



**"CLONACION MOLECULAR DE LOS DNAS  
COMPLEMENTARIOS QUE CODIFICAN PARA  
LAS HORMONAS DE CRECIMIENTO DE ORIGEN  
HIPOFISIARIO HUMANO EN ESCHERICHIA COLI"**

**T E S I S**

**PRESENTADA A MAESTROS Y ESTUDIANTES  
DE LA ESCUELA DE GRADUADOS DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA DE LA  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA MEDICA**

**POR**

**DIEGO ENRIQUE RINCON LIMAS**

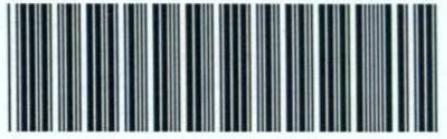
**MONTERREY, N. L., MEXICO ABRIL 1990**

TM

QP624

R5

c.1



1080071405

**"CLONACION MOLECULAR DE LOS DNAs COMPLEMENTARIOS QUE  
CODIFICAN PARA LAS HORMONAS DE CRECIMIENTO DE ORIGEN  
HIPOFISIARIO HUMANO EN ESCHERICHIA COLI"**

**Por**

**DIEGO ENRIQUE RINCON LIMAS**

**T E S I S**

**Presentada a Maestros y Estudiantes de la Escuela de  
Graduados de la Facultad de Medicina de la Universidad  
Autónoma de Nuevo León.**

**Como requisito parcial para obtener el grado de :**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**Con especialidad en Microbiología Médica**

**Monterrey, N.L., México**

**Abril 1990**



**BIBLIOTECA**

TM  
Q P624  
R5





**BIBLIOTECA**



BIBLIOTECA

**"CLONACION MOLECULAR DE LOS DNAs COMPLEMENTARIOS QUE  
CODIFICAN PARA LAS HORMONAS DE CRECIMIENTO DE ORIGEN  
HIPOFISIARIO HUMANO EN ESCHERICHIA COLI"**

**Por**

**DIEGO ENRIQUE RINCON LIMAS**

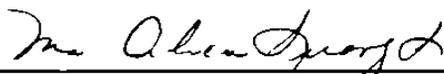
**El Comité de Tesis:**



**Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla**



**Dr. Hugo A. Barrera Saldaña**



**M.C. Ma. Alicia Suárez Semour**

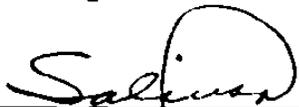


**Dra. Herminia G. Martínez Róz.**



**M.C. Irma Salinas González**

**Aprobó:**



**Dr. Mario Cesar Salinas Carmona  
Secretario de Ciencias Básicas  
de la Escuela de Graduados de  
la Fac. de Medicina de la U.A.N.L.**

**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 de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.**

**INDICE**

Indice .....	i
Dedicatorias .....	iii
Agradecimientos .....	iv
Lista de abreviaturas .....	v
Lista de figuras .....	vi
<b>I. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCION .....</b>	<b>2</b>
a) Ingeniería Genética y Clonación molecular .....	2
b) Ingeniería Genética y Salud .....	4
c) Antecedentes particulares .....	5
d) Justificación .....	9
<b>III. OBJETIVOS E HIPOTESIS .....</b>	<b>10</b>
<b>IV. MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>12</b>
a) Origen de los reactivos .....	12
b) Material biológico .....	12
c) Métodos .....	13
Extracción de RNA total por el método de isotiocianato . de guanidina-fenol-cloroformo .....	13
Electroforesis de RNA en geles de agarosa-urea-ácido ...	15
Hibridación de RNA-DNA en gota seca .....	16
Aislamiento de RNAs mensajeros poli A <sup>+</sup> por cromatografía de afinidad en columnas de celulosa oligo-dT .....	18
Síntesis de DNA's complementarios .....	20
Electroforesis en geles alcalinos de agarosa .....	23
La estrategia de clonación. Digestión enzimática de los DNA's complementarios con <u>Aat</u> II y <u>Xma</u> I .....	24
Selección y preparación del vehículo de clonación .....	25
Purificación del vector de clonación a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión .....	25
Clonación molecular de los DNA's complementarios .....	27
Hibridación tipo Southern .....	28
Transformación de bacterias con DNA plasmídico .....	29
Minipreparaciones de plásmidos por el método de lisis .. alcalina .....	31
Hibridación de DNA en gota seca .....	32
Crecimiento de plásmidos a mediana escala .....	33
Caracterización enzimática de los plásmidos portadores del DNAC de hGH .....	34
Electroforesis en geles de poliacrilamida .....	35
Electroelución de DNA a partir de geles de..... poliacrilamida .....	36
Caracterización del DNAC de hGH con enzimas de .....	
restricción diagnósticas .....	37
Subclonación en fagos M13 .....	37
Transformación de bacterias con DNA fágico .....	39

Transformación de bacterias con DNA fágico .....	39
Preparación de templados de DNA de cadena sencilla .....	40
Secuenciamiento de nucleótidos por el método de Sanger .	41
<b>V. RESULTADOS</b> .....	44
Extracción de RNA total de hipófisis humanas .....	44
Detección de secuencias codificantes para hGH .....	46
Aislamiento de RNA's mensajeros poli A <sup>+</sup> .....	46
Síntesis de los DNA's complementarios .....	49
Una nueva estrategia de clonación .....	49
Tamizaje de los plásmidos recombinantes .....	52
pDRhGH3, pDRhGH7 y pDRhGH10: plásmidos portadores del... DNAC de hGH .....	55
Los insertos de DNAC en los plásmidos .....	58
Se logra también la clonación del DNAC de hGH 20 Kd ....	58
Subclonación en vectores fágicos de la serie M13 .....	61
Determinación de la secuencia nucleotídica y su análisis computacional .....	63
<b>VI. DISCUSION</b> .....	68
<b>VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....	70
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA</b> .....	72

**DEDICATORIAS**

Con todo mi amor a mis padres Dr. Enrique Rincón Zamudio y Sra. Leonor Limas de Rincón, por su inmenso cariño y su incesante apoyo y como un tributo a sus consejos, sus desvelos y sus sacrificios.

A mi tía Laura Limas Rodríguez, a quien debo gran parte de lo que soy, en reconocimiento a todo lo que ha hecho por mi familia.

Con cariño a mis hermanos Gloria, Mily, Jose Luis y Juan, por todas las alegrías y sin sabores que hemos compartido juntos.

Con eterna gratitud a mis tíos Dr. Adán Limas Rodríguez y Sra. Oralia García de Limas y a mis primos Gerardo, Mayela, Mireya, Mauro y Alejandro, por el invaluable apoyo que me otorgaron durante mis estudios.

Y en forma muy especial a Jovis, por todo el aliento que me brindó durante la realización del presente trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis, Dr. Hugo Barrera Saldaña, quien con su carácter recio y firme me enseñó a pensar, analizar, discernir y decidir por mi mismo en este difícil pero siempre fascinante campo de la investigación.

Al Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla y al personal docente del Departamento de Microbiología, por sus enseñanzas y sabios consejos.

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

A la Dirección y al Grupo Satélite de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, por su incondicional apoyo.

Mi sincero agradecimiento a la Secretaría de Educación Pública por haberme honrado con una beca para realizar estudios de postgrado.

De igual manera al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme concedido una beca-Tesis.

Al personal del Anfiteatro del Hospital Universitario "Dr. José E. González", por su valiosa cooperación.

A mis compañeros de laboratorio: Diana, Ramiro, Felipe, Herminia, Paty, Eddy, Alfredo, Manuel, Victor, Jaime, Rocío, Ataúlfo, Claudio, Irma y Raúl, por su inquebrantable amistad.

A los doctores Grady F. Saunders y Randy Lejerski por haberme facilitado sus respectivos laboratorios para la realización de algunos experimentos.

Al Instituto de Genética Molecular del Baylor College of Medicine por proporcionarme el material necesario para la impresión de este trabajo.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	....	Adenosin trifosfato
°C	....	Grados centígrados
cm	....	Centímetro
cols	...	Colaboradores
cpm	....	Cuentas por minuto
CTP	....	Citidin trifosfato
DEP	....	Dietil pirocarbonato
DNAc	...	DNA complementario
dNTP	...	Desoxinucleósido trifosfatado
ddNTP	..	Dideoxinucleósido trifosfatado
DO	....	Densidad óptica
EDTA	...	Acido etilendiamin tetracético
g	....	Gramo
GTP	....	Guanosin trifosfato
h	....	Hora
hGH	....	Hormona de crecimiento humana
hPL	....	Hormona lactogénica placentaria
IPTG	...	Isopropil tio-β-D-galactósido
Kd	....	Kilodaltones
Kg	....	Kilogramo
M	....	Molar
min	....	Minuto
ml	....	Mililitro
mm	....	Milímetro
mM	....	Milimolar
μCi/μl	.	Microcuries por microlitro
μg	....	Microgramo
μl	....	Microlitro
ng	....	Nanogramo
nm	....	Nanómetro
nmol	...	Nanomoles
pb	....	Pares de bases
pH	....	Logaritmo negativo de la concentración de H <sup>+</sup>
rpm	....	Revoluciones por minuto
s	....	Segundo
S	....	Unidades Svedverg
SSC	....	Solución salina citratos
SDS	....	Lauril sulfato de sodio
TTP	....	Timidin trifosfato
UV	....	Ultravioleta
V	....	Voltios
X	....	Veces la concentración
xg	....	Veces la gravedad
X-gal	..	5-Bromo-4-Cloro-3 indolil-β-D galactopiranósido

## LISTA DE FIGURAS

Frontispicio ‡ Pag.	Título
1 6	Procesamiento del RNAm de hGH.
2 11	Mapa de restricción del DNAc de hGH.
3 45	Caracterización electroforética de RNA's extraídos de tejidos humanos.
4 47	Hibridación en gota seca de phPL815( <sup>32</sup> P) contra RNA's de placenta, hígado e hipófisis humana.
5 48	Análisis electroforético de RNA's de hipófisis humanas.
6 50	Análisis de los DNA's complementarios de hipófisis humanas.
7 51	Preparación del plásmido pUC19 para la clonación del DNAc de hGH.
8 53	Clonación molecular del DNAc de hGH en el plásmido pUC19.
9 54	Perfil electroforético de los plásmidos recombinantes.
10 56	Detección de los plásmidos portadores del DNAc de hGH.
11 57	Análisis de restricción de los plásmidos portadores del DNAc de hGH.
12 59	Digestión de los plásmidos portadores del DNAc de hGH con <u>Xma</u> I y <u>Aat</u> II.
13 60	Análisis de restricción de los DNAc's de hGH 20 y 22 kd.
14 62	Comparación de mapas de restricción de los DNAc's de hGH.
15 64	Subclonación de un fragmento del DNAc de hGH en el fago M13mp18.
16 65	Determinación de la secuencia nucleotídica del DNAc de hGH.
17 67	Análisis computacional de la secuencia nucleotídica del DNAc de hGH.