



" EXPRESION EN ESCHERICHIA COLI DEL DNA
COMPLEMENTARIO DE LA HORMONA DEL
CRECIMIENTO BOVINO "

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN:
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA

PRESENTA:

IBO. VICTOR RAMIREZ ANGULO

MONTERREY · N.L. · MEXICO

JULIO 1991

TM

Z6658

FM

1991

R3



1020071203

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

" EXPRESION EN Escherichia coli DEL DNA
COMPLEMENTARIO DE LA HORMONA DEL
CRECIMIENTO BOVINO"

T E S I S

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

con especialidad en:
Biologia Molecular e Ingenieria Genetica

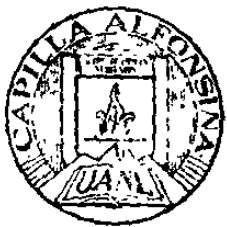
Presenta

IBQ. VICTOR RAMIREZ ANGULO

MONTERREY, N.L., MEXICO

1 JULIO 1991

TM
26658
FM
1991
R3



FONDO TESIS

16367J

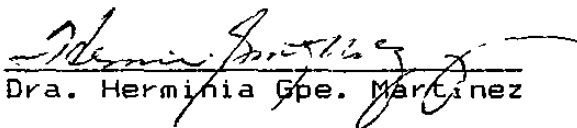
" EXPRESION EN Escherichia coli DEL DNA
COMPLEMENTARIO DE LA HORMONA DEL
CRECIMIENTO BOVINO"

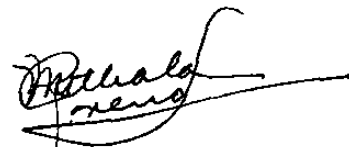
Por

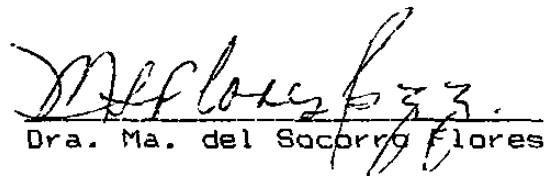
Victor Ramírez Angulo

Aprobó:


Hugo A. Barrera Saldaña


Dra. Herminia Gpe. Martínez


Dra. Myrthala Moreno S.


Dra. Ma. del Socorro Flores


Dr. Mario C. Salinas Carmona

El presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, en la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

INDICE

Indice	1
Agradecimientos	ii
Dedicatorias	iii
Lista de abreviaturas	iv
Resumen	v
I. INTRODUCCION	10
a) Breve introducción a la Ingeniería Genética	10
b) Las hormonas del crecimiento	11
i) estructura.....	11
ii) función	12
iii) clonación	12
c) El caso de la hormona del crecimiento bovino (bGH)	13
d) Objetivos del trabajo.....	17
II MATERIALES Y METODOS	18
a) Origen de los reactivos.....	18
b) Material Biológico	18
c) Estrategia de trabajo desarrollada	18
i) vector de expresión procariótica pKK233-2.....	20
ii) estrategia de subclonación del DNAc nativo de bGH.	21
iii) alteración de los primeros 24 codones del DNAc de bGH.....	23
iv) estrategia de subclonación del DNAc de hGH en el vector de expresión	26
v) estrategia para expresión de RNAm y proteínas.....	28
d) Métodos	28
Preparación de bacterias Ca ⁺⁺ competentes de <u>E.coli</u>	28
Minipreparación de plásmidos por el método de lisis alcalina.....	30
Preparación de plásmidos a gran escala.....	31
Electroelución de fragmentos de restricción	33
Extracción fenólica.....	35
Precipitación de DNA con etanol.....	36
Desfosforilación de los extremos Pvu II del vector pKKoligo.....	36
Formación de extremos romos usando DNA polimerasa T4...	37
Purificación de DNA de fragmentos de agarosa de bajo punto de fusión por el método GENECLEAN.....	38
Ensayos de expresión para las clonas de <u>E.coli</u> portadoras de los plasmidos recombinantes.....	39
Extracción de RNA de bacterias.....	40
Separación de RNAs en gel de agarosa úrea-acido.....	42
Análisis de RNAs tipo "Northern".....	43
I Electroforesis de RNA desnaturalizado con glioxal..	43
II Transferencia a filtro de nitrocelulosa.....	45

<u>III</u>	Prehibridación del filtro de nitrocelulosa.....	45
<u>IV</u>	Marcaje radiactivo de la sonda por el método de movimiento de la muesca.....	46
<u>V</u>	Evaluación del marcaje de la sonda por absorción a filtros DE-81.....	47
<u>VI</u>	Purificación de la sonda radiactiva.....	48
<u>VII</u>	Hibridación con la sonda PvuII-PvuII del DNA de bGH	49
	Gel de poliacrilamida-SDS.....	49
	a) Preparación del gel y electroforésis.....	50
	b) Tinción con azul de coomassie	50
	Inmuno-electrotransferencia o "Western blotting".....	50
	Determinación de la secuencia nucleotídica del DNAC de bGH y el promotor trc.....	53
	a) Preparación de células calcio-competentes de E. coli, cepa JM101 y transformación con el fago M13.....	53
	b) Análisis del DNA de clonas de M13+inserto.....	55
	c) Obtención del DNA de cadena sencilla del fago M13... ..	56
	d) Reacción enzimática de secuenciamiento de DNA.....	57
	e) Preparación y corrimiento del gel de secuencia.....	59
	f) Secado y exposición del gel a película de rayos X... ..	61
III.	RESULTADOS.....	62
	Caracterización enzimática del plásmido pKbGH-N.....	63
	Caracterización enzimática del plásmido pKbGH-S.....	63
	Caracterización enzimática del plásmido pKhPLhGH22K....	63
	Extracción de RNAs de células con y sin inducción del promotor trc.....	67
	Electroforésis de los RNAs en gel agarosa úrea-ácido ..	68
	Detección de RNAs mensajeros para hormonas del crecimiento por el ensayo tipo "Northern".....	68
	Análisis de proteínas	71
	a) por poliacrilamida-SDS.....	71
	b) inmuno-electrotransferencia.....	73
	Análisis de la secuencia nucleotídica del inserto de pKbGH-S y el promotor trc.....	73
IV.	DISCUSION	84
V.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	85
VI.	APENDICE.....	87
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	90

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, cuyo ejemplo como científico he tratado de seguir y continuaré en mi empeño.

A mis sinodales por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo.

A la subdirección de postgrado de la Facultad de Medicina de la UANL por su interés en el cumplimiento de nuestras metas.

Mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios de maestría.

Al Dr Daniel Lluch y Dr. José Luis Ochoa del Centro de Investigaciones Biológicas de B.C.S. por su valiosa influencia en mi decisión de hacer estudios de maestría.

A la ULIEG como ejemplo de laboratorio donde no existe el "no se puede".

A mis compañeros de laboratorio : Diana, Rocío, Eddy, Rossy, Herminia, Alma, Irma, Carmen, Ramiro, Diego, Manuel, Jaime, Luis, Ataulfo. Claudio, Jorge, Augusto, Raúl, Clarita por aguantarme tanto tiempo.

Al personal administrativo: Leonor, Mirthala y Carmen Cantú por tantos favores prestados.

DEDICATORIAS

Con todo mi cariño para mis padres Sr. Vicente Ramirez Aguilar y Sra. Ma de la Luz Angulo Millan por comprender mis aspiraciones y por estar siempre conmigo cuando los he necesitado.

A mi Hija Dulce Vadira que ha soportado esta larga separación con su sonrisa siempre hermosa y su cariño fiel.

A mi siempre amada esposa Guadalupe Martínez Morales por su comprensión y apoyo incondicional en todo momento.

A mis bebés Victor Eduardo y la pequeñita Perla Guadalupe que vinieron a alegrar nuestras vidas.

Mi eterna gratitud a mis hermanos: Tello, Guadalupe, Hector, Socorro, Felipe, Lamberto, Santos, Jesús y mis adorables cuñadas y mis amigos cuñados que bloqueaban el teléfono de la ULIEG con sus llamadas continuas para saber en que nos podían ayudar.

Al prof. Rafael Martínez y esposa Rosa Morales, padres de mi esposa de quienes siempre recibimos cariño, estímulo y consejos durante nuestra estancia fuera de casa.

Y por supuesto a Rafael, Cotti, Alejandro y Nicolas mis mejores amigos por su gran ayuda.

A mi buen amigo Paco que me hace sentir en casa con sus múltiples atenciones en mis visitas a Xalapa.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ATP	Adenosin trifosfato
bGH	Hormona del crecimiento bovino
Ci/mM	Curie/mili Mol
cm	Centímetro
conc	Concentración
°C	Grados Centígrados
DNA	Acido desoxirribonucleico
D.O.	Densidad óptica
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
g	Gramos
hGH	Hormona del crecimiento humano
h	Horas
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido
Kb	Kilobases
l	Litros
M	Concentración Molar
mA	Miliamperios
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Concentración Milimolar
μ g	Microgramos
μ l	Microlitros
N	Concentración Normal
ng	Nanogramos
nuc	Nucleótidos
pb	Pares de bases
pH	Potencial Hidrógeno
poli-A	Acido poliadenílico
P.P.	Precipitado
RNA	Acido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Lauryl Sulfato de Sodio
seg	Segundos
T.A.	Temperatura ambiente
uv	Ultravioleta
v	Voltios
vol	Volumen
%	Porcentaje

RESUMEN

La hormona del crecimiento bovino (bGH) es un polipéptido de 191 aminoácidos, cuyo peso molecular es de 22,000 daltones. A esta proteína se le han encontrado una serie de propiedades ventajosas para la industria pecuaria. Las más importantes son su capacidad para estimular la producción de leche, reducir los depósitos de grasa y aumentar la eficiencia de conversión alimenticia.

En el presente trabajo llevamos a cabo la manipulación de los extremos del DNAc de bGH con enzimas de restricción para subclonarlo en un vector de expresión procariótica, modificamos además el extremo 5' del mismo DNAc con DNA sintético con el fin de mejorar la expresión. Paralelamente construimos también un plásmido para expresión de hormona del crecimiento humano, para detectar por radioinmunoensayo incluso niveles bajos de expresión.

En los ensayos de expresión para detectar los RNA mensajeros (RNAm) para ambas hormonas, pudimos apreciar una abundancia de éstos similar a la producida por el plásmido usado como testigo positivo. En el caso de hGH la cantidad de mensajeros detectados fué menor. No detectamos las hormonas en geles de poliacrilamida donde se resolvieron proteínas totales de las bacterias portadoras de los plásmidos de interés. Tampoco se detectó señal alguna usando la técnica de inmunoelectrotransferencia y radioinmunoensayo (para el caso de hGH), lo anterior creemos se debe a problemas en la traducción de los RNAm.

Para la realización de este trabajo montamos y estandarizamos la técnica para determinación de la secuencia nucleotídica por el método de Sanger y desarrollamos una técnica para extracción de RNAs de bacterias

I. INTRODUCCION

a) Breve introducción a la Ingeniería Genética

La herramienta más poderosa del conjunto de las metodologías de la ingeniería genética, desarrolladas en la década de los setentas para el análisis directo de genes eucarióticos, consistió en la introducción de fragmentos específicos de DNA en vehículos moleculares y su propagación en bacterias: método conocido como clonación molecular. Con la ayuda de estos vehículos moleculares es posible obtener grandes cantidades del gen eucariótico deseado o de su RNA mensajero (copiado a DNA por transcripción inversa), propagando en un medio de cultivo adecuado la bacteria portadora de la molécula recombinante que lo contiene. Como vehículos moleculares se usan principalmente plásmidos bacterianos modificados en el laboratorio aunque también funcionan los bacteriofagos, así como híbridos entre estos dos tipos de elementos genéticos, llamados cósmidos₍₁₎.

La creación de moléculas de DNA recombinante fué posible gracias a que las endonucleasas o enzimas de restricción descubiertas a finales de los sesentas, liberan extremos "pegajosos" cuando hacen sus cortes altamente específicos en el DNA. Al volverse a aparear los fragmentos liberados, por complementaridad de bases, con los extremos "pegajosos" del mismo tipo (es decir liberados por la misma enzima de restricción) pero del DNA del vehículo, se producen moléculas híbridas o recombinantes. Estas requieren de ser tratadas con la enzima DNA ligasa para unir las covalentemente.

Usando estos procedimientos, el Dr. Paul Berg y sus colaboradores en la Universidad de California (Stanford), construyeron en 1972 la primera molécula recombinante, consistente en híbridos o "quimeras" del virus SV40 que contenían genes de E. coli₍₂₎.

Por otro lado, en el primer experimento de clonación molecular con plásmidos bacterianos, realizado en 1973 por los Doctores Herbert Boyer, Stanley Cohen y sus colaboradores, también de la Universidad de California, se construyeron híbridos de dos plásmidos diferentes₍₃₎.

El éxito de estas manipulaciones abrió las puertas a la realización de nuevos experimentos con DNA, de todos tipos, aislados ya sea de microorganismos, plantas o animales para insertarlos en vehículos de clonación bacterianos. Estas construcciones permitirían investigar y manipular en detalle un gen y dejaban entrever posibles explotaciones comerciales, como la producción de proteínas útiles en la medicina y la agroindustria.

b) Las hormonas del crecimiento

1. Estructura

Todos los miembros de la familia de las hormonas de crecimiento (GH) o somatotropinas son proteínas formadas por una cadena polipeptídica de alrededor de 190 aminoácidos, con dos o tres enlaces disulfuro internos y ámbos extremos libres. Estas proteínas son globulinas con un peso molecular aproximado de 22,000 daltones. Las hormonas del crecimiento se expresan en la hipófisis anterior de los animales y actúan directamente o vía somatomedinas para estimular el crecimiento somático postnatal. Las hormonas del crecimiento pertenecen a una familia de hormonas protéicas cuyos otros miembros son las prolactinas (PRL), también derivadas de la hipófisis, y el lactógeno placentario (PL) o somatomamotropina coriónica que se expresa en placenta⁽⁴⁾. Los genes para estas hormonas surgieron por duplicación y divergencia de una secuencia génica ancestral, de aquí que exhiban similitud en su secuencia de nucleótidos e incluso en sus funciones (tabla 1).

Tabla 1 Porcentajes de similitud en las secuencias de diversas hormonas del crecimiento.

hormona	similitud (%)	
	nucleótidos	aminoácidos
bGH-gGH	98.8	99.0
bGH-rGH	83.9	83.5
rGH-gGH	84.3	83.0
bGH-cGH	76.3	77.0
rGH-dGH	75.0	73.0
hGH-gGH	77.3	66.0
hGH-bGH	76.5	65.0
hGH-dGH	53.0	56.0
dGH-sGH	40.0	32.0
rGH-sGH	53.0	39.0
hGH-sGH	50.0	35.0

hGH, hormona del crecimiento humano; bGH, hormona del crecimiento bovino; gGH hormona del crecimiento de cabra; rGH, hormona del crecimiento de rata; cGH, hormona del crecimiento de pollo; sGH, hormona del crecimiento de salmón; dGH, hormona del crecimiento de pato.

Las hormonas del crecimiento son sintetizadas como un precursor (pre-hormona) con un péptido señal de 22 a 27 residuos hidrofóbicos en su extremo amino terminal. La expresión del gen

da lugar a una proteína de un tamaño de 22 Kd, pero en algunas especies como en el humano y el bovino se producen además variantes menores en longitud y menos abundantes, generalmente a través del uso de vías alternativas en la remoción de intrones⁽⁶⁾.

2. Función

Los efectos de las hormonas del crecimiento pueden ser considerados a dos niveles: efectos en la proliferación celular y síntesis de proteínas y los efectos sobre factores metabólicos. En algunos tejidos se puede inducir primero la diferenciación de células precursoras y después incrementar la producción de factores de crecimiento tipo insulina en las células diferenciadas, resultando en un efecto mitogénico. Los efectos fisiológicos de las GH se manifiestan en lo siguiente: a) Efectos anabólicos, tales como asimilación de nitrógeno en animales en crecimiento o síntesis de leche en lactantes; b) metabolismo de carbohidratos; c) metabolismo de lípidos y d) crecimiento de cartilago y hueso⁽⁷⁾. En otras palabras, las GH son anabólicos generales.

Las GH encuentran su principal aplicación en la medicina y en la industria pecuaria. Las hormonas del crecimiento se consideran especie-específicas en su acción, aunque una hormona de una especie evolutivamente superior, por ejemplo la hormona del crecimiento humano, tiene efecto sobre el crecimiento de una especie inferior, no siendo el caso a la inversa^(8,9).

3. Clonación

El primer DNA complementario al RNAm (DNAc) de GH en ser sintetizado, determinada su secuencia y clonado molecularmente fué el de rata (rGH)⁽¹⁰⁾. Fueron sintetizados los DNAc a partir de RNAm purificado de extractos de células de hipófisis de rata en cultivo, en las cuales se enriquecieron los RNAm de rGH por efecto de hormonas tiroideas y glucocorticoides. Los DNAc sintetizados fueron insertados en el vector pBR322 y usados para transformar E. coli. Posteriormente se seleccionaron las clonas portadoras de insertos de aproximadamente 800 pares de bases (10 clonas) de las cuales cuatro resultaron positivas para el DNAc de rGH.

También han sido clonados ya los DNAc codificantes para GH de origen humano (hGH) de 22Kd por grupos independientes en el mismo año^(11,12).

La hormona del crecimiento bovino (bGH) fue clonada y expresada en E. coli por primera vez por Miller y cols. en 1980⁽¹³⁾. A partir de hipófisis bovinas, se extrajeron los RNAm y se sintetizaron sus DNAc clonándose estos en pBR322 y

transformando E. coli. Las clonas portadoras se identificaron por hibridación in situ, usando como sonda al DNAC de rGH marcado radiativamente.

Seeburg y colaboradores por su parte, reportaron en 1983 la clonación y expresión en E. coli de los DNAC codificantes para hormona del crecimiento bovino y porcino (bGH y pGH)⁽¹⁴⁾. En éstos usaron DNA sintético para modificar el extremo 5' del DNAC de las hormonas. Lo anterior con el fin de utilizar en lo posible codones más preferidos por E. coli en la formación de sus propios polipéptidos, sin modificar la secuencia de aminoácidos, resultando en cepas sobreproductoras de ambas hormonas recombinantes.

Por otra parte, Souza y cols. en 1984 clonaron en E. coli el DNAC de la hormona de crecimiento de pollo. A partir de un banco de DNACs de hipófisis de pollo, fueron detectadas las clonas portadoras de los DNAs de cGH mediante el uso de una sonda de hGH o bGH, dada la alta similitud existente entre las secuencias nucleotídicas de estos DNAC⁽¹⁵⁾.

De la misma manera, Chen y cols. en 1988 publicaron la clonación y expresión del DNAC de la hormona del crecimiento de pato (dGH)⁽¹⁶⁾, usando como sonda rastreadora del banco de DNACs al DNA de pGH marcado radiativamente. El péptido señal de esta hormona (27 aminoácidos) es ligeramente mayor a los ya reportados para las versiones humanas, bovinas, murinas y porcinas de esta hormona (26 aminoácidos).

En 1988, Yamano y cols. clonaron en E. coli el DNAC codificante para la hormona de crecimiento de cabra (gGH), usando como sonda el DNAC de bGH⁽¹⁷⁾; por su parte, Wallis y cols. en 1989⁽¹⁸⁾ reportaron la clonación y expresión del DNAC de ovinos (oGH) en E. coli.

Debido al valor económico que representa para la piscicultura el poder reducir los tiempos de cultivo de peces y con ésto los gastos que ésto implica, se iniciaron los trabajos dirigidos a clonar y expresar hormonas del crecimiento de peces. Sekine y cols. en 1985 sintetizaron, clonaron y expresaron en E. coli la primera hormona de crecimiento de peces, la de salmón^(19,20,21). A ésta siguieron la de atún⁽²²⁾, carpa⁽²³⁾, trucha⁽²⁴⁾ y anguila⁽²⁵⁾, entre otras.

c) El caso de la hormona del crecimiento bovino (bGH).

Usualmente la expresión de altos niveles de bGH en E. coli requiere de un plásmido de expresión multicopia con un promotor fuerte y un sitio de unión al ribosoma eficiente. Existen algunas excepciones notables donde, a pesar del uso de tales plásmidos de

expresión, se sintetizan muy bajos niveles de bGH. Comúnmente son dos las explicaciones para estos resultados, a saber: (1) la proteína es inestable en E. coli y es degradada rápidamente por proteasas, o (2) el transcrito de RNAm no es traducido eficientemente. El primer problema es más severo con proteínas de bajo peso molecular y frecuentemente puede ser resuelto creando poliproteínas, proteínas de fusión o el uso de mutantes de E. coli deficientes en proteasas. El segundo problema es más complejo y es la causa principal de la baja o nula expresión de bGH₍₂₆₎. A continuación resumimos algunas de las estrategias seguidas para producir bGH a partir de su clonación por Miller y cols en 1980₍₁₃₎.

Ramabhadran y cols en 1985₍₂₇₎, expresaron bGH al clonar el gen de bGH en un derivado del virus SV40 y ponerlo bajo el control del promotor de metalotioneína (MT) y transfectar células CV-1 de mono. De igual manera, este DNA quimera de MT-bGH lo clonaron en un vector formado por el 69% de fragmento transformante de papiloma virus bovino (BPV) y transfectaron células C127 de ratón. En ambos sistemas obtuvieron 5 µg de bGH/10⁶ células/h.

En el mismo año, Pasleau y cols₍₂₈₎ construyeron dos plásmidos para expresión de bGH en células GH₃ de rata. Estos investigadores subclonaron el gen de bGH frente a la región reguladora del gen inmediato temprano del citomegalovirus (CMVIE). Además, en otra construcción (pBGH-1) clonaron un fragmento de DNA de aproximadamente 1.5 kb, que incluye al LTR virus del sarcoma de Rous (RSV) fusionado al extremo 5' del gen de bGH. Esta última construcción no produjo más de 230 ng de bGH/ml de cultivo; en cambio, el DNA de CMVIE-bGH dió lugar a 75 ng de bGH/ml a las 24 h y 760 ng/ml a las 72 h. Así mismo en 1985, dos grupos independientes de investigadores (Leung y cols₍₂₉₎; Kopchick y cols₍₃₀₎ expresaron bGH, pero en este caso usaron células L de ratón deficientes en timidina cinasa (TK) y adenina fosforribosiltransferasa (APRT⁻). Para ello cotransfectaron con un plásmido portador del gen quimera regulador del LTR de RSV fusionado al gen de bGH, además del plásmido portador del gen viral de herpes TK y el gen APRT de hamster. El cultivo de la línea celular derivada produjo 75 µg de bGH/5x10⁶ células/24 h.

McGrane y cols en 1988₍₃₁₎ construyeron una serie de ratones transgénicos mediante la microinyección de un segmento de DNA conteniendo 460 pb de la región promotor-reguladora de fosfoenolpiruvato carboxicinas, ligado al gen estructural de bGH. La concentración de bGH detectada en el suero de los animales transgénicos varió de 5 ng de bGH/ml a 2,300 ng de bGH/ml. El transgen solo se expresó en hígado y riñón.

Como se puede apreciar en los ejemplos mencionados, la expresión de bGH se logró sin grandes problemas al usar la

secuencia completa del gen en células en cultivo o en ratones transgénicos. Estos sistemas son eficientes para un ensayo rápido de expresión que busque principalmente corroborar la identidad del gen clonado y la actividad biológica de la proteína, pero no es eficiente para producir cantidades de importancia industrial de la proteína. Cuando la estructura de la proteína no es muy compleja y no requiere de modificaciones postraduccionales, la mejor opción es E. coli, con la que se pueden lograr altos niveles de producción de la hormona en procesos de fermentación a gran escala. A continuación resumimos algunos de los trabajos en los que se ha usado a E. coli como huésped y la serie de manipulaciones requeridas en la secuencia de DNA para corregir el problema de la baja eficiencia en los niveles de traducción de los RNAm.

En 1981, Keshet y cols construyeron un plásmido híbrido portador del gen para β -lactamasa de pBR322 y el gen codificante para bGH. El gen híbrido se expresó en bacterias y el producto, una proteína de fusión se acumuló en el citoplasma, detectándose solo muy bajos niveles en el espacio periplásmico⁽³²⁾.

Seeburg y cols en 1983⁽¹⁴⁾, clonaron el DNAc que codifica para la proteína madura de bGH en un plásmido derivado de pBR322 portador del promotor triptófano. Para obtener un alto nivel de expresión de la proteína, aplicó la estrategia diseñada por Goeddel y cols en la clonación del DNAc de hormona del crecimiento humano (hGH)⁽¹²⁾. Esta metodología consistió en sustituir los codones codificantes para los 22 aminoácidos del extremo amino terminal por DNA sintético conteniendo los codones preferencialmente usados por E. coli en la síntesis de sus proteínas. Esta modificación, permitió a Seeburg y cols lograr una producción de 1.5 g de bGH/l de cultivo bacteriano.

Por su parte Schoner y cols en 1984⁽³³⁾, reportaron la construcción de dos plásmidos para expresar bGH, en uno de los cuales usaron el promotor triptofano (trp) y en el otro el promotor de lipoproteína (lpp) de E. coli. La expresión de bGH fué muy baja. Después obtuvieron niveles de expresión mayores al 30% del total de las proteínas celulares al introducir los últimos cinco codones que codifican para el péptido señal entre el ATG (codón de inicio de la traducción) y el codón que da lugar al primer aminoácido de la proteína madura. Esta construcción, aunque dió un alto nivel de expresión, alteró el extremo NH₂ terminal de la proteína. Para corregirla, construyeron un sistema de dos cistrones al incorporar en el primero los codones que aumentan la expresión de bGH y en el segundo la región codificante para Met-bGH.

George y cols en 1985⁽³⁴⁾, eliminaron los 111 pb de la región 5' no traducible y la correspondiente al péptido señal y colocaron un codón de inicio de la traducción (ATG) frente al extremo 5' del DNAc de bGH restante. Posteriormente, insertaron

este fragmento en un vector de expresión portador del promotor lacUV5. La producción de bGH fué muy baja. Para mejorarla reemplazaron el promotor por el promotor tac y cambiaron los primeros 22 codones con DNA sintético de acuerdo al protocolo seguido por Seeburg y cols.⁽¹⁴⁾. Con estos cambios lograron una producción de bGH del 15% de total de proteínas celulares.

Siguiendo una estrategia diferente a la empleada por los investigadores anteriores, Buell en 1987⁽³⁵⁾, clonó el DNAC de bGH en dos sistemas de expresión portadores del promotor trp y P_L, respectivamente. Con estas construcciones, obtuvieron 50 moléculas de bGH/célula en la construcción que usó el promotor trp; en cambio, la que portaba el P_L obtuvieron 1,000 moléculas de bGH/célula. Tratando de mejorar la producción, insertaron los últimos cinco codones del péptido señal entre el ATG y el codón que da lugar al primer aminoácido de bGH. Al llevar a cabo los ensayos detectaron 500 moléculas/célula en el caso del promotor trp, mientras que en P_L quedó igual. Considerando que los codones que dan lugar a los primeros aminoácidos de la proteína son los causantes de la baja eficiencia de traducción (lo cual corroboraron después al producirla como proteína de fusión), decidieron eliminar varios de ellos y analizar la expresión de bGH. Obtuvieron dos clonas con delección de cuatro y nueve aminoácidos, respectivamente y las probaron en ambos promotores. Con P_{trp} obtuvieron 8,000 moléculas de bGH/célula en la delección de cuatro aminoácidos, en la delección de nueve aminoácidos dió 50,000 moléculas/célula. Usando el promotor P_L se produjeron 1.5×10^6 moléculas de bGH/célula para la primera delección 5×10^6 moléculas/célula para la segunda delección. De estas construcciones eligieron la combinación del promotor P_L con la delección de nueve aminoácidos del DNAC de bGH para probar los niveles de expresión en diferentes cepas de E. coli. Usando la cepa MC1061, la producción de bGH fué de 1.4×10^6 moléculas/célula en la cepa HB101 se obtuvieron 1.1×10^6 moléculas/célula, y finalmente con la cepa PRT detectaron 1.5×10^6 moléculas de bGH/célula. Posteriormente el grupo de Keith mejoró los sistemas de fermentación de las bacterias portadoras de este plásmido y logró obtener una producción de bGH de 3.8 a 5.3 g de bGH/l de cultivo⁽³⁶⁾.

En nuestro laboratorio, recientemente se sintetizó el DNA complementario al RNA mensajero (DNAC al RNAm) que codifica para bGH, que incluye la región codificante para la proteína madura, parte de la correspondiente al péptido señal y una porción no traducible en el extremo 3' de 150 pb, clonándose en pBR322 para dar lugar al plásmido p63. También, como parte del trabajo anterior se subclonó la mayor parte del DNAC mencionado (PstI-PstI) en el plásmido pGEM3 dentro de la estrategia de secuenciación, dando lugar al plásmido pGEM3' bGH⁽³⁷⁾. De manera similar, se sintetizaron y clonaron los DNAC correspondientes a hormona del crecimiento humano hGH20Kd y 22Kd en pUC19, obteniendo los plásmidos pDRhGH20Kd y pDRhGH22Kd,

respectivamente (38). También se subclonaron los DNAC anteriores en el vector de expresión eucariótica pAVE2 (39), para generar los plásmidos pAVE2bGH, pAVE2hGH20K y pAVE2hGH22K para la expresión transitoria en células eucariotes en cultivo (40).

Como siguiente paso de nuestra línea de investigación sobre la bGH y de nuestro interés de contribuir al desarrollo de la biotecnología animal nacional, en el presente trabajo nos propusimos manipular el DNAC de la bGH con que ya contamos, para lograr su expresión en Escherichia coli.

d) Objetivos del trabajo

Objetivos Generales:

- a) Contribuir al desarrollo de sistemas plasmídicos para expresión de hormonas del crecimiento recombinantes de interés médico y pecuario, por fermentación de bacterias reprogramadas por Ingeniería Genética.

Objetivos Particulares:

Para el cumplimiento del presente trabajo nos planteamos cinco objetivos experimentales, los cuales se describen a continuación:

- a) Subclonar el DNAC nativo de bGH en un vector de expresión procariótico.
- b) Modificar los extremos del DNAC de bGH con DNA sintético.
- c) Subclonar el DNAC de hGH en un vector de expresión procariótico.
- d) Confirmar la secuencia nucleotídica del DNAC de bGH subclonado una vez concluidas las manipulaciones.
- e) Llevar a cabo ensayos de expresión para la detección de los RNAMs de bGH y hGH.

II. MATERIALES Y METODOS

a) Origen de los Reactivos:

Las enzimas de restricción y modificación de ácidos nucleicos fueron obtenidas de varias casas comerciales: Bethesda Research Laboratories, New England Biolabs, Pharmacia, Boehringer Mannheim y se utilizaron de acuerdo a las condiciones especificadas por el proveedor.

Para determinar la secuencia nucleotídica del DNAc de bGH se utilizó el "Kit" Sequenase de la compañía United States Biochemical Corporation (USB).

Los Reactivos usados para preparar soluciones, medios de cultivo y geles fueron adquiridos de diversas casas comerciales: Sigma Chemical Company, Bethesda Research Laboratories, Merck, Aldrich, IBI y Casa Rocas (Monterrey N.L.).

El "Gene clean" lo obtuvimos de Bio101. Los nucleótidos radioactivos ^{32}P -dCTP (para los ensayos tipo Northern) y ^{35}S - α -dATP (para determinación de la secuencia nucleotídica) fueron adquiridos de Amersham Internacional.

b) Material Biológico:

Tanto las cepas RR1, MC1061, W3110 y JM101 de E.coli, así como los plásmidos p63, pGEM3'bGH, pDRhGH20 y 22Kd, pAVE2bGH usados para el desarrollo del presente trabajo fueron facilitados por la Bacterioteca y Genoteca de nuestra Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG). El plásmido pKK233-2 al igual que la cepa E.coli JM105 que forman parte del "kit" de expresión, fueron adquiridos de Pharmacia. Los anticuerpos de conejo contra bGH forman parte de los reactivos con que cuenta la ULIEG y los anticuerpos de chivo contra IgG de conejo, acoplados a fosfatasa alcalina fueron comprados a Sigma. La proteína bGH purificada (usada como testigo positivo) fué donada por la Dra. Angélica Salas del Instituto de Investigación Biomédica de la UNAM. Para la preparación del DNA de cadena sencilla (ssDNA) para usarse en las reacciones de secuenciación, utilizamos el fago M13 mp18 y mp19 así como E.coli cepa JM101 como hospedero.

c) Estrategia de trabajo desarrollada

El DNA nativo de bGH tiene una extensión de 800 nuc que incluye la región 5' no codificante y la 3' no traducible (Seeburg y cols. 1983_(1,3)), y está flanqueado por la enzima PstI (además de contener un sitio de reconocimiento interno para esta

enzima de restricción), ver figura 1. El inicio de la región codificante para la proteína madura coincide con el sitio de reconocimiento para la enzima HaeII y termina 10 nuc después del segundo sitio PvuII. Además, los sitios internos PstI, y SmaI se encuentran localizados a distancias apropiadas para generar fragmentos adecuados para la determinación de la secuencia nucleotídica.

C.I
*

cagggtcctgtggacagctcaccagctATGATGGCTGCAGGCCGCCGGADCTCCCTGCTCCTGGC
** H
TTTGGCCCTGCTCTGCCTGCCCTGGACTCAGGTGGTGGGGCCCTTCCCAGCCATGTCCCTTGTCCG
Pv
GCCTGTTTGCCAAAGCTGTGCTCCGGGCTCAGCAGCTGCATCAGCTGGCTGCTGACACCTTCAAA
GAGTTTGAGGGCAGCTACATCCCGGAGGGACAGAGATACTCCATCCAGAACACCCAGGTTGCCTT
CTGCTTCTCTGAAADCATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAGCAGAAATCAGACTTGG
P
AGCTGCTTCCATCTCACTGCTCCTCATCCAGTGGTGGCTGGGGCCCTGCAGTTCCCTCAGCAGA
S
GTCTTACCAACAGCTTGSTGTTTGGCAGCTCGGACCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGA
GGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGAGCTGGAAGATGGCAGCCCGGGCTGGGCAGATCCCTCA
AGCAGAGCTATGACAAATTTGACADAAACATGGGCAGTGACGACGGCTGCTCAAGAACTACGGT
CTGCTCTCCTGCTTCCGGGAGGACCTGCATAAGAGCGGAGAGCTACCTGAGGCTCATGAGGTGCCG
Fv C.T
CCGCTTGGGGGAGGCCAGCTGGCCCTTCTAGTtgcagccctcagttgtttgcccctcccccgtt
ccttcccttgacccctggaagggtgccactccactgtccttctcctaataaaaatgagggaattgc

FIGURA 1. MAPA DE RESTRICCIÓN DEL DNAC DE bGH NATIVO.

Analizamos la secuencia del DNAC de bGH con el programa "Pustell para ubicar los sitios de restricción que se muestran en la figura. El sitio HaeII, H se encuentra flanqueando el extremo 5' codificante para la proteína madura, y PvuII. Fv se localizan a 10 pb del extremo 3'. S.I.= sitio de inicio de la traducción; C.T.= codon de terminación; P= PstI; S= SmaI; **= inicia proteína madura.

Con este conocimiento de la estructura del DNAC, nos propusimos una estrategia general de trabajo que nos permitiera expresar y detectar en cultivos de *Escherichia coli* los RNAm que

dan lugar a la hormona del crecimiento bovino y de ser posible llevar a cabo ensayos de expresión de proteínas en geles de poliacrilamida (ver estrategia, figura 2).

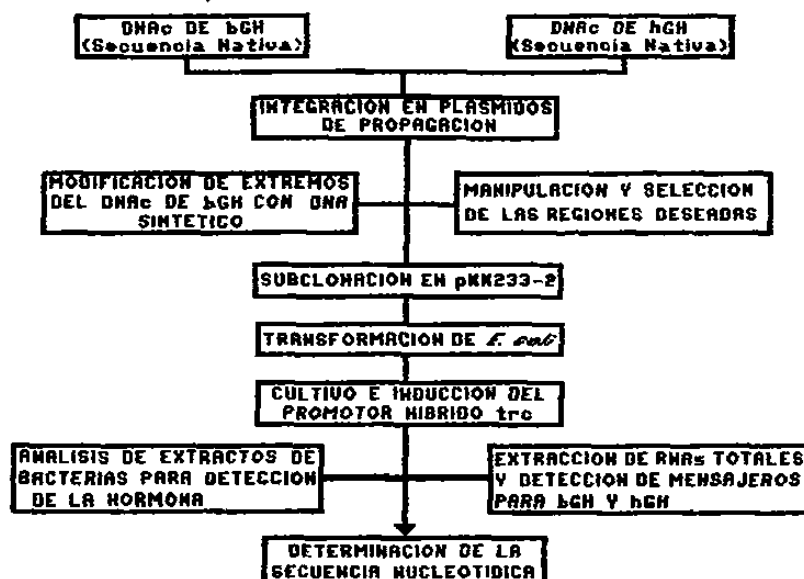


FIGURA 2. ESTRATEGIA GENERAL PARA EXPRESION DEL DNAc DE bGH EN BACTERIAS. A partir de los DNacs naturales de bGH y hGH construimos los plásmidos pKbGH-N, pKbGH-S y pKhPLhGH22K portadores del DNA nativo de bGH, de su DNA modificada y de hGH. Enseguida, hicimos experimentos para analizar los RNAm expresados a partir de estos DNacs. También extrajimos las proteínas para analizar la presencia de la hormona en las clonas construidas. Finalmente determinamos la secuencia nucleotídica del DNA de bGH-S y del promotor trc.

Vector de Expresión Procariótico pKK233-2₍₄₂₎.

El vector pKK233-2 permite la síntesis de proteínas heterólogas sin generar fusiones con otras secuencias peptídicas. Este plásmido contiene el promotor trc además del operador lac, de aquí que la síntesis de proteínas heterólogas está reprimida en cepas productoras del represor lac, pero puede ser inducido en la presencia de isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG).

El promotor trc es idéntico al promotor tac, excepto que el

espacio entre las secuencias consenso -10 y -35 es de 17 nuc, mientras que en el promotor *lac* es de 16₍₄₂₎. Tanto la cepa JM105 como W3110 de E. coli son productoras del represor *lac*, de aquí que pueda ser inducido el promotor *trc* en el momento deseado con la adición de IPTG a una concentración final de 0.1 mM. Esto conduce a la transcripción del DNA colocado bajo la regulación del promotor. En frente de este promotor y a una distancia adecuada se localiza el sitio de unión al ribosoma, seguido por el sitio de clonación múltiple (SCM) para tres enzimas: *NcoI* (proporciona el codón ATG de inicio de la traducción), *PstI* y *HindIII*. El SCM es seguido por un fragmento de DNA de 424 pb conteniendo terminadores de la transcripción de origen ribosomal.

Transformamos la cepa JM105 de E. coli con el DNA del vector pKK233-2 para propagarlo y guardar alícuotas en glicerol a -70 °C y en cajas de Petri. Posteriormente crecimos dichas clonas y obtuvimos suficiente plásmido para llevar a cabo una caracterización con enzimas de restricción que nos permitiera corroborar la identidad del plásmido recibido (figura 3).

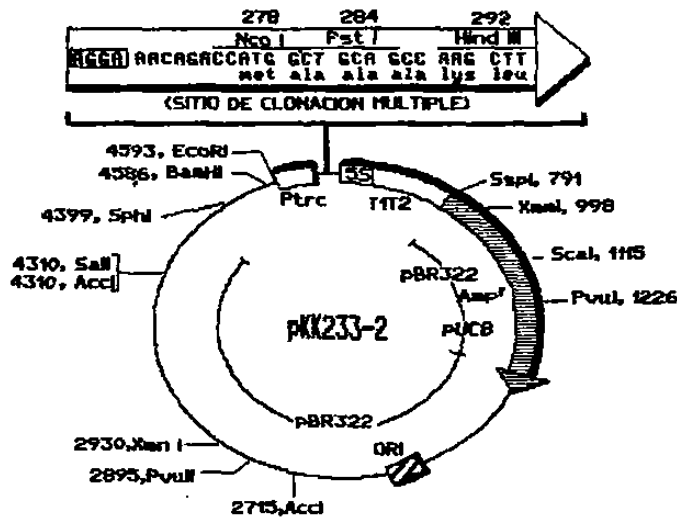
Estrategia de subclonación del DNAc nativo de bGH en el vector pKK233-2.

Dado que el DNAc de bGH se encontraba incorporado en el plásmido pBR322 (con el nombre de p63) y no estaba flanqueado por sitios de restricción adecuados para su integración en pKK233-2, decidimos reconstruir la secuencia que codifica para la hormona del crecimiento bovino en un plásmido intermediario portador de parte de la misma. Lo anterior con el fin de ganar un sitio *HindIII* en el extremo 3' del DNAc que nos permitiera subclonarlo en el SCM del vector. Para ello, primeramente digerimos 10 µg del plásmido p63 con las enzimas *EcoRI-SmaI* para liberar un fragmento de 1240 pb el cual después de ser purificado por uno de los métodos que se describen más adelante, lo ligamos al vector purificado pGEM3' bGH digerido con las mismas enzimas. Esta fusión vector-inserto que llamamos pGEMbGH, la digerimos con *HaeII - HindIII* para liberar un fragmento de 725 pb portador de la secuencia para la proteína madura y la región 3' no traducible. Este fragmento lo clonamos en los sitios *PstI* y *HindIII* del vector pKK233-2 para de esta manera ganar un codón ATG necesario para el inicio de la traducción del mensajero (figura 4).

A

PLASMIDO pKK233-2 (4593 pb): VECTOR DE EXPRESION

13



B

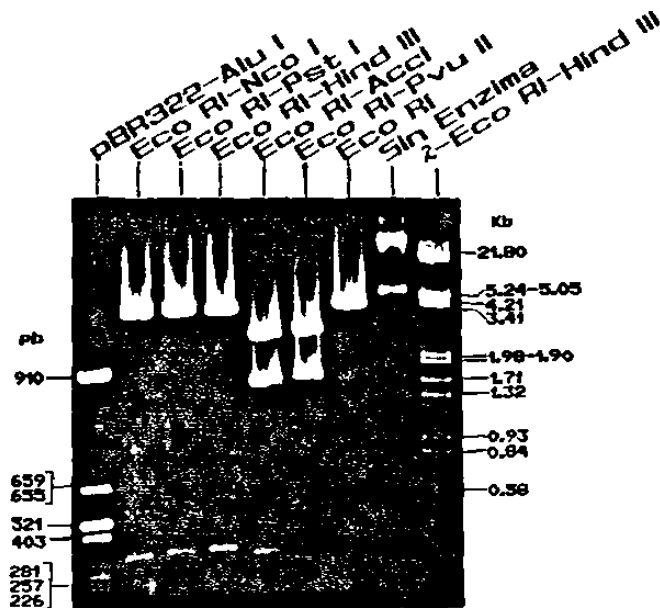


FIGURA 3. CARACTERIZACION DEL VECTOR DE EXPRESION PROCARIOTICA pKK233-2. En A mostramos el mapa del vector con los sitios de clonación múltiple (SCM) que permiten subclonar insertos en los sitios NcoI, PstI, HindIII. En B mostramos los fragmentos liberados de las digestiones con EcoRI (lineariza), para liberar fragmentos de 278 pb (EcoRI+NcoI), de 284 pb (EcoRI+PstI), de 292 pb (EcoRI+HindIII), los de 2998 y 1595 pb (EcoRI+AccI) y los de 2895+1698 pb al digerir con EcoRI+PvuII. Como marcadores, usamos DNA de pBR322 digerido con AluI en el extremo izquierdo y DNA del bacteriófago lambda cortado con EcoRI+HindIII en el derecho, figura B.

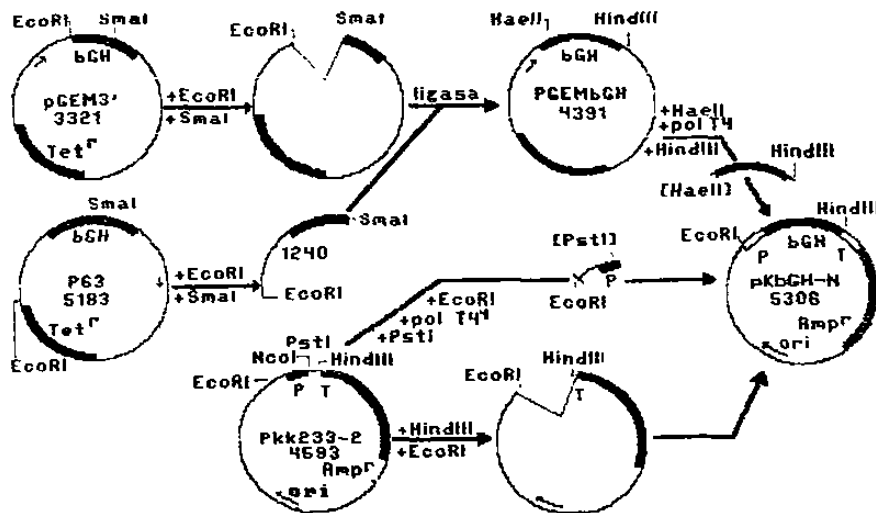


FIGURA 4. ESTRATEGIA DE CONSTRUCCION DEL PLASMIDO pKbGH-N PORTADOR DEL DNAC NATIVO DE bGH. Partimos de dos plásmidos previamente construídos que portaban la secuencia completa y la región 3' del DNac de bGH, respectivamente. Los fusionamos para ganar un sitio Hind III. Posteriormente, mediante la formación de extremos romos (del vector y del inserto), fué posible la ligación del DNac de bGH en pK233-2

Ya que el extremo HaeII del inserto de bGH, y el sitio PstI del vector no son compatibles, decidimos tratarlos con DNA polimerasa de T4, para formar extremos romos y poderlos unir (ver figura 5).

Alteración de los primeros 24 codones del DNac de bGH: pKbGH-S.

La expresión de hormonas animales en *E. coli* no siempre es exitosa y en la mayoría de los casos ha sido necesario realizar una serie de manipulaciones en las secuencias codificantes y no codificantes para la proteína madura, probar varios vectores de expresión, transformar varias cepas bacterianas con los plásmidos, etc.

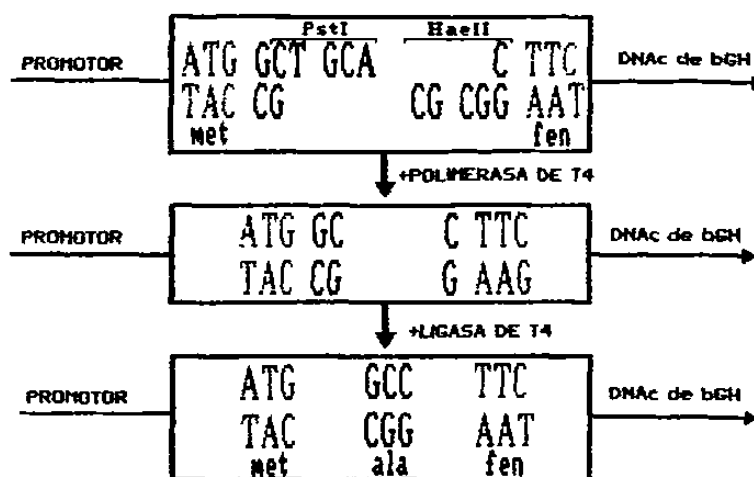


FIGURA 5. TRATAMIENTO ENZIMATICO DE EXTREMOS PstI EN pKK233-2 Y HaeII EN EL DE DNAc de bGH PARA HACER POSIBLE SU UNION. La digestión del DNAc de bGH con HaeII nos generó un extremo 3' saliente el cual no era compatible con el generado por PstI en pKK233-2. El tratamiento con DNA polimerasa de T4 dió lugar a la formación de extremos romos capaces de ser unidos adyacentes al codón de iniciación (ATG) del vector. La ligación de estos extremos regeneró el codón codificante para alanina que es uno de los dos aminoácidos con los que inicia la hormona en forma natural en el 50 % de las moléculas de bGH naturales.

La hormona de crecimiento bovino (bGH) ha sido reportada como una proteína difícil de expresar en *E. coli* (34,45). Es por eso que se ha optado entre otras estrategias, sustituir los primeros 70-72 nucleótidos codificantes para la proteína madura por DNA sintético formado por los codones preferencialmente utilizados por *E. coli* en la síntesis de sus propias proteínas, lo anterior sin cambiar la secuencia de aminoácidos. Para llevar a cabo esta modificación, mandamos sintetizar un par de oligonucleótidos complementarios a Applied Biosystems con la secuencia y sitios de restricción que se describen en la figura 6.

```

      E      N
5' -aattccATGGCTTTTCCAGCTATGTCTCTATCTGGTCTATTGGCTAAGCTGTTCTTGGTG
3' -----GGTACCGAAGGGTGGATACAGAGATAGACCAGATAAGCGATTGGCGAAGAGGAC

```

```

      Pv      X      H
CTCAGCATCTTCATCAAGCTGGSCATTCTAGa-----3'
GAGTCGTAGAAAGTAGTGGAGCGGTAAGATCttcgaa-5'

```

FIGURA 6. DNA SINTETICO USADO EN LA MODIFICACION DEL EXTREMO 5' DEL DNAC DE bGH. El apareamiento de los dos oligonucleótidos de 92 bases de extensión dió lugar a un DNA de doble cadena con extremos EcoRI y HindIII, útiles para subclonarlo en el vector preparado para este fin. También se generó un sitio PvuII necesario para fusionar el oligo al DNA nativo y sustituir los primeros 72 nucleótidos y se proporcionó un codón de terminación de la traducción (TAG) que permitió eliminar los 150 pb de DNA no traducible en el extremo 3'. E= EcoRI; N= NcoI; Pv= PvuII; X= XbaI y H= HindIII.

Estos oligos que recibimos liofilizados, los resuspendimos en agua ultrapura, los mezclamos con una relación molar 1:1 y los calentamos 5 min a 70 °C. Transcurrido este tiempo, los retiramos y colocamos a 65°C, dejamos enfriar hasta 25 °C o menos. Hicimos alícuotas de 10 µl a una conc. de 520 ng/µl y guardamos en tubos eppendorf a -20 °C.

Para la sustitución del DNA sintético en la secuencia natural de bGH, primeramente preparamos un vector pKK233-2 al cual le eliminamos el sitio interno PvuII. Esto fué posible debido a que este sitio de restricción está flanqueado por la enzima AccI, de aquí que al cortar con esta última enzima se liberara un fragmento de 1595 pb que incluía el mencionado sitio. Posteriormente ligamos los extremos AccI y obtuvimos el vector sin PvuII (pKKΔAccI), lo digerimos con EcoRI-HindIII y ligamos contra el DNA sintético usando una relación vector- inserto de 1:50. Pudimos identificar las clonas portadoras del oligo por la presencia de un sitio PvuII que había sido eliminado del vector. Este nuevo plásmido al que llamamos pKKoligo, lo digerimos con PvuII, lo tratamos con fosfatasa alcalina para reducir las posibilidades de recircularización, y le agregamos DNA ligasa y el inserto PvuII-PvuII (494 pb) proveniente del plásmido pKbGH-N construido inicialmente. Este fragmento portaba 494 de los 575 nucleótidos que forman el DNAC codificante para la proteína madura. La clona portadora del producto de ligación mencionado, la identificamos por la presencia de sitios de restricción para SmaI y PstI y por el aumento de tamaño del plásmido pKKoligo. Este nuevo plásmido, al que llamamos pKolibGH, porta la secuencia de DNA modificado que esperábamos, pero no tenía el promotor, ya que se eliminó éste en el fragmento AccI anterior. Para construir

el plásmido final de expresión solo fué necesario digerir con EcoRI+HindIII este último plásmido, purificar el fragmento de 859 pb y subclonarlo en el vector pKbGH-N abierto con las mismas enzimas. Este plásmido (pKbGH-S) es portador del DNAc modificado de bGH en su extremo 5' y sin la región 3' no traducible (ver estrategia en figura 7).

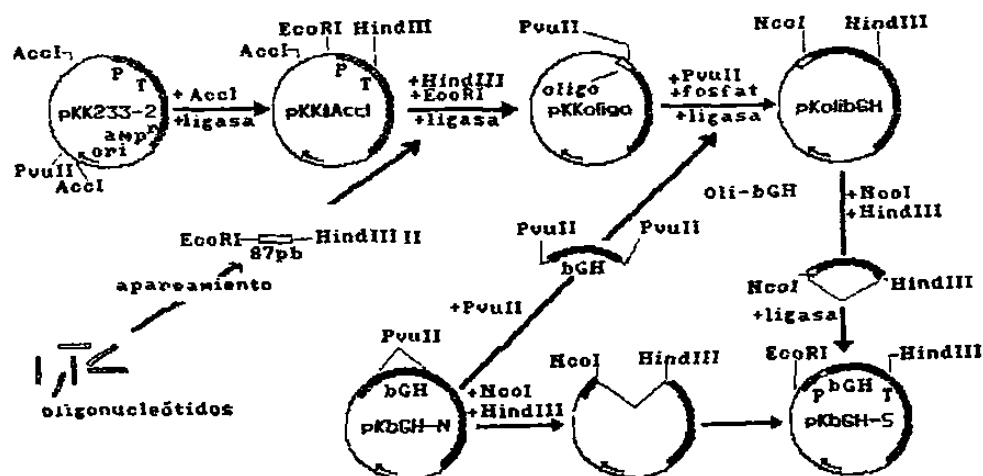


FIGURA 7. ESTRATEGIA GENERAL PARA LA CONSTRUCCION DEL PLASMIDO PORTADOR DEL DNAC MODIFICADO DE bGH. Preparamos un vector al cual se le eliminó el sitio PvuII, clonamos el oligo entre los sitios EcoRI y HindIII y posteriormente incluimos el DNAc de bGH con enzima Pvu II. De este plásmido sin promotor, sacamos el inserto portador del DNAc modificado y lo ligamos al vector generado al digerir pKbGH-N con EcoRI+ HindIII.

Estrategia de subclonación del DNAc de hGH en el vector de expresión pKK233-2.

Dado el caso de que la expresión de bGH fuera muy pobre, no estaríamos en condiciones de detectarla mediante electroforesis en gel e incluso por inmunoelectrotransferencia usando antisueros contra la hormona bGH. Decidimos pues subclonar en el mismo vector pKK233-2 el DNAc que da lugar a la hormona de crecimiento humano (hGH 22K). Lo anterior, debido a que dentro de nuestra institución se cuenta con el sistema de detección de hGH con anticuerpos anti hormona del crecimiento humano para ser

utilizados en el radioinmunoensayo, mismo que se practica rutinariamente y que tiene un nivel de sensibilidad mucho mayor. Obtuvimos la mayor parte del DNAc codificante para la proteína madura de hGH (640 pb) del plásmido pDRhGH22K. Esta región está flanqueada por las enzimas AatII y SmaI en el extremo 5' y 3', respectivamente. Para completar la región faltante en el 5' correspondiente al péptido señal y parte de la proteína madura, construimos el plásmido p20KbGH, originado por la unión del vector pKK233-2 (PstI-EcoRI), un inserto de pKbGH-N (SmaI-EcoRI) y un segundo inserto de pAVE2hGH20K (SmaI-PstI). Este plásmido (p20KbGH) cuenta con un DNA híbrido formado por el DNA codificante para el péptido señal de lactógeno placentario humano (HPL3), los primeros nucleótidos (hasta PvuII) codificantes para la proteína madura de hGH y un segmento desde PvuII a HindIII de bGH. Al eliminarse la región en p20KbGH desde AatII hasta HindIII y sustituirla por la correspondiente del plásmido pDRhGH22K, generamos el plásmido portador de toda la secuencia codificante para hGH 22K y péptido señal [pKhGH22K], (ver estrategia en figura 8).

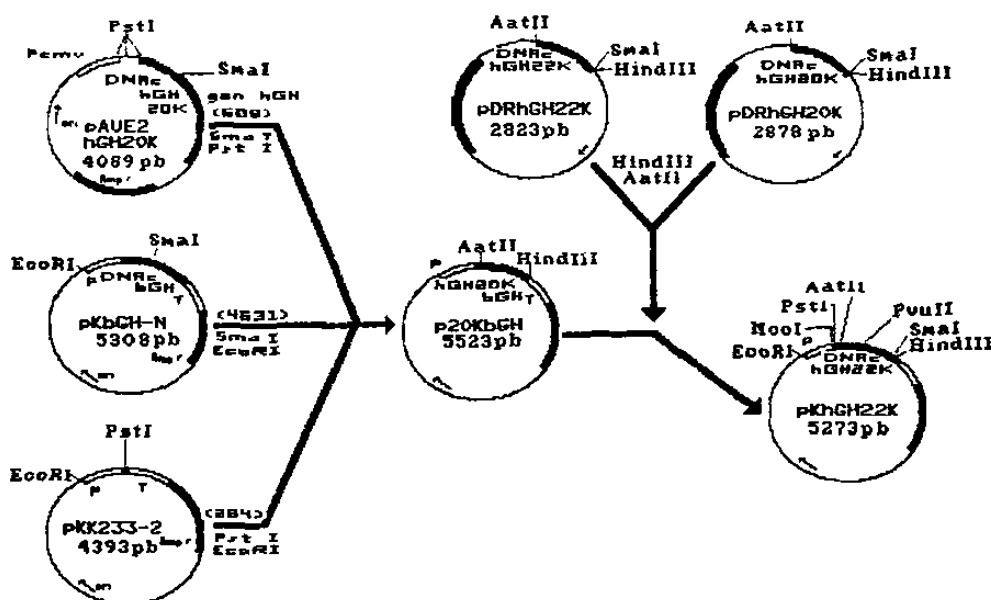


FIGURA 8. ESTRATEGIA PARA LA SUBCLONACION DEL DNAc DE hGH EN pKK233-2. La presencia de un sitio PstI al inicio y otro interno en el DNAc de hGH completo, no permitió la subclonación directa de un fragmento PstI-HindIII a partir del plásmido pAVE2hGH22K (fragmentaría el inserto). Esta fue la razón por la cual construimos el plásmido intermediario p20KbGH, usando parte de la secuencia de hPL3-hGH 20K (de pAVE2hGH20K), la cual no tiene PstI interno y además proporciona el péptido señal. Ya con el plásmido intermedio estuvimos en condiciones de sustituir el inserto AatII-HindIII por el correspondiente de pDRhGH22K o pDRhGH20K.

Estrategia seguida para los ensayos de expresión de los DNACs de hGH y bGH en pKK233-2

Cultivamos las tres clonas de *E. coli* (cepa W3110) portadoras de los plásmidos recombinantes y llevamos a cabo la inducción del promotor de acuerdo a la metodología detallada en la sección de métodos. Extrajimos y analizamos los RNAs para detección de mensajeros para bGH o hGH. De igual manera, se analizaron las proteínas por "Western blotting" y por RIA (caso de hGH).

Independientemente de que en todas las construcciones tomamos muy en cuenta que al unir los fragmentos de DNA no se alterara la fase de lectura del DNA, decidimos verificar la secuencia nucleotídica del DNA clonado en uno de los plásmidos y del promotor.

Con toda esta serie de experimentos de clonación, expresión a nivel de RNAm y de proteínas y el análisis de la secuencia nucleotídica, estuvimos en condiciones de determinar si el vector de expresión con las secuencias de DNAC generadas de las manipulaciones del DNAC podían expresar eficientemente tanto los RNAm que dan lugar a las hormonas como la proteína misma.

d) Métodos:

Después de recibir el plásmido comercial pKK233-2 procedimos a transformar células *E. coli*, cepa RR1 para obtener suficiente DNA que nos permitiera confirmar su identidad. El procedimiento consistió en preparar primeramente células calcio competentes para que pudieran ser transformadas con el plásmido en cuestión de acuerdo al método descrito por Hanahan en 1983⁽⁴⁴⁾ y modificado por nosotros:

Preparación de Bacterias Calcio-Competentes de *E. coli*.

Este tratamiento permeabiliza la pared de las bacterias para permitir la entrada del DNA plasmidico transformante mas eficientemente.

Reactivos y soluciones:

- a) Medio LB (Luria-Bertani): Triptona al 1%, Extracto de Levadura al 0.5% y NaCl al 1%, pH 7.5.
- b) Cloruro de Calcio 0.1 M, estéril y enfriado a 4°C.
- c) Cajas con agar LB-Ampicilina: Triptona al 1%, Extracto de

Levadura al 0.5%, NaCl al 1%, Agar al 1.5% y Ampicilina a 100 µg/ml).

Procedimiento:

a) Preparación:

- 1) A partir de un cultivo puro de E. coli cepa RR1, inoculamos 10 µl (de las alícuotas conservadas en glicerol) o una colonia (conservada en placa) en un tubo de ensaye conteniendo 4 ml de LB. Permitimos el crecimiento durante toda la noche con agitación vigorosa a 37 °C.
- 2) Diluimos el inóculo 1:100 en un matríz con 50 ml de medio y dejamos crecer con agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.35-0.4 a 600 nm.
- 3) Una vez alcanzada esta D.O., colocamos el matraz en hielo por 10 min. Cosechamos las células al centrifugar a 3,000 rpm por 5 min.
- 4) Desechamos el sobrenadante y resuspendimos la pastilla celular en 20 ml de cloruro de calcio frío. Incubamos 20 min en hielo.
- 5) Centrifugamos en las mismas condiciones del paso 3 y resuspendimos en 2 ml de CaCl₂. Dejamos 10-20 min en hielo y utilizamos 200 µl para cada transformación.

b) Transformación:

- 1) Transferimos 100 µl de bacterias competentes recién preparadas a un tubo eppendorf frío que contenía el DNA transformante (no más de 50 ng). Incluyendo además: un tubo con 1 ng de DNA superenrollado (pBR322) para usarse como testigo positivo y otro conteniendo solo 10 µl de H₂O estéril (negativo).
- 2) Mezclamos y mantuvimos los tubos con bacterias y DNA en hielo por 40-45 min. mezclando cada 10 min.
- 3) Sacamos los tubos del hielo y los introducimos 1.5 min en un baño maria a 42°C. Los colocamos a T.A. y agregamos 200 µl de medio LB precalentado a 37 °C e incubamos a 37 °C/20 min.
- 4) Transferimos el contenido de los tubos por decantación en cajas de petri con agar LB+ antibiótico y extendimos con asa de vidrio.
- 5) Dejamos secar 10 min y después las invertimos e incubamos a 37°C/15 hr.
- 6) Finalmente, levantamos las colonias y analizamos la presencia del plásmido por la técnica de minipreparación (minipreps) que se describe a continuación.

Minipreparación de plásmidos por el método de lisis alcalina:

El presente protocolo está basado en el método de Morelle descrito en 1989⁽⁴⁵⁾ y fué utilizado para recuperar los plásmidos de las clonas transformada y caracterizarlos con enzimas de restricción.

Reactivos y soluciones:

- a) Caldo LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml).
- b) Solución de lisis: Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM y Lisozima a 4 mg/ml.
- c) Solución alcalina: NaOH 0.2 N y SDS al 1%.
- d) Acetato de amonio 7.5 M.
- e) Isopropanol
- f) Etanol al 70%
- g) TE: Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM.
- h) RNAsa a 10 mg/ml.

Procedimiento:

- 1) Inoculamos cuatro clonas bacterianas provenientes de la transformación con el plásmido pKK233-2 en 4 ml de caldo LB-Ampicilina a 37°C/16 hr con agitación vigorosa.
- 2) En tubos de microcentrifuga cosechamos 3 ml de cultivo bacteriano mediante dos centrifugaciones sucesivas a 10,000 rpm por 1 min y posteriormente resuspendimos las pastillas bacterianas en 200 µl de solución de lisis.
- 3) Después de 5 min a T.A. agregamos 400 µl de solución alcalina recientemente preparada, mezclamos por inversión los tubos 3 a 6 veces y los colocamos en hielo por 5 min.
- 4) Agregamos 300 µl de acetato de amonio 7.5 M y mezclamos suavemente el contenido 3 a 6 veces. Colocamos nuevamente en hielo por 10 min para permitir la precipitación de proteínas, RNA de alto peso molecular y DNA cromosómico.
- 5) Centrifugamos a 12,000 rpm/10 min y transferimos los sobrenadantes a otros tubos de microcentrifuga. Agregamos 500 µl de isopropanol, mezclamos y dejamos reposar por 10 min a T.A.
- 6) Precipitamos a 14,000 rpm por 10 min. Decantamos el sobrenadante y lavamos las pastillas de DNA con 800 µl de etanol al 70%. Secamos las pastillas en el evaporador centrífugo al vacío (SAVANT)/10 min.
- 7) Disolvimos las pastillas en 25 µl de TE y les agregamos 1 µl de RNAsa (10 mg/ml). Colocamos los tubos a 37°C por 15 min y por último tomamos alícuotas de 1 µl para analizar el perfil electroforético de los plásmidos obtenidos.

Con el DNA obtenido en el procedimiento anterior, procedimos a caracterizar exhaustivamente el vector de clonación pKK233-2 con enzimas que cortan en el sitio de clonación múltiple (NcoI,

PstI, HindIII), así como en otras regiones del vector, (EcoRI, PvuII, AccI). Los tamaños generados al llevar a cabo las digestiones fueron los esperados para el plásmido en cuestión (ver figura 4), de aquí que decidiéramos purificarlo a gran escala en gradiente de cloruro de cesio, junto con pGEM3' bGH y p63, los cuales también intervinieron en la generación del primer plásmido de expresión de bGH.

Preparación de plásmidos a gran escala (46).

Una vez confirmada la identidad de los plásmidos, procedimos a prepararlos a gran escala para obtener una mayor calidad y cantidad del plásmido. Este procedimiento involucra una ultracentrifugación a 45,000 rpm/24 a 36 h que permite separar el DNA plasmídico del genómico y de los RNAs.

Reactivos:

- a) Medio LB
- b) Solución I: Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris HCl 25 mM, pH 8.0.
- c) Solución II: NaOH 0.2 N, SDS al 1%.
- d) Solución de RNasa: RNasa a 10 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, pH 8.0.
- e) TE
- f) Acetato de amonio 7.5 M
- g) Isopropanol
- h) Etanol al 95%
- i) Etanol al 70%
- j) Solución de lisozima: 10 mg/ml en TE.
- k) Isopropanol
- l) Fenol (saturado con Tris HCl 0.1 M pH 8.0; Hidroxiquinoleína al 0.1% y β -mercaptoetanol al 0.2%, según Sambrook y cols (46)).
- m) Sevag: Cloroformo alcohol isoamílico 24:1
- n) Fenol-sevag (v/v)
- ñ) Ampicilina en polvo
- o) Cloruro de Cesio
- p) Bromuro de Etidio (10 mg/ml)
- q) Aceite mineral
- r) Butanol saturado con TE (Butanol en fase superior)
- s) Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 10%
- t) Proteinasa K (50 μ g/ml)
- u) Acetato de sodio 3 M pH 5.5

Procedimiento:

- 1) Propagamos la clona de E.coli portadora del plásmido en 4 ml de medio LB mas ampicilina 37°C toda la noche.

- 2) Pasamos 1 ml del precultivo en un matr az conteniendo 500 ml de LB m as antibiótico y dejamos crecer a 37°C/16-20 h con agitación vigorosa.
- 3) Colectamos las células al centrifugar a 7,000 rpm/10 min a 4°C, decantamos el sobrenadante hasta eliminar completamente (ayudándose con una pipeta Pasteur conectada al vacío) y resuspendimos las células en 18 ml de solución I fría. Agregamos 2 ml de solución de lisozima, mezclamos y dejamos a T.A./10 min.
- 4) Agregamos 40 ml de solución II recién preparada, mezclamos rápida y gentilmente por inversión de vez en cuando y dejamos 5-10 min a T.A.
- 5) Adicionamos 20 ml de solución III fría (4°C), mezclando perfectamente por inversión y dejando 10 min a 4°C.
- 6) Centrifugamos a 7,000 rpm/10 min a 4°C. Filtramos el sobrenadante con la ayuda de una tela de nylon con porosidad fina sobre un embudo en una probeta de 100 ml para medir el volúmen (todo estéril). Pasamos el filtrado a un matr az Erlenmeyer de 250 ml.
- 7) Agregamos 0.6 vol de isopropanol a T.A. y mezclamos bién.
- 8) Centrifugamos a 8,000 rpm/10 min a T.A.
- 9) Eliminamos el isopropanol por decantación y escurrimos sobre servilletas.
- 10) Resuspendimos la pastilla en 3 ml de TE (con la resuspensión, el vol aumenta ligeramente). Ajustamos el vol a 3.35 ml con agua ultrapura (miliQ) en tubo Falcon de 15 ml y corrimos 1 él en gel de agarosa 0.8% para corroborar su cantidad y calidad.
- 11) Agregamos 3.85 g de CsCl (vol final= 4.25 ml), disolvimos muy bién y transferimos a tubo de 7 ml de ultracentrífuga (rotor VTI65).
- 12) En condiciones de baja luminosidad añadimos 500 él de bromuro de etidio a 10 mg/ml a cada tubo, mezclamos bién y agregamos aceite mineral hasta llenar el tubo. Balanceamos los tubos por pares agregando incluso TE cuando fué y sellamos con calor.
- 13) Colocamos los tubos en el rotor y centrifugamos a 45,000 rpm/36 h/a 25°C.
- 14) Sacamos los tubos con mucho cuidado evitando alterar el gradiente y los llevamos al cuarto oscuro para observar la presencia de bandas con la lámpara de luz u.v. de longitud de onda larga.
- 15) De no observarse separación de bandas, Centrifugamos otras 24 h, y en caso afirmativo procedimos a clavar una aguja de jeringa en la parte superior del tubo para evitar la formación de vacío en el siguiente paso.
- 16) Clavamos otra jeringa en la parte inferior de la segunda banda (plásmido) con el bisel hacia arriba y retiramos toda la banda por succión.
- 17) Quitamos la aguja a la jeringa y vaciamos el contenido en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Practicamos 5 extracciones con butanol saturado con TE para eliminar el bromuro de etidio

- * de las muestras.
- 18) Dializamos contra 2 litros de TE/2 h. Agregamos RNAsa a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$ (10 μl en un vol de 1 ml) e incubamos a 65°C/30 min.
 - 19) Añadimos SDS a una concentración final de 0.5%, y Proteinasa K a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$. Continuamos la incubación a 65°C por una h.
 - 20) Extrajimos la solución de DNA con un vol de fenol, otra con fenol-sevag y finalmente con sevag.
 - 21) Dividimos la solución de DNA en dos partes iguales y agregamos acetato de sodio 3 M a una concentración final de 0.3 M (1/10 de vol). Agregamos 2.5 vol de etanol al 95-100%, mezclamos e incubamos 1 h a -20°C.
 - 22) Centrifugamos a 14,000 rpm/15 min y tiramos el sobrenadante. Disolvimos la pastilla en un vol final de 400 μl de Acetato de sodio 0.3 M y agregamos 1 ml de etanol.
 - 23) Dejamos 1 h a -20°C y centrifugamos 15 min/14,000 rpm. Agregamos 1 ml de etanol al 70 %, mezclamos y centrifugamos 5 min/14,000 rpm.
 - 24) Eliminamos el etanol y secamos los tubos en el Savant/5 min. Disolvimos la pastilla en 200 μl de TE y diluimos 2 μl en 1 ml de agua (dil 1:500) para leer absorbancia a 260 y 280 nm. Ajustamos la concentración a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ final.
 - 25) Corrimos una alícuota de 200 ng en gel de agarosa 0.8- 1 % para verificar integridad del DNA.

Electroelución de DNA de fragmentos de restricción.

El que se describe a continuación es un método eficiente de electroseparación de DNA a partir de un gel de agarosa o poliacrilamida. Fue publicado por Gobel y cols. en 1987,⁴² y su aplicación requiere de un dispositivo (ver figura 9) ya comercializado conocido como "elutrap" (Schleicher & Schuell). Este método fue utilizado para recuperar los fragmentos de DNA usados en las diferentes construcciones. Su aplicación mas eficiente la encontramos con fragmentos pequeños (menos de 500 pb) o provenientes de geles de poliacrilamida

Reactivos, soluciones y materiales:

- a) TAE 1: Tris-acetato 0.04 M pH 8.2 y EDTA 0.002 M.
- b) Fenol saturado.
- c) Sevag.
- d) Acetato de amonio 7.5 M.
- e) Etanol al 95% y al 70 % fríos (a -20°C).
- f) Membranas BT1
- g) Membranas BT2
- h) TE. -

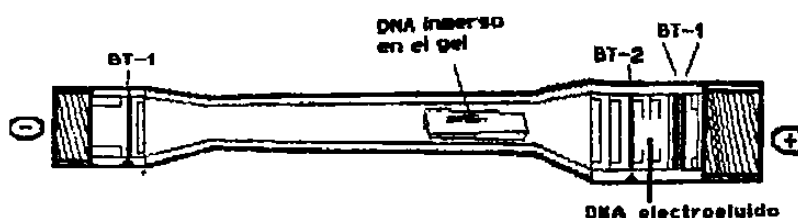


FIGURA 9. RECUPERACION DE FRAGMENTOS DE DNA MEDIANTE EL SISTEMA DE "ELUTRAP". Colocamos una membrana BT1 en el cátodo (-) y otra en el ánodo (+). De igual manera, colocamos otra intermedia (BT2) que solo permite el paso de DNA y retiene la agarosa o poliacrilamida. Introdujimos el fragmento de agarosa portador del DNA lo más cercano a la membrana BT2 y agregamos el amortiguador de corrida. Corrimos la electroforésis y precipitamos el DNA para resuspenderlo en TE.

Procedimiento:

- 1 Colocamos una membrana BT1 en cada extremo de la cámara y una BT2 intermedia (la posición de esta membrana está dada por el volumen en el que se quiera coleccionar el DNA eluido).
- 2 Introdujimos el trozo de gel en el depósito mayor, formado por las membranas BT1 y BT2. El trozo de gel debe quedar lo más cerca de la membrana BT2 (extremo +).
- 3 Colocamos el dispositivo de electroelución orientado de negativo a positivo en la cámara de electroforésis.
- 4 Agregamos el amortiguador de corrida TAE 1X tanto a la cámara de electroforésis, como al dispositivo de electroelución hasta un nivel que cubría el trozo de gel.
- 5 Aplicamos 150 v por 2 h y al final de la corrida invertimos la polaridad y aplicamos 200 v por 20 seg para despegar el DNA de las membranas. Recuperamos la solución conteniendo el DNA con puntillas de 200 μ l y la colocamos en un tubo eppendorf.
- 6 Hicimos dos extracciones fenólicas y una con sevag. Agregamos medio volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2.5 vol. de etanol al 95% frío.
- 7 Colectamos el DNA por centrifugación a 15,000 rpm/15 min.

Lavamos la pastilla con etanol al 70 % y resuspendimos en 20 μ l de agua ultrapura.

- 8 Tomamos una alícuota para analizar su perfil electroforético y la cantidad del fragmento recuperada.

NOTA: Para determinar los tiempos de corrida mínimos para recuperar un fragmento dado es conveniente tomar en cuenta los siguientes valores:

Tiempos de corrida

tamaño del fragmento (en pb)	tiempo (en hs)
18	1-2
564-2028-2322	2-3
4371	3-4
6557	4-5

Extracción fenólica.

Como lo mencionamos anteriormente, el DNA obtenido de la electroelución lo sometimos a una serie de extracciones fenólicas para purificarlos. El método utilizado está tomado de la técnica descrita por Sambrook y cols. en 1989 (46).

Reactivos y soluciones:

- TE
- Fenol saturado
- Sevag
- Acetato de amonio 7.5 M
- Etanol al 95%
- Etanol al 70%

Procedimiento:

- Para una muestra de DNA de 100 μ l, añadimos un volumen de fenol, mezclamos bien al vortex por al menos un minuto.
- Centrifugamos a 10,000 rpm/3 min y recuperamos la fase acuosa, repetimos la extracción pero ahora con un volumen de sevag.
- Recuperamos el sobrenadante (fase acuosa) con una micropipeta y lo transferimos a otro tubo limpio. Repetimos el procedimiento, pero ahora usando solo sevag (100 μ l).
- Transferimos la fase acuosa (superior) a otro tubo limpio, dejando una pequeña interfase para evitar coleccionar sevag junto con el DNA. Llevamos a cabo una precipitación con acetato de amonio y etanol de acuerdo al protocolo que se describe más adelante.
- Resuspendimos en 20 μ l de TE.

Precipitación de DNA con etanol:

Durante el curso del presente trabajo en muchas ocasiones fué necesario concentrar soluciones de ácidos nucleicos, cambiar de amortiguador de reacción o simplemente eliminar las sales del DNA mediante precipitación con etanol. El que utilizamos fué tomado de la técnica descrita por Wallace en (1987),⁴⁸.

Reactivos y soluciones:

- a) Acetato de sodio 3 M pH 5.5.
- b) Etanol al 95% (frío).
- c) Etanol al 70% (frío).
- d) TE

Procedimiento:

- 1) Agregamos 2 μ l de acetato de sodio 3 M a una solución de 20 μ l de DNA en un tubo Eppendorf y 55 μ l de etanol al 95%.
- 2) Mezclamos bien al vortex y mantuvimos a $-20^{\circ}\text{C}/10-20$ min o a temperaturas inferiores. La mezcla formó escarcha.
- 3) Centrifugamos el DNA a máxima velocidad por 10 min. Apareció una pastilla blancuzca de DNA en el fondo del tubo (en general, las pastillas de 10 μ g o más son visibles).
- 5) Tiramos el sobrenadante y lavamos la pastilla con 500 μ l de etanol al 70% (-20°C). Este paso ayuda a remover cualquier soluto atrapado en el precipitado y paredes del tubo.
- 6) Precipitamos la pastilla al centrifugar 2-3 min a 12,000 rpm y retiramos el sobrenadante de la manera mencionada, secando los bordes del tubo con una servilleta.
- 7) Secamos la pastilla de nucleótidos al Savant por 5-8 min.

Desfosforilación de los extremos Pvu II del vector pKKoligo:

Durante la ligación de fragmentos la enzima DNA ligasa cataliza la formación del enlace fosfodiéster entre nucleótidos adyacentes solo si en los extremos de las cadenas existe un grupo fosfato en el 5' y un hidroxilo en el 3'. Por lo tanto cuando queríamos evitar que el vector se recircularizara lo tratamos con fosfatasa alcalina para eliminar los fosfatos de extremos 5' del DNA. De esta manera solo se ligaba el plásmido que incluía un inserto portador de fosfatos en sus extremos 5'.

El método que usamos fué el sugerido por el proveedor de la fosfatasa (Boehringer Mannheim Biochemicals).

Reactivos y soluciones:

- a) CIAP (Fosfatasa alcalina de intestino de ternera).
- b) Etanol al 70%
- c) Etanol al 95%
- d) T.E (10 mM de Tris-HCl, pH 8 y 0.1 mM EDTA.

Procedimiento:

- 1) Digerimos 2.3 μ g del vector y los disolvimos en 30 μ l de amortiguador T.E. Posteriormente los llevamos a un volúmen final de 100 μ l al agregar 68.7 μ l de agua y 1.3 μ l de tris HCl 0.075 M, pH 8.8 (para tener una solución 10 mM final).
- 2) Agregamos 3.5 μ l de fosfatasa alcalina (1 U/ μ l) para extremos romos o 0.035 μ l para extremos pegajosos e incubamos 1 h a 50°C. Suspendimos la reacción al remover la enzima CIAP mediante extracciones con fenol y con fenol-sevag.
- 3) Finalmente, precipitamos el DNA agregando 3 volúmenes de etanol frío (-20 °C) y colocando a -70°C/10 min.
- 4) Removimos el etanol al centrifugar 5 min a 12,000 rpm. Lavamos el precipitado con 300 μ l de etanol al 70% y centrifugamos 5 min a 12,000 rpm.
- 5) Secamos en savant 5 a 8 min y resuspendimos en TE.

Formación de extremos romos usando DNA polimerasa de T4:

Esta enzima fué usada para generar extremos romos tanto en el extremo HaeII del inserto de bGH como en el PstI del vector y de esa manera poder llevar a cabo la unión de extremos no compatibles en la construcción del plásmido de expresión pKbGH-N. Este reactivo fué usado de acuerdo a las indicaciones del proveedor Boehringer Mannheim.

Reactivos y soluciones:

- a) dNTPs (buffer T4 1x con 50 mM de cada nucleótido).
- b) Buffer T4 10x (330 mM tris-acetato a pH 7.9, 660 mM de acetato de potasio).
- c) TE
- d) Etanol al 95%.
- e) Etanol 70%.
- f) Acetato de amonio 7.5 M.

Procedimiento:

- 1) En un tubo Eppendorf mezclamos lo siguiente:

Fragmento de DNA	1-2 μ g
Buffer T4 10x	5 μ l
DNA polimerasa de T4	5-10 unidades
Agua miliQ (llevar a)	50 μ l

- 2) Incubamos a 37°C/20 min. Después agregamos 6 µl de dNTPs.
- 3) Incubamos a 37°C/40 min y detuvimos la reacción poniendo los tubos a 70°C/5 min.
- 4) Precipitamos el DNA con etanol y resuspendimos en TE.

Purificación de DNA de fragmento de agarosa de bajo punto de fusión por el método de "Gene Clean" (49).

Cuando los fragmentos usados en las diversas construcciones tenían un tamaño superior a los 500 pb, usamos el método de Gene Clean para eluirlos ya que es muy rápido y eficiente. El protocolo seguido fué el recomendado por el proveedor "BIO 101 Inc".

Reactivos y soluciones.

- a) Ioduro de Sodio saturado
- b) Solución de lavado: Etanol al 50%, Tris HCl 20 mM pH 7.2, NaCl 0.2 M y EDTA 2 mM.

Procedimiento:

- 1) Preparamos un gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 1 % en TAE 1X y dejamos que se enfriara hasta 50-60 °C para agregar bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml.
- 2) Dejamos gelificar a T.A. y colocamos las muestras de DNA digerido y con "jugo azul" 6X a una concentración final 1X.
Jugo azul 6X:

Azul de bromofenol	0.25 %
Xilen cianol FF	0.25 %
Glicerol en TE	30.00 %
- 3) Seguimos la migración de los fragmentos de DNA con ayuda de una lámpara de luz u.v. de longitud de onda larga. Cuando se resolvieron los fragmentos, cortamos la banda de gel con bisturí y la colocamos en un tubo eppendorf.
- 4) Centrifugamos 30 seg y medimos el vol. (aproximado) de la agarosa en el tubo. La eficiencia del método es mayor en volúmenes iguales o menores a 400 µl y a concentración de DNA de 5 µg o menores.
- 5) Agregamos 2.5 vols de ioduro de sodio frío (NaI) y colocamos el tubo a 70°C hasta total disolución de la agarosa.
- 6) Adicionamos 5 µl de sílica gel fría por tubo y mezclamos el contenido en vortex 20 seg.
- 7) Incubamos 5 min en hielo y centrifugamos 5 seg al máximo.
- 8) Retiramos el sobrenadante y resuspendimos la pastilla en 300 µl de solución de lavado fría.
- 9) Centrifugamos 5 seg al máximo y repetimos la operación dos veces más.
- 10) Después del tercer lavado, resuspendimos la pastilla en 10 µl de agua miliQ e incubamos 2-3 min/50°C.

- 11) Centrifugamos esta vez 30 segundos y recuperamos el sobrenadante. Resuspendimos la pastilla en 10 μ l de agua y repetimos la operación.
- 12) Juntamos ambas alícuotas (20 μ l totales) y corrimos el volumen necesario para ver el fragmento y calcular la concentración aproximada. Guardamos a -20°C hasta su uso.

Ensayos de expresión para las clonas de E.coli portadoras del DNAC de bGH y hGH.

Una vez construidos los diversos plásmidos de expresión de bGH o hGH, llevamos a cabo los ensayos para inducir el promotor y analizar la posible presencia de RNAm codificante para las hormonas y/o la hormona misma. El método seguido para inducir el promotor así como los plásmidos testigos positivos de expresión de hGH, fueron amablemente proporcionados por el Dr Daniel Baty del Centre de Biochimie et de Biologie Moléculaire du C.N.R.S., Marseille, France.

Reactivos, soluciones y plásmidos:

- a) Inductor (IPTG): Isopropil β -D-tiogalactósido 100 mM en agua ultrapura.
- b) Medio de cultivo LB
- c) Ampicilina a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (final)
- d) Amortiguador de muestra: Tris HCl 50 mM pH 6.8, DTT 100 mM, SDS al 2%, Glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.1%.
- e) Sales H 5X: [para 100 ml]: K_2HPO_4 , 12.0 g; KH_2PO_4 , 5.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.5 g.
- f) Medio H complementado [para 100 ml]: Sales H 5X, 20 ml; H_2O 62 ml; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40 mM, 1 ml; Vitamina B1 1%, 10 μ l; Glucosa 20%, 10 ml; Casaminoácidos 20%, 5 ml; Ampicilina 10 mg/ml, 1 ml y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mM, 1 ml.
- g) Plásmido de expresión BHX: portador del DNAC de hGH de 22Kd
- h) Plásmido de expresión p270: portador del DNAC de hGH de 22Kd.

Procedimiento:

- 1) Sembramos un inóculo de la cepa portadora del plásmido en 4 ml de medio LB con el antibiótico (ampicilina al 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). y dejamos crecer con agitación toda la noche a 37°C .
- 2) Al siguiente día, hicimos una dilución 1:10 del inóculo y leímos absorbancia a 600 nm. Diluimos las células a una densidad óptica de 0.5 U Abs//ml en matraces con 20 ml de medio H.
- 3) Dejamos crecer a 37°C con agitación vigorosa por 30 min y repartimos los 20 ml de cada matrás en dos con 10 ml c/u (uno que serviría como testigo negativo sin inducir y el otro sería inducido con IPTG).

- 4) Agregamos IPTG (0.1 mM de conc. final) a uno de los matraces de cada par en el experimento, y se dejaron crecer a 37°C/3 h.
- 5) Una vez transcurrido este tiempo, tomamos 200 µl de cultivo de cada tubo y los llevamos a 2 ml con agua para leer absorbancia a 600 nm.
- 6) Tomamos 1 ml de cada muestra, se puso en un tubo eppendorf y centrifugamos 2-3 min/10,000 rpm. Tiramos el sobrenadante y resuspendimos en el volumen adecuado de amortiguador de muestra para tener una concentración celular final de 0.01 U abs/µl.
- 7) Centrifugamos el resto de las células 2-3 min/10,000 rpm y tiramos el sobrenadante. Estas células se procesaron inmediatamente para extracción de RNAs.
- 8) De las muestras para análisis de proteínas, corrimos generalmente 10 µl para detección de bGH o hGH con anticuerpos y 40 µl para coloración con azul de Coomassie.

Después de crecer las cepas portadoras de los plásmidos de expresión, extrajimos los RNAs por el método desarrollado por nosotros.

Extracción de RNA de bacterias:

Esta metodología que combina el uso de una solución de lisis con cambios bruscos de temperatura permite una lisis eficiente y rápida de las células. El pH ácido del fenol permite la separación diferencial de los RNA en la fase acuosa mientras que en la fase orgánica se retienen las proteínas.

Reactivos y soluciones:

- a) Agua-DEPC: Solución de Dietil Pírocarbonato al 0.1% en agua ultrapura, incubamos al menos a 37°C/12 h y esterilizamos por autoclave.
- b) EDTA 0.5M
- c) Tris HCl 1M, pH 8.0
- d) SDS al 10%
- e) Tris HCl 50mM, pH 8.0
- f) Fenol Saturado (con Tris HCl 10mM, pH 8.0, EDTA 1mM, NaCl 100mM o agua miliQ)
- g) Agarosa
- h) Azul de Bromofenol
- i) Nitrógeno Líquido o CO₂ sólido
- j) Cloruro de Litio LiCl 4 M
- k) Etanol al 95%
- l) Etanol al 70%
- m) Citrato de Sodio 0.25M, pH 3.5
- n) Citrato de Sodio 0.025M, pH 3.5

- o) Urea 10 M
- p) Bromuro de Etidio a 10 mg/ml
- q) Amortiguador de Lisis [para 10 ml de cultivo]:
 - 950 μ l Tris HCl 50 mM pH 8.0
 - 1.0 μ l MgCl₂ 4.9 M (2 mM final)
 - 1 mg de Lisozima en 50 μ l de Tris HCl 50 mM pH 8.0 (1 mg/ml final)
 - 10 μ l DNAsa de 1 μ g/ml (10 μ g/ml final)

NOTA: Todas aquellas soluciones que fué posible tratarlas con DEPC se trataron directamente, las que no, se prepararon en agua previamente tratada con DEPC.

Procedimiento:

- 1) A partir de un cultivo celular de 10 ml, centrifugamos a 7,000 rpm/5 min para recuperar las células libres de medio de cultivo.
- 2) Resuspendimos la pastilla celular en 950 μ l de Tris HCl 50 mM (al vortex), agregamos 1 μ l de MgCl₂, 50 μ l de lisozima y 10 μ l de DNAsa. Mezclamos e incubamos 5 min en hielo.
- 3) Congelamos por inmersión en nitrógeno líquido [o hielo seco con etanol] y descongelamos la pastilla introduciendo los tubos en baño de 37°C. Repetimos el ciclo dos veces más (se obtuvo un lisado claro).
- 4) Agregamos 10 μ l de SDS al 10% y 40 μ l de EDTA 0.5 M y mezclamos al vortex. Pasamos el contenido de cada tubo (1,100 a 1,200 μ l) a dos tubos Eppendorf (550 μ l c/u) para llevar a cabo las extracciones fenólicas más rápida y eficientemente.
- 5) Agregamos un volúmen de fenol saturado y mezclamos al vortex por al menos 1 min (se obtiene una solución blancuzco lechosa). Centrifugamos a 10,000 rpm/2 min y recuperamos el sobrenadante en otro tubo.
- 6) Repetimos las extracciones 3 veces más. Precipitamos los ácidos nucleicos con 1 volúmen de isopropanol a cada tubo (mezclamos al vortex) y centrifugamos a 6,500 rpm/7 min.
- 7) Resuspendimos el precipitado en 100 μ l de agua DEPC y agregamos un volúmen de LiCl 4 M. Mezclamos al vortex (se formó una solución blancuzca) y centrifugamos a 14,000 rpm/5 min. Resuspendimos en 100 μ l de agua DEPC y repetimos la operación.
- 8) Resuspendimos la pastilla de RNAs en 100 μ l de etanol 70% y centrifugamos a 12,000 rpm/5 min.
- 9) Secamos los RNAs en el evaporador centrífugo (SAVANT) por 5 min y resuspendimos en 200 μ l de agua DEPC.
- 10) Tomamos 2 μ l de la solución de RNAs y la llevamos a 1 ml con agua destilada para medir concentración y pureza de los RNAs en el espectrofotómetro a 260 nm y 280 nm. Una relación 260/280 igual o mayor a 1.8 indica que la preparación es aceptablemente pura.

→ Ajustamos la concentración de RNAs a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, tomando en cuenta las lecturas de absorbancia del espectrofotómetro y corrimos un gel urea-ácido para visualizar tanto la concentración como la integridad de los RNAs obtenidos. Pudimos apreciar claramente la separación de las tres fracciones de RNA ribosomal bacteriano (23S, 16S y 5S).

Separación de RNAs en gel de agarosa urea-ácido:

Utilizamos el método descrito en su forma original por Rosen y cols. en 1975 (30). Esta técnica de separación de RNAs en condiciones desnaturalizantes nos permitió apreciar la calidad y cantidad del RNA obtenido así como sus tres fracciones ribosomales bacterianas.

Reactivos y soluciones::

- a) Agua DEPC
- b) Urea 10 M
- c) Citrato de sodio 0.25 M pH 3.

Procedimiento:

a) Preparación del gel de agarosa 1.5% :

- 1) Pesamos 0.4 g de agarosa y los disolvimos en 7.8 ml de agua DEPC. Fundimos con calor y agregamos 15.6 ml de Urea 10 M, seguimos calentando hasta fundir completamente la agarosa y dejamos enfriar a aproximadamente 65°C.
- 2) Agregamos 2.6 ml de amortiguador citratos 0.25 M, pH 3.5 y vaciamos en los moldes verticales de vidrio (14 x 18 cm). Dejamos gelificar a 4°C por al menos 4 horas (puede conservarse uno o dos días en estas condiciones).

b) Preparación de la muestra:

	20.0 μl de RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
	30.0 μl de Urea 10 M
	<u>06.0 μl de Azul de Bromofenol al.5%</u>
Total	56.0 μl .

c) Electroforesis:

- 1) Calentamos las muestras a 65°C por 10 min y las colocamos rápidamente en hielo. Las aplicamos a las casillas del gel y corrimos a 80 voltios hasta que el colorante migró 3/5 partes del gel.
- 2) El amortiguador de corrida empleado fué citratos 0.025 M.

Una vez terminada la corrida, pasamos el gel al recipiente con 200 ml de EtBr a 1ug/ml por 20 min y observamos la presencia de RNAs en el transiluminador de luz ultravioleta.

Análisis de RNAs tipo "Northern" (51,52).

Para realizar la detección de secuencias específicas en los RNAs aislados, los separamos electroforéticamente, transferimos a filtros de nitrocelulosa e hibridamos con sonda radiactiva específica (ver estrategia general en la figura 10).

Reactivos y soluciones:

- a) Agua DEPC
- b) Glioxal. Solución al 40% (6 M)
- c) Dimetilsulfóxido (DMSO).
- d) Amortiguador fosfatos (NaH_2PO_4) preparado disolviendo 10.7 g de fosfato monobásico de sodio en el mínimo volumen de agua y ajustando el pH a 7.0 con ácido fosfórico y luego aforando a 1 lt y esterilizando por autoclave.
- e) Agarosa al 1.2 % amortiguador fosfatos 10 mM.
- f) NaOH 50 mM.
- g) Amortiguador de muestra: Glicerol 50%, azul de bromofenol al 0.25%, Fosfato de sodio 10 mM pH 7.0 y xilen cianol al 0.25%.
- h) Solución salina citratos SSC20X Preparada disolviendo 175.3 g de NaCl y 88.2 g de Citrato de sodio en 800 ml de agua y luego ajustando el a pH 7.0 con NaOH 10 N para finalmente aforar a 1 lt con agua y esterilizar por autoclave.

Procedimiento:

I Electroforésis de RNA desnaturalizado con glioxal.

a) Preparación de la muestra:

Ajustamos el volumen de la muestra (15 μl de RNA de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a un volumen final de 4.2 μl en agua DEPC re-precipitando con acetato de amonio 7.5 M y etanol. Tratamos las muestras con glioxal de la manera siguiente:

RNA	4.20 μl
Sol. NaH_2PO_4 0.1 M, pH 7	1.95 μl
DMSO	10.35 μl
Glioxal 6 M	<u>3.50 μl</u>
Volúmen total	20.00 μl

Cerramos y colocamos los tubos a 70°C/3 min. Los pasamos rápidamente a hielo y les agregamos 5 μl de amortiguador de muestra

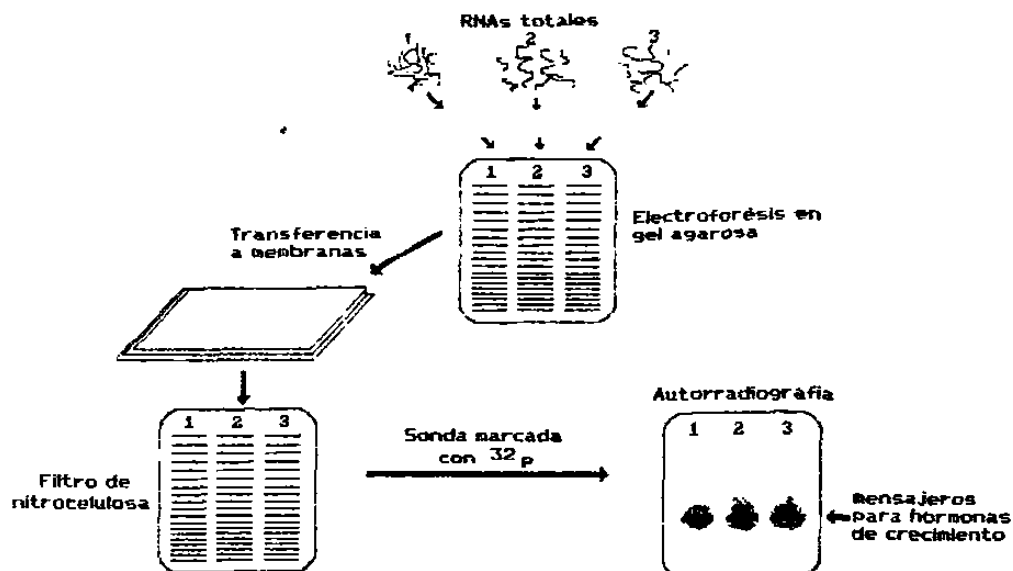


FIGURA 10. ESTRATEGIA PARA ANALISIS DE RNAm , "NORTHERN". Para analizar la expresión de RNA mensajeros de las hormonas, primeramente separamos los RNAs en un gel de agarosa, transferimos a filtro de nitrocelulosa, prehibridamos, hibridamos con la sonda de DNA de bGH marcada radiactivamente con ^{32}P y finalmente expusimos a película de rayos X..

- b) Gel horizontal de agarosa 1.2 % para transferencia:
- i) Preparamos un gel horizontal en solución de fosfatos 10 mM y con peine de dientes anchos y gruesos. Una vez gelificado lo sumergimos en una cámara horizontal con amortiguador fosfatos 10 mM y colocamos las muestras. Se aplicaron 5-6 voltios/cm (aprox 80 voltios).
 - ii) Ya que entraron las muestras al gel, conectamos un sistema de recirculación de amortiguador para mantener el pH >8.0. Permitimos que el azul de bromofenol migrara 4/5 partes del gel.
 - iii) Usamos una de las muestras de la orilla para cortarla y colorearla con bromuro de etidio para observar la apariencia del RNA separado en el gel glioxal, antes de la transferencia.

II Transferencia a filtro de nitrocelulosa:

- 1) Primeramente desmontamos el sistema de electroforésis y colocamos el gel en una solución de NaOH 0.05 N/30 min, y después enjuagamos rápidamente en agua destilada y esterilizada en autoclave.
- 2) Posteriormente, sumergimos el gel en una solución de SSC20X/20 min. Cinco min antes de terminar este periodo, recortamos y humedecemos en el agua anterior un trozo de papel de nitrocelulosa del tamaño del gel.
- 3) Posteriormente, sumergimos el filtro, junto con dos trozos de papel filtro en solución SSC 20X/20 min. Se montó el sistema de transferencia de la manera siguiente:

arriba: Objeto pesado (aprox 500-1000 gr)
 Vidrio plano.
 Columna de servilletas de aprox 10 cm
 2 trozos de papel filtro (del tamaño del gel)
 Trozo de nitrocelulosa
 Gel de agarosa (invertido y con marca en una esquina)
 Hoja de plástico o rayos X con una ventana del tamaño ligeramente menor al gel
 Puente de papel filtro con extremos sumergidos en SSC20X
 Soporte de vidrio o acrílico.

abajo Recipiente con el amortiguador de transferencia
- 4) Dejamos transferir por 15-18 hr, haciendo un cambio de servilletas a las 8 hr. Pasado este tiempo, desmontamos el filtro y el gel y teñimos este último en bromuro de etidio para verificar la eficiencia de transferencia.
- 5) Para hibridar la sonda radiactiva con el RNA unido a la matriz de nitrocelulosa, primeramente tratamos y prehibridamos el filtro de acuerdo al siguiente protocolo:

III Prehibridación del filtro de nitrocelulosa

- 1) Colocamos el filtro de nitrocelulosa en SSC6X por 5 min. Posteriormente, secamos entre dos servilletas por 15 min y horneamos a 80°C/2 hr con vacío.
- 2) Sacamos el filtro y lo introducimos en Tris-HCl 20 mM pH 8.0 a 65°C/20 min, seguidamente lo secamos sobre servilletas a T.A. e introducimos enrollado en un tubo de vidrio con tapa de rosca.
- 3) Agregamos la solución de prehibridación e incubamos 8 h/25°C en la incubadora de hibridación modelo 310 de Robbins Scientific.

SOLUCION DE PREHIBRIDACION	Conc. final
2.500 ml de Formamida al 100%	50%
1.025 ml de SSPE 20X	5X
0.050 ml Denhart 100X	1X
0.025 ml SDS 20%	0.1%
1.250 ml Agua DEP	----
Volúmen final	5.0 ml

Mientras se llevaba a cabo la prehibridación, procedimos a marcar la sonda de DNA con [α - 32 P] dCTP de la manera siguiente:

IV MARCAJE RADIOACTIVO DE bGH POR EL METODO DE OLIGONUCLEOTIDOS AL AZAR.

Utilizamos como sonda el fragmento PvuII del DNAc de bGH del plásmido pKbGH-N. Para reducir al máximo la posibilidad de contaminación del fragmento de DNAc con vector al llevar a cabo la digestión y purificación del mismo realizamos dos purificaciones del fragmento.

- 1) Primeramente cortamos 10 μ g de plásmido pKbGH-N con las enzimas EcoRI y HindIII y recuperamos el fragmento de 1240 pb.
- 2) Posteriormente recortamos dicho fragmento con PvuII y recuperamos el DNA de 494 pb.
- 3) Ajustamos su concentración a 5 ng/ μ l y procedimos con la reacción de marcaje utilizando el Kit de Amersham "Multiprime DNA Labelling System RPN 16012", de la manera siguiente:"

DNAc de bGH 5 ng/ μ l (ebullido 5 min)	10.00 μ l (50 ng)
dNTPs	10.00 μ l
cebador	5.00 μ l
[α - 32 P]dCTP, 10 mCi/ μ l	8.72 μ l *
Klenow 1 U/ μ l	1.50 μ l
Agua miliQ	<u>15.28 μl</u>
Volúmen final de la reacción	50.00 μ l

* La actividad de la marca hasta este día era de 0.573 (casi una vida media), así que fué necesario usar doble cantidad para obtener los μ Ci deseados.

Incubamos 3 horas a T.A. . Durante ese tiempo preparamos una columna Sephadex G-50 para purificación de la sonda:

V Evaluación del marcaje de la sonda por absorción a filtros DE-81:

- 1) Después de marcar la sonda, aumentamos el volumen a 200 μ l con el amortiguador NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, SDS 0.1% y Tris-HCl 50 mM pH 7.5.
- 2) Tomamos 1 μ l de la solución marcada, lo colocamos en un trozo de papel filtro DE-81 y dejamos secar para después colocarlo en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
- 3) Este microlitro dió una lectura directa de cuentas totales de 2,105 en el contador modelo "BIOSCAN/QC-2000". De igual manera, tomamos dos alícuotas de 1 μ l y las colocamos en trozos de papel filtro (1cm x 1cm).
- 4) Estos últimos fueron lavados 3 veces con solución de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) 0.5 M/5 min, una vez con agua ultrapura/1 min y finalmente dos veces con etanol al 95%/1 min.
- 5) Dejamos secar al aire e introdujimos los trozos de papel en tubos Eppendorf para leer la radiactividad incorporada o retenida por la sonda (850 cpm). Con las lecturas anteriores, procedimos a evaluar la eficiencia del marcaje de la manera siguiente:

% INCORPORACION

$$\frac{\text{Lectura promedio de los dos filtros lavados}}{\text{Lectura de la muestra directa}} \times 100$$

Sustituyendo valores:

$$\frac{850 \text{ cpm}}{2105 \text{ cpm}} = 40.3\%$$

MASA DE LA SONDA MARCADA

$$\frac{\mu\text{Ci añadidos} \times 13.2 \times \% \text{ incorporación}}{\text{Actividad del isótopo (Ci/mM)}} + \text{DNA de sonda}$$

Sustituyendo valores:

$$\frac{(50)(13.2)(40.3)}{3,000} + 50 \text{ ng} = 58.8 \text{ ng}$$

RADIOACTIVIDAD INCORPORADA

$$\mu\text{Ci añadidos} \times 2.2 \times 10^4 \times \% \text{ incorporación}$$

Sustituyendo valores:

$$(50)(2.2 \times 10^4)(40.3) = 4.4 \times 10^7$$

ACTIVIDAD ESPECIFICA

$$\frac{\text{Radiactividad incorporada en la sonda} \times 10^3 \text{ cpm}/\mu\text{g}}{\text{Masa de la sonda marcada}}$$

Sustituyendo valores:

$$4.4 \times 10^7 \times (10^3 / 60.0) = 7.3 \times 10^8$$

Este resultado está muy cercano al 10^9 que es una buena actividad específica.

VI Purificación de la sonda radiactiva

Purificación en columna de Sephadex G-50:

Preparamos una columna de filtración en gel de la siguiente manera:

- 1) A una jeringa de 1 ml (usadas para insulina) le colocamos fibra de vidrio siliconizada y seca en el fondo (aprox. 1 cm de altura).
- 2) La cargamos con una solución de sephadex G-50 y la colocamos en un tubo Falcon de 15 ml para centrifugar a 7,000 rpm/5 min. Repetimos el proceso hasta que el gel llenó la jeringa a un cm del borde superior.
- 3) Lavamos la columna dos veces con 300 μ l de amortiguador de corrimiento (NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, SDS al 0.1% y Tris-HCl 50 mM pH 7.5) y centrifugamos a 6,000 rpm/5 min.
- 4) Colocamos la punta de la jeringa en un tubo Eppendorf sin tapa y la introducimos en un tubo Falcon de 15 ml.
- 5) Agregamos la sonda radiactiva (200 μ l) y centrifugamos a 6,000 rpm/10 min para colectar la solución marcada en el tubo Eppendorf inferior.

VII Hibridación con sonda del DNAC de bGH.

- 1) Calentamos la sonda a 100°C/5 min y agregamos 1/4 del volumen total (50 μ l) a la solución de prehibridación e incubamos primeramente a 42°C/12 h y después al darnos cuenta que las condiciones debían ser relajadas, decidimos incubar otras 6 hr a T.A.
- 2) Recobramos la solución de hibridación para reusarse y procedimos a lavar el filtro en condiciones relajadas (SSC 0.5X, 0.1% SDS a T.A./30 min).
- 3) Hicimos 4 lavados en estas condiciones y finalmente uno con SDS al 0.1%, secamos a T.A. sobre servilletas, envolvimos el

filtro en plástico y lo expusimos a dos películas de rayos X.

- 4) Dejamos exponiendo a $-20^{\circ}\text{C}/16\text{ h}$ y revelamos una de las películas. la otra a las 50 h.

Gel de poliacrilamida-SDS:

Para separar las proteínas en los experimentos de expresión y llevar a cabo la detección de la hormona mediante tinción con azul de Coomassie, usamos una combinación de los protocolos reportados por Sambrook y cols. en 1989⁽⁴⁶⁾ y Towin y cols. en 1979⁽⁵⁷⁾.

Reactivos y soluciones:

- a) Solución de poliacrilamida al 30%: Acrilamida al 29% y Bisacrilamida al 1% en agua.
- b) Lauril sulfato de sodio (SDS): Solución al 10 % en agua.
- c) Amortiguadores Tris para preparación de las dos fases del gel (usar solo tris base):
Tris-HCl 1.0 M pH 6.8 (fase superior o gel concentrador).
Tris-HCl 1.5 M ph 8.8 (fase inferior o gel de resolución).
- d) N,N,N'.N'-tetrametilendiamino (TEMED).
- e) Persulfato de Amonio (PSA): Al 10 % en agua.
- f) Amortiguador de Electroforésis Tris-glicina: Tris base 125 mM, Glicina 1250 mM, SDS 0.5%. Ajustamos pH 8.3.
- g) Amortiguador para muestra: Tris-HCl 50 mM pH 6.8, β -mercaptoetanol 5%, SDS al 2%, Azul de bromofenol 0.1%, y Glicerol al 10%.
- h) Solución de tinción de geles: H_2O al 45%; Metanol al 45%, Acido acético al 10% y Coomassie brillant blue R250 al 0.25 %..
- i) Solución de desteñido: Misma formulación que la de tinción pero sin Coomassie.
- j) Solución fijadora: Solución de desteñido pero con glicerol al 1%.
- k) Gel de poliacrilamida al 15% (25 ml): Agua, 5.7 ml; Solución de poliacrilamida al 30%, 12.5 ml; Tris HCl 1.5 M pH 8.8, de 6.3 ml; SDS al 10%, 0.25 ml; PSA al 10%, 0.250 ml y TEMED, 0.015 ml.
- l) Gel de poliacrilamida al 5% (8 ml): Agua, 5.5 ml; Solución de poliacrilamida al 30%, 1.3 ml; Tris HCl 1.0 M pH 6.8, 1 ml; SDS al 10%, 0.080 ml; PSA al 10%, 0.080 ml y TEMED, 0.008 ml.

Procedimiento:

- a) Preparación del gel y electroforésis.

- 1) Ensamblamos el par de vidrios 14 cm x 18 cm y agregamos 25 ml de solución de poliacrilamida al 15 % (fase de resolución). Vaciamos una capa delgada de isopropanol en la parte superior para evitar la inhibición que ejerce el aire sobre la polimerización.
- 2) Dejamos polimerizar y vaciamos los 8 ml de solución de poliacrilamida al 5% (Concentradora).
- 3) Colocamos el peine y dejamos polimerizar a T.A.
- 4) Cuando hubo polimerizado, retiramos el peine lentamente y montamos el gel en la cámara de electroforésis vertical.
- 5) Llenamos tanto el depósito superior como el inferior de la cámara con amortiguador de corrida 1X.
- 6) Ebulлим las muestras (0.4 unidades de absorbancia a 600 nm) 2-3 min. Las aplicamos en el gel con jeringas Hamilton de 10 y 50 μ l.
- 7) Corrimos la electroforésis inicialmente a 60-80 voltios y ya que entraron las muestras al gel aumentamos a 150-200 voltios hasta salir el azul de bromofenol en la parte inferior.

b) Tinción con azul de Coomassie

- 1) Retiramos el gel de los vidrios y lo sumergimos en la solución colorante por 30-40 min (se obtienen mejores resultados dejando colorear toda la noche).
- b) Recuperamos la solución colorante y agregamos la de desteñido. Un lavado rápido y después cambiamos la solución cuando estaba muy teñida (cada 1-2 horas) hasta eliminar el fondo azul.
- c) Secamos el gel a 80 °C con vacío.

Inmuno-electrotransferencia (Western blotting):

Después de analizar las proteínas de los extractos celulares originados de los experimentos de expresión por el método de coloración con azul de Coomassie, decidimos aumentar la sensibilidad nuestros experimentos al usar anticuerpos. Usamos una combinación del método de inmuno-electrotransferencia reportado por Towin y cols. en 1979⁽³⁵⁾, y el de Sambrook y cols de 1989⁽⁴⁴⁾. Los componentes separados electroforéticamente son transferidos de un gel de poliacrilamida a un soporte sólido para seguidamente ser expuesto a reactivos que son específicos para secuencias de aminoácidos determinadas (ver estrategia general en figura 11).

TECNICA DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

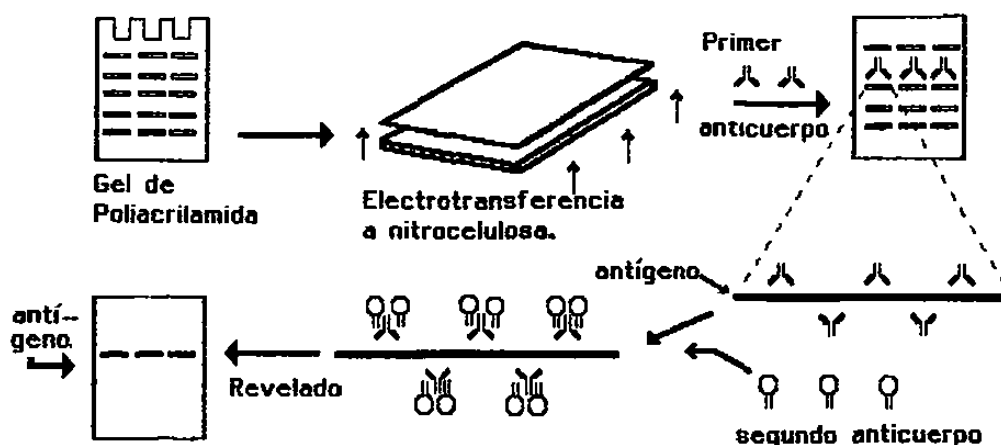


FIGURA 11. ESTRATEGIA SEGUIDA PARA PRACTICAR "WESTERN BLOTTING" A LOS EXTRACTOS CELULARES. Primeramente separamos las proteínas en un gel de poliacrilamida-SDS, transferimos a filtro de nitrocelulosa, y detectamos la proteína usando dos anticuerpos.

Reactivos y soluciones:

- Amortiguador de transferencia: Glicina 39 mM, Trisma base 48 mM, SDS al 0.037%, Metanol al 20%, ajustar pH 8.3.
- Amortiguador Tris-salino (TBS): Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM.
- TBST: Tween-10 al 0.05% en TBS.
- Solución de bloqueo Leche Sveltex al 5% en TBST.
- Solución PA 1X: Tris HCl 0.1 M pH 9.5, NaCl 0.1 M.
- Solución reveladora: 10 ml de PA 1X, 1 μ l de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 4.9 M, 40 μ l de NBT (nitro azul de tetrazolio al 50% en dimetilformamida), 40 μ l de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato al 50% en dimetilformamida).
- Primer Anticuerpo: Antisero de conejo contra bGH (dilución 1:1000 en TBST+ leche al 5%).
- Segunda Anticuerpo: Conjugado de antinmunoglobulinas de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (dilución 1:1000 en TBST+5% de leche).

Procedimiento:

- 1) Una vez corrido el gel de poliacrilamida-SDS, montamos el sistema de transferencia de proteínas, colocando en secuencia del cátodo(-) al ánodo(+) lo siguiente:
 - (+) -Rejilla de plástico
 - Esponja humedecida
 - Papel filtro recién humedecido (2)
 - Filtro de nitrocelulosa humedecido previamente.
 - Gel humedecido en amortiguador de transferencia
 - Papel filtro húmedo (2)
 - Esponja
 - (-) -Rejilla de plástico

Después de colocar el filtro de nitrocelulosa (humedecido en solución tampón) sobre el gel, pasamos una pipeta rodando para eliminar burbujas. Usamos guantes para evitar el contacto del filtro de nitrocelulosa con los dedos.

- 2) Colocamos el sistema en posición vertical en las ranuras de la cámara de transferencia (el lado correspondiente al gel debe quedar hacia el polo negativo (negro).
- 3) Llenamos la cámara con amortiguador de transferencia (de preferencia frío) y aplicamos voltage a 100 v por 2-3 h.
- 4) Desmontamos el filtro de nitrocelulosa y lo colocamos en solución de bloqueo (15-20 ml) con movimiento rotatorio lento al menos 30 min. Al mismo tiempo, colocamos el gel en azul de Coomassie para verificar transferencia de proteínas al filtro.
- 5) Recuperamos la solución de bloqueo y agregamos el primer anticuerpo (que cubra el filtro). Incubamos con movimiento rotatorio lento por 6-12 h a T.A.
- 6) Recuperamos la solución de anticuerpos y practicamos un lavado rápido con 15-20 ml de TBST y 3 más lentos de 10 min. Incubamos con el segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina) 1 h a T.A.
- 7) Otro lavado rápido con TBST y tres de 10 min.
- 8) Dos lavados con solución P.A. 1X de 10 min c/u.
- 9) Cuando el filtro se encontraba en el segundo lavado, preparamos 10-15 ml de solución reveladora y la agregamos después del último lavado.
- 10) Observamos la aparición de bandas y suspendimos la reacción al introducir el filtro en agua destilada.

Determinación de la secuencia nucleotídica del DNAC de bGH y el promotor ptrc.

Verificamos el intercambio de los extremos del DNA natural de bGH por DNA sintético recurriendo a determinar la secuencia nucleotídica del DNAC de bGH en su verificación final (en el

plásmido pKbGH-S) mediante el método enzimático desarrollado por Sanger en 1977⁽⁵⁴⁾. Determinar la secuencia nucleotídica requiere una serie de etapas como son las siguientes: a) Subclonación del inserto en el vector M13; b) transformación de células calcio competentes (JM101); c) análisis de la forma replicante de fagos recombinantes en las clonas; d) obtención del DNA de cadena sencilla de fagos recombinantes; e) reacción enzimática de secuenciación; f) preparación y corrimiento del gel de secuencia; g) secado y exposición de este a película de rayos X para la autoradiografía.

a) Calcio competentes de *E. coli* JM101 y transformación con fago M13.

Esta cepa de *E. coli* es huedep para la serie de fagos M13. ya que debido a su genotipo (*lac-proB*)F'*traD36proAB+lacIqZM145* tiene la capacidad de complementar al operon *lac* del fago M13 y producir la enzima β -galactosidasa. Esta enzima es expresada por la induccion del promotor *lac* con la adición de IPTG y su actividad es monitoriada por rompimiento enzimático del compuesto incoloro 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-Gal), para formar galactosa y un compuesto azul oscuro. La infección del fago se lleva acabo a traves del pili de la bacteria.

Reactivos y soluciones:

- a) Tubos con caldo 2YT: Triptona, 16 g/l; Extracto de levadura, 10 g/l; NaCl, 5 g/l.
- b) Tubos con medio B: Triptona, 10 g/l; NaCl, 8 g/l; Agar, 6 g/l.
- c) Cajas con medio B: Triptona, 10 g/l; NaCl, 8 g/l; Agar, 15 g/l.
- d) Cloruro de calcio 0.05 M (frío).
- e) X-Gal 20 mg/ml (en dimetilformamida)
- f) IPTG 100 mM en agua.
- g) Medio mínimo (para 100 ml 10x): K_2HPO_4 , 10.5 g; KH_2PO_4 , 4.5 g; $(NH_4)_2SO_4$, 1 g; Citrato de sodio $2H_2O$, 0.5 g. Llevar a 88.5 ml con agua y esterilizar. Agregar por separado: 1 ml $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ al 20 %; 10 ml de Glucosa al 20 % y 0.5 ml de solución Tiamina al 1% y 10 ml de solución de Glucosa al 20%.

Procedimiento:

A) Calcio competentes

- 1) Sembramos *E. coli* (JM101) en una caja con medio mínimo e incubamos a 37°C/12-14 h.
- 2) Levantamos una colonia e inoculamos un tubo de ensaye con 4 ml de medio 2YT. Dejamos crecer a 37°C/12 h con agitación vigorosa.

- 3) Inoculamos un matraz conteniendo 50 ml de 2YT con una dilución 1:100 de cultivo de células del tubo de ensaye y permitimos crecimiento hasta una densidad óptica (a 600 nm) de 0.30 -0.35 (1 a 1.5 h).
- 4) Colocamos el matraz con células 10 minutos en hielo. Sembramos una dilución 1:100 en un tubo con 4ml de 2YT para uso posterior y vaciamos el resto en un tubo Falcon frío de 50 ml.
- 5) Centrifugamos a 5,000 rpm/5 min y decantamos el sobrenadante (todo en hielo y frente al mechero).
- 6) Resuspendimos la pastilla en 20 ml de cloruro de calcio 50 mM e incubamos 20 min en hielo. Repetimos paso 5 y resuspendimos en 2 ml de CaCl₂ 0.050 M.
- 7) Dejamos en hielo 10 a 20 min y transformamos usando 200 µl de células (se ha observado muy buena eficiencia aún a las 24 h, al conservar las células en una charola con hielo y guardada en el refrigerador).

B) Transformación de JM101 con Fago M13

- 1) Colocamos en diferentes tubos nuevos, fríos y estériles lo siguiente:
 - 1 µl del producto de ligación
 - 5 µl del producto de ligación
 - 1 ng de M13 superenrollado (testigo positivo)
 - 1 ng de M13 lineal (testigo negativo)
- 2) Agregamos 200 µl de bacterias calcio competentes a cada tubo y mezclamos suavemente. Incubamos 30-40 min en hielo, mezclando cada 10 minutos.
- 3) Diez o quince min antes de terminar la incubación, fundimos el medio B suave de los tubos y los mantuvimos a 47°C en baño María. Al mismo tiempo colocamos las cajas con medio B a 47°C en la incubadora.
- 4) Una vez terminado el período de incubación del paso 2, colocamos los tubos con células + DNAs en un baño a 42°C/2 min y los retiramos poniéndolos en una gradilla a T.A.
- 5) Agregamos a cada tubo lo siguiente:
 - a) 100 µl de bacterias no competentes dejadas creciendo en el paso A-4 anterior.
 - b) 50 µl de X-Gal a 20 mg/ml
 - c) 10 µl de IPTG de una concentración 100 mM.
 - d) 4 µl de tiamina de la solución al 1%.
- 6) Mezclamos suavemente y vaciamos el contenido en un tubo con 4 ml de agar suave fundido y conservado a 47°C. Mezclamos 2 o 3 veces por inversión.
- 7) Vaciamos el contenido inmediatamente en una caja con medio B recién sacada de la estufa. Distribuimos homogéneamente el agar con células transformadas con movimiento circular sobre la mesa.
- 8) Dejamos solidificar a T.A. (10-15 min) e incubamos las cajas invertidas a 37°C/6-8 h. Observamos la aparición de colonias

azules en el testigo positivo (M13 superenrollado), ausencia en el negativo y transparentes y azules en las ligaciones. Tomamos en cuenta lo siguiente:

1 ng de moléculas de M13 superenrollado produce 1000 transformantes, moléculas linealizadas transforman con una eficiencia cercana al 0% y moléculas ligadas, con una eficiencia aproximada del 50 % (según instructivo de la compañía Pharmacia P-L Biochemicals).

b) Análisis de DNA de clonas fágicas recombinantes:

Después de llevar a cabo la transformación de bacterias e incubado a 37°C, pudimos apreciar la aparición de colonias opacas desde las 4 h, tanto en el testigo positivo como en la ligación. A las 6-8 h las cajas correspondientes al positivo ya tenían una apariencia azul y en las ligaciones la mayoría eran opacas (posibles recombinantes) y una pocas azules (vector recircularizado). Las recombinantes portadoras del o los fragmentos de DNA las crecimos y caracterizamos para después proceder secuenciarlas.

Material y soluciones:

- a) Tubos con 4 ml de caldo 2YT
- b) Palillos de madera (de dientes) estériles

Procedimiento:

- 1) Crecimos JM101 toda la noche en tubo con caldo 2YT.
- 2) Al otro día, inoculamos nuevos tubos de 2YT con una dilución 1:100 del inóculo anterior y permitimos crecer 30 min. a 37°C con agitación.
- 3) Picamos con un palillo una colonia y lo arrojamos en un tubo con el cultivo fresco de bacterias. Dejamos crecer a 37°C/5 a 8 h con agitación vigorosa.
- 4) Empastillamos 3 ml de cultivo mediante dos centrifugaciones sucesivas de 1.5 ml (a 10,000 rpm/2 o 3 min).
- 5) Recuperamos 200-300 µl del sobrenadante con puntilla estéril y lo colocamos en un tubo Eppendorf estéril (conservamos el tubo con el sobrenadante a 4°C). Desechamos el resto del sobrenadante y practicamos minipreparación de plásmidos al paquete bacteriano como se describió anteriormente.
- 5) Caracterizamos con las enzimas de restricción más ilustrativas para para cada caso y seleccionamos la clona respectiva.

c) Obtención del DNA de cadena sencilla del fago M13.

Es esencial que el DNA de cadena sencilla sea de buena

calidad para la obtención de excelentes resultados en la secuenciación. Existen varios métodos reportados para purificar DNA de cadena sencilla a partir de vectores M13 e híbridos plásmido-fago. El siguiente método nos funcionó muy bien en el presente trabajo:

Reactivos y soluciones:

- a) Matraces con caldo 2YT
- b) Polietilenglicol al 30 % + NaCl 1.8 M .
- c) Fenol saturado
- d) TE
- e) Eter etílico anhidro
- f) Acetato de sodio 3 M, pH 5.5
- g) Etanol al 95%
- h) Etanol al 70 %

Procedimiento

- 1) Inoculamos 11 ml de 2YT (en matríz Erlenmeyer de 200 ml) con 0.3 ml de la cepa JM101 de E. coli en fase estacionaria y dejamos crecer 30 min a 37°C.
- 2) Agregamos 4-6 placas de fago recombinante deseado (o 10 μ l del sobrenadante apartado al analizar las clonas recombinantes). Crecimos 5-8 h a 37°C con agitación vigorosa.
- 3) Centrifugamos 1.2 ml del cultivo en 6 tubos Eppendorf de 1.5 ml a 12,000 rpm/10 min y recuperamos el sobrenadante sin tocar las paredes del tubo procurando dejar de 50 a 100 μ l para evitar material de la pastilla.
- 4) Procesamos el precipitado para obtención y caracterización del DNA de doble cadena.
- 5) Agregamos 200 μ l de PEG al 30%-NaCl 1.8 M a cada uno. Mezclamos en vortex e incubamos 15 min a T.A. Centrifugamos a 12,000 rpm/5 min y eliminamos el sobrenadante.
- 6) Resuspendimos la pastilla en 100 μ l de TE y agregamos 100 μ l de fenol saturado. Mezclamos al vortex por 2 min y Centrifugamos 5 min. Recuperamos la fase superior con extremo cuidado.
- 7) Juntamos el contenido de los tubos (90 μ l c/u) en uno o sea 3 tubos finales con 180 μ l c/u. Agregamos 1 ml de éter etílico y mezclamos.
- 8) Centrifugamos a 12,000 rpm/10 min y retiramos el éter (fase superior) sin romper la interfase. Repetimos esta operación.
- 9) Mezclamos el contenido de cada juego de tres tubos en 2 tubos de 270 μ l cada uno. Agregamos 90 μ l de acetato de sodio 3 M y mezclamos. Agregamos 800 μ l de etanol al 95% mezclamos y dejamos a -20°C/1 h.
- 10) Centrifugamos 14,000 rpm/10 min y tiramos el sobrenadante. Lavamos el precipitado con 1 ml de etanol al 70% y centrifugamos 5 min.
- 11) Secamos en el Savant por 5 min y Resuspendimos en 20 μ l de

- TE. Corrimos 0.5 μ l y 1 μ l de DNA un gel de agarosa 0.8%.
- 12) Determinamos la concentración de DNA y la pureza en el espectrofotómetro a 280 nm y 260 nm.

d) **Reacción enzimática de secuenciación de nucleótidos.**

Método desarrollado por Sanger (56), recomendado por USB, United States Biochemical Corporation en su "estuche" de secuenciación.

Reactivos y soluciones:

- a) Amortiguador de secuencia: Tris HCl 200 mM pH 7.5, MgCl 50 mM, NaCl 250 mM.
- b) Cebador (0.5 pmol/ μ l (5'-GTAAAACGACGGCCAGT)
- c) Ditioneitol (DTT 0.1 M)
- d) Mezcla de oligonucleótidos marcados como dGTP 5x: dGTP 7.5 μ M, dCTP 7.5 μ M, dTTP 7.5 μ M.
- e) Mezcla terminadora ddG: dGTP 80 μ M, dATP 80 μ M, dCTP 80 μ M, dTTP 80 μ M y ddGTP 8 μ M.
- f) Mezcla terminadora ddA: dGTP 80 μ M, dATP 80 μ M, dCTP 80 μ M, dTTP 80 μ M y ddATP 8 μ M.
- g) Mezcla terminadora ddT: dGTP 80 μ M, dATP 80 μ M, dCTP 80 μ M, dTTP 80 μ M y ddTTP 8 μ M.
- h) Mezcla terminadora ddC: dGTP 80 μ M, dATP 80 μ M, dCTP 80 μ M, dTTP 80 μ M y ddCTP 8 μ M.
- i) Enzima secuencia
- j) Mezcla terminadora de la reacción: Formamida al 95%, EDTA 20 mM, Azul de bromofenol al 0.5% y Xilen cianolal al 0.5%.
- k) Nucleósido radiactivo: (α -³⁵S)dATP 10 mCi/ μ l.
- l) Agua grado miliQ.
- m) Amortiguador TE:

I Apareamiento del templado y cebador.

- 1) En un tubo Eppendorf colocamos lo siguiente:

-Cebador	1 μ l
-Amortiguador de secuencia	2 μ l
-DNA (150 μ g/ μ l)	7 μ l (aprox. 1 μ g) *

* Si está más concentrado, ajustar volumen a 7 μ l con agua ultrapura.
- 2) Calentamos el tubo a 65°C por 2 min y dejamos enfriar a 25-30°C en baño María (aprox. 30 min).

II Reacción de polimerización.

- 1) Para reacciones normales (secuencia de aprox. 500 nucleótidos) el proveedor recomienda diluir la mezcla de nucleótidos de polimerización seis veces con agua ultrapura (4 μ l de nucleótidos y 20 μ l de agua).
- 2) Diluimos la enzima "secuencia" 1:8 con TE frío (solo

preparamos la enzima necesaria para cada corrida).

- 3) Mezclamos en un tubo lo siguiente:
- | | |
|--|--------------|
| -Plantilla-cebador apareados | 10 μ l |
| -DTT 0.1 M | 1 μ l |
| -Mezcla de nucleótidos diluidos | 2 μ l |
| - $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)* | 0.5 μ l |
| -Secuenasa diluida | 2 μ l |
| | ----- |
| Volúmen total | 15.5 μ l |

* El volúmen utilizado del nucleótido marcado dependió de la actividad en el momento de su uso aunque se recomienda usar 5 μCi por reacción.

- 4) Mezclamos suavemente e incubamos a T.A./10 min.

III Reacción de terminación.

- 1) Preparamos cuatro tubos marcados con las letras G,A,T y C respectivamente; les agregamos 2.5 μ l de la mezcla de terminación ddGTP en el tubo marcado con G; ddATP en A; ddTTP en T y ddCTP en C .
- 2) Precalentamos los tubos anteriores a 37°C al menos un min. Una vez terminada la incubación de la reacción de formación de la cadena complementaria, sacamos 3.5 μ l de la solución marcada radiactivamente y los agregamos a cada uno de los tubos del punto 1 (que contienen los terminadores). Centrifugamos (para bajar las muestras) y continuamos la incubación a 37°C por un total de 5 min (se puede continuar hasta 30 min).
- 3) Agregamos 4 μ l de la solución para parar la reacción; mezclamos y mantuvimos en hielo hasta su uso en el gel de secuenceo o guardamos a -20°C por un tiempo mayor.
- 4) Cuando el gel estaba listo, calentamos las muestras a 75-80 °C/2 min y usamos 2-3 μ l por carril.
- 5) Lavamos con una jeringa los carriles del gel y colocamos las reacciones de cada plantilla en el órden G,A,T,C,.

e) Preparación y corrimiento del gel de secuenciación.

La duración de la corrida y la concentración del gel de secuenciación son los principales factores que determinan la región de la secuencia clonada que podrá ser leída. Bajo condiciones óptimas, se pueden leer 300-400 bases comenzando a leer desde la parte inferior del gel. Desafortunadamente, son muchos los factores que reducen esta resolución. Entre ellos están la calidad de los reactivos usados, la velocidad con que ocurre la polimerización, la temperatura del gel durante la electroforésis y un secado apropiado del gel después de la corrida.

Recomendaciones:

- i) El gel se deberá preparar de 1 a 20 h antes de su uso y pre-correrlo 30-60 min a 55-60 watts.
- ii) Corridas de geles por 10 a 12 h permiten leer en un rango de 400 a 800 bases.
- iii) Colocar las muestras en el órden G,A,T,C.
- iv) Para geles en los que se usa (^{32}S), la exposición deberá hacerse con contacto directo entre el gel seco y la película fotográfica de rayos X.
- v) Evitar que al vaciar la póliacrilamida en los vidrios, se derrame hacia la cinta autoadherible que sella los bordes de los vidrios, porque se despega y hay fugas.

Reactivos, soluciones y materiales:

- a) Solución de silicón: Diclorodietil silano al 5 % en cloroformo.
- b) Cinta adhesiva ancha
- c) Cinta masking-tape
- d) TBE 5X (para 1 l): Tris-base, 54.0 g; Acido Bórico, 27.5 g y EDTA 0.5 M pH 8.0, 20.0 ml.
- e) Solución de urea (para 500 ml): Urea, 233.5 g; TBE 5X, 100.0 ml; Agua, hasta 500.0 ml.
- f) Solución de poliacrilamida 20% (para 500 ml): Acrilamida 96.50 g; Metilen-Bis-Acrilamida, 3.35 g; Urea ultrapura, 233.00 g; TBE 5X, 100.0 ml, Agua hasta 500.0 ml.

GEL AL 6 % (120 ml):

Solución de poliacrilamida al 20%	38.560 ml
Solución de Urea (7.77 M)	72.000 ml
Urea en polvo (ajuste de conc.)	6.240 g
Persulfato de amonio al 10 % (PSA)	0.500 ml
TEMED	0.060 ml

GEL AL 8 % (120 ml):

Solución de poliacrilamida al 20%	48.20 ml
Solución de Urea (7.77 M)	72.00 ml
Persulfato de amonio al 10 % (PSA)	0.57 ml
TEMED	0.065ml

* Polimeriza en 15 minutos aproximadamente. Es recomendable filtrar la solución de gel antes de agregar el TEMED.

Procedimiento:

- 1) Lavamos los vidrios con jabón, agua y finalmente con alcohol. El vidrio mas grande lo colocamos en la campana de extracción, agregamos unas gotas de solución de silicón y la distribuimos con una gasa. Dejamos secar 30 min. Lavamos

- con etanol y dejamos secar a T.A. Repetimos el tratamiento con la otra cara del vidrio.
- 2) Ensamblamos los vidrios con los separadores con la parte más gruesa (1.2 mm) en la parte inferior y la más delgada (0.4 mm) en la superior. Pegamos cinta adhesiva en los lados de los vidrios y los sujetamos con dos pinzas en cada lado.
 - 3) Moldeamos con Masking-tape los bordes superiores de los vidrios para evitar derrame de la poliacrilamida al vaciarla. Preparamos la solución de poliacrilamida en un matraz Erlenmeyer de 200 ml y mezclamos suavemente.
 - 4) Vaciamos la poliacrilamida poniendo los vidrios en una inclinación de 10-15°. Si al llenarlo se formaban burbujas en el fondo, lo poníamos vertical hasta deshacerse de éstas al flotar y lo volvíamos a inclinar.
 - 5) Una vez lleno, colocamos el peine tipo "diente de tiburón" invertido (con los dientes hacia arriba). El peine debe introducirse unos 7-8 mm en el gel, si se introduce más no es posible poner las muestras. Nos aseguramos de que el peine no quedara flojo colocando una o dos pinzas en la parte superior.
 - 6) Dejamos polimerizar con la misma inclinación (de ser necesario lo dejamos hecho hasta otro día sellando la parte superior con todo y peine con agarosa fundida o simplemente colocando toallas absorbentes empapadas con agua y luego cubriendo con plástico autoadherible).
 - 7) Retiramos cinta inferior del gel y el peine, quitamos los restos de poliacrilamida y urea y reintroducimos el peine pero ahora con los dientes hacia abajo hasta pinchar ligeramente el gel.
 - 8) Montamos el gel en la cámara de secuenciación y llenamos los depósitos con amortiguador TBE 1X. Llevamos a cabo una pre-corrida a 40-60 watts por 30 a 60 min.
 - 9) Lavamos los carriles con una jeringa con solución de corrida para eliminar el exceso de urea, inmediatamente antes de poner las muestras; de lo contrario las muestras no migraban adecuadamente.
 - 10) Corrimos el gel a 50-60 watts por 4 u 8 h.

f) Secado y exposición del gel a película de rayos X.

Reactivos, soluciones y material:

- a) Charola de plástico o vidrio (40x50x3 cm)
- b) Papel Wattman 3MM (46x57 cm)
- c) Plástico autoadherible (Kleen pack)
- d) Cartucho para rayos X (30x38 cm)
- e) Equipo de secado con vacío y calor
- f) Solución de lavado: metanol o alcohol al 10% y ácido acético al 10 % en agua.

Procedimiento:

- 1) Después de correr la electroforesis el tiempo necesario, retiramos de la cámara de electroforesis los vidrios con el gel.
- 2) Despegamos el vidrio grande haciendo palanca entre los dos vidrios suavemente y en seguida los separadores de plástico.
- 3) Sumergimos el vidrio con el gel adherido en la cara superior en una charola del mismo tamaño con solución de lavado. Primero introducimos un extremo y después bajamos el otro lentamente (de lo contrario se forman burbujas). Dejamos en la solución por 30 min.
- 4) Sacamos el vidrio con el gel levantándolo de un extremo lentamente y lo dejamos a escurrir en un ángulo de 60-70° sobre servilletas/10 min.
- 5) Colocamos el vidrio horizontalmente (con el gel en la cara superior) y colocamos la hoja de papel filtro Wattman 3MM sobre el gel empezando del centro de uno de los extremos y avanzando gradualmente hasta cubrir todo el gel. Extendimos bien al pasar una pipeta rodando sobre el papel.
- 6) Invertimos todo el conjunto (el papel quedó abajo) y levantamos suavemente el vidrio siguiendo el movimiento con una mano abajo de la hoja de papel hasta despegar completamente el gel del vidrio.
- 7) Recortamos los excesos de papel (dejando un margen de 1-2 cm) y cubrimos con plástico kleen pack todo el gel.
- 8) Ensamblamos el sistema de secado del gel en el aparato para este propósito (BIO-RAD Dual temperature slab gel dryer, Model 1125B) conectado a una bomba de vacío potente en el orden siguiente:
 - aparato de secado con hoja de acero perforado
 - dos hojas de papel filtro whatman 3MM
 - papel filtro con el gel hacia la cara superior
 - hoja de plástico rígido con cara lisa hacia abajo.
 - Cubierta de hule flexible (del aparato)
- 9) Conectamos la bomba de vacío al aparato de secado y la (con trampa condensadora y secadora).
- 10) Encendimos el vacío del secador y lo ajustamos a 3-4 h. De igual manera seleccionamos 80°C y programamos el mismo tiempo en el calentador de geles.
- 11) Una vez secado el gel (se sabe porque ya no se siente pegajoso al contacto), retiramos el papel portador del gel y eliminamos el plástico autoadherible.
- 12) Recortamos los bordes superior y laterales del gel a la medida del chasis para exposición con película de rayos X. Dejamos exponer con la película a T.A. por 3 o 4 días.

III. RESULTADOS

Después de obtener el plásmido por minipreparación de las diferentes construcciones (pKbGH-N, pKbGH-S y pKhPLhGH22K) los caracterizamos para seleccionar las clonas portadoras del DNAC buscado para cada caso. Acto seguido, los purificamos a gran escala en gradiente de cloruro de cesio para obtener suficiente plásmido y de buen grado de pureza para manipulaciones subsecuentes. Cuantificamos por el método espectrofotométrico, tomando en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm es equivalente a tener 50 µg de DNA/ml. La relación de absorbancias 260/280 en las lecturas da el grado de contaminación con proteínas. De aquí que una relación igual o mayor de 1.8 es indicativo de DNA de buena calidad, tabla 2.

TABLA 2. Cantidad y calidad de los DNAs obtenidos a gran escala.

PLASMIDO diluc. 1:500	LECTURA DE ABS		RELACION 260/280	U de ABS totales	µg DNA obtenido
	260 nm	280 nm			
pKbGH-N	0.150	0.080	1.87	15	0,750 µg
pKbGH-S	0.200	0.120	1.66	20	1,000 µg
pKhPLhGH22K	0.410	0.210	1.95	41	2,050 µg

Caracterización enzimática del plásmido pKbGH-N.

Después de construir el plásmido pKbGH-N a partir de pGEM3' bGH, p63, pGEMbGH y pKK233-2, procedimos a caracterizarlo con las enzimas que nos dieran más información de su identidad. Para lo anterior, analizamos el mapa de restricción con el programa Pustell en una microcomputadora IBM sistema personal 2 modelo 70/386. Con el análisis de la secuencia pudimos predecir los fragmentos generados al llevar a cabo las digestiones con las enzimas de restricción más informativas para cada plásmido. Esta clona portadora del DNAC nativo fué caracterizada primeramente con Eco RI para linearizar y a partir de este corte llevamos a cabo digestiones con otra enzima en cada caso para liberar fragmentos de diferentes tamaños y compararlos con los calculados teóricamente (figura 12). Una vez caracterizada, la usamos para los experimentos de expresión y obtuvimos tanto los RNAs totales como las proteínas para usarse en los experimentos que se detallan mas adelante.

Caracterización enzimática del plásmido pKbGH-S.

Este plásmido lo construimos con el fin de expresar o mejorar la expresión de bGH intracelular en E. coli. Para su obtención, llevamos a cabo la construcción de una serie de plásmidos intermediarios, necesarios para integrar el DNA sintético, proporcionar los sitios de restricción que facilitarían la inserción del DNA de bGH en fase de lectura con el oligo, etc. Los plásmidos generados en esta construcción fueron, pKK Δ AcCI, PKK_{oligo}, pKolibGH (ver apéndice A para los mapas de restricción) y finalmente pKbGH-S (figura 13).

Caracterización enzimática del plásmidos pKhPLhGH22K.

El presente plásmido lo construimos con el fin de tener un gen testigo que nos permitiera saber si el vector pKK233-2 era capaz de dirigir la transcripción y expresión de la hormona del crecimiento humano, sin importar que los niveles fueran bajos ya que estaríamos en condiciones de detectar la hormona por radioinmunoensayo (figura 14).

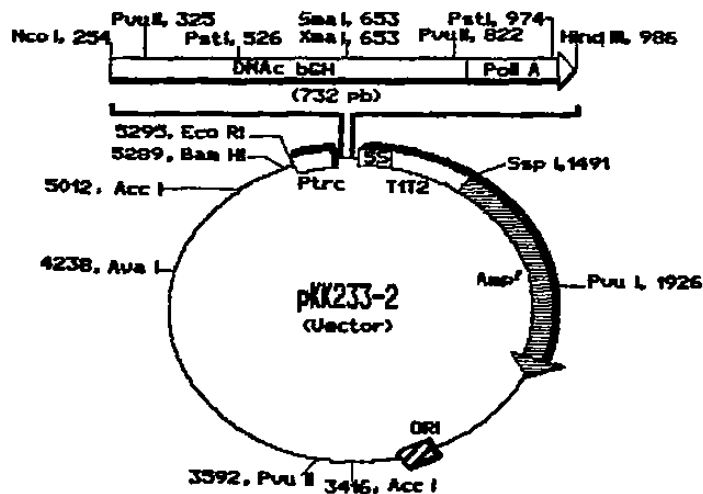
Extracción de RNAs de E. coli.

Extrajimos los RNAs de 8 ml de cultivo de bacterias transformadas con los plásmidos de expresión tanto para bGH como para hGH. Siguiendo la metodología detallada en la sección de métodos, indujimos el promotor ptrc de nuestras construcciones plasmídicas así como el ptac del usado como testigo con IPTG (0.1 mM conc. final). Usamos las clonas portadoras de los plásmidos pKbGH-N, pKbGH-S, pKhPLhGH22K, y pBHx (positivo), sin inducir (negativos) e inducidos.

Después de inducir la expresión por tres horas a 37°C con agitación vigorosa, centrifugamos las células apartando 1 ml para análisis de proteínas y 8 ml para análisis de RNAs. Extrajimos los RNAs totales por el método descrito y resuspendimos la pastilla final por 30-60 min para después cuantificar la concentración por el método espectrofotométrico y a su vez determinamos el grado de pureza con lecturas a 260nm y 280 nm, respectivamente (ver tabla 3).

PLASMIDO pKbGH-N (5295 pb), INSERTO: DNAC DE bGH NATIVO

A



B

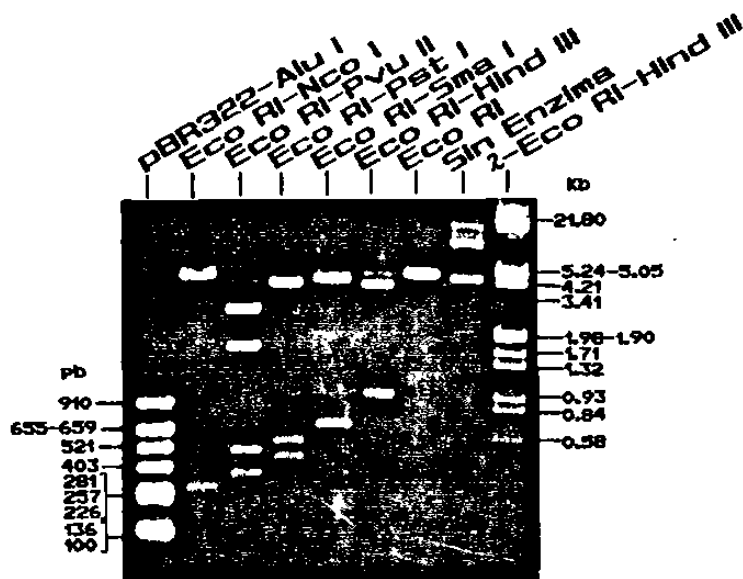
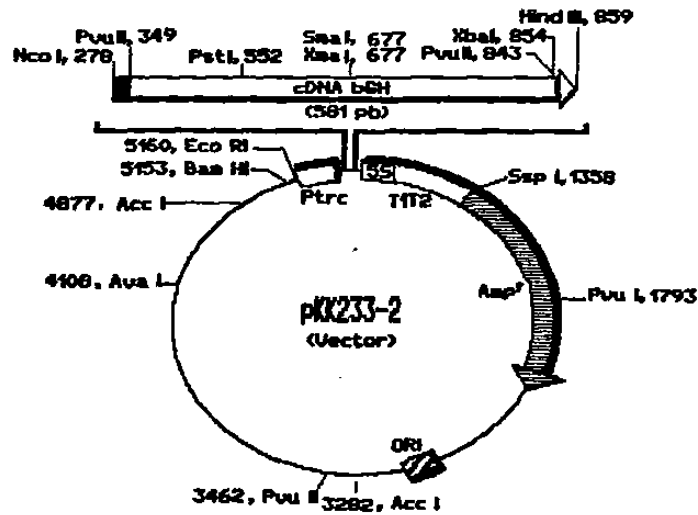


FIGURA 12. CARACTERIZACION ENZIMATICA DEL PLASMIDO pKbGH-N. El plásmido lo digerimos con las enzimas de restricción que se detallan más adelante y los fragmentos generados, así como los marcadores de peso molecular, los separamos en un gel de agarosa al 1.5 %. Los marcadores de PM pBR322-AluI y fago lambda EcoRI+HindIII los colocamos en los carriles del extremo izquierdo y derecho, respectivamente. El segundo carril muestra el producto de la digestión con EcoRI+ NcoI (5.928 y 278 pb); el tercero, EcoRI+PvuII (2767, 1698, 494 y 278 pb); el cuarto, EcoRI+PstI (4756 y 552 pb); el quinto, EcoRI+SmaI (4631 y 677); sexto, EcoRI+HindIII (4301 y 1007 pb); séptimo, EcoRI (linearización); y finalmente colocamos 300 ng de DNA superenrollado (debido a la concentración del gel, no se resolvió adecuadamente).

A

PLASMIDO pKbGH-S (5160 pb), INSERTO: DNAc DE bGH MODIFICADO



B

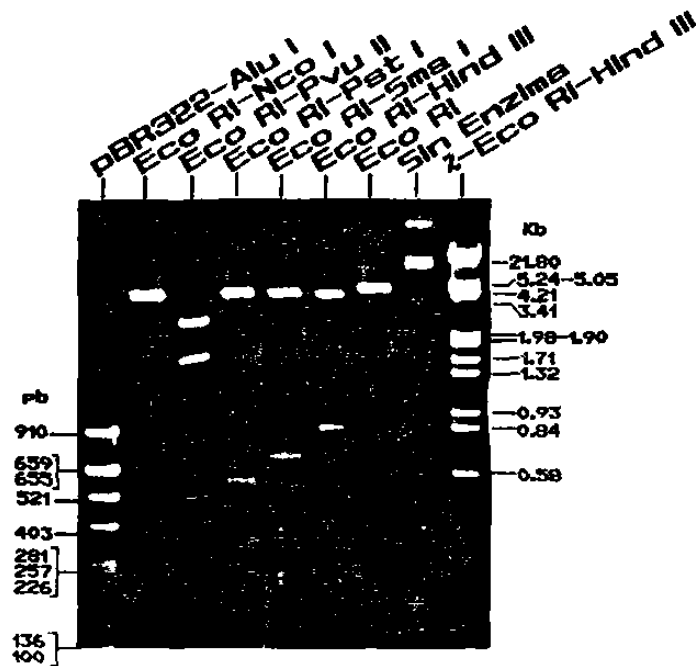
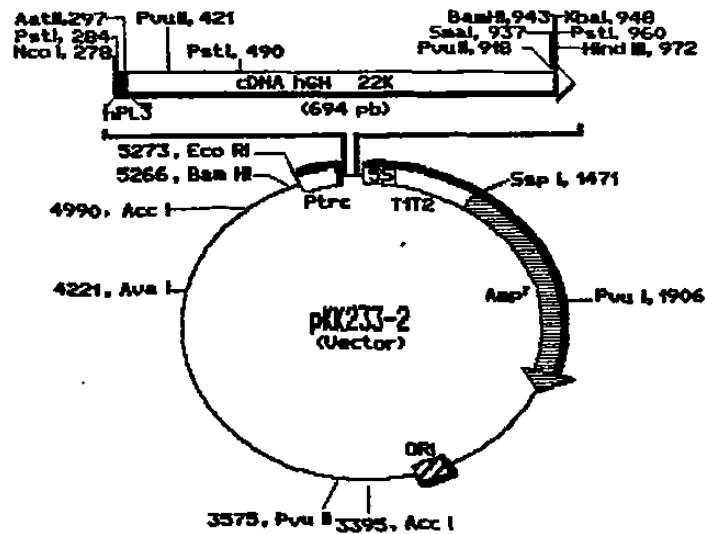


FIGURA 13. CARACTERIZACION DEL PLASMIDO pKbGH-S. Separamos los productos de las digestiones enzimáticas en un gel de agarosa al 1.5 %. Las bandas de los extremos representan los marcadores de PM, pBR322-AluI y fago lambda EcoRI+HindIII, respectivamente. En el segundo carril se muestran los fragmentos EcoRI+NcoI (4882 y 278 pb); en el tercero, EcoRI+PvuII (2619, 1698, 494 y 349 pb); en el cuarto, EcoRI+PstI (4608 y 552 pb); quinto, EcoRI+SmaI (4483 y 677 pb); sexto, EcoRI+HindIII (4301, 859 pb); séptimo, EcoRI (lineariza) y finalmente plásmido superenrollado.

PLASMIDO pKHGH22K (5273 pb), INSERTO: DNAC DE hPL-hGH 22K

A



B

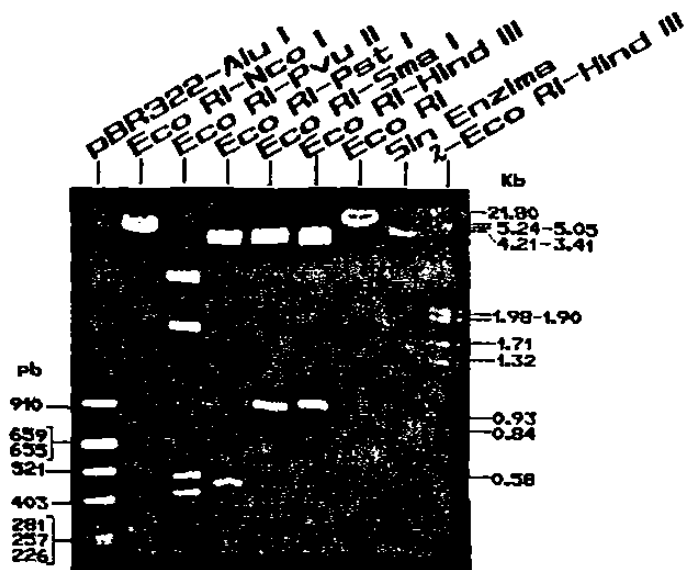


FIGURA 14. CARACTERIZACION DEL PLASMIDO pKHGH22K CON ENZIMAS DE RESTRICCION. Para caracterizar el presente olásmido, hicimos los cortes con las mismas enzimas y en el mismo órden que las caracterizaciones anteriores, tomando en cuenta que los fragmentos liberados son diferentes en cada caso. En los extremos colocamos los marcadores de PM que se indican y en el primer carril colocamos la doble digestión con EcoI+NcoI (4995 y 278 pb); en el tercero, EcoRI+PvuII (2837, 1518, 497 y 421 pb); cuarto, EcoRI+PstI (4313, 470, 284 y 206 pb); quinto carril, EcoRI+SmaI (4336 y 937 pb); sexto, EcoRI+HindIII (4301 y 972 pb); séptimo, EcoRI (lineariza) y finalmente 300 ng de DNA.

TABLA 3. Cuantificación y calidad de los RNAs obtenidos.

PLASMIDO Dil. 1:500	ABSORBANCIA		RELACION 260/280	UNIDADES DE ABSORBANCIA	CANTIDAD RNA (μ g)
	260	280			
pKbGH-N (n.i)	1.6	1.00	1.60	40.0	1,600
pKbGH-N (ind)	1.15	0.64	1.80	28.7	1,148
pKbGH-S (n.i)	0.31	0.17	1.80	07.7	0,308
pKbGH-S (ind)	1.32	0.74	1.77	33.0	1,320
pKhPLhGH (n.i)	1.60	0.76	2.10	40.0	1,600
pKhPLhGH (ind)	1.48	0.82	1.80	37.0	1,480
pKhPLbGH (n.i)	0.75	0.45	1.66	18.9	0,754
pKhPLbGH (ind)	0.39	0.25	1.60	9.87	0,394
pKK233-2 (n.i)	0.27	0.16	1.70	6.77	0,270
pKK233-2 (ind)	0.46	0.28	1.64	11.6	0,462
pBHx (n.i)	1.71	0.95	1.80	42.7	1,708
pBHx (n.i)	0.16	0.09	1.78	04.1	0,166

n.i= no inducido (negativo)

ind= inducido

pBHx = testigo positivo (hGH)

* 1 unidad de absorbancia se considera equivalente a 40 μ g RNA/ml.

* Una relación 260/280 igual o mayor a 1.8 indica una buena calidad del RNA (baja concentración de proteínas contaminantes)

Electroforésis de los RNAs en gel de agarosa urea-acido.

Los RNAs así obtenidos y cuantificados, los separamos en un gel agarosa urea-ácido vertical. Pusimos 20 μ g de RNA para cada caso y después de dejar migrar el azul 3/5 partes del gel, paramos la electroforésis y pusimos a teñir el gel en bromuro de etidio (2 μ g/ml) por 15 min. Pasado este tiempo, observamos la calidad del RNA obtenido al colocar el gel en un transiluminador de luz u.v.. Pudimos apreciar claramente las 3 bandas prominentes correspondientes a los tres RNA ribosomal bacteriano (23S, 16S y 5S), figura 15. Con esta observación pudimos darnos cuenta que no existía degradación abajo de la banda correspondiente a 5S. La pureza promedio de los RNAs fue buena, razón por la cual decidimos analizar la presencia de RNAm para bGH y hGH por hibridación con una sonda radiactiva de DNAc de bGH (ensayo tipo "Northern").

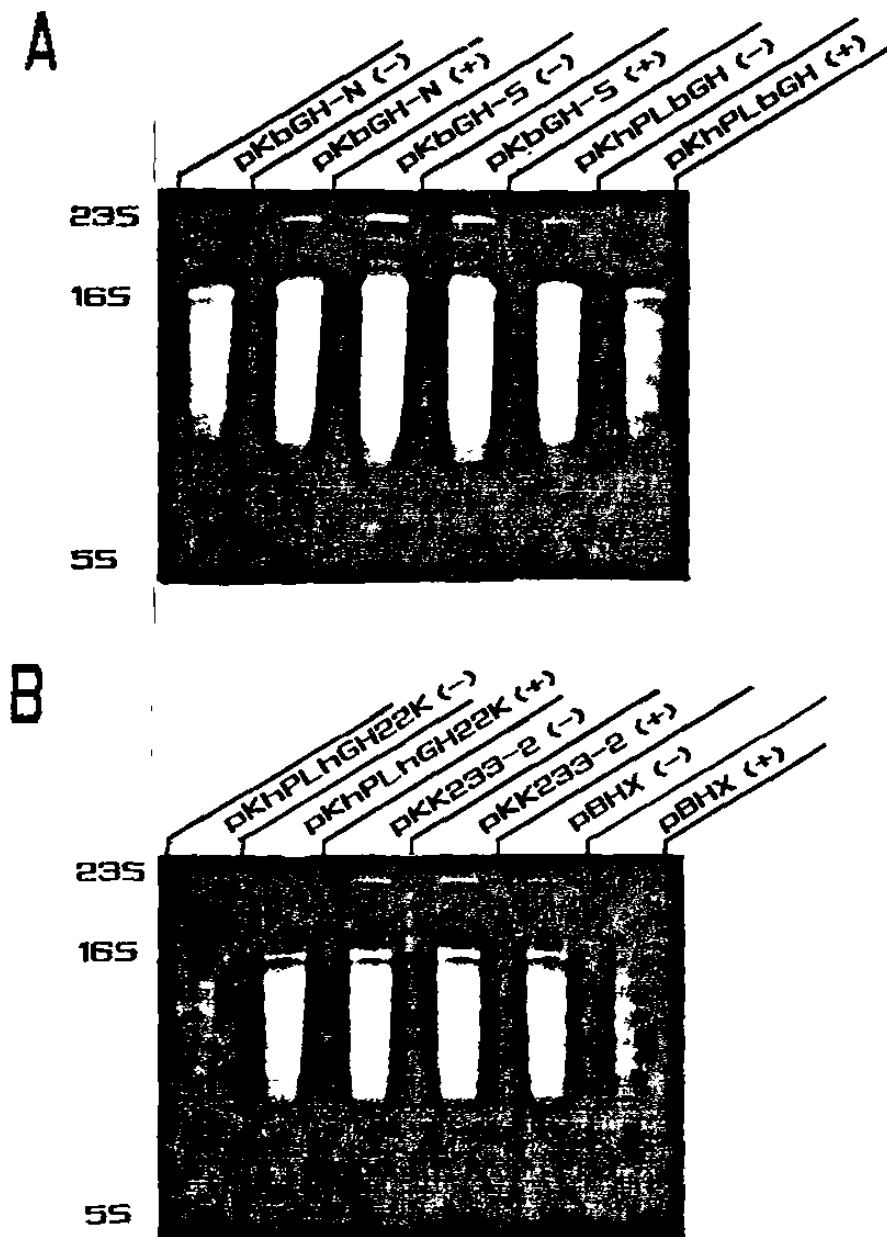


FIGURA 15. SEPARACION DE RNAs EN GEL AGAROSA UREA-ACIDO 1.4 %. Separamos 20 μ g de RNA de cada muestra en un gel vertical de agarosa urea-ácido al 1.4 %. En A, el primero y segundo carril corresponden al RNA de pKbGH-N; el tercero y cuarto a pKbGH-S; quinto y sexto a pKhPLbGH sin inducir e inducido, respectivamente. En B, corrimos la misma cantidad y en las mismas condiciones de RNA de pKhPLhGH22K, pKK233-2, pBHx sin inducir e inducidos, respectivamente. Las bandas más prominentes corresponden a las subunidades 23S, 16S y 5S, respectivamente.

Detección de RNA mensajeros para hormonas del crecimiento por el ensayo tipo "Northern".

61

El primero y más importante paso en la expresión de genes bacterianos es el evento de transcripción, un proceso catalizado por la enzima RNA polimerasa. Nos aseguramos de la presencia de RNAm para las diferentes versiones de la hormona mediante el uso de una sonda homóloga de DNA radiactiva. Como testigo positivo para estos experimentos usamos RNAs de bacterias transformadas con el DNA del plásmido pBHX; como testigo negativo usamos RNAs de los mismos plásmidos pero sin inducción con IPTG. Como testigo positivo para la hibridación de la sonda radiactiva usamos 500 ng de DNA del plásmido pKbGH-N digerido con NcoI+HindIII. Esta digestión libera un fragmento de 732 pb, el cual es ligeramente mayor que los mensajeros esperados para la proteína madura de las GHs (581 pb), excepto para aquellos de pKhPLhGH22K que expresa la prehormona (217 aminoácidos).

Colocamos las muestras en el mismo orden que en el gel agarosa urea-ácido pero ahora en un gel agarosa fosfatos horizontal al 1.2 % y la cantidad de muestra fué menor (15 µg) La primera muestra del lado izquierdo la pusimos por duplicado, y llevamos a cabo la separación de los RNAs hasta una migración del del colorante (azul de bromofenol) de 4/5 de la longitud del gel. Cortamos el primer carril y lo teñimos para ver la separación de RNAs en luz u.v. y saber si la separación se llevó a cabo eficientemente. Pudimos apreciar buena separación, aunque no se veían con la misma nitidez que en gel agarosa urea-ácido.

Transferimos el resto de RNAs a filtro de nitrocelulosa, prehibridamos e hibridamos y expusimos a película de rayos X por 24 h obteniendo los resultados que se aprecian en la figura 16.

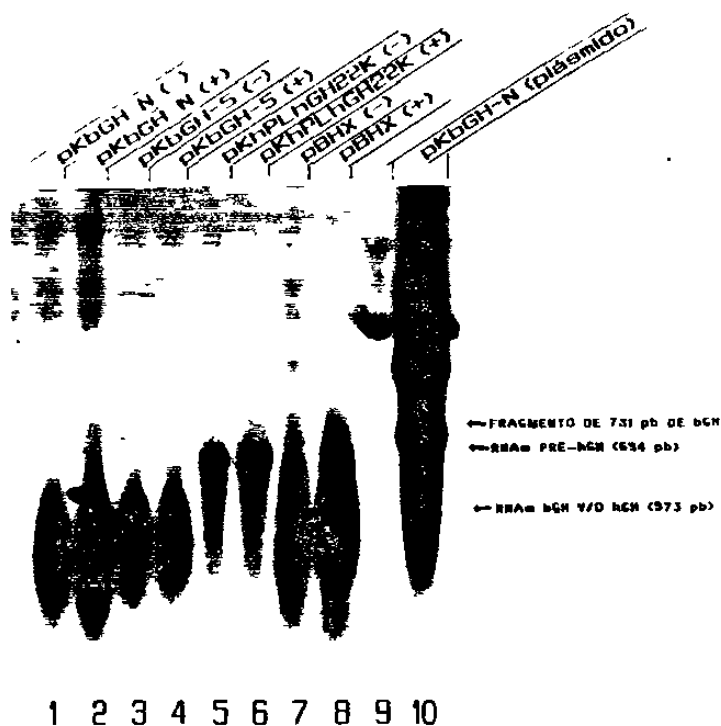


FIGURA 16. ANALISIS TIPO "NORTHERN" DE LOS RNAs DE Escherichia coli TRANSFORMADA CON LOS DIFERENTES PLASMIDOS DE EXPRESION. Separamos los RNAs en un gel agarosa-fosfatos al 1% (horizontal) usando 15 μ g de RNA de cada muestra. Los carriles 1,3,5 y 7, representan RNAs totales de cultivos en los que no agregamos IPTG. En cambio las muestras en los números 2,4,6 y 8, corresponden a RNAs de cultivos que si recibieron IPTG. El último carril (10) corresponde a 500 ng de plásmido de pKbGH-N digerido con NcoI+HindIII.

Análisis de proteínas.

a) Por poliacrilamida-SDS

Procesamos 1 ml de células obtenidas del mismo experimento usado para extracción de RNAs, las centrifugamos y resuspendimos el paquete celular en un volumen de tampón de lisis equivalente a 0.01 U de Abs/ μ l. En un primer experimento, colocamos 40 μ l de muestra de proteínas (0.4 U) por carril en un gel de poliacrilamida al 15 %. Además, agregamos en el primer carril 30 μ g de bGH purificada y en el segundo 10 μ l de marcador de PM para proteínas preteñido. Lo corrimos como se describe en métodos, y pudimos visualizar las bandas correspondientes a las proteínas totales de las bacterias además de una banda gruesa y teñida muy fuerte correspondiente a la hormona de crecimiento humana (hGH), expresada por el plásmido usado como positivo. También pudimos apreciar una banda intensa y una tenue correspondientes a la muestra de bGH purificada que usamos como testigo y marcador de tamaño de la hormona (figura 17).

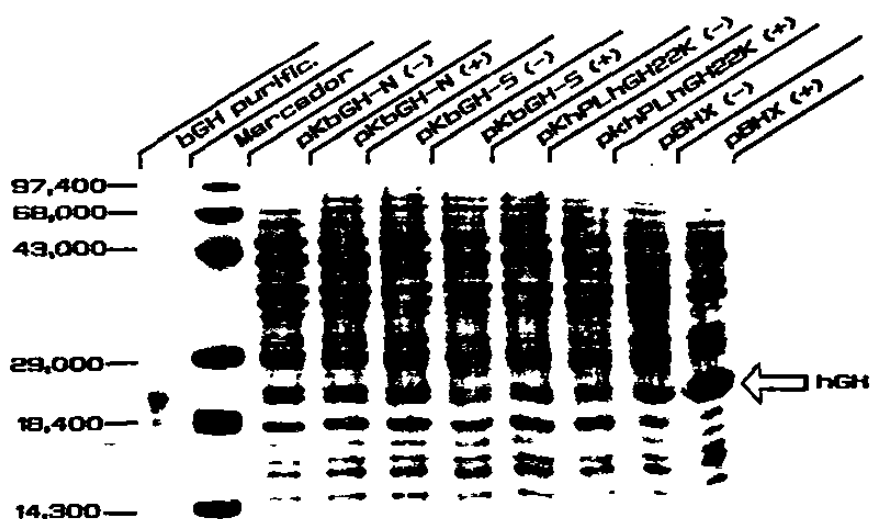


FIGURA 17. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS. Las 0.4 U de Absorbancia usadas para cada muestra las separamos en un gel de poliacrilamida-SDS al 15 %. En el primer carril pusimos 30 μ g de bGH purificada, en el segundo 10 μ l de marcador de PM pre-teñido. Los carriles 3,5,7 y 9 corresponden a proteínas de los plásmidos pKbGH-N, pKbGH-S, pKhGH22K y pBHx, respectivamente, sin inducir con IPTG. En cambio las muestras correspondientes a 4,6,8 y 10 son muestras inducidas.

La selección de la cepa bacteriana adecuada juega un papel muy importante en la expresión de proteínas heterólogas, de aquí que decidiéramos hacer un experimento en el cual transformamos otra cepa con los mismos plásmidos para saber si mejoraba la expresión. Usamos dos testigos positivos que expresan hGH 22K en abundancia, p270 y pBHx amablemente proporcionados por el Dr Daniel Baty. Se puede apreciar claramente que la expresión de hormona es mayor en W3110, siguiéndole JM101 y finalmente VG12. También incluimos el plásmido pPROKbGH, el cual consiste del vector pPROK-1 (facilitado por el Dr. Francisco Xavier Arredondo, de la Universidad de Duke en Carolina del Norte, E.U.A.). A este vector, que porta el promotor tac, le introdujimos el inserto EcoRI+HindIII del plásmido pKolibGH (ver gel en figura 18).

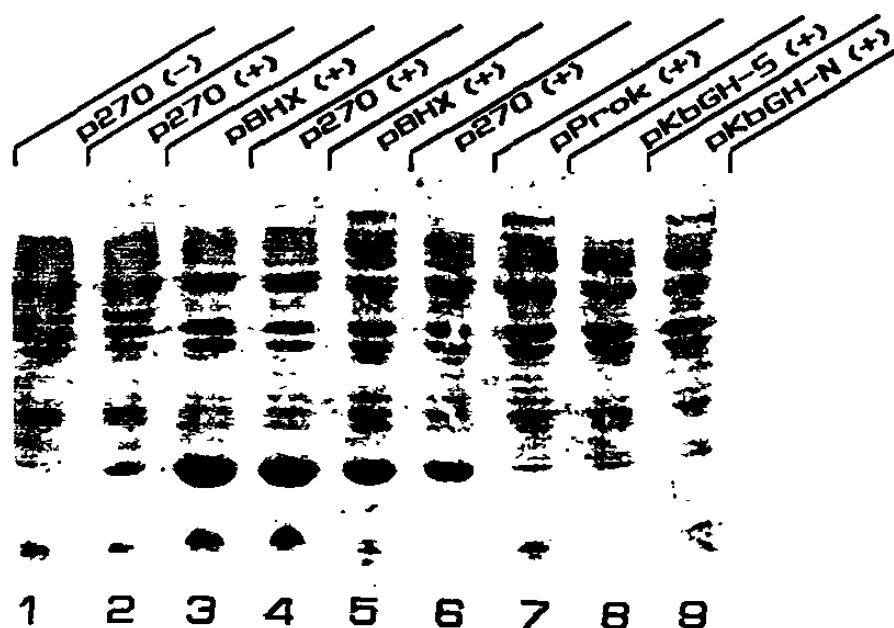


FIGURA 18. EXPRESION DE PROTEINAS EN TRES CEPAS DE *Escherichia coli*. Preparamos un gel con las mismas condiciones de la figura 18 pero en este caso con tres cepas diferentes de *E. coli*. En el carril 1 y 2 el plásmido positivo p270 sin y con inducción, respectivamente, en la cepa VG12; el 3 y 4 corresponden al plásmido pBHx y p270 inducidos, respectivamente en la cepa W3110; en el 5,6,7,8 usamos los plásmidos pBHx, p270, pProkbGH, pKbGH-S y pKbGH-N inducidos, en la cepa JM101.

b) Inmunoelctrotransferencia (Western blotting).

De la misma forma, una vez que vimos que la separación de proteínas era eficiente, y que solo los testigos positivos mostraban la hormona, decidimos usar anticuerpos y el método de inmunoelctrotransferencia, ya que el nivel de sensibilidad es mayor con esta técnica. Preparamos un gel en las mismas condiciones anteriores, pero esta vez solo usamos 10 μ l de lisado celular y 0.5 μ g de bGH purificada. En este ensayo de expresión también incluimos las proteínas de la clona portadora del plásmido pHLbGH. Este plásmido, lo construimos en pKK233-2 para probar si la sustitución de los primeros 72 pb del DNAC de bGH por los correspondientes del DNAC de lactógeno placentario (hPL3) y el péptido señal podría dar expresión de hormona híbrida. Esta misma secuencia de DNA ya fué subclonada en el vector pAVE2 y se obtuvo buena expresión en células eucarióticas (40).

Después de separar las proteínas en un gel de poliacrilamida-SDS al 15% hasta salirse el colorante indicador, las transferimos al filtro de nitrocelulosa, incubamos con el primer anticuerpo y después con el segundo. Finalmente revelamos y aparecieron las bandas mostradas en la figura 19. Se puede apreciar claramente la banda correspondiente a la hGH de BHX, que migró a la misma altura que la muestra de bGH purificada. También se aprecia una banda tenue en el testigo positivo sin inducir, lo cual nos demuestra que la represión del promotor lac no es total.

En los carriles correspondientes a los plásmidos construidos en pKK233-2 no se observan bandas a esta altura.

Análisis de la secuencia nucleotídica del inserto de pKbGH-S y el promotor p_{lac}.

Verificamos el intercambio de los primeros 71 pb codificantes para la proteína madura por el DNA sintético, mediante una técnica más fina de caracterización como es el método enzimático de análisis de secuencias de DNA (34). Este método nos permitió leer toda la región del DNA desde -251 pb hasta 581 pb (el signo negativo indica la parte río arriba o anterior al primer codón de iniciación, ATG). El DNA desde -251 a +1 corresponde al promotor, de +1 a 71 es el DNA sintético y lo que sigue es DNA natural de bGH (ver estrategia general de subclonación en fago M13 en figura 20). Los diferentes fragmentos secuenciados se muestran en las figuras 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27.

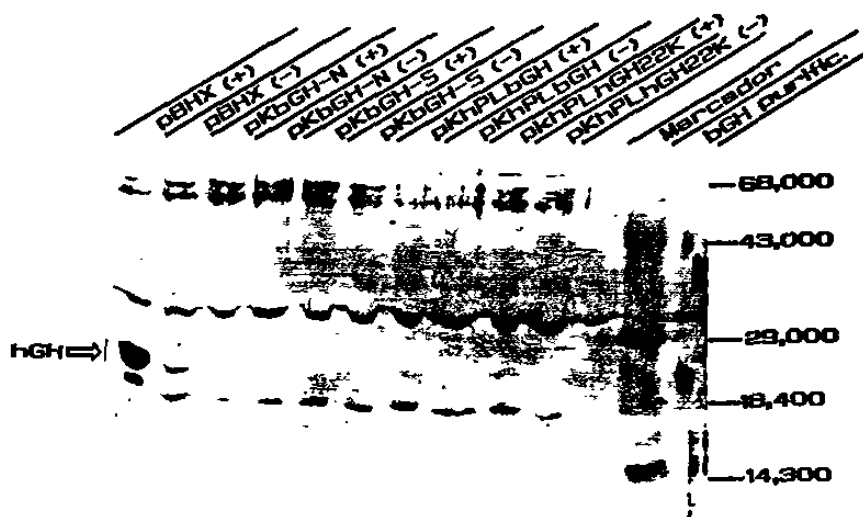


FIGURA 19. "WESTERN BLOTTING" DE LOS EXTRACTOS CELULARES DE LOS EXPERIMENTOS DE EXPRESION DE HORMONAS DEL CRECIMIENTO. Usamos 0.1 U de Abs (10 μ l) de cada muestra en cada carril. Colocamos 0.5 μ g de bGH purificada en el último carril del lado derecho; en el penúltimo, 10 μ l de marcador de PM cuyos tamaños se indican en el margen derecho. En el 1,3,5,7 y 9 corrimos 10 μ l de extracto de clonas pBHx, pKbGH-N, pKbGH-S, pKhGH22K y pKhPLbGH inducidos con IPTG, respectivamente. Las muestras en el 2,4,6,8 y 10 son de las mismas clonas, pero sin inducir.

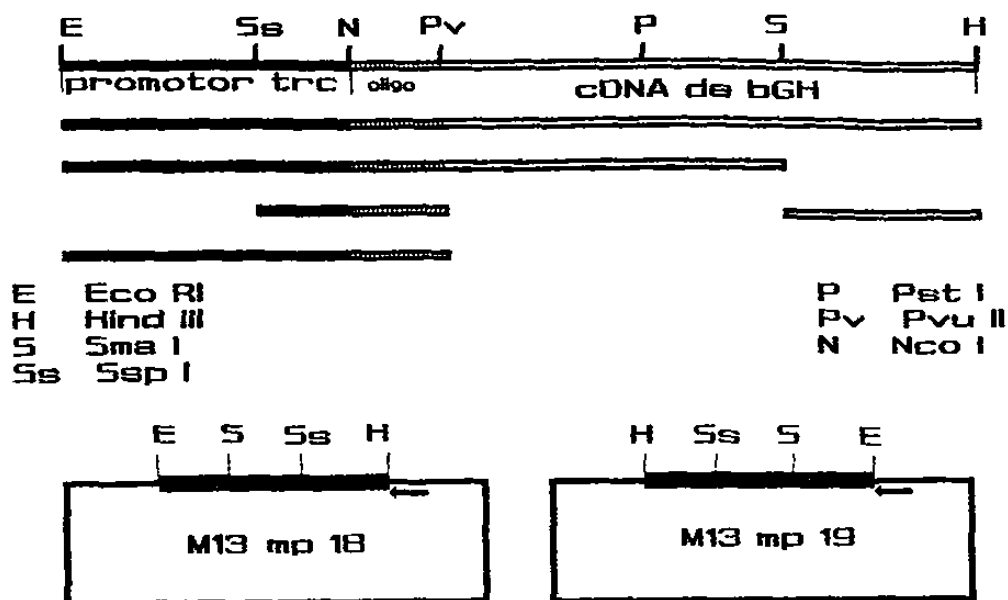
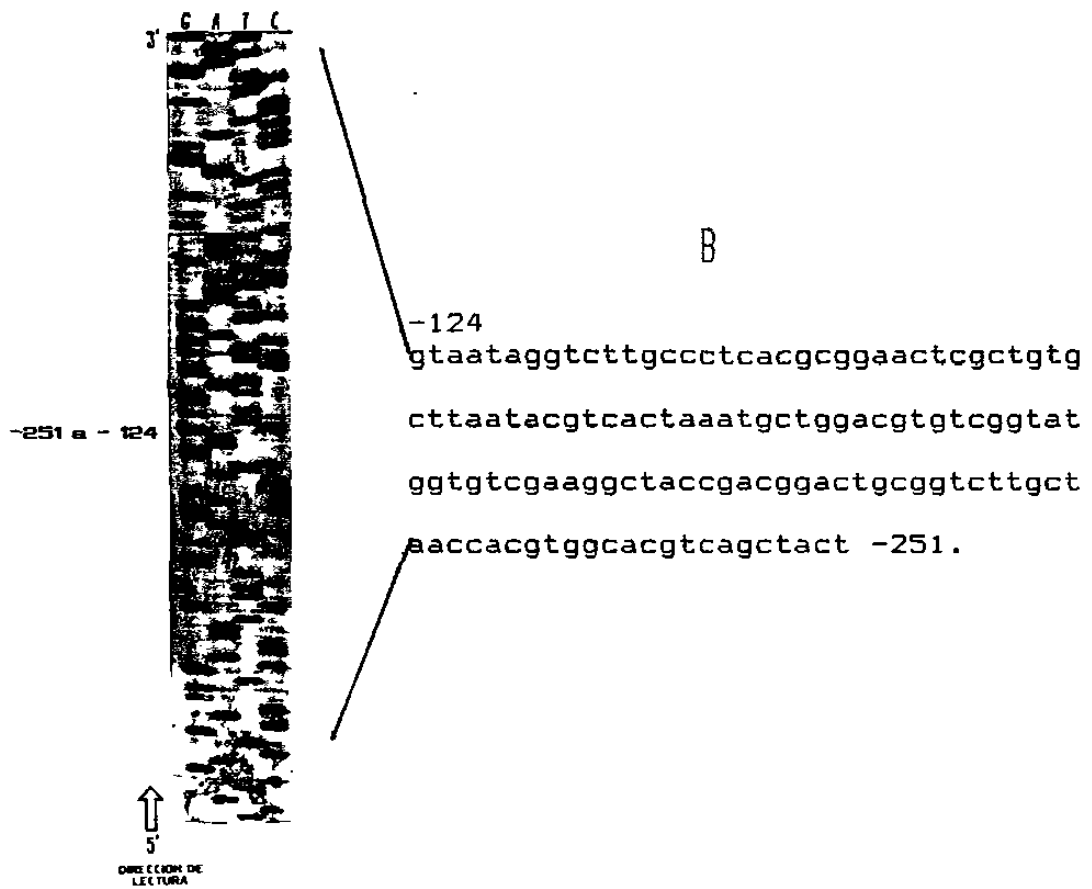


FIGURA 20. ESTRATEGIA GENERAL DE SUBCLONACION DEL DNAC EN FAGO M13. Digerimos el DNA con enzimas de restricci3n que nos generaran fragmentos de tama1o adecuado para secuenciaci3n. En la mayor1a de los casos, subclonamos en el fago M13 mp18 y cuando la lectura no era clara, introdujimos en mp19 para leer la cadena complementaria.



A .

FIGURA 21. SECUENCIA NUCLEOTIDICA DE LA REGION DEL PROMOTOR Ptac DE -251 a -124. En la figura A mostramos el gel de secuenciación al 6 %, leyendo de abajo hacia arriba se avanza desde el nucleótido -251 hasta el -124 del promotor. En B se muestra la secuencia nucleotídica leída en el gel de la figura A. En este fragmento no encontramos discrepancia con la misma región reportada originalmente.

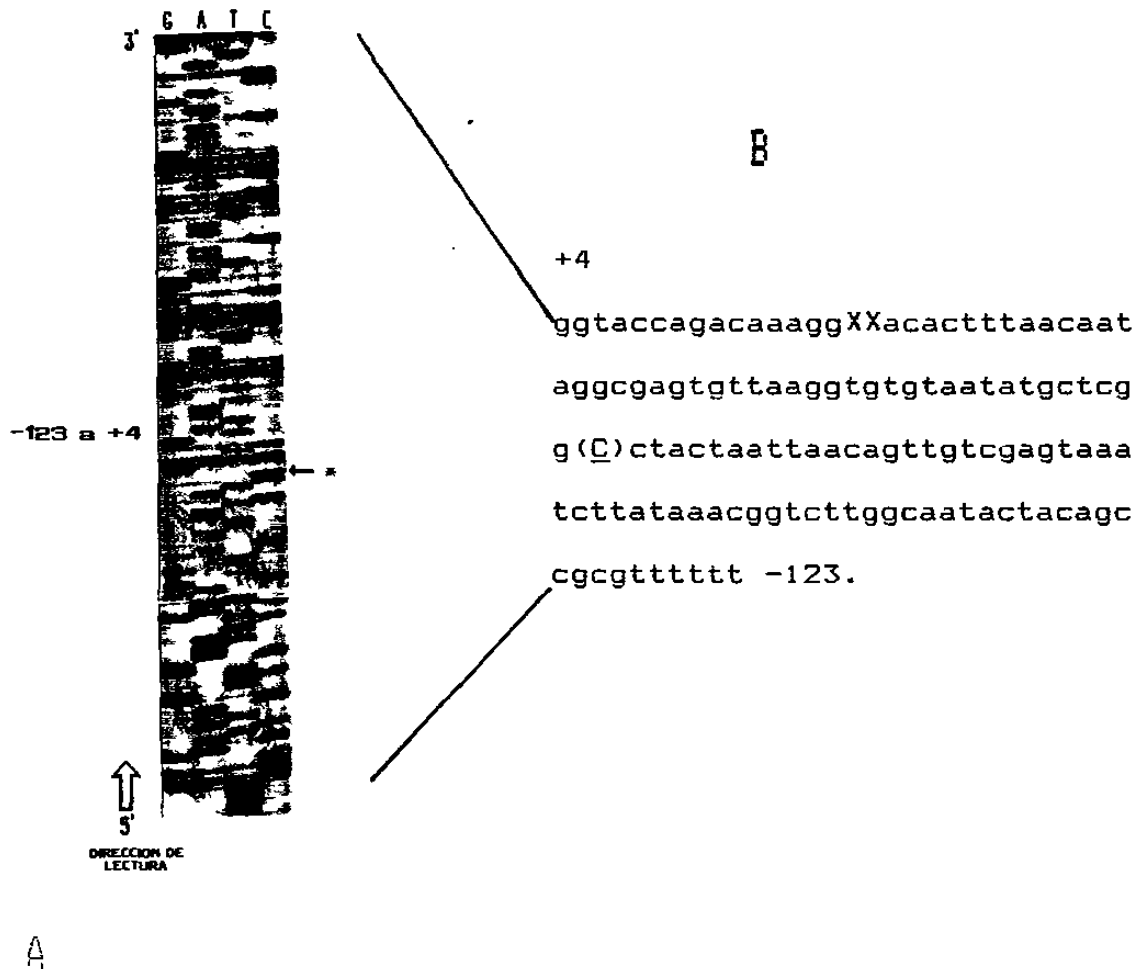


FIGURA 22. SECUENCIA NUCLEOTIDICA DE LA REGION DEL PROMOTOR Ptac DE -123 A +4. En la figura A mostramos el gel de secuenciación al 6 %, leyendo de abajo hacia arriba se avanza desde el nucleótido -123 hasta el +4 del promotor. En B se muestra la secuencia nucleotídica leída en el gel de la figura A. En este fragmento encontramos 3 mutaciones (inserción de C en -156 y delección de CA en -13) al comparar dicha secuencia leída con la misma región reportada del promotor. Las delecciones las representamos con X mayúscula en negritas y la inserción entre paréntesis en mayúsculas y negritas.

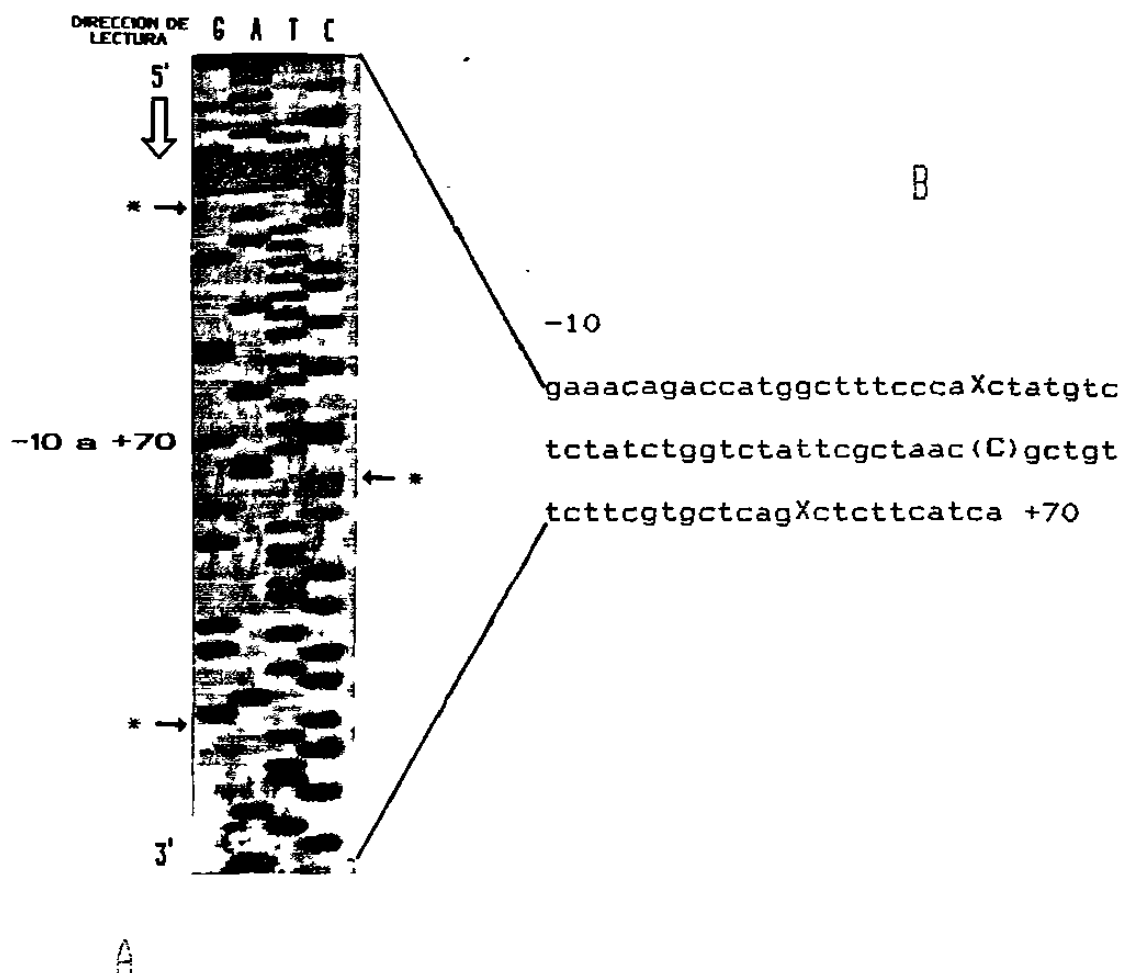


FIGURA 23. SECUENCIA NUCLEOTIDICA DE LA REGION 5' DEL DNAC DE bGH -10 A +70. En la figura A mostramos el gel de secuenciación al 6 %, leyendo de abajo hacia arriba se avanza desde el nucleótido -10 del promotor hasta el +70 del DNAC de bGH. En B se muestra la secuencia nucleotídica leída en el gel de la figura A. En este fragmento encontramos 3 mutaciones (delección de una G, inserción de una C y delección de una A), respectivamente. Las delecciones las representamos con X mayúsculas en negritas y las inserciones con mayúsculas y negritas entre paréntesis.

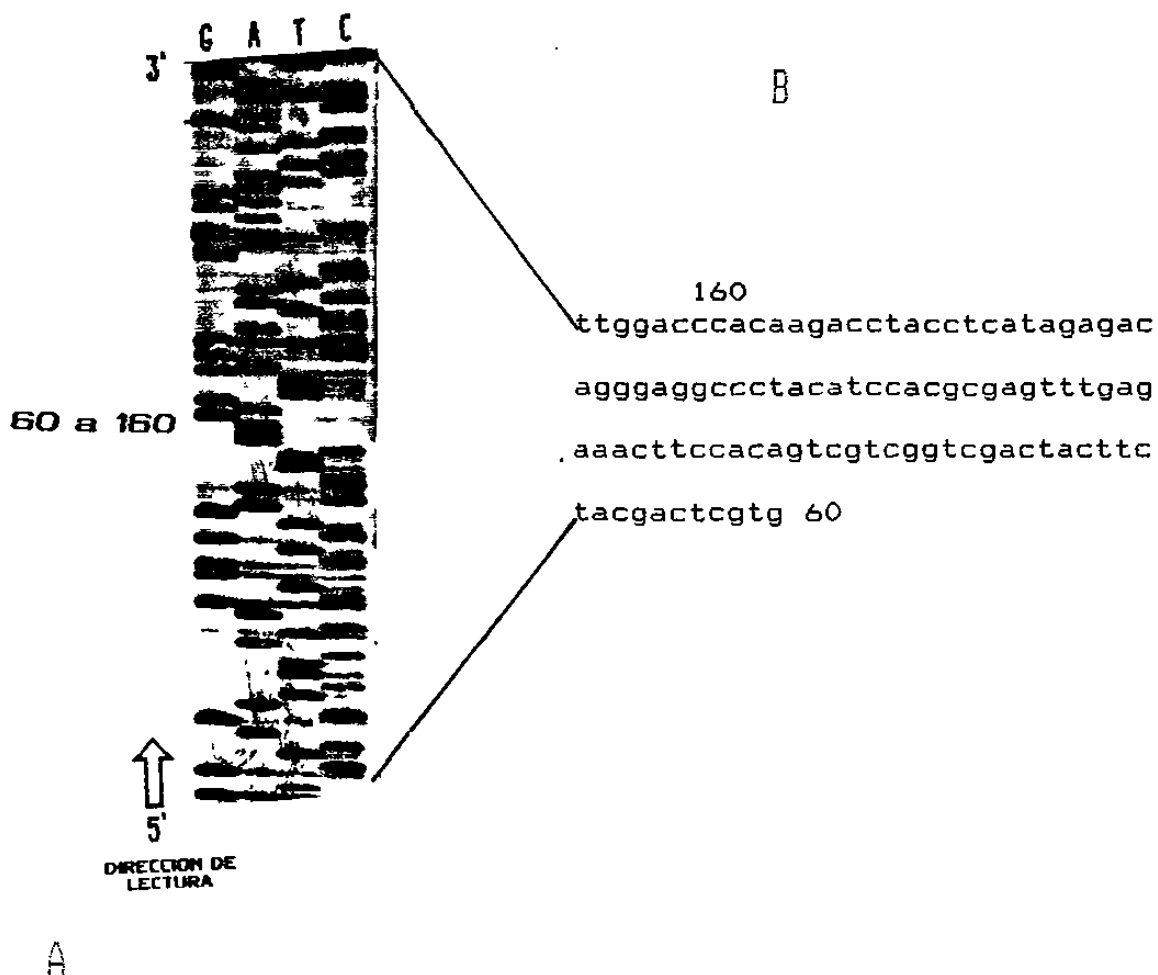


FIGURA 24. SECUENCIACION DEL DNAc DE bGH DESDE EL NUCLEOTIDO 60 A 160. Este fragmento lo subclonamos en M13 mp19 y separamos los productos de la reacción de secuenciación en un gel al 6 %. No se observan mutaciones al comparar la secuencia con la esperada. En A mostramos la radiografía del gel de secuenciación y en B la secuencia obtenida.

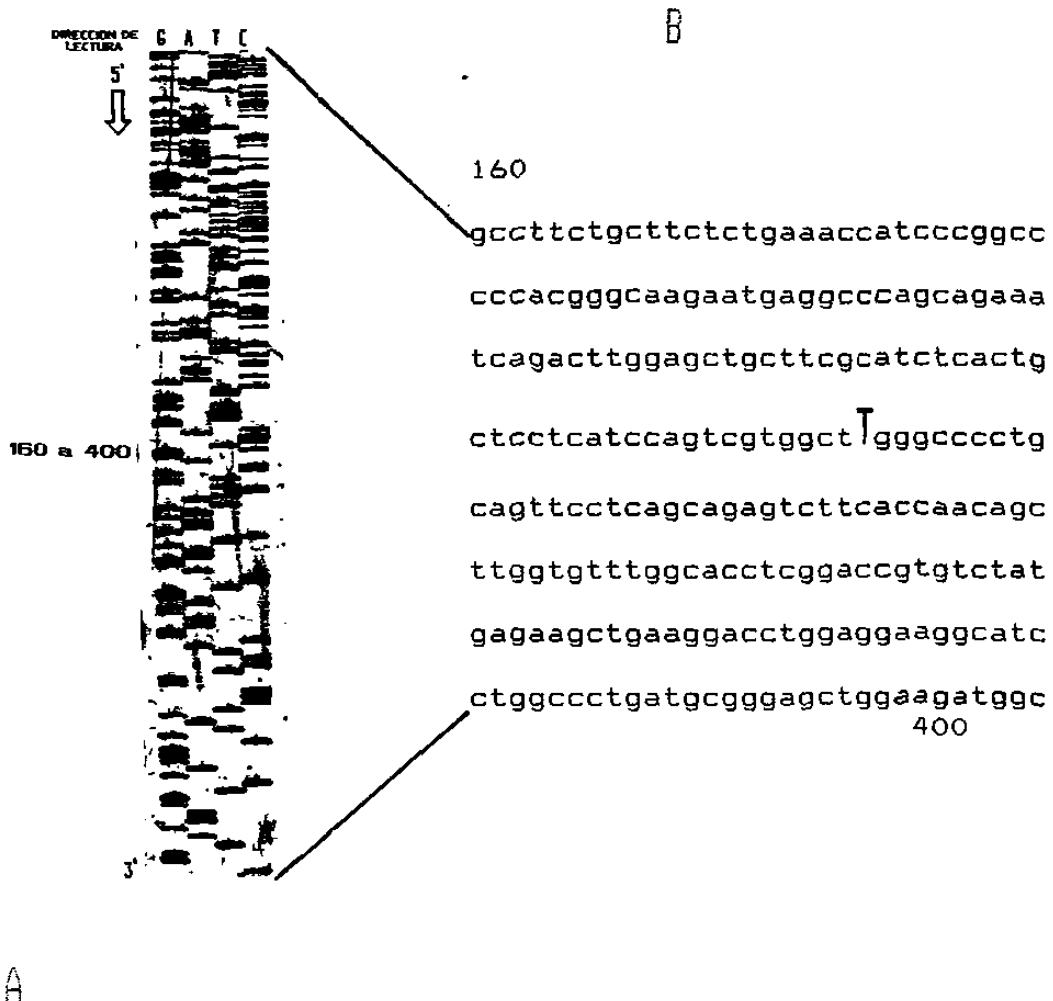


FIGURA 25. SECUENCIA NUCLEOTIDICA DESDE LAS POSICION 160 HASTA 400 DEL DNAC DE bGH. Con esta construcción en M13 logramos leer aproximadamente 240 pb un una sola dirección, encontrando una sustitución en la tercera posición del codón **CTC** para dar lugar **CTT**, el cual codifica para el mismo aminoácido: leucina. En la figura A se muestra la radiografía del gel de secuenciación y en B la secuencia obtenida. La sustitución se representa en letra grande y en negritas en posición 271.

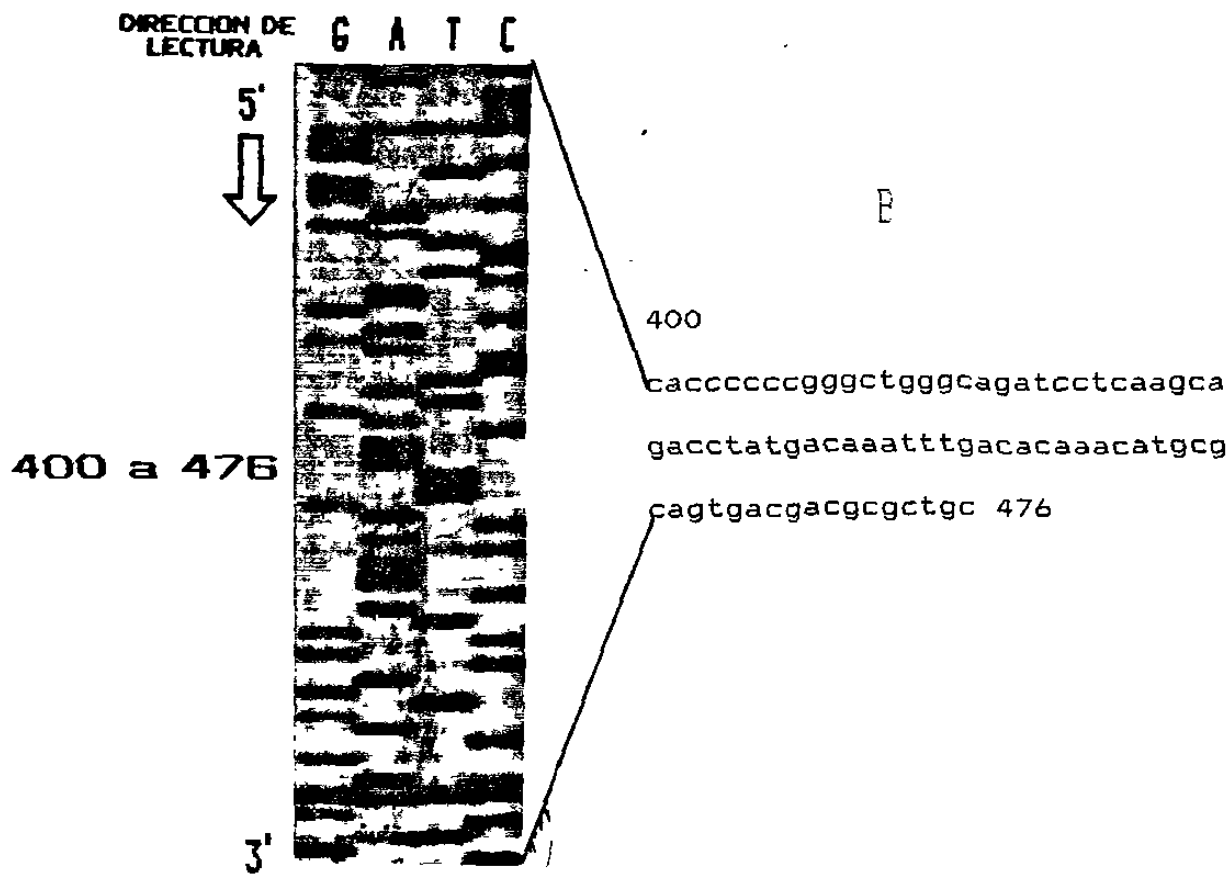


FIGURA 26. SECUENCIA NUCLEOTIDICA DESDE LA POSICION 400 HASTA LA 476. Aquí tampoco encontramos discrepancia en la secuencia leída con la ya reportada. En la figura A representamos la radiografía del gel de secuenciación y en B la lectura en el orden que se indica con flechas.

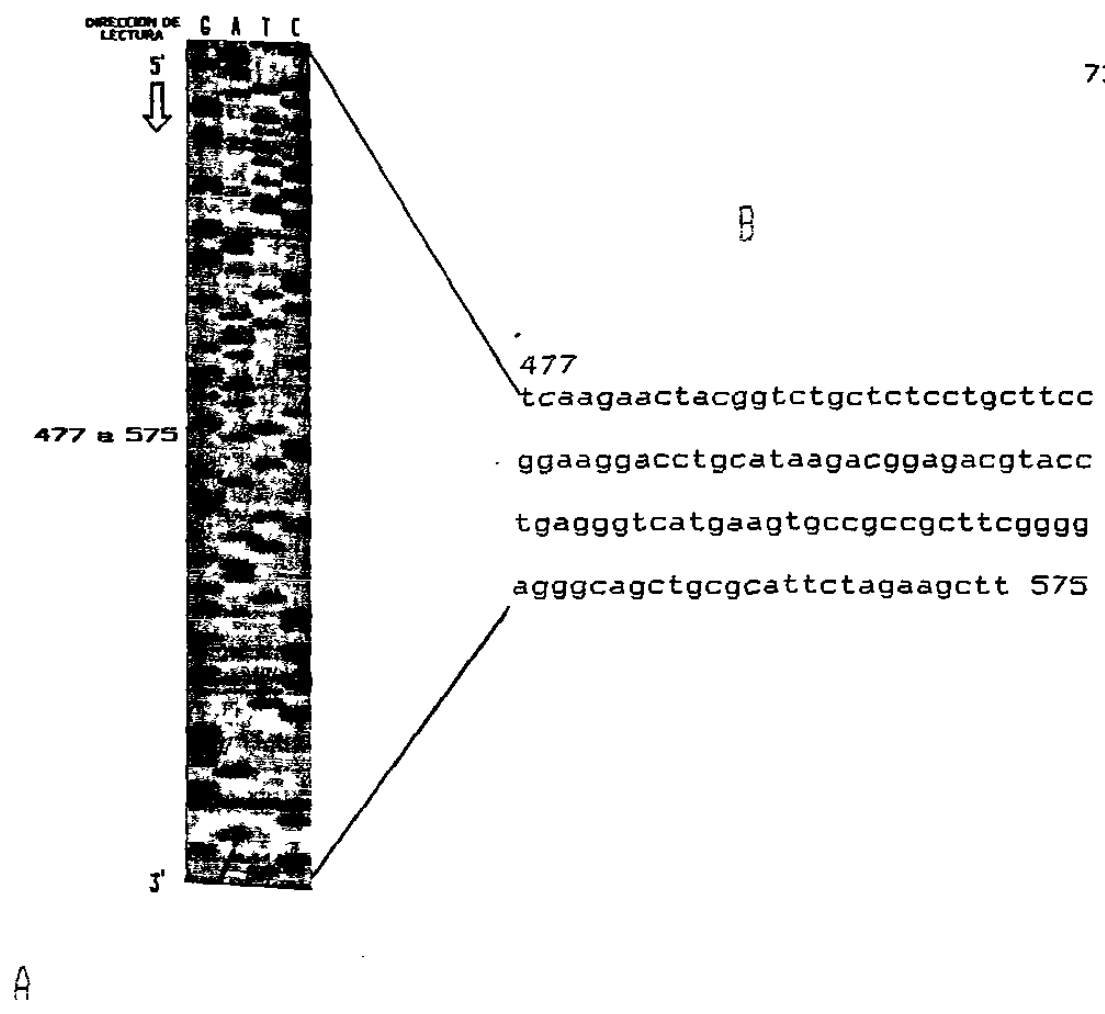


FIGURA 27. SECUENCIA NUCLEOTIDICA DESDE 477 HASTA 575 DEL DNAC DE bGH. Las muestras de la reacción enzimática las separamos en un gel al 8 %, lo que nos permitió leer hasta la posición 575 con exactitud. No encontramos diferencias al comparar la secuencia leída con la reportada. En A mostramos el la película de rayos X del gel y en B la lectura en la dirección indicada.

-250

catcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcatgcagccatcggaagctgtggtat
 ggctgtgcaggtcgtaaataactgcataaattcgtgtcgcctcaaggcgcactcccgttctg
 gataatgttttttgcgccgacatcataacggttctggcaaataattctgaaatgagctgtt
 gacaattaatcatc(C)ggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcac
 () C.I
 () aggaacagaccatggctttccca()ctatgtctctatctggctctattcgctaa(C
)cgctgttcttcgtgctcagc()tcttcatcagctggctgctgacaccttcaaagagttt
 gagcgcatacatcccggaggacagagatactccatccagaacacccaggttgccttctg
 cttctctgaaaccatcccggccccacgggcaagaatgaggcccagcagaaatcagactt
 ggagctgcttcgcatctcactgctcctcatccagtcgtggcTtgggcccctgcagttcct
 cagcagagtcttcaccaacagcttgggtgtttggcacctcggaccgtgtctatgagaagct
 gaaggacctggaggaaggcatcctggccctgatgcgggagctggaagatggcaccccccg
 ggctgggcagatcctcaagcagacctatgacaaatttgacacaaacatgcgcagtgacga
 cgcgctgctcaagaactacggctctgctctcctgcttccggaaggacctgcataagacgga
 Gacgtacctgagggctcatgaagtgccgccgcttcggggaggccagctgcgcatcttag C.T

FIGURA 28. RESUMEN DE LAS MUTACIONES ENCONTRADAS EN EL DNA SECUENCIADO. La figura muestra la secuencia correspondiente al promotor y el DNAc de bGH modificado. En la comparación de las secuencias encontramos discrepancia en seis posiciones. Las deleciones las representamos con paréntesis, las inserciones las marcamos en negritas entre paréntesis y finalmente las sustituciones en mayúsculas y negritas. C.I.= codón de iniciación; C.T.= codón de terminación. La parte correspondiente al DNA sintético está subrayada.

IV. DISCUSION

Durante el presente trabajo construimos una serie de plásmidos de expresión con el fin de expresar en *E. coli* los DNACs de bGH y hGH. Cabe mencionar que ya existe el antecedente de expresión de estos DNACs en células en cultivo en nuestro laboratorio⁽⁴⁰⁾. El primer plásmido que construimos (pKbGH-N) con el DNAC nativo de bGH nos permitió detectar altos niveles de RNAm en el "Northern", aunque no detectamos la proteína en los geles de poliacrilamida y con anticuerpos.

En segundo plásmido (pKbGH-S) sustituimos con el fragmento de DNA sintético los primeros codones del DNAC con el fin de expresar o mejorar la expresión de este DNAC.

También incorporamos el DNAC de hGH 22K en este vector pKK233-2 para estar en posibilidades de detectar bajos niveles de la hormona por radioinmunoensayos.

En todos los plásmidos construídos, se pudo apreciar un buen nivel de transcripción de RNAs mensajeros para las hormonas (en el caso de hGH los niveles de RNAm fueron más bajos). Estos resultados nos permitieron afirmar que el proceso transcripcional es eficiente y que los ensayos de expresión los realizamos adecuadamente, evidenciado esto último el alto nivel de expresión del plásmido usado como testigo positivo. También nos permitió saber que nuestro método de extracción de RNAs bacterianos funciona satisfactoriamente.

Uno de los factores que mas influyen para construir un buen plásmido de expresión es que el promotor sea regulable de manera eficiente, esto es, que el nivel máximo de represión versus el nivel máximo de inducción difieran por más de 1000 órdenes de magnitud⁽³⁷⁾. La regulación del promotor de nuestros plásmidos no es eficiente (como se puede apreciar en la figura 16), ya que aunque la mancha correspondiente al testigo negativo (sin inducir) de los plásmidos pKbGH-N, pKhPLhGH22K y pBHx es menor, no deja de ser indicativo de que el promotor se sigue expresando. Esta falta de regulación estricta del promotor puede ser debida a que el plásmido por ser multicopia, de origen a más copias del operador lac de las que pueden ser reguladas eficientemente por las moléculas del represor⁽³⁸⁾.

Asimismo, la presencia de moléculas del tipo del inductor IPTG como contaminantes de los medios de cultivo puede causar que el nivel de transcripción basal sea muy alto en sistemas basados en el promotor-operador triptófano-lactosa⁽³⁹⁾.

Desde la construcción de las primeras moléculas recombinantes de DNA para producir proteínas en *E. coli*, la causa principal de la baja o nula expresión de las proteínas ha sido de tipo traduccional y podría ser quizá debido a factores tales como

la presencia de codones no usuales en bacterias y las estructuras secundarias del transcrito de RNAm que interfieren con el inicio de la traducción⁽⁴⁰⁾. Se ha descrito^(18,34,35) que dentro de la secuencia de DNA de bGH existen regiones nucleotídicas que previenen su alto nivel de expresión en E. coli.

La determinación de la secuencia nucleotídica de toda la región involucrada en la expresión de RNAs y proteínas nos permitió detectar dos mutaciones dentro de la región promotora, de las cuales una queda fuera de la región consenso del promotor y la otra entre la posición -35 y -10. De acuerdo al nivel de transcripción detectado en nuestros experimentos, estas mutaciones no tienen efecto en la producción de mensajeros para las hormonas; en cambio, las tres mutaciones puntuales dentro del oligo (dos deleciones y una inserción) cambian la fase de lectura para dar lugar probablemente a un producto aberrante. Al revisar el corrimiento de fase de lectura en la secuencia nucleotídica no encontramos la generación de un codón de terminación prematuro que diera lugar a una proteína de tamaño menor.

Debido a las mutaciones presentes en el DNA sintético usado, esta opción de expresión de bGH queda abierta para ser explorada con más detalle, ya con un análisis de secuencia de varios oligos de los usados en el presente trabajo, se podría localizar uno o más con la secuencia correcta y entonces proceder a clonarlo en uno de los plásmidos construídos para este propósito.

V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Como resultado del trabajo desarrollado podemos concluir que:

- a) Se producen niveles considerables RNAm para bGH (secuencia natural y modificada) y niveles bajos en los RNAm de hGH 22K.
- b) Los RNAm producidos no son traducidos a proteínas en los casos de los DNAs clonados en pKK233-2, al menos a niveles que nos permitan su detección con las técnicas aquí empleadas.
- c) La maquinaria traduccional funciona eficientemente en los casos de los plásmidos usados como testigos positivos, p270 y pBHX.
- d) El promotor trc no es regulado ya que los niveles de RNAm en las clonas sin inducir son muy similares a los observados en los experimentos donde se indujo el promotor.
- e) Los ensayos de expresión los llevamos a cabo correctamente, como lo demuestra la buena expresión tanto a nivel de RNAm como de proteínas obtenidas con los plásmidos usados como testigos positivos.
- f) La secuencia nucleotídica desde el promotor hasta el extremo 3' del DNA de bGH, presenta un total de seis mutaciones (dos inserciones y cuatro deleciones), de las cuales tres están localizadas dentro de la región del promotor y las otras tres en la región del DNA correspondiente al DNA sintético.
- g) Las mutaciones en el DNA sintético (dos deleciones y una inserción) podrían causar un corrimiento en la fase de lectura de una base dando lugar a una proteína aberrante.
- h) Montamos y estandarizamos la metodología de secuenciación de DNA y desarrollamos un método eficiente para la extracción de RNA bacteriano.

Como se mencionó anteriormente las posibles causas de la falta de expresión a nivel de proteínas pueden tener su origen en problemas con:

- 1) La secuencia nucleotídica de la región de unión al ribosoma (SD).
- 2) La distancia entre la secuencia de unión al ribosoma y el codón de inicio de la traducción.
- 3) Las secuencias nucleotídicas río arriba de la región de unión al ribosoma que afectan la eficiencia en la traducción del RNAm.
- 4) Las secuencias inmediatamente río arriba del codón de inicio de la traducción, mismas que afectan profundamente la eficiencia de traducción de los RNAm.
- 5) La composición de los codones enseguida del AUG de inicio de

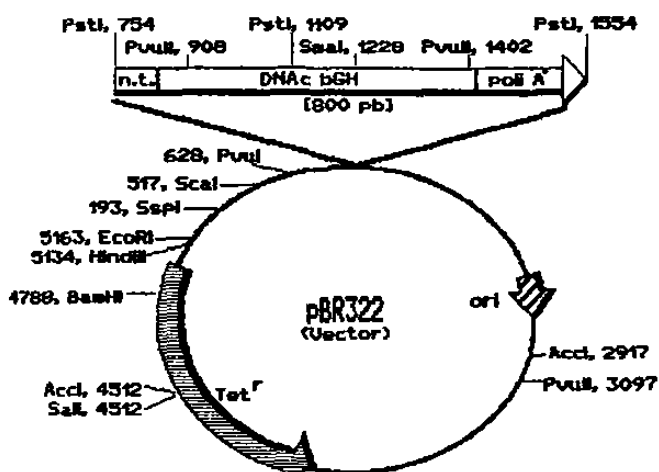
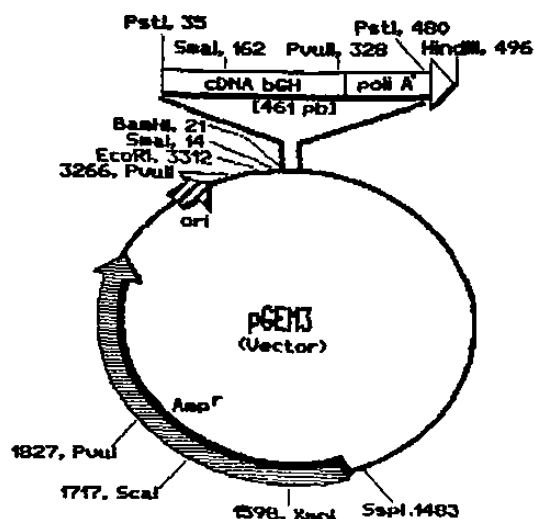
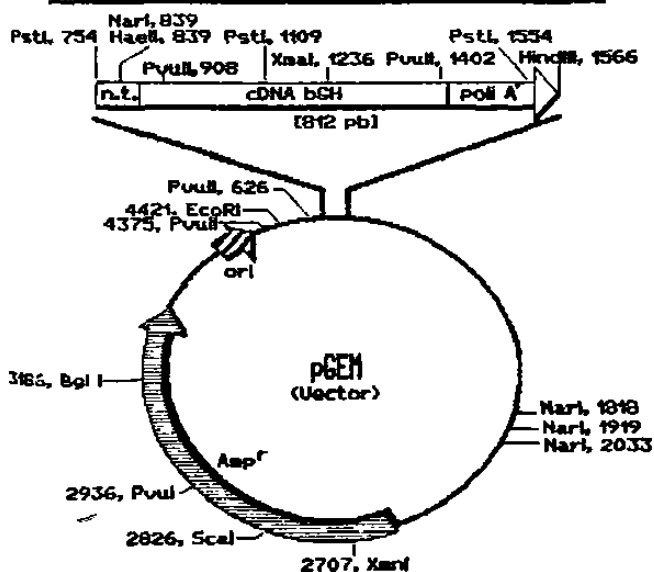
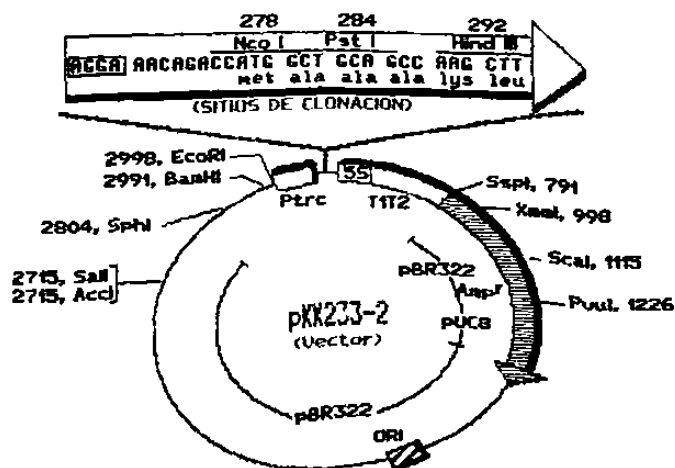
la traducción y sus efectos sobre la traducción. (se).

Dentro de las estrategias implementadas en nuestro grupo para buscar resolver los bajos niveles de traducción se encuentran los siguientes:

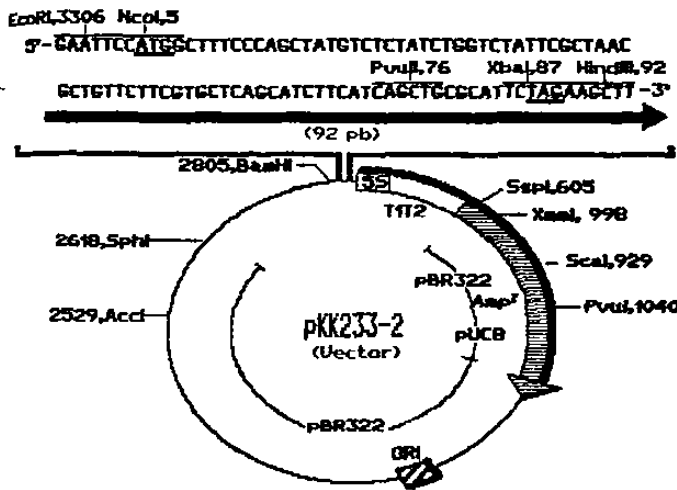
- i) Producir bGH como proteína de fusión.
- ii) Clonar el DNAC de bGH enfrente del promotor P_L y a otra región de unión al ribosoma del fago lambda.
- iii) Determinar la secuencia nucleotídica de varias de las clonas portadoras del DNA sintético que mandamos construir para este trabajo, con el fin de definir si las mutaciones detectadas están presentes desde su síntesis o surgieron durante la clonación. Se sabe ahora que es común que aproximadamente el 70% de los oligos sintéticos puedan sufrir mutaciones al momento de su síntesis (comunicación personal del Dr. Daniel baty).

VI. APENDICE

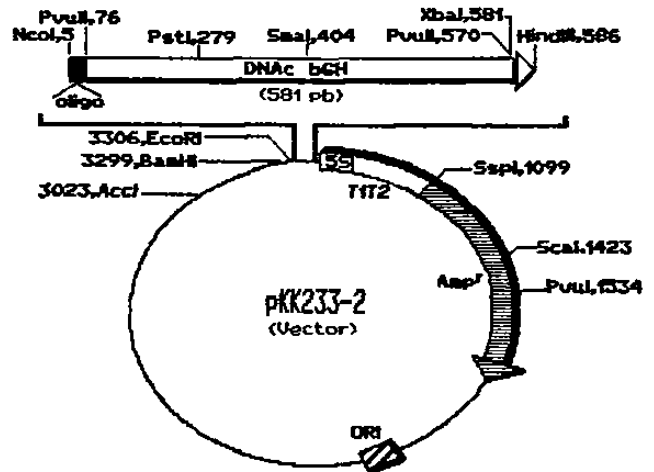
Plásmidos involucrados en el presente trabajo, p63, pGEM³bGH, pDRhGH22K y pAVE2hGH20K ya eran parte de la genoteca de la ULIEG. Los otros plásmidos que se indican en las estrategias de trabajo se generaron para el cumplimiento de los objetivos planteados.

PLÁSMIDO p63 (5163 pb), INSERTO: DNAC DE bGHPLÁSMIDO pGEM³bGH (3312 pb), INSERTO: 3' DEL DNAC DE bGHPLÁSMIDO pGEM¹bGH (4421 pb), INSERTO: DNAC DE bGHPLÁSMIDO pKK1AccI (2998 pb), SIN SITIO Pvu II

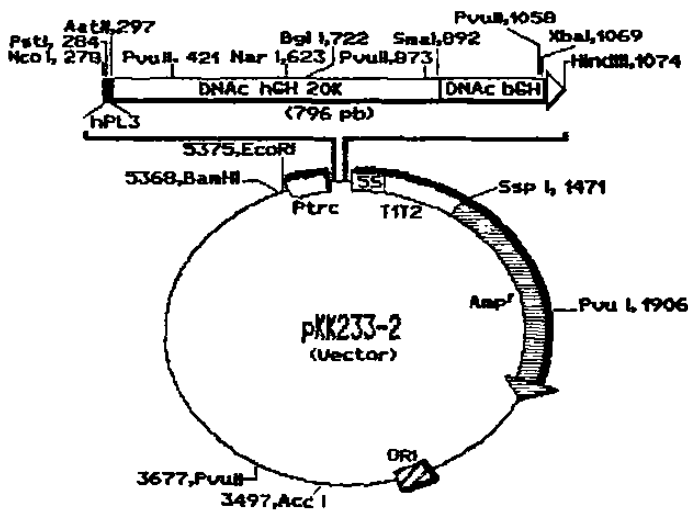
PLASMIDO pKKOLIGO (2812 pb), INSERTO: OLIGO SINTETICO



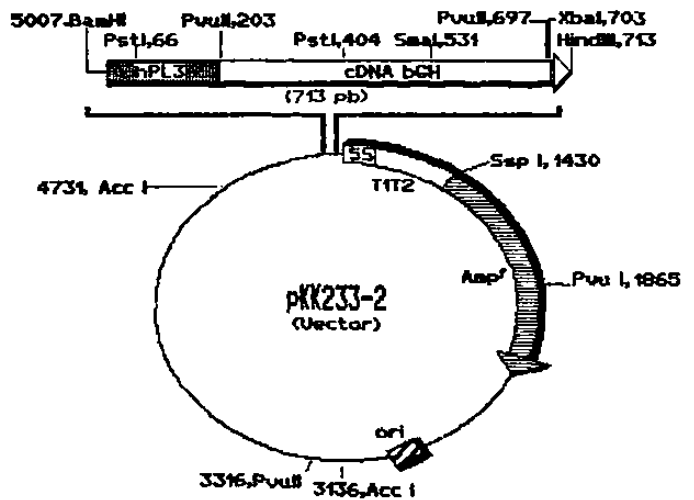
PLASMIDO pKOLbGH (3306 pb), INSERTO: DNAC DE bGH MODIFICADO



PLASMIDO p20kbGH (5375 pb), INSERTO: DNAC hGH 20k-bGH



PLASMIDO pHPLbGH (5007 pb), INSERTO: DNAC hPL-bGH



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Watson, J.D., Tooze, J. y Kurtz, D.T. (1983). Recombinant DNA: A short course. Scientific American Books. W.H. Freeman y Co. New York, N.Y.
2. Jackson, D., Symons, R. y Berg, P. (1972). Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus SV40: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69:2904-2909.
3. Cohen, S., Chang, A., Boyer, H. y Helling, R. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70:3240-3244.
4. Chen, E.Y., Liao, Y-C., Smith, D.H., Barrera-Saldaña, H.A., Gelinas, R.E. y Seeburg, P.H. (1989). The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. Genomics. 4:479-497.
5. Woychik, R.P., Camper, S.A., Lyons, R.H. y Horowitz, S. (1982). Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. Nucl. Acids Res. 10: 7197-7220.
6. Paladini, A.C., Peña, C. y Poskus, E. (1983). Molecular biology of growth hormone. CRC Crit. Rev. Biochem. 15:25-56.
7. Juskevich, J.C. y Guyer, C.G. (1990). Bovine growth hormone: Human food safety evaluation. Science. 249:875-884.
8. Pursel, V.G., Miller, K.F., Pinkert, C.A., Palmiter, R.D. y Brinster, R.L. (1987). Development of 1 cell and two cell pig ova after microinjection of genes. J. Animal. Sci. 65(suppl. 1):402. abstract.
9. Gill, J.A., Sumpter, J.P. y Donaldson, E.M. (1985). Recombinant chicken and bovine growth hormone accelerate growth in aquacultured juvenile pacific salmon Oncorhynchus kitutch. Bio/technology. 3: 643-646..
10. Seeburg, P.H., Shine, J., Martial, J.A., Baxter, J.D. y Goodman, H.M. (1977). Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone. Nature. 279:486-495.
11. Martial, J.A., Hallewell, R.A., Baxter, J.D. y Goodman, H.M. (1979). Human Growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. Science. 205:602.
12. Goeddel, D.V., Heyneker, H.L., Hozumi, T., Anentzen, R., Itakura, K., Yansura, D.G., Ross, M.J., Miozzari, G., Crea, R. y Seeburg, P.H. (1979). Direct expression in Escherichia coli of a DNA sequence coding for human growth hormone. Nature. 281:544.
13. Miller, W.L., Martial, J.A. y Baxter, J.D. (1980). Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. J. Biol. Chem. 255: 7521-7524.
14. Seeburg, P.H., Sias, S., Adelman, J., de Boer, H.A., Hayflick, J. y Jhurani, P. (1983). Efficient bacterial expression of bovine and porcine growth hormone. DNA. 2: 37-45.
15. Souza, L.M., Boon, T.C., Murdock, D., Langley, k., Wypych,

- J., Fenton, D. y Johnson, S., (1984). Application of recombinant DNA technologies to studies on chicken growth hormone. *The Journal of Experimental Zoology*. 232: 465-473.
16. Chen, H.T., Pan, F.M. y Chang, W.C. (1988). Purification of duck growth hormone and cloning of the complementary DNA. *Biochemica et Biophysica Acta*. 949:247-251.
 17. Yamano, Y., Oyabayashi, K., Okuno, M., Yato, M., Kioka, N., Manabe, E., Hashi, H., Sakai, H., Komano, T., Utsumi, K. y Iritani, A. (1988). Cloning and sequencing of cDNA that encodes goat growth hormone. *FEBS LETTERS*. 228:301-304.
 18. Wallis, O.C. y Wallis, M. (1989) Production of plasmids giving high expression of recombinant DNA-derived ovine growth hormone variants in Escherichia coli. *FEBS LETTERS*. 250: 371-376.
 19. Sekine, S., Muzukami, T., Nishi, T. y Kuwana, Y. (1985). Cloning and expression of DNA for salmon growth hormone in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82: 4306-4310.
 20. Gonzales-Villaseñor, L. I., Zhang, P., chen, T.T. y Powers, D.A. (1988). Molecular cloning and sequencing of coho salmon growth hormone cDNA. *Gene*. 65: 239-246.
 21. Johansen, B., Johansen, O.C. y Valla, S. (1989). The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from Atlantic salmon (Salmo salar). *Gene*. 77: 317-324.
 22. Sato, N., Watanabe, K., Murata, K., Sakaguchi, M., Kariya, Y., Kimura, S., Nonaka, M. y Kimura, A. (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence of tuna growth hormone cDNA. *Biochimica et Biophysica Acta*. 949: 35-42.
 23. Koren, Y., Sarid, S., Ber, R. y Daniel, V. (1989). Carp growth hormone: molecular cloning and sequencing of cDNA. *Gene*. 77: 309-315.
 24. Agellon, L.B. y Chen, T.T. (1986). Rainbow trout growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in Escherichia coli. *DNA*. 5. 462-471.
 25. Saito, A., Sekine, S., Komatsu, Y., Sato, M., Hirano, T. y Itoh, S. (1988). Molecular cloning of eel growth hormone cDNA and its expression in Escherichia coli. *Gene*. 73:545-551.
 26. Schonher, B.E., Belajage, R.M. y Schonher, R.G. (1990). Enhanced translational efficiency with two-cistron expression system. *Methods in Enzymology*. 185:94-103.
 27. Ramabhadran, T.V., Reitz, B.A. y Shab, D.M.. (1985). High level expression of the bovine growth hormone gene in heterologous mammalian cells. *Gene*. 111-118.
 28. Pasleau, F., Tocci, M., Leung, F. y Kopchick, J.J.. (1985). Growth hormone gene expression in eukaryotic cells directed by the Rous-sarcoma virus long terminal repeat or cytomegalovirus immediate early promoter. *Gene*. 38: 227-232..
 29. Leung, F.C., Bowen, D.L. y Chandler, D.P., (1990). Construction of a biologically active recombinant DNA plasmid containing a mouse methallothionein promoter and genomic bovine growth hormone gene. *Nucl. Acids. Res*. 18:4948.

30. Kopchic, J.J., Malavarca, R.H., Livelli, T.J. y Leung, F.C.. (1985). Use of avian retroviral bovine growth hormone DNA recombinants to direct expression of biologically active growth hormone by cultured fibroblasts. *DNA*. 4: 23-31.
31. Mcgrane, M.M., de Vente, J., Yun, J., Bloom, J., Park, E., Wynshaw-Boris, A., Wagner, T., Rottman, F.M. y Hanson, R.W. (1988). Tissue specific expression and dietary regulation of a chimeric phosphoenolpyruvate carboxikinase/ bovine growth hormone gene in transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry*. 263(23): 11443-11451.
32. Keshet E., Rosner A., Berstein Y., Gorecki M. y Aviv H. (1981). Cloning of bovine growth hormone gene and its expression in bacteria. *Nucl. Acids Res.* 9: 19-21.
33. Schoner, B.E., Hsiung, H.M., Belagaje, R.M., Mayne, N.G. y Schoner, R.G. (1984). Role of mRNA translational efficiency in bovine growth hormone expression in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81:5403-5407.
34. George, H.J., L'italien, J.J., Pilacinski, W.P., Glassman, D.L. y Krzyzek, R.A. (1985). High-Level Expression in Escherichia coli of Biologically Active Bovine Growth Hormone. *DNA*. 4. 273-281.
35. Buell, G.N. (1987). DNA sequences, recombinant DNA molecules and processes for producing bovine growth hormone-like polypeptides in high yield. United States Patent, No. 4,693,973.
36. Keith, P.M. y Cain, W.J. (1988). Fermentation process for the high level production of bovine growth hormone. United States Patent, No. 4,762,784.
37. Amaya-Manzanares, F. (1989). Obtención del DNA complementario al RNA Mensajero de la Hormona de Crecimiento Bovina. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. UANL.
38. Rincón-Limas, D.E., (1990). Clonación de los DNAs Complementarios que Codifican para las Hormonas de Crecimiento de Origen Hipofisiario Humano en Escherichia coli. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, U.A.N.L.
39. Ramírez-Solis, R., Reséndez-Pérez, D., Alvidrez-Quihui, L.E., Rincón-Limas, D.E., Varela-Martínez, R., Martínez-Rodríguez, H.G. y Barrera-Saldaña, H.A. (1990). New Vectors for the Efficient Expression of Mammalian Genes in Cultured Cells. *Gene*, 87:291-294.
40. Alvidrez-Quihui, L.E. (1990). Subclonación y Expresión Transitoria de los DNAs Complementarios de las Hormonas de Crecimiento Humana y Bovina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL.
41. Pharmacia, Molecular Biologicals
42. Amann, E. y Brosius, J. (1985). ATG vectors for regulated High-Level Expression of Cloned Genes in Escherichia coli. *Gene*. 40. 183-190.
43. Wallis, O.C. y Wallis, M. (1989) Production of plasmids giving high expression of recombinant DNA-derived ovine growth hormone variants in Escherichia coli. *FEBS LETTERS*. 250: 371-376.

44. Hanahan, D. (1983). Studies on Transformation of Escherichia coli with Plasmids. J. Mol. Biol. 166:557.
45. Morelle, G. (1989). A plasmid extraction procedure on a miniprep scale. Focus 11:7-8.
46. Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual I. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York. 1.21.
47. Gobel, U., Maas, R., Bantel-Schal, U. y Clad, A. (1987). Rapid and quantitative electroelution and electro dialysis of DNA from gels. J. Biochem. Biophys. Methods. 4:245-260.
48. Wallace, D.M. (1987). Methods in Enzymology. (Berger, S.L. y Kimmel, A.R. eds). Academic Press. New York. New York, USA. 93. vol. 152: 41-43.
49. BIO 101, Inc. GENE CLEAN kit.
50. Rosen, JM., Woo, S.L.C., Holder, J.W., Means, A.R. y O'Malley, B.W. (1975). Preparation and preliminary characterization of purified ovalbumin messenger RNA from the hen oviduct. Biochemistry. 14:69-78.
51. McMaster, G.K. y Carmichael, G.G. (1977). Analysis of single and double stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 74:4835-4838.
52. Thomas, P.S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:5201-5205.
53. Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. (1983). A Technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132:6-13.
54. Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum, Anal. Biochem. 137:266-267.
55. Towin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrilamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76. 4350-4354.
56. Sanger, F. (1977). Determination of Nucleotide Sequence in DNA. Science. 214. 1205-1210.
57. Balbas, P. y Bolivar, F. (1990). Design and construction of expression plasmid vectors in Escherichia coli. Methods in Enzymology. 185:14-37.
58. Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. y Dubendorff, W. (1990). Use of T7 RNA polimerase to direct expression of cloned genes. Methods in Enzymology. 185: 60-89.
59. Ge, A.Z., Pfister, R.M. y Dean, D.H. (1990). Hyperexpression of Bacillus turingiensis delta-endotoxin-encoding gene in Escherichia coli: properties of the product. Gene. 93:49-54.
60. De Boer, H.A. y Hui, A.S. (1990). Sequences within ribosome binding site affecting messenger RNA translatability and methods to direct ribosomes to single messenger RNA species. Methods in Enzymology. 185:103-114.

