DNA de alto peso molecular (> 1000 pares de bases) se analizaron en geles de agarosa, mientras que las de bajo peso molecular (< 1000 pares de bases) en geles de poliacrilamida. La visualización de ácidos nucleicos se logró mediante la tinción del gel con bromuro de etidio, seguido por irradiación con luz ultravioleta. El bromuro de etidio se intercala entre las bases nitrogenadas y fluoresce en respuesta a la excitación por la luz ultravioleta.

6.—*Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS.*—Proteínas fueron desnaturalizadas en presencia de mercaptoetanol y dodecil sulfato de sodio (SDS) y analizadas por electroforesis en geles

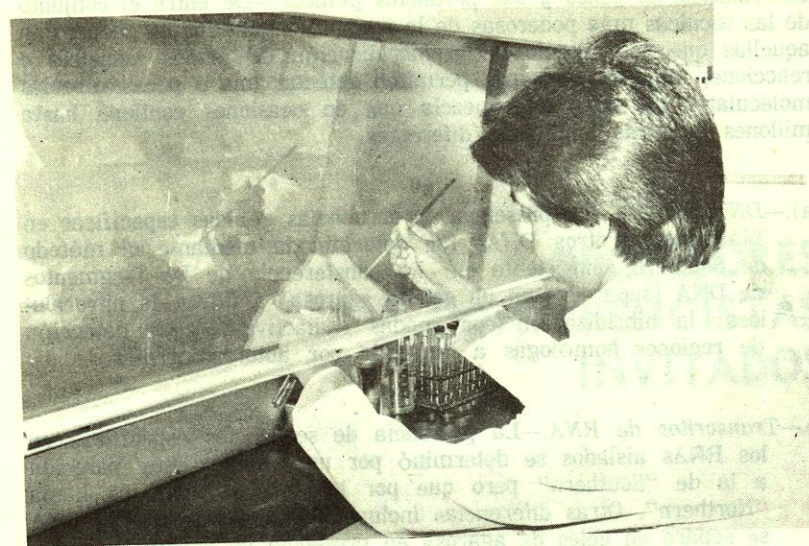
discontinuos de poliacrilamida y SDS. Para la visualización de las bandas de las diferentes especies moleculares se coloreó con azul brillante de coomasie.

7.—*Aislamiento de DNA de alto peso molecular de linfocitos y tejidos.*—DNA de alto peso molecular es el material a partir del cual se preparan bancos de genes o se realizan estudios de hibridación en filtro para averiguar sobre la estructura de los genes. Para su preparación se procedió de la siguiente manera: los núcleos celulares fueron obtenidos por homogenización del tejido y centrifugación diferencial y se resuspendieron en buffer de lisis. Se agregó SDS y proteinasa K, incubándose toda la noche a 37°C. A través de varias extracciones con fenol y cloroformo, tratamiento con RNasa, reextracciones y precipitación con etanol a -20°C, se recuperó el DNA de alto peso molecular.

8.—*Ingeniería del DNA con enzimas de restricción y modificación.*—Enzimas de restricción y de modificación (fosfatasa alcalina, polimerasa de DNA, ligasa de DNA, etc.) fueron utilizadas bajo las condiciones de reacción sugerida por la casa comercial proveedora de las mismas. Con la ayuda de ellas se realizaron todas aquellas manipulaciones a nivel molecular de los ácidos nucleicos utilizados en nuestros estudios.

9.—*Recuperación de fragmentos de DNA a partir de geles preparativos.*—Aquellos fragmentos de DNA que fueron necesarios aislar en forma pura para su utilización en subsecuentes experimentos, fueron preparados a partir de geles preparativos de agarosa de bajo punto de fusión o de geles preparativos de poliacrilamida. De los de agarosa se extrajo el DNA al fundir el trozo de agarosa conteniendo la banda del fragmento deseado y recuperando el DNA por extracciones con solventes orgánicos y precipitación con etanol. De los de poliacrilamida se recuperó el DNA por electroelución seguida también de extracciones y precipitación.

10.—*Subclonación de los fragmentos de DNA en plásmidos y otros vehiculos moleculares.*—Fragmentos de DNA obtenidos en forma pura fueron ligados con el DNA de vectores utilizando reacciones de 10 a 20 microlitros conteniendo las condiciones de reacción para ligasa, el DNA del vector (≈ 200 ng) y la cantidad del fragmento para guardar una relación molar de éste con el vector de 2 a 10 veces en exceso. La reacción se incubó a 14°C toda la noche, verificando el éxito de la misma mediante el análisis por electroforesis en gel.



11.—*Transformación de bacterias E. coli Ca⁺⁺ competentes.*—Para la preparación de las moléculas recombinantes, se introducen éstas a bacterias por la técnica de transformación, misma que se describe a continuación. La cepa C600 o HB101 fue hecha competente para la captación de DNA foráneo mediante el tratamiento a 4°C con una solución hipotónica de cloruro de calcio. Las bacterias así tratadas fueron expuestas al producto de la reacción de ligasa del vector más el fragmento que se deseaba subclonar. Aquellas bacterias que capturaron el plásmido recombinante fueron seleccionadas en cajas de Petri conteniendo el antibiótico para cuya resistencia el vector portaba un gen.

12.—*Traducción in vitro de RNAs mensajeros.*—Una de las pruebas de la integridad de los RNA mensajeros que purificamos consistió en evaluar su capacidad de síntesis de proteínas. Estos estudios además arrojan información sobre la naturaleza de las proteínas codificadas en estos RNA mensajeros. Esta capacidad de síntesis de proteínas de los RNAs totales y poli A⁺ (mensajeros) fue analizada mediante la incubación de estos en un extracto libre de células obtenido a partir de reticulocitos de conejo y en presencia de metionina marcada radioactivamente con azufre 35. Las proteínas sintetizadas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS. Los geles fueron tratados y secados para sujetarlos a autorradiografía y así poder visualizar las proteínas sintetizadas *in vitro*.

13.—*Análisis de genes y sus productos génicos.*—De entre el conjunto de las técnicas más poderosas de la ingeniería genética se encuentran aquellas que por reacciones de hibridación de ácidos nucleicos o reacciones inmunológicas nos permiten detectar una o pocas especies moleculares de entre una mezcla que en ocasiones contiene hasta millones de otras moléculas diferentes.

a).—*DNA del gen.*—La presencia de secuencias génicas específicas en plásmidos u otros DNAs fue determinada mediante el método de Southern, consistente en: la transferencia de los fragmentos de DNA (separados en un gel de agarosa) a filtros de nitrocelulosa; la hibridación con sondas radiactivas; y la detección de regiones homólogas a la sonda por autorradiografía.

b).—*Transcritos de RNA.*—La presencia de secuencias específicas en los RNAs aislados se determinó por una técnica muy parecida a la de "Southern" pero que por tratarse de RNA se llama "Northern". Otras diferencias incluyen el hecho de que el RNA se separa en geles de agarosa en presencia de agentes desnaturizantes, y la transferencia se hace inmediatamente después de corrido el gel, omitiéndose los pasos del ácido, álcali y neutralización.

c).—*Análisis de proteínas.*—La presencia de ciertas especies polipeptídicas en mezclas de proteínas específicas se determinó por las técnicas de inmunotransferencia o "Western blotting". Aquí las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida y SDS fueron transferidas por corriente eléctrica y una vez presentes en la superficie del papel de nitrocelulosa, fueron detectadas por reacciones del tipo antígeno-anticuerpo con acoplamiento a reacciones enzimáticas o a radiactividad.

PROFESORES Y CONFERENCISTAS INVITADOS

Dr. Antonio Velázquez

Director del Programa
Universitario de Investigación
Clínica de la UNAM

Dr. Francisco J. Sánchez Anzaldo

Investigador de los Laboratorios
Clínicos de Puebla

Ing. Rosana Sánchez

CNRS-LGME, Facultad de
Medicina, Estrasburgo, Francia

Dr. Francisco Bolívar Zapata

Director del Centro de
Investigación sobre Ingeniería
Genética y Biotecnología

Dr. Patricio Gariglio

Centro de Investigación y Estudios
Avanzados del IPN

Dra. Isaura Meza

Centro de Investigación y Estudios
Avanzados del IPN

- Dr. Fernando Díaz B. Facultad de Medicina, UASLP
- Dr. Jesús M. Rodríguez Medina Facultad de Medicina, UASLP
- Dr. Luis Cañedo Director del Hospital Metropolitano
"Dr. Bernardo Sepúlveda"
- Dr. Salvador Said Fernández Unidad de Investigaciones
Biomédicas del Noreste del IMSS
- Dr. José Galindo Unidad de Investigaciones
Biomédicas del Noreste del IMSS
- Dr. Raúl Garza Chapa Unidad de Investigaciones
Biomédicas del Noreste del IMSS
- Dr. Ramiro González Facultad de Ciencias
Biológicas, UANL
- Biól. Mario Morales V. Facultad de Ciencias
Biológicas, UANL



Dr. Fernando Díaz R. Facultad de Medicina, UANL
Dr. Jorge M. Rodríguez Muñoz Facultad de Medicina, UANL
Dr. José Calles Director del Hospital Metropolitano
"Dr. Rafael Arce" UANL
Dr. Salvador José Ferrández Unidad de Investigaciones
Biomédicas del Noroeste de UANL
Dr. Juan Velasco Unidad de Investigaciones
Biomédicas del Noroeste de UANL
Dr. José María Pineda Unidad de Investigaciones
Biomédicas del Noroeste de UANL
Dr. Tomás Sánchez Facultad de Medicina
Burgos, UANL
Dra. María Mercedes Facultad de Ciencias
Biológicas, UANL

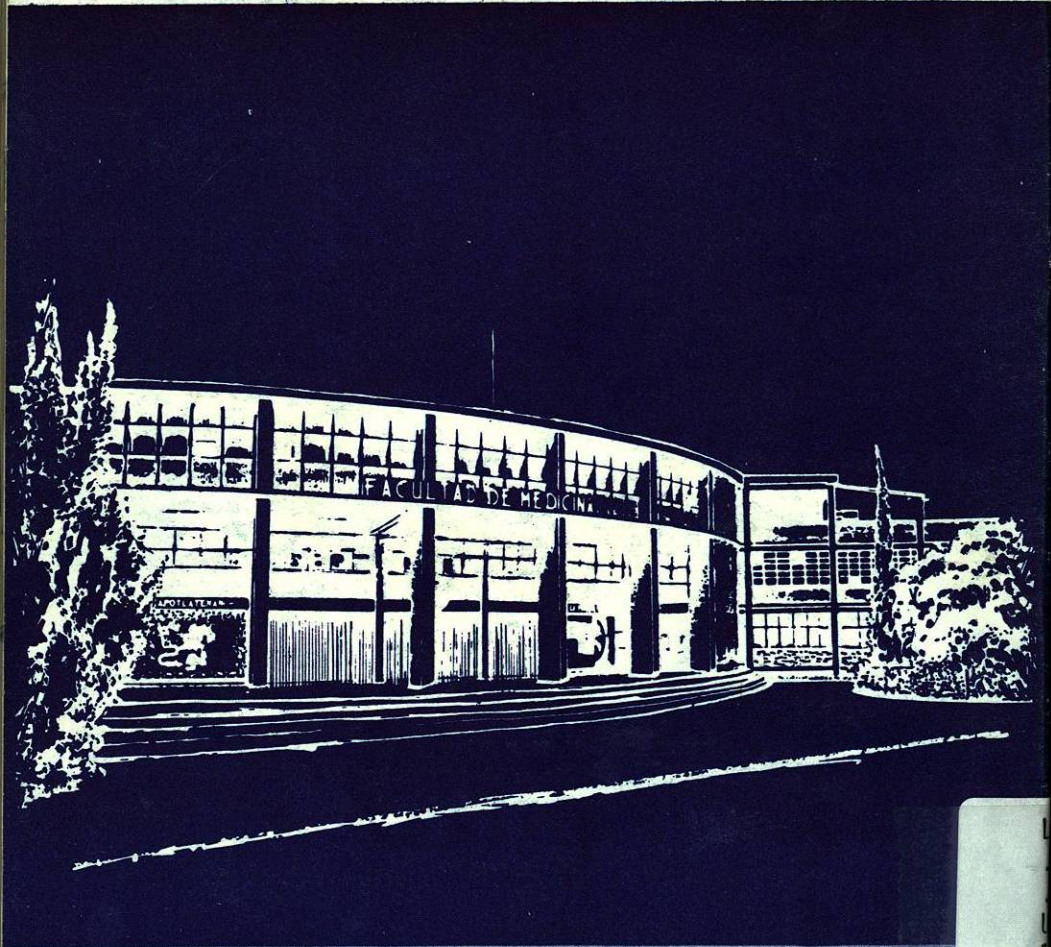


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
CAPILLA ALFONSINA
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA



INFORME 84-87 DE LA ULIEG,
se terminó de imprimir el 14 de octubre de 1987,
en la Imprenta de la Facultad de
Ciencias de la Comunicación de la U.A.N.L.

Tiraje 500 ejemplares.



FACULTAD DE MEDICINA U.A.N.L.