



**"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"

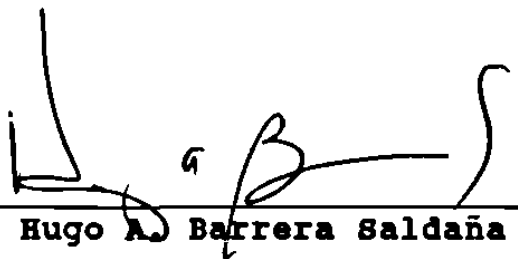
Por

DIEGO ENRIQUE RINCON LIMAS

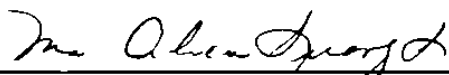
El Comité de Tesis:



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
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
a) Ingeniería Genética y Clonación molecular	2
b) Ingeniería Genética y Salud	4
c) Antecedentes particulares	5
d) Justificación	9
III. OBJETIVOS E HIPOTESIS	10
IV. MATERIALES Y METODOS	12
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 ⁺ 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
V. RESULTADOS	44
Extracción de RNA total de hipófisis humanas	44
Detección de secuencias codificantes para hGH	46
Aislamiento de RNA's mensajeros poli A ⁺	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
VI. DISCUSION	68
VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	70
VIII. BIBLIOGRAFIA	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 ⁺
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(³² 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.