

I) RESUMEN.

La hormona de crecimiento humana (hGH) es una proteína con un amplio espectro fisiológico y terapéutico. En la práctica clínica, la hGH ha sido utilizada para el tratamiento de pacientes que sufren de hipopituitarismo, hipoglicemia, fracturas de huesos, quemaduras de la piel y úlceras. Recientemente se demostró que algunos pacientes que habían recibido hGH de origen hipofisiario fallecieron como consecuencia de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob lo cual motivó a la producción de hGH de origen recombinante. Dado que la hGH disponible en nuestro país es ya insuficiente para satisfacer la demanda de los pacientes que la requieren, y puesto que cada día es más difícil importarla, emprendimos el presente trabajo.

Utilizando técnicas de Ingeniería Genética y partiendo de los ácidos ribonucleicos mensajeros (RNAm) que extrajimos a partir de tejido hipofisiario humano, construimos moléculas de DNAs complementarios (DNAc). Posteriormente diseñamos una estrategia para enriquecer el DNAc de hGH y favorecer su inserción en el plásmido pUC19. Los plásmidos obtenidos de esta manera fueron propagados en Escherichia coli para generar una bacterioteca recombinante. Por hibridación de DNA en gota seca detectamos tres clonas positivas. Después de un minucioso análisis de restricción descubrimos que dos de las clonas (pDRhGH3 y pDRhGH7) portaban el DNAc de hGH de 22 Kd, mientras que la otra (pDRhGH10) portaba el DNAc de la variante hGH de 20 Kd. Por el método enzimático de Sanger determinamos la secuencia nucleotídica del DNAc de hGH con lo cual inequívocamente demostramos su identidad e integridad plena. Esta es la primera vez que se logra la obtención de los DNAs complementarios de ambas formas de hGH hipofisiaria en un solo paso de clonación preferencial.

II) INTRODUCCION.

A partir de la última década hemos presenciado una revolución en los campos de la Biología Moderna. Esta revolución no solo ha sido el resultado de un avance instrumental o un progreso en el conocimiento teórico, sino mas bien fue consecuencia de la aplicación de una variedad de técnicas colectivamente denominadas **Ingeniería Genética** o **tecnología del DNA recombinante**. Esta tecnología implica la manipulación y recombinación in vitro del material genético de diferentes organismos para crear nuevas combinaciones genéticas, lo cual puede lograrse actualmente en días o semanas y no a través de millones de años como lo ha venido haciendo la naturaleza.

El impacto que en la ciencia básica ha causado la Ingeniería Genética ha sido dramático, ya que grandes enigmas de la Biología Molecular han sido o están siendo elegantemente dilucidados. Pero junto a estos estudios fundamentales, lo que mas interesa al mundo médico o comercial es que la Ingeniería Genética proporciona los medios para producir en abundancia sustancias escasas o difíciles de extraer del organismo humano y que representan un ilimitado valor terapéutico o diagnóstico. En la actualidad, el aislamiento de un gen que gobierna la síntesis de una proteína de interés para la medicina, no plantea ya muchos problemas al investigador. Gracias a un esfuerzo técnico sin precedentes, cualquier laboratorio puede aplicar la tecnología del DNA recombinante puesto que se dispone comercialmente de todo lo necesario, a veces incluso en forma de paquetes listos para ser usados, lo cual se ha reflejado en un desarrollo vertiginoso de esta nueva y prometedora biotecnología.

a) Ingeniería Genética y clonación molecular.

El descubrimiento del código genético como base química de la herencia así como las técnicas enzimáticas capaces de modificar al DNA, han ampliado el espectro de investigaciones básicas en áreas como la Genética, la Bioquímica, la Microbiología y la Biología Molecular. Como una consecuencia de ello, en la actualidad es posible reprogramar el legado genético de los microorganismos al gusto del investigador.

El éxito de este suceso depende, en principio, de la disponibilidad de un amplio repertorio de enzimas que actúan sobre los ácidos nucleicos. Se requiere básicamente de enzimas para cortar, unir y modificar el DNA. Los cortes sobre la molécula de DNA fueron posibles gracias al descubrimiento de una serie de proteínas denominadas enzimas de restricción. Estas son endonucleasas capaces de reconocer secuencias

precisas de DNA y de provocar una escisión a nivel de ellas. Un fragmento de DNA originado por la acción de una enzima de restricción puede ser específicamente cortado por la acción sucesiva de una o mas enzimas. Los fragmentos obtenidos de esta manera pueden ser analizados para generar un mapa de restricción, el cual funciona como una cartilla de identidad para la molécula de DNA que se está inspeccionando. La disponibilidad de un gran número de enzimas de restricción y de DNA ligasas (enzimas que unen segmentos de DNA) hace factible tratar a una determinada secuencia génica como un módulo, de tal manera que se pueda mover de una molécula de DNA a otra en forma premeditada.

Puesto que pueden hacerse las mismas operaciones de corte y ligación en dos DNA's de orígenes distintos pero que han sido producidos por la acción de una misma enzima de restricción, resulta posible insertar un fragmento cualquiera de DNA extraño en un vector de clonación (plásmidos o bacteriófagos) proceso conocido como **clonación molecular**. Una vez hecha la recombinación del material genético, basta luego con introducir las moléculas recombinantes a células apropiadas, de tal manera que puedan amplificarse al utilizar la maquinaria sintetizadora de DNA de la célula huésped. A este respecto los plásmidos son los vectores mas utilizados para la clonación en Escherichia coli. Estos son pequeñas moléculas de DNA circular con replicación independiente que existen naturalmente en algunas bacterias y que les confieren, por lo regular, resistencia a un antibiótico. Durante el mencionado proceso de clonación, y cuando se trata de clonar todo el DNA del genoma celular, se originan miles de clonas bacterianas cada una de las cuales acarrea un recombinante con un inserto de DNA diferente. A esta colección de clonas se le conoce como banco de DNA genómico o genoteca. El siguiente paso es identificar la clona que contiene el plásmido deseado para lo cual se requiere el empleo de un fragmento de DNA cuya secuencia de nucleótidos sea complementaria al gen de interés, de tal manera que pueda ser utilizado como sonda radiactiva para detectar, mediante hibridación de ácidos nucleicos y autorradiografía, a la bacteria que porta el plásmido recombinante que interesa al investigador.

Una estrategia alternativa para simplificar el proceso de clonación de secuencias génicas es seleccionar aquellas secuencias de DNA transcritas a RNA mensajero (RNAm). Esto es, en un grupo celular dado, de los cientos de miles de genes existentes en el genoma sólo unos cuantos miles son copiados a RNAm. La obtención de un banco que sea representativo de los RNAm de estas células contiene pues menos miembros distintos y estarían más representados aquellos RNAm característicos del tejido en cuestión. Lo anterior se lleva a cabo purificando los RNAm y a partir de cada una de esas moléculas se fabrica una copia de DNA conocida como **DNA complementario (DNAc)**. La

clave para formar el DNA complementario es la enzima transcriptasa inversa. Dicha enzima cataliza la síntesis de una cadena de DNA complementario a una plantilla de RNAm. El DNAc monocatenario proveniente de la acción de la transcriptasa inversa, puede convertirse ahora a DNAc de doble cadena mediante un tratamiento con las enzimas RNasa H y DNA polimerasa. Los DNAs complementarios así obtenidos son más estables y más manipulables que los RNAm y pueden insertarse en algún vector de clonación dependiendo de la estrategia y los propósitos del investigador, para generar así finalmente lo que se conoce como un "banco de DNAs complementarios".

b) Ingeniería Genética y Salud.

Existe un buen número de productos biológicos de uso en la medicina cuya utilidad en el tratamiento y prevención de muchas enfermedades se ha visto severamente limitada por dos razones principales: 1) las concentraciones tan bajas en que estos productos se hallan presentes en sus fuentes naturales y 2) la insuficiente disponibilidad de las fuentes naturales de estos productos.

En este momento, los ingenieros genéticos enfrentan la difícil misión de incrementar el actual y ya insuficiente ritmo de producción de algunas proteínas de importancia médica que, dadas las limitaciones de sus fuentes naturales, su producción por técnicas bioquímicas convencionales solo permite el tratamiento de muy pocos de los enfermos que las requieren. Actualmente, en los países industrializados, la Ingeniería Genética ha desarrollado una biotecnología cuyos principales esfuerzos se han dirigido, con un éxito sin precedentes, a la utilización y manipulación de microorganismos a fin de obtener hormonas, factores de coagulación, factores de crecimiento, vacunas, drogas antineoplásicas, drogas antivirales así como otros factores biológicos y farmacéuticos para los cuales la Ingeniería Genética representa la mejor y en ocasiones la única alternativa para su producción.

En México, la explotación de la Ingeniería Genética en beneficio del sector salud se encuentra sumamente retrasada con respecto a los países desarrollados. Por ello es imperativo establecer sistemas para la producción de proteínas de importancia biomédica mediante la tecnología del DNA recombinante. Probablemente uno de los mejores ejemplos de todas las posibles contribuciones que la Ingeniería Genética tendrá en el área de la salud para nuestro país, sea la producción de hormona de crecimiento humana recombinante.

c) Antecedentes particulares :

La hormona de crecimiento humana (hGH) o somatotropina, es una proteína con un peso molecular de 22,000 daltones constituida por una sola cadena polipeptídica de 191 aminoácidos unida por dos puentes disulfuro (1). Esta hormona se sintetiza en la hipófisis o pituitaria, que en los seres humanos es una glándula de 1 cm de diámetro situada en la base del cráneo como una prolongación del hipotálamo; dicha estructura pesa alrededor de 0.5 g y desde el punto de vista histológico, se reconocen tres zonas en ella: el lóbulo anterior o adenohipófisis, el lóbulo posterior o neurohipófisis y la parte intermedia (2,3). Es precisamente en el lóbulo anterior o adenohipófisis donde se sintetiza la hormona de crecimiento así como también las hormonas folículo estimulante, luteinizante, prolactina y diversas hormonas tróficas (2).

La hGH es codificada por un gen que forma parte de un complejo génico integrado también por los genes de la hormona lactogénica placentaria (hPL) (4). Los genes que codifican para hGH y hPL se encuentran agrupados en las bandas q22-24 del cromosoma 17, son cinco y se disponen en el siguiente orden: 5' * hGH-N * hPL-1 * hPL-4 * hGH-V * hPL-3 * 3' (5). El gen hGH-N (normal) tiene una longitud de 1,653 pb y está compuesto de 5 exones y 4 intrones. Este gen es expresado exclusivamente en la hipófisis y codifica para una proteína de 22 Kd. Además de esta forma predominante, el 10% de la hGH hipofisiaria está presente como una proteína de 20 Kd, la cual carece de los residuos aminoácidos 32 al 46 como consecuencia de un "splicing" diferencial (6) (Figura 1). Por otra parte, el gen hGH-V (variable) difiere del gen hGH-N en la información para 13 residuos aminoácidos; recientemente su transcrito fue detectado en tejido placentario (7) pero el producto proteico de ese gen no ha sido aun identificado por lo tanto su fisiología permanece desconocida.

La hGH de 22 Kd presenta una gran cantidad de funciones entre las que destacan la actividad impulsora del crecimiento, actividad promotora de la síntesis de proteínas, DNA y RNA, efectos diabéticos y acciones lactogénicas y mamotróficas (1,4). Así mismo está involucrada en la regulación de una variedad de procesos metabólicos que incluyen el metabolismo del Nitrógeno, Lípidos, Minerales, Carbohidratos y además actúa como elemento sinérgico para reforzar el efecto de otras hormonas (8).

En la práctica clínica la hGH de 22 Kd tiene un amplio potencial farmacológico, el cual ha sido aprovechado principalmente para el tratamiento de niños con problemas de crecimiento debido a una deficiencia de dicha hormona y también para el tratamiento de pacientes que sufren de

PROCESAMIENTO DEL RNAm DE hGH

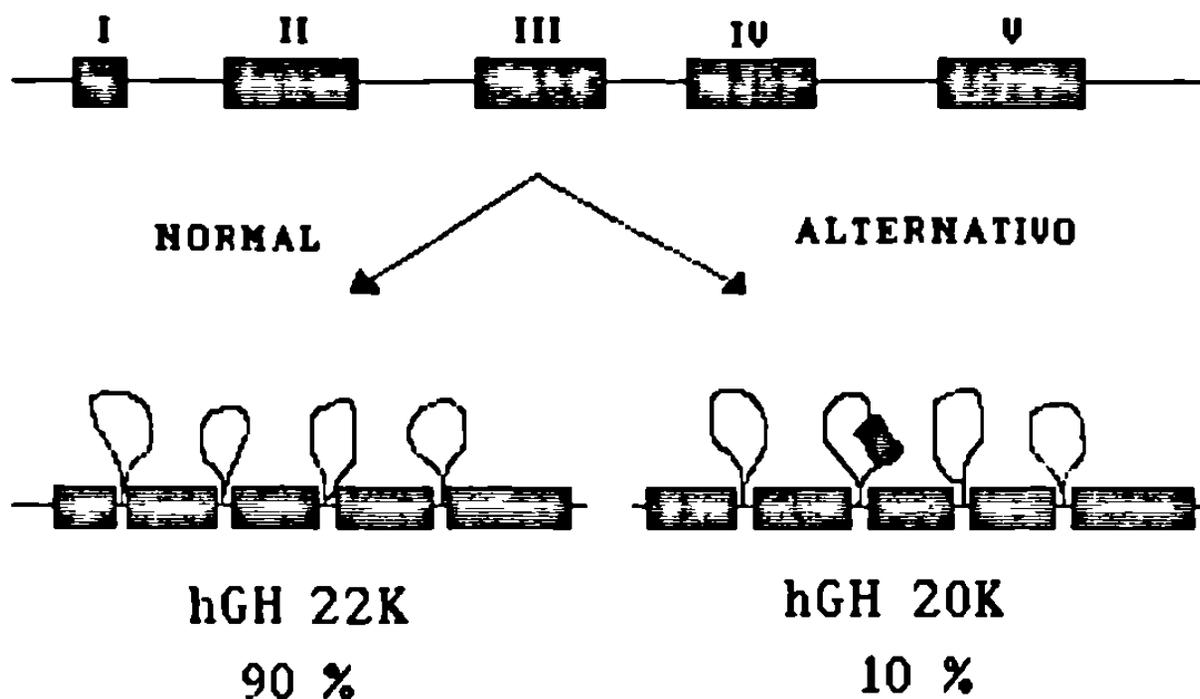


Figura 1.- Mecanismos de "splicing" alternativo en los RNAm de hGH. La expresión del gen hGH ha sido detectada únicamente en hipófisis. El transcrito primario sufre dos clases de "splicing" cada uno de los cuales produce un RNA mensajero que da origen a diferentes proteínas. La hormona 22 Kd constituye el 90% y la variante 20 Kd, el restante 10% de la producción total de hGH. Esta última se origina como una consecuencia de una delección de 45 nucleótidos localizados en el extremo 5' del tercer exón.

hipoglicemia, fracturas de huesos, quemaduras de la piel y úlceras (9). A pesar de los enormes avances científicos y tecnológicos, el papel terapéutico de la hGH 20 Kd no ha sido aun esclarecido.

Desde hace mas de 25 años la hormona utilizada para propósitos clínicos en E.U.A. fue obtenida a partir de hipófisis extraídas de cadáveres humanos (10). Hasta antes de 1977 esta hormona había sido purificada y proporcionada por tres Universidades diferentes. Posteriormente fue distribuida por el National Hormone and Pituitary Program y desde entonces estuvo disponible comercialmente como Asellacrin (Serono Labs) y Crescormon (Kabi Vitrum) (9). Sin embargo, ya que la hormona de crecimiento es especie-específica en su acción y puesto que los cadáveres humanos eran la única fuente de obtención de dicha hormona, esto representó obviamente una limitante muy marcada para el suministro y el abasto de los miles de niños que la requieren, ya que para tratar a un niño hasta la pubertad pueden ser necesarios varios centenares de hipófisis (11). Aunado a ello se demostró recientemente que cuatro adultos jóvenes que habían recibido ese tipo de preparados fallecieron como consecuencia de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, una infección letal causada por un virus lento que se caracteriza por demencia, síntomas cerebelares, ataxia, mioclonía y muerte inexorable (10,11,12,13,14). Esto condujo a que el 19 de Abril de 1985 un grupo de expertos del National Institute of Health prohibiera la utilización de estos productos debido a que muy probablemente las preparaciones de la hormona estaban contaminadas con ese virus (10).

La necesidad de utilizar el potencial terapéutico de la hormona de crecimiento humana motivó a los biólogos moleculares para que solucionaran este problema haciendo uso de las poderosas herramientas que nos proporciona la tecnología del DNA recombinante. En este caso, dicha tecnología ha jugado un papel importante ya que fue aplicada exitosamente para producir hormona de crecimiento humana en Escherichia coli sin riesgo de contaminación viral y en cantidades ilimitadas (15,16,17) dando solución definitiva al grave problema de disponibilidad e inseguridad terapéutica. Además de ello, se ha logrado también la clonación del gen de la hormona de crecimiento de especies diferentes incluyendo a la rata (18), bovino y porcino (19). Las secuencias del RNAm de la hormona de crecimiento de estas especies han sido analizadas a través de sus DNAs complementarios y han mostrado ser moléculas de aproximadamente 800 nucleótidos que codifican para un precursor de esta hormona (18,20, 21,22). El precursor contiene un péptido señalador hidrofóbico de 26 residuos aminoacídicos covalentemente unido al extremo amino terminal de la hormona madura. Este péptido señalador está involucrado en el mecanismo de secreción de la hormona de crecimiento por las células somatotrópicas de la hipófisis (1).

Puesto que la administración de la préhormona es afuncional en el organismo debido a la conservación del péptido señalador, nuevamente los biólogos moleculares buscaron la manera de producir la hormona madura en microorganismos programados por Ingeniería Genética. En 1979, Goeddel y colaboradores lograron la expresión directa en E. coli de la hormona de crecimiento humana sin su péptido señalador, al construir un gen híbrido mediante la combinación de un segmento de DNA sintético y otro segmento de DNAC derivado del RNAm de hGH (15). El uso del DNA sintético facilitó el diseño conveniente de una nueva secuencia codificadora para la región amino terminal de hGH. En este diseño el codón de iniciación de la traducción (ATG) precede directamente al codón del primer aminoácido de hGH (15). Por lo tanto la forma biosintética de la hormona de crecimiento, la cual fue manufacturada por la compañía Genentech, difiere de la hormona natural en que posee un residuo de metionina extra en su extremo amino terminal (12). El producto de Genentech denominado " Protropin " fue sometido a pruebas de experimentación desde 1981 (23). Olson y colaboradores demostraron que produce los mismos efectos que la proteína nativa ya que mantiene las actividades biológicas promotoras del crecimiento (24). En 1983, Jonsdottir realizó un estudio con anticuerpos monoclonales para saber si existía variación entre los determinantes antigénicos de la hormona biosintética y la hormona nativa y no encontró diferencia significativa con lo cual se descartó la posibilidad de una reacción inmunológica secundaria a su administración (25).

En una prueba clínica contundente en la que se utilizó hormona de crecimiento producida por Ingeniería Genética, se demostró que de 84 pacientes voluntarios con hipopituitarismo solamente uno no respondió al tratamiento y no se observaron efectos secundarios a la administración (23). Fue así como en Octubre de 1985, finalmente la Food and Drugs Administration en E.U.A. aprobó la venta de la metionil-hormona de crecimiento para el tratamiento terapéutico de las personas con deficiencia de dicha hormona (23,26). Protropin representa el segundo producto de la tecnología del DNA recombinante disponible comercialmente en el mercado. El primero fue una versión biosintética de la insulina humana que también fue manufacturada por Genentech.

En Europa, la versión biosintética de hGH es suministrada por Kabi Vitrum con el nombre de Somatonorm y en E.U.A. por la compañía Genentech bajo el nombre de Protropin. A medida que se acumulan datos clínicos sobre eficacia y seguridad, las autoridades recomiendan el empleo del producto recombinante. Por lo anterior es claro que la hormona de crecimiento humana biosintética cubre todas las posibilidades terapéuticas de su homóloga de procedencia extractiva. Su producción por fermentación bacteriana constituye un rotundo ejemplo del

enorme potencial que tienen las técnicas de la Ingeniería Genética para la solución de problemas clínicos, abriéndose consecuentemente un futuro esperanzador para la explotación de secuencias proteicas de importancia biomédica.

d) Justificación :

Actualmente no es posible suministrar ninguna garantía de seguridad en la administración de la hGH de origen hipofisiario, sean cuales sean las precauciones tomadas en su fabricación. Además dado que la hormona del crecimiento humana disponible en nuestro país es insuficiente para satisfacer la demanda de los pacientes que la requieren y puesto que cada día es mas difícil importarla por su alto costo, emprendimos el presente trabajo. Su propósito fue el de sintetizar enzimáticamente el DNAC de hGH e introducirlo a un vector de clonación molecular. El logro de esta meta es el requisito para que en un proyecto subsecuente se pueda producir hGH en bacterias, y de esta manera se produzca una fuente virtualmente inagotable de hormona de crecimiento humana sin riesgo de contaminación.

III) OBJETIVOS E HIPOTESIS.

Objetivo General:

Con el presente trabajo pretendemos contribuir al surgimiento y desarrollo de la biotecnología para la salud humana, mediante la obtención de la información genética requerida para la producción de hGH de origen biosintético.

Objetivos Particulares:

La estrategia general que utilizamos para la realización del presente trabajo estuvo integrada por seis objetivos experimentales los cuales se describen a continuación :

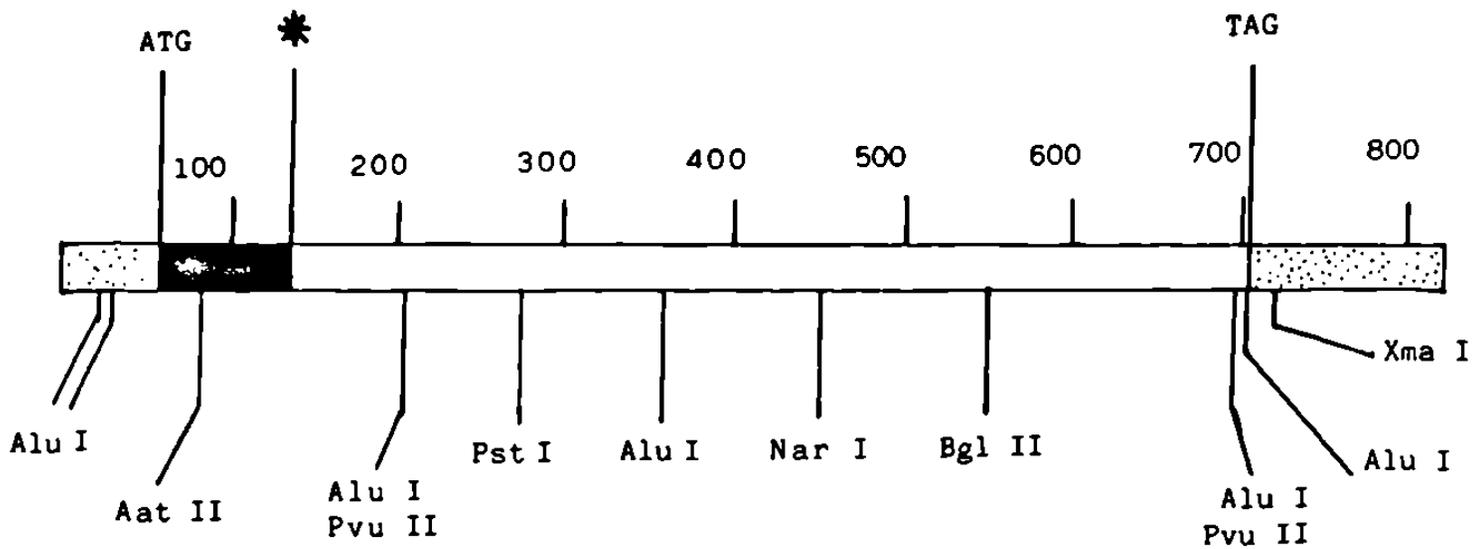
- a.- Obtención de las moléculas de RNA's mensajeros a partir de hipófisis extraídas de cadáveres humanos.
- b.- Síntesis de los DNA's complementarios a estos RNA's mensajeros.
- c.- Inserción selectiva del DNAC de hGH en un vector de clonación molecular y su propagación en E. coli.
- d.- Identificación de la clona bacteriana portadora del plásmido recombinante que contiene la información para hGH.
- e.- Caracterización del DNAC de hGH con enzimas de restricción específicas.
- f.- Determinación parcial de la secuencia nucleotídica del DNAC de hGH para demostrar su identidad e integridad plena.

Hipótesis :

Después de analizar la secuencia nucleotídica previamente reportada del DNAC de hGH (22) y construir su mapa de restricción (Figura 2), nos percatamos de que la información que codifica para la hGH madura estaba flanqueada por sitios únicos para las enzimas de restricción Aat II y Xma I. Puesto que dichas enzimas reconocen secuencias nucleotídicas raramente encontradas a lo largo del genoma humano (27), propusimos lo siguiente :

"La digestión enzimática de los DNA's complementarios derivados de hipófisis humanas con las enzimas de restricción Aat II y Xma I y su posterior inserción en un vector de clonación, similarmente digerido, nos permitirá obtener rápida y eficientemente a las clonas recombinantes portadoras del DNAC de hGH".

MAPA DE RESTRICCIÓN DEL DNAC DE hGH



ATG Codón de iniciación

TAG Codón de terminación

 Región codificante para la hormona madura

 Región codificante para el péptido señalador

 Región no traducible

* Primer aminoácido de la hormona madura

Figura 2.- Organización del DNAC de la hormona de crecimiento humana. Se muestra la estructura anatómica del DNAC de hGH y se indican los sitios de restricción diagnósticos para su identificación. Se observa que la información que codifica para la proteína madura es flanqueada por los sitios Aat II y Xma I hacia los extremos 5' y 3' respectivamente.

IV) 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 y Boehringer Mannheim y se utilizaron de acuerdo a las condiciones especificadas por el proveedor.

La celulosa oligo-dT utilizada para la purificación de los RNA mensajeros fue adquirida de Collaborative Research Inc.

El conjunto enzimático para la síntesis de DNA's complementarios fue obtenido de Bethesda Research Laboratories y el nucleótido radiactivo (^{35}S - α -dATP) utilizado para este propósito fue obtenido de Amersham.

De igual manera el nucleótido radiactivo ^{32}P - α -dCTP utilizado para marcar el DNAC de hPL fue adquirido de Amersham International.

Para la determinación de la secuencia nucleotídica del DNAC de hGH se utilizó el conjunto de reactivos "Sequenase kit" de la compañía United States Biochemical.

Los reactivos empleados en la elaboración de amortiguadores, soluciones diversas y medios de cultivo fueron obtenidos de distintas casas comerciales: Sigma, Merck, Aldrich, IBI y Casa Rocas, procurando cuando fue posible emplear los de mayor calidad disponibles.

B) MATERIAL BIOLÓGICO :

5 g de tejido hipofisiario humano fueron recuperados de autopsias por el personal del Anfiteatro del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González". Estas hipófisis fueron extraídas en el menor tiempo posible para evitar la degradación del RNA y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido donde fueron almacenadas hasta su uso.

Se utilizó el plásmido pUC19 para la clonación de los DNA's complementarios y la bacteria Escherichia coli cepa RR1 para la propagación de los plásmidos recombinantes.

El marcador de peso molecular 1Kb Ladder fue donado por el Dr. Randy Lejersky (Departamento de Genética, M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute, University of Texas).

El DNAC de hPL, fragmento de 785 pb utilizado como rastreador molecular, fue derivado del plásmido p hPL815 (28) mediante una digestión con la enzima de restricción Pst I y

posterior purificación. Para la hibridización de RNA-DNA en gota seca se utilizó phPL815 linearizado con Eco RI. El marcaje radiactivo de ambas secuencias génicas fue realizado generosamente por el M.C. Ramiro Ramirez Solís (Institute for Molecular Genetics, Baylor College of Medicine).

Para la preparación de los fagos recombinantes durante el protocolo del secuenciamiento nucleotídico utilizamos la bacteria Escherichia coli cepa JM103.

Tanto los plásmidos y los fagos así como las bacterias utilizadas provienen de la genoteca y la bacteriotea de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas.

C) METODOS :

Extracción de RNA total de hipófisis humanas por el método de Isotiocianato de guanidina-Fenol-Cloroformo:

El método que utilizamos es una modificación de la técnica descrita por Chomczynsky y Sacchi en 1987 (29).

Materiales, Reactivos y Soluciones : Para eliminar las RNAsas, todo el material de plástico utilizado se sometió a un lavado con NaOH 1N por 10 min y se enjuagó exhaustivamente con agua tratada con dietil pirocarbonato (H₂O-DEP). Todo el material de vidrio empleado (tubos y botellas de centrifuga, probetas, pipetas, vasos, etc.) fue horneado a 250°C por 4 h.

Las soluciones de los incisos a hasta e fueron tratadas con dietil pirocarbonato (DEP) al 0.1% por al menos 12 h a 37°C y posteriormente esterilizadas en el autoclave.

- a) Acetato de sodio 2 M pH 4.
- b) Citrato de sodio 0.75 M pH 7.
- c) Acetato de sodio 4 M pH 6.
- d) Cloruro de litio 4 M.
- e) Agua ultrapura (Milli Q).
- f) Sarcosil al 10%.
- g) Fenol saturado con H₂O-DEP.
- h) Solución Sevag (cloroformo-alcohol isoamílico, 24:1).
- i) Etanol absoluto y etanol al 70% almacenados a -20°C.
- j) Solución D (isotiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM pH 7, sarcosyl 0.5% y β-mercaptoetanol 0.1 M).

Procedimiento:

- 1) Las hipófisis fueron colocadas sobre hielo seco inmediatamente después de sacarse del Nitrógeno líquido. Se pesó una alícuota de 5 g y se procesó rápidamente para evitar cualquier descongelamiento.

- 2) Se homogenizaron 5 g de tejido hipofisiario en una licuadora de vidrio que contenía 50 ml de solución D. Se mezcló a alta velocidad durante 3 min encendiendo y apagando cada 20 s para permitir que los trozos que quedaban en la superficie bajaran y fueran alcanzados por las aspas.
- 3) Se pasó el homogenizado a un frasco de vidrio de 500 ml con tapón esmerilado y se agregaron 5 ml de acetato de sodio 2 M pH 4, se agitó 1 min. Luego se añadieron 50 ml de fenol saturado con H₂O-DEP y se agitó por 2 min. Por último, 10 ml de Sevag y se mezcló vigorosamente por 3 min. Se repartió la mezcla en dos botellas Corex de 150 ml y se colocaron en hielo durante 15 min.
- 4) Se centrifugó a 8,000 rpm durante 20 min a 4°C en una centrífuga B-20A de DAMON/IEC DIVISION utilizándose el rotor 872. Al terminar la centrifugación se recuperaron las fases acuosas de ambas botellas utilizando una jeringa de vidrio de 20 ml y se transfirieron a otras dos botellas Corex. Se les agregaron dos volúmenes de etanol absoluto frío, se agitaron suavemente por inversión y se colocaron a -20°C por al menos 1 h para precipitar los ácidos nucleicos.
- 5) Se centrifugó bajo las condiciones especificadas en el punto anterior. Se decantaron los sobrenadantes y se invirtieron las botellas a 4°C por 10 min para que escurrieran las pastillas. Se disolvió completamente cada una de las pastillas en 3 ml de solución D y se transfirieron a un solo tubo Corex de 30 ml horneado. Se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto frío y se colocó el tubo a -20°C por 1 h.
- 6) Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm en la centrífuga B-20A utilizándose el rotor 870 durante 25 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 5 ml de H₂O-DEP. Se agregó un volumen de cloruro de litio 4 M y se colocó el tubo a 4°C por un mínimo de 4 h con el propósito de eliminar residuos de DNA.
- 7) Se centrifugó al igual que en el punto 6 y se decantó cuidadosamente el sobrenadante. La pastilla se lavó con etanol al 70% frío y se secó a 4°C con el tubo en posición invertida durante 10 min.
- 8) Finalmente, la pastilla de RNA se disolvió en 5 ml de H₂O-DEP y se tomó una alícuota (50 µl) para efectuar lecturas en el espectrofotómetro a 230, 260 y 280 nm, así como para verificar su calidad electroforética. Se agregó acetato de sodio 4.5 M pH 6 para dar una concentración final de 0.3 M y dos volúmenes de etanol absoluto frío. La solución se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml y se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

Electroforesis de RNA en geles de agarosa-urée-ácido:

Se utilizó el método descrito en su forma original por Rosen y cols. en 1975 (30).

Reactivos y soluciones :

- a) Agua tratada con DEP.
- b) Urea 10 M.
- c) Amortiguador de citrato de sodio 0.25 M pH 3.5.
- d) Amortiguador de citrato de sodio 0.025 M pH 3.5.
- e) Agarosa al 1.5 % (ver inciso 1 del procedimiento).
- f) Amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.6.
- g) Solución de bromuro de etidio a 10 mg/ml.

Nota: Las soluciones c y d fueron tratadas con DEP.

Procedimiento:

- 1) Preparación del gel de agarosa al 1.5 %.- 1.5 g de agarosa se añadieron a 60 ml de urea 10 M y 30 ml de H₂O-DEP. La mezcla se calentó a ebullición hasta disolver la agarosa. Se dejó enfriar hasta aproximadamente 60°C y luego se añadieron 10 ml de amortiguador de citratos 0.25 M pH 3.5. Posteriormente se vació en el molde para el gel (de preferencia en placa vertical) y se mantuvo a 4°C por lo menos 4 h para que solidificara.
- 2) Preparación de la muestra:
 - 10 µl de RNA (1 µg/µl)
 - 5 µl de H₂O-DEP
 - 30 µl de Urea 10 M
 - 5 µl de Azul de bromofenol al 0.5%
- 3) Electroforesis.- Las muestras se calentaron a 65°C por 10 min y se colocaron rápidamente en hielo. Se aplicaron en las casillas del gel y se realizó la electroforesis a 80 volts por 3 a 4 h a temperatura ambiente. Al término de la misma, el gel fue sumergido en 200 ml de una solución de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.6 conteniendo 1 µg/ml de bromuro de etidio durante 20 min. Finalmente se destiñó el gel durante 5 min en agua y se analizó bajo luz ultravioleta.

Criterios para establecer cantidad, pureza e integridad del RNA extraído:

Para determinar la concentración del RNA se tomó en cuenta que un valor de absorbancia de 1.0 a 260 nm equivale a 40 µg/ml de RNA; de manera que la concentración de RNA se obtiene al multiplicar el valor de la absorbancia obtenida por 40 y por el factor de dilución que generalmente corresponde a

un valor de 101 (una alícuota de 10 μ l de RNA se diluye en 1000 μ l de H₂O-DEP para hacer las lecturas al espectrofotómetro, por lo tanto al dividir el volumen final entre el volumen inicial obtenemos un factor de dilución de 101).

Para determinar la pureza del RNA, generalmente se obtiene la razón de la absorbancia a 260 nm UV entre la absorbancia a 280 nm UV. Una razón de 1.8 o mayor indica que la preparación es aceptablemente pura.

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

Hibridación de RNA-DNA en gota seca:

El presente método, basado en la descripción de Davis y cols. (31), fue utilizado para analizar los RNA's totales y detectar la presencia de secuencias génicas que codifican para hGH.

Reactivos y Soluciones:

- a) Formamida desionizada.
- b) SSC 20 X (Cloruro de sodio 17.53% y citrato de sodio 8.82% pH 7).
- c) Solución Denhardt 100 X (Albúmina sérica bovina 2%, Ficoll tipo 400 2% y polivinil pirrolidona 10%).
- d) Fosfato de sodio 1 M pH 8.
- e) SDS al 10%.
- f) Dextrán sulfato al 50%.
- g) Agua tratada con DEP.
- h) Solución de prehibridación (Formamida desionizada 50%, SSC 5 X, Solución Denhardt 5 X, Fosfato de sodio 50 mM pH 8, SDS 0.1% y DNA de esperma de salmón 250 μ g/ml).
- i) Solución de hibridación (Formamida desionizada 50%, SSC 5 X, Solución Denhardt 5 X, Fosfato de sodio 50 mM pH 8, SDS 0.1%, Dextrán sulfato 10% y 3 x10⁶ cpm del plásmido phPL815 marcado con ³²P).
- j) Soluciones de RNA's totales de placenta, hígado e hipófisis humanas a una concentración de 2 μ g/ μ l.

Procedimiento:

- 1) En tubos de microcentrífuga debidamente rotulados se hicieron las siguientes mezclas:

	<u>PLACENTA</u>	<u>HIGADO</u>	<u>HIPOFISIS</u>
RNA	10 μ l	10 μ l	10 μ l
SSC 20 X	4 μ l	4 μ l	4 μ l
H ₂ O-DEP	<u>6 μl</u>	<u>6 μl</u>	<u>6 μl</u>
	20 μ l	20 μ l	20 μ l

Posteriormente se calentaron a 65°C para desnaturalizar los RNA's y se colocaron rápidamente en hielo.

- 2) A un papel filtro de nitrocelulosa previamente recortado a una dimensión de 6 x 2 cm se le hicieron 6 divisiones de 2 cm² con la ayuda de un bolígrafo. De esta manera se obtuvieron 3 columnas de 2 compartimientos cada una con el objeto de colocar cada muestra por duplicado. Este papel fue humedecido en agua destilada estéril por 5 min y posteriormente en SSC 20 X por otros 5 min. Se dejó secar a temperatura ambiente.
- 3) Se depositaron por duplicado cada una de las muestras desnaturalizadas en su respectiva columna y se aplicó aire caliente con una pistola secadora. Se colocó el papel de nitrocelulosa entre papel Whatman 3 MM y se horneó al vacío por 2 h a 80°C.
- 4) Se colocó el papel filtro en una bolsa de plástico y se agregaron 5 ml de la solución de prehibridación. Se eliminaron las burbujas de aire, se selló la bolsa por calentamiento y se prehibridizó a 42°C por 12 h.
- 5) Se calentó la solución de hibridación a 100°C por 10 min para desnaturalizar la sonda y se colocó súbitamente en hielo.
- 6) Se hizo un orificio en una esquina de la bolsa que contiene el papel de nitrocelulosa y se desechó la solución de prehibridación. En su lugar se agregaron 1.5 ml de la solución de hibridación (con la sonda previamente desnaturalizada), se selló nuevamente la bolsa y se colocó en un baño de agua a 42°C por 16 h con agitación suave.
- 7) Se recuperó el papel filtro de la bolsa y se sometió a 3 lavados de 15 min cada uno en 400 ml de SSC 2 X y SDS 0.1%. Los dos primeros a temperatura ambiente y el último a 50°C.
- 8) Posteriormente se hicieron 2 lavados en 400 ml de SSC 0.1 X y SDS 0.1% a 50°C por 45 min con agitación suave. En seguida se enjuagó el filtro en 200 ml de SSC 0.1 X por 10 min y se dejó secar a temperatura ambiente sobre una hoja de papel Whatman 3 MM.

- 9) Finalmente se cubrió el papel filtro con plástico adherible y se colocó en un cartucho para exposición radiactiva conteniendo una película ultrasensible. Se permitió la exposición por 12 h a -70°C , se reveló la autorradiografía y se interpretaron los resultados.

Aislamiento de RNA's mensajeros poli A* por cromatografía de afinidad en columnas de celulosa oligo-dT:

Se utilizó el método originalmente descrito por Aviv y Leder (32) y fue tomado de Maniatis y cols. (33).

Materiales, reactivos y soluciones:

Para eliminar la presencia de RNAsas, todo el material de plástico utilizado se sometió a un lavado con NaOH 1 N por 10 min y se enjuagó exhaustivamente con agua tratada con DEP. Todo el material de vidrio empleado (probetas, pipetas, vasos, etc.) fue horneado a 250°C por al menos 4 h. Se utilizaron guantes de latex durante todo el procedimiento.

Las soluciones de los incisos a hasta d fueron tratadas con dietilpirocarbonato (al 0.1%) por al menos 12 h a 37°C y posteriormente esterilizadas en el autoclave.

- a) Cloruro de sodio 5 M.
- b) Sarcosil al 10%.
- c) EDTA 0.2 M.
- d) Acetato de sodio 4.5 M pH 6.
- e) $\text{H}_2\text{O-DEP}$.
- f) Tris-HCl 1 M pH 7.5 (Se preparó en $\text{H}_2\text{O-DEP}$ y posteriormente se esterilizó en el autoclave).
- g) Hidróxido de sodio 0.1 N.
- h) Amortiguador de unión 4 X (NaCl 2 M, Tris-HCl 40 mM pH 7, Sarcosil 2% y EDTA 4mM en $\text{H}_2\text{O-DEP}$).
- i) Amortiguador de elución 4 X (Tris-HCl 40 mM pH 7, Sarcosil 2% y EDTA 4 mM en $\text{H}_2\text{O-DEP}$).
- j) Etanol absoluto y etanol al 70% almacenados a -20°C .

Procedimiento:

Preparación del RNA total.

- 1) El RNA total almacenado a -20°C en una solución de etanol y sales fue centrifugado en una microcentrífuga (Eppendorf) por 10 min a 15,000 rpm. Se lavó con etanol al 70% y se secó en un evaporador centrífugo al vacío (Savant) por 5 min.
- 2) La pastilla se resuspendió en 1 ml de $\text{H}_2\text{O-DEP}$ y la solución fue transferida a un tubo Falcon de 50 ml. Dicha solución se ajustó de tal manera que la concentración de RNA fuese de 1 mg/ml.

- 3) La solución de RNA se calentó a 65°C por 5 min y se colocó rápidamente en hielo. Después de 5 min se agregó amortiguador de unión a una concentración final de 1 X.

Preparación de la celulosa oligo-dT.

- 4) 0.5 g de celulosa oligo-dT tipo III (Collaborative Research Incorporation) fueron suspendidos en 10 ml de amortiguador de unión 1 X mezclando suavemente la solución con una pipeta pasteur.
- 5) Después de 5 min de sedimentación se descartó el sobrenadante por aspiración y la celulosa se resuspendió nuevamente en 10 ml de amortiguador de unión 1 X.

Preparación de la columna.

- 6) Una columna de 5 ml (Dispocolumn de BIORAD) fue sujeta a un soporte universal mediante unas pinzas para bureta. Así mismo un tubo Falcon de 50 ml, el cual fue utilizado como depósito para las soluciones que se pasarían a través de la columna, fue sujeta también al soporte con otras pinzas para bureta. En la tapa de dicho tubo se hizo un pequeño orificio y a través de él se introdujo un extremo de una manguera de plástico de 5 mm de diámetro por 30 cm de largo. El otro extremo de la manguera fue conectado a la tapa de la columna.
- 7) Se colocaron unas pinzas de presión regulable sobre la manguera para controlar la velocidad de flujo hacia la columna. Se aplicó la solución de celulosa oligo-dT directamente en el dispositivo de BIORAD y se dejó reposar para que se empaquetara fuertemente hasta formar una columna de aproximadamente 2 ml.
- 8) Se agregaron al depósito 5 volúmenes de columna de una solución de NaOH 0.1 N y EDTA 5 mM permitiéndose un flujo de 250 µl/min. Posteriormente se aplicaron 5 volúmenes de H₂O-DEP y luego 3 volúmenes de amortiguador de unión verificándose que el pH del líquido eluido fuese neutro.

Cromatografía de afinidad.

- 9) El RNA total previamente desnaturalizado fue aplicado a la columna y el RNA no unido se colectó en un tubo Falcon de 15 ml sumergido en hielo. Se dejó de colectar hasta que la absorbancia de la solución eluida era igual a cero a 260 nm.
- 10) Se lavó la columna con 3 volúmenes de amortiguador de unión 1 X y posteriormente se aplicaron 5 volúmenes de amortiguador de elución 1 X para eluir los RNA mensajeros. Se dejó de colectar hasta que la absorbancia del líquido eluido era igual a cero.

- 11) Los RNA mensajeros colectados se desnaturalizaron a 65°C por 5 min y se colocaron rápidamente en hielo. Se les agregó amortiguador de unión a una concentración final de 1 X. Se equilibró la columna con 3 volúmenes de amortiguador de unión 1 X y se aplicaron nuevamente estos RNA's para realizar una segunda cromatografía.
- 12) Se lavó la columna con 3 volúmenes de amortiguador de unión 1 X y posteriormente se aplicaron 3 volúmenes de amortiguador de elución 1 X. En esta etapa se colectaron 10 fracciones de 1.5 ml cada una, se midió la absorbancia de cada una de ellas y se mezclaron aquellas con mayor densidad óptica. Se agregó acetato de sodio a una concentración final de 0.2 M y se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Esta solución se colocó a -20°C durante toda la noche.
- 13) Los RNA's mensajeros fueron colectados por centrifugaciones sucesivas en un solo tubo de microcentrífuga a 15,000 rpm por 10 min. La pastilla de RNA se lavó con etanol al 70% y se secó en un evaporador centrífugo al vacío. Finalmente los RNA's fueron disueltos en 100 µl de H₂O-DEP, se determinó su concentración por espectrofotometría a 260 nm y se verificó su calidad por electroforesis en un gel de agarosa-urea-ácido.

Síntesis de DNA's Complementarios:

Para la síntesis de los DNA's complementarios utilizamos un conjunto enzimático de la compañía BRL (cDNA Synthesis System, catálogo 8267SA) cuya aplicación está basada en la técnica descrita por Gubler y Hoffman en 1983 (34).

Reactivos y soluciones:

- a) TE pH 7.6 (Tris-HCl 10 mM pH 7.6 y EDTA 1 mM).
- b) EDTA 250 mM pH 7.5.
- c) Acido tricloroacético (TCA) al 5 y al 10% almacenados a 4°C.
- d) Etanol absoluto y etanol al 70% almacenados a -20°C.
- e) Acetatato de amonio 7.5 M
- f) Fenol-sevag (1:1).
- g) ³⁵S-α-dATP a 10 µCi/µl.
- h) RNAm's de hipófisis humanas a 1 µg/µl.

Componentes del conjunto enzimático:

- i) Transcriptasa inversa MMLV (virus de la leucemia murina de Moloney) a 200 U/µl.
- j) Amortiguador para síntesis de la primera cadena 5 X.
- k) Oligo-dT₁₂₋₁₈ 0.5 mg/ml.
- l) DNA polimerasa I de E. coli a 10 U/µl
- m) Amortiguador para síntesis de la segunda cadena 10 X.
- n) RNAsa H de E. coli a 2 U/µl.

- ñ) Mezcla de dNTP's a 10 mM cada uno.
- o) Agua tratada con DEP.

Procedimiento:

- 1) En un tubo de microcentrífuga sumergido en hielo se hizo la siguiente mezcla de reacción:

Amortiguador para síntesis de la primera cadena 5 X.	10	μl
Mezcla de dNTP's a 10 mM cada uno	2.5	μl
Oligo-dT ₁₂₋₁₈ 0.5 μg/μl	5	μl
RNAM's de hipófisis humanas a 1 μg/μl	5	μl
Transcriptasa inversa MMLV a 200 U/μl	5	μl
Agua tratada con DEP	22.5	μl

Después de realizar la mezcla se tomó una quinta parte (10 μl) y se pasó a un segundo tubo de microcentrífuga que contenía 0.2 μl de una solución del radioisótopo ³⁵S-α-dATP (10 μCi/μl), el cual fue utilizado como trazador radiactivo. De esta fracción radiactiva se tomó 1 μl y se colocó sobre un filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/C) rotulado como "TCA antes".

- 2) Ambos tubos se colocaron a 37°C por 1 h. Después de este tiempo se detuvo la reacción radiactiva mediante la adición de 0.2 μl de EDTA 0.25 M pH 7.5.
- 3) La reacción no radiactiva fue sometida a una extracción orgánica con un volumen (40μl) de una solución de fenol-sevag (1:1), se centrifugó a 10,000 rpm por 3 min y se recuperó la fase acuosa. La fase orgánica fue sometida a una segunda extracción con 40 μl de TE y al final se mezclaron ambas fases acuosas. Se les agregó medio volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2.2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se colocó la mezcla a -20°C por al menos 1 h. Se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 30 μl de H₂O-DEP. Esta solución (híbrido RNAM-DNAC) fue utilizada para la síntesis de la segunda cadena como se mencionará mas adelante.
- 4) De la mezcla radiactiva se tomaron 2 alícuotas de 1 μl y se colocaron respectivamente sobre 2 piezas de papel filtro (Whatman GF/C) rotulados como "TCA total" y "TCA después". Se dejaron secar al aire.
- 5) Al resto de la solución radiactiva (7 μl) se le agregaron 43 μl de TE, 25 μl de acetato de amonio 7.5 M y 165 μl de etanol absoluto frío. Se colocó a -20°C por 1 h. Se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 10 μl de TE. De esta solución se tomaron 3 μl para analizar la síntesis de DNAC monocatenario por electroforesis en un gel alcalino de agarosa como se mencionará en la sección posterior.

- 6) Los filtros rotulados como "TCA antes" y "TCA después" fueron sometidos a un lavado con TCA al 10% por 10 min, dos lavados con TCA al 5% por 5 min y un lavado con etanol al 95% por 5 min. Se dejaron secar a temperatura ambiente por 10 min.

Posteriormente estos dos filtros al igual que el rotulado como "TCA total" fueron colocados respectivamente dentro de 3 viales que contenían 5 ml de líquido de centelleo y se cuantificó la radiactividad emitida en un contador de centelleo utilizando el canal para ^{35}S . Se cuantificó la síntesis de DNAC monocatenario de acuerdo a la siguiente fórmula (35, 36):

$$\mu\text{g de DNAC monocatenario} = \frac{\text{cpm TCA antes} - \text{cpm TCA después}}{\text{cpm TCA total}} \times \text{nmoles de dATP} \times 4 \times .33$$

- 7) Para la síntesis de la segunda cadena de los DNAC se hizo la siguiente mezcla en un tubo de microcentrífuga colocado sobre hielo:

Solución de RNAm-DNAC monocatenario (inciso 3)	30 μl
Agua tratada con DEP	35.6 μl
Solución de dNTP's (10 mM)	3 μl
Amortiguador para síntesis de la segunda cadena 10 X.	8 μl
^{35}S - α -dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)	0.5 μl
DNA polimerasa I de <u>E. coli</u> (10 U/ μl)	2.5 μl
RNAsa H de <u>E. coli</u> (2U/ μl)	0.4 μl

Después de realizar la mezcla se tomó una alícuota de 1 μl y se depositó sobre un filtro Whatman GF/C rotulado como "TCA antes". Se colocó la mezcla de reacción en un baño de agua a 16°C por 2 h.

- 8) Al término de la incubación se tomaron 2 alícuotas de 1 μl y se colocaron respectivamente en 2 filtros rotulados como "TCA total" y "TCA después". Posteriormente se detuvo la reacción mediante la adición de 3 μl de EDTA 0.25 M.
- 9) De esta reacción radiactiva se tomó una décima parte (8 μl) y se precipitaron los ácidos nucleicos con acetato de amonio y etanol. Se colocó la solución a -20°C por 1 h y posteriormente se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min. Se lavó la pastilla con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 3 μl de H₂O-DEP. Esta fracción fue utilizada para analizar la síntesis de la segunda cadena por electroforesis en un gel alcalino de agarosa.
- 10) La solución restante fue sometida a una extracción orgánica con un volumen de fenol-sevag en forma similar a como se mencionó en el inciso 3. Se recuperó la fase acuosa y se le agregó medio volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2.2 volúmenes de etanol absoluto frío. Después de 1 h a -20°C se

obtuvieron los DNAs complementarios mediante el mismo procedimiento del inciso anterior excepto que en este caso la pastilla fue resuspendida en 20 μ l. Esta solución (que contiene los DNAC de doble cadena) fue colocada a 4°C donde fue almacenada hasta su uso posterior.

- 11) En seguida los 3 filtros que contienen alícuotas radiactivas fueron tratados de igual manera que en el inciso 6 y finalmente se cuantificó la síntesis de DNAC's bicatenarios mediante la siguiente fórmula (35, 36):

$$\mu\text{g de DNAC bicatenarios} = \frac{\text{cpm TCA antes} - \text{cpm TCA después}}{\text{cpm TCA total}} \times \text{nmoles de dATP} \times 4 \times .33$$

Electroforesis en geles alcalinos de agarosa:

El presente método fue utilizado para analizar los productos obtenidos durante la síntesis de los DNA's complementarios y fue tomado de Maniatis y cols. (33).

Reactivos y soluciones:

- 1) Amortiguador de gel 10 X (NaCl 0.3 M y Na_2EDTA 20 mM pH 7.5).
- 2) Amortiguador alcalino de electroforesis 10 X (NaOH 0.3 M y EDTA 20 mM).
- 3) Amortiguador de muestra 2 X (NaOH 20 mM, glicerol 20% y azul de bromofenol 0.02%).
- 4) Acido tricloroacético al 7%.

Procedimiento:

- 1) Se preparó un gel de agarosa al 1.5% con amortiguador de gel 1 X y se vació en un molde horizontal para electroforesis. Se montó el gel sobre una cámara y posteriormente se cubrió con amortiguador alcalino de electroforesis 1 X a una altura no mayor de 3 mm. Se permitió un lapso de 30 min con el propósito de que difundiera el álcali hacia el interior del gel.
- 2) Alícuotas de las reacciones de síntesis de la primera y segunda cadena fueron mezcladas con un volumen de amortiguador de muestra 2 X.
- 3) Se aplicaron las muestras y se llevó a cabo la electroforesis a un voltaje de 7.5 V/cm hasta que el colorante migró a una distancia de 8 cm. Al término de la electroforesis el gel fue sumergido por 30 min en ácido tricloroacético al 7%.
- 4) Finalmente el gel fue depositado sobre varias piezas de papel Whatman 3 MM, se cubrió la parte superior con plástico adherible y se secó en un secador de geles a 80°C por 1 h. Posteriormente se retiró la pieza de plástico y el gel fue

colocado dentro de un cartucho para exposición radiactiva conteniendo una película ultrasensible. Se permitió la exposición por 48 h a temperatura ambiente, se reveló el autorradiograma y se interpretaron los resultados.

La estrategia de clonación. Digestión enzimática de los DNA's complementarios con Aat II y Xma I:

Frecuentemente la selección de una clona bacteriana que porta una determinada secuencia de DNA recombinante es el paso más difícil durante un proceso de clonación. En nuestro caso hemos diseñado una estrategia para favorecer, en forma casi exclusiva, la inserción del DNAC de hGH en un vector de clonación. Dicha exclusividad fue vislumbrada cuando analizamos, ayudados por programas computacionales, la secuencia nucleotídica del DNAC de hGH. Nos percatamos de que la información que codifica para la hormona madura era flanqueada por sitios únicos para dos enzimas de restricción: Aat II y Xma I, las cuales reconocen secuencias nucleotídicas que no son muy repetitivas en el genoma humano (27).

Basándonos en estos hallazgos, decidimos someter la población de los DNA's complementarios a la acción de dichas enzimas de restricción, suponiendo que solo una pequeña fracción de ellos serían cortados con esas enzimas. Los fragmentos generados durante la digestión enzimática, mas no aquellos DNA's que quedarán intactos o que contuvieran uno o varios sitios para una misma enzima, serían capaces de integrarse fácilmente en un vector de clonación que hubiese sido digerido con las mismas enzimas de restricción. De ocurrir esto, esperábamos que por complementariedad de pares de bases se formarían las moléculas recombinantes, de las cuales una gran proporción debería contener secuencias codificantes para hGH. Fue así como procedimos a digerir los DNA's complementarios con dichas enzimas de restricción de la siguiente manera:

- 1) En un tubo de microcentrífuga se colocaron 200 ng de DNA's complementarios, los cuales fueron digeridos con Xma I de acuerdo a las condiciones especificadas por el proveedor (New England Biolabs). Después de 5 h de incubación a 37°C, los DNA's fueron precipitados de manera habitual con etanol y acetato de amonio. Se colocó la mezcla a -20°C.
- 2) Los DNA's fueron colectados por centrifugación a 15,000 rpm por 10 min. Se lavó la pastilla con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 10 µl de agua ultrapura estéril.
- 3) Los DNA's complementarios fueron digeridos nuevamente pero ahora con la enzima Aat II. Después de 5 h a 37°C se repitieron los mismos procedimientos de los incisos 2 y 3.

Finalmente los DNA's fueron colocados a 4°C donde fueron almacenados hasta su uso posterior.

NOTA: Puesto que la solución de DNA's complementarios es una mezcla muy heterogénea de diversas secuencias génicas, se utilizó un exceso de 10 veces la concentración de enzima de restricción requerida para digestiones convencionales (comunicación personal, Hugo Barrera Saldaña).

Selección y preparación del vehículo de clonación:

Como se mencionó en la sección anterior una vez que los DNA's complementarios hubiesen sido digeridos con Aat II y Xma I, estos deberían de ser integrados en un vector de clonación que hubiese sido digerido también con las mismas enzimas.

Para este propósito seleccionamos el plásmido pUC19 (37), el cual tiene un sitio único para la enzima de restricción Aat II localizado en la posición 2,617 y otro sitio único para la enzima Xma I localizado en la región de sitios múltiples de clonación exactamente sobre la posición 412. Para la preparación de dicho vector realizamos lo siguiente:

- 1) 5 μ g del plásmido pUC19 fueron digeridos con Aat II en un volumen de 50 μ l de acuerdo a las instrucciones especificadas por el proveedor. Después de 2 h a 37°C se precipitó el DNA mediante la adición de etanol y acetato de amonio. Se colocó la mezcla a -20°C por 30 min.
- 2) Se colectó el DNA digerido mediante centrifugación a 15,000 rpm por 15 min, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 10 μ l de agua ultrapura estéril.
- 3) Se realizó la segunda digestión enzimática con Xma I a 37°C por 2 h. Después de este lapso se tomó una alícuota de 200 ng y se hizo una electroforesis analítica en un gel de agarosa al 1% (28) para verificar la doble digestión. Posteriormente al resto de la mezcla de reacción se le agregó una quinta parte de jugo azul 6 X (glicerol al 30%, xilencianol al 25% y azul de bromofenol al 0.25%) y se sometió a una electroforesis preparativa tal y como se menciona en la siguiente sección.

Purificación del vector de clonación a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión:

El presente método, tomado de Maniatis y cols. (33), fue utilizado para recuperar el vector de clonación después de haber sometido los productos de la digestión anterior a una electroforesis preparativa en un gel de agarosa de bajo punto de fusión.

Reactivos y soluciones:

- a) Agarosa de bajo punto de fusión (Sea Plaque, FMC).
- b) TAE 1 X (Tris-acetato 0.04 M y EDTA 0.002 M).
- c) Bromuro de etidio a 10mg/ml.
- d) Cloruro de sodio 1 M.
- e) Fenol saturado con Tris 0.1 M pH 8.
- f) Etanol absoluto y etanol al 70% fríos.

Procedimiento:**Electroforesis preparativa.**

- 1) Se prepararon 50 ml de una solución de agarosa al 1% en TAE 1 X y se calentó a ebullición. Se dejó enfriar hasta 50°C, se agregaron 2.5 µl de bromuro de etidio (10mg/ml), se mezcló y se vertió la solución en un molde horizontal para electroforesis. Se dejó solidificar por 2 h.
- 2) Se montó el gel en la cámara de electroforesis y se cubrió con TAE 1 X. Se aplicaron los productos de la digestión del plásmido pUC19 con Aat II y Xma I (aproximadamente 5 µg) después de haber tomado una alícuota de 200 ng para analizar posteriormente la recuperación del fragmento de nuestro interés. Se aplicaron también 200 ng del plásmido pBR322 digerido con Rsa I, el cual fue utilizado como marcador de peso molecular.
- 3) Se realizó la electroforesis a 50 volts hasta que el azul de bromofenol migró a 3/4 partes de la longitud del gel (10 cm). En un cuarto oscuro y con la ayuda de una lámpara de luz UV de onda larga, se localizó la banda de 2,205 pb correspondiente al vector de clonación. Dicha banda fue cortada con una hoja de bisturí y se colocó en un tubo de microcentrífuga.

Recuperación del DNA.

- 4) El tubo que contiene el fragmento de agarosa de bajo punto de fusión, fue colocado a 70°C por 5 min. Se agregó una décima parte de NaCl 1 M para evitar la separación de las cadenas de DNA y se colocó nuevamente a 70°C hasta que la agarosa se fundió completamente.
- 5) Se agregaron 3/4 partes de fenol y se mezcló fuertemente en un vortex por 2 min. Se centrifugó a 15,000 rpm por 5 min. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo de microcentrífuga. Nuevamente se agregaron 3/4 partes de fenol y se mezcló de igual manera en el vortex.
- 6) Se centrifugó a 15,000 rpm por 5 min. se recuperó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo de microcentrífuga. Se

agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se colóccó a -20°C por 1 h.

- 7) Se centrifugó a la misma velocidad por 15 min. Se lavó la pastilla con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en $20\ \mu\text{l}$ de agua ultrapura. Finalmente se verificó la recuperación por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Clonación molecular de los DNA's complementarios:

Una vez que se obtuvo el vector de clonación, éste fue utilizado para la inserción de los DNA's complementarios que hubiesen sido digeridos con Aat II y Xma I. Lo anterior se llevó a cabo mediante el empleo de DNA ligasa de T4 (38) de la siguiente manera:

- 1) En tubos de microcentrífuga se hicieron las siguientes mezclas de reacción:

	<u>PROBLEMA</u>	<u>CONTROL</u>
DNA del vector (pUC19)	6 μl (100 ng)	6 μl (100 ng)
DNA's complementarios	2 μl (9 ng)	-----
DNA ligasa de T4 (1U/ μl).....	1 μl	1 μl
Amortiguador de ligasa 10 X...	2 μl	2 μl
Agua ultrapura	9 μl	11 μl
	20 μl	20 μl

NOTA: El vector tiene un tamaño de 2,205 pb y el DNAC de hGH un tamaño de 640 pb lo cual quiere decir que el vector es 3.4 veces mas grande que el inserto. Lo anterior indica que si se desea una relación molar de 1:1, debemos mezclar, por decir algo, 10 ng del vector y 3 ng del inserto. En nuestro caso se eligió una relación de vector a inserto de 10:1 para asegurar la inserción del DNAC de hGH (Comunicación personal, Hugo Barrera Saldaña). Ahora bien, puesto que esta secuencia representa probablemente el 30% de todos los DNA's complementarios, la cantidad del inserto se multiplicó por un factor de 3, por lo que finalmente mezclamos 9 ng de los DNAC's y 100 ng del vector en nuestra reacción de ligación.

- 2) Se incubaron ambas mezclas a 15°C por 12 h. Se tomó una quinta parte de cada una de ellas y se analizaron los productos de ligación por electroforesis en un gel de agarosa. Al resto de la solución se le agregó medio volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2.2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se colocó a -20°C durante toda la noche.
- 3) Se precipitaron los DNA's por centrifugación a 15,000 rpm por 15 min, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en $20\ \mu\text{l}$ de agua ultrapura. Esta solución se colocó a 4°C donde fue almacenada hasta su uso posterior.

Hibridación tipo "Southern":

El presente método (39) fue utilizado para analizar la integración del DNAC de hGH en el vector de clonación.

Reactivos y soluciones:

- a) TAE 1 X (Tris-acetatos 0.04 M y EDTA 0.002 M).
- b) Bromuro de etidio (0.5 µg/µl).
- c) Solución desnaturalizante (NaOH 1 M y NaCl 3 M).
- d) Solución neutralizante (NaCl 3 M y Tris-HCl 1 M pH 7.5).
- e) SSC 20 X (NaCl 17.53% y Citrato de sodio 8.82% pH 7).
- f) SDS al 10%.
- g) Solución de prehibridación (Formamida desionizada 50%, SSC 5 X, Solución Denhardt 5 X, Fosfato de sodio 50 mM pH 8, SDS 0.1% y DNA sonificado de esperma de salmón 250 µg/ml).
- h) Solución de hibridación (Formamida desionizada 50%, SSC 5X, Solución Denhardt 5 X, Fosfato de sodio 50 mM pH 8, SDS 0.1%, Dextrán sulfato 10% y 1×10^6 cpm del DNAC de hPL marcado con ^{32}P).

Procedimiento:

Preparación del gel.

- 1) Se preparó un gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X y de izquierda a derecha se aplicaron las siguientes muestras: DNA 1 Kb Ladder como marcador de peso molecular, DNA's complementarios sin digerir, DNA's complementarios digeridos con Aat II y Xma I, el fragmento de pUC19 Aat II-Xma I utilizado como vector y el DNAC de hPL como control positivo de la hibridización.
- 2) Después de realizar la electroforesis se tiñó el gel en 200 ml de bromuro de etidio por 15 min y se destiñó en agua destilada por otros 15 min. Se tomó una fotografía.
- 3) El gel fue sumergido en solución desnaturalizante por 30 min. Se enjuagó en agua destilada y se introdujo en solución neutralizante por otros 30 min. Posteriormente fue colocado en SSC 20 X por 10 min.

Transferencia a papel filtro de nitrocelulosa.

- 4) En una cuba hidroneumática se vertió SSC 20 X y se introdujo un bloque de material inerte que sobresalía de la superficie del líquido. Sobre este material se diseñó un puente de humedad con una tira de papel Whatman 3 MM previamente humedecida en SSC 20 X y se eliminaron las burbujas de aire que se formaron entre el papel y el bloque utilizando una pipeta como rodillo.
- 5) Se colocó el gel sobre el papel filtro evitando la formación de burbujas. Sobre el gel se colocó una membrana de

nitrocelulosa previamente humedecida en agua por 10 min y en SSC 20 X por 15 min. La membrana era unos pocos milímetros mas grande que el gel. Se eliminaron las burbujas con una pipeta y sobre dicha membrana se depositaron 3 capas de papel Whatman 3 MM del mismo tamaño y después una cantidad abundante de toallas absorbentes. Se colocó un objeto pesado (0.5 Kg) sobre las toallas y se permitió la transferencia por 16 h.

- 6) Se desmontó el aparato, se recuperó la membrana y se dejó secar al aire entre dos hojas de papel Whatman. Se horneó la membrana durante 2 h a 80°C en una estufa con vacío mientras que el gel fue teñido con bromuro de etidio y analizado con luz UV para verificar la transferencia.

Hibridación y autorradiografía.

- 7) Se colocó la membrana en una bolsa de plástico, se agregaron 5 ml de solución de prehibridación y se selló la bolsa con un sellador térmico. Se prehibridó por 5 h a 42°C en un baño de agua con agitación lenta.
- 8) Se descartó la solución de prehibridación y en su lugar se agregaron 2 ml de la solución de hibridación con la sonda radiactiva previamente calentada a ebullición por 5 min y enfriada en hielo por otros 5 min. Se eliminaron las burbujas y se selló nuevamente la bolsa. Se hibridó toda la noche a 42°C con agitación lenta.
- 9) Se desechó cuidadosamente la solución de hibridación. Se recuperó la membrana y se sometió a 3 lavados de 15 min en 400 ml de SSC 2 X y SDS 0.1%. Los dos primeros a temperatura ambiente y el último a 50°C.
- 10) Posteriormente se hicieron 2 lavados en 400 ml de SSC 0.1 X y SDS 0.1% a 50°C por 45 min agitación suave.
- 11) Finalmente se enjuagó la membrana en 200 ml de SSC 0.1 X por 10 min y se dejó secar al aire entre dos hojas de papel Whatman 3 MM. Se envolvió la membrana con plástico adherible y se expuso a una película ultrasensible de rayos X durante toda la noche a -70°C. Se reveló la película al día siguiente y se interpretaron los resultados.

Transformación de bacterias con DNA plasmídico:

El presente método (40) fue utilizado para propagar en Escherichia coli los productos generados durante la ligación de los DNA's complementarios con el vector de clonación pUC19.

Reactivos y soluciones:

- a) Medio LB (Triptona 1%, Extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%, pH

7.5).

- b) Cloruro de calcio 0.1 M estéril y enfriado a 4°C.
- c) Placas de agar LB-Ampicilina (Tryptona 1%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, Agar 1.5% y Ampicilina 100 µg/ml).

Procedimiento:

Preparación de bacterias Ca⁺⁺ competentes (41).

- 1) A partir de un cultivo puro de Escherichia coli cepa RR1 se inocularon 20 ml de caldo LB. Se permitió el crecimiento durante toda la noche a 37°C con agitación vigorosa.
- 2) Se tomó 1 ml de este cultivo y se inoculó un matraz con 50 ml de caldo LB. Se incubó a 37°C con agitación constante hasta que alcanzó una D.O. de 0.350 a 550 nm.
- 3) Se colocó el matraz en hielo por 10 min. Se cosecharon las células en un tubo Falcon de 50 ml mediante centrifugación a 3,000 xg por 5 min a 4°C.
- 4) Se desechó el sobrenadante, se eliminó el exceso de líquido y se resuspendió la pastilla en 20 ml de CaCl₂ 0.1 M frío con la ayuda de un vortex. Se colocó el tubo en hielo por 20 min y se repitió la centrifugación. Finalmente se resuspendió la pastilla bacteriana en 1 ml de CaCl₂ 0.1 M frío y se mantuvo en hielo hasta su uso posterior.

Introducción de los plásmidos.

- 5) Se transfirieron 100 µl de bacterias Ca⁺⁺ competentes a cada uno de 4 tubos de microcentrifuga debidamente rotulados y respectivamente se agregaron los siguientes DNA's:
 - 5 µl (20 ng) de la ligación del vector + DNAC's.
 - 5 µl (20 ng) del vector sin insertos.
 - 10 µl (1 ng) de pUC19 superenrollado (control positivo).
 - 10 µl de agua destilada estéril (control negativo).
- 6) Se colocaron los tubos en hielo por 1 h y posteriormente se dió un choque térmico a 42°C por 45 s. Se regresaron los tubos al hielo por otros 10 min. Se agregó a cada tubo, cerca del mechero, 200 µl de caldo LB estéril (sin ampicilina) y se incubaron a 37°C por 20 min.
- 7) Finalmente se transfirió el contenido de cada tubo a su respectiva placa de agar LB-ampicilina y se extendieron con una asa de vidrio. Se colocaron las placas a 37°C durante toda la noche.

Minipreparaciones de plásmidos por el método de lisis alcalina:

El presente protocolo está basado en el método de Morelle descrito en 1989 (42) y fue utilizado para recuperar los plásmidos de las clonas recombinantes.

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 4 mg/ml).
- c) Solución alcalina (NaOH 0.2 N y SDS 1%).
- d) Acetato de amonio 7.5 M.
- e) Isopropanol y etanol al 70%.
- f) TE (Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM).
- g) RNasa (1 mg/ml).

Procedimiento:

- 1) Cada una de las clonas bacterianas provenientes de la transformación fue cultivada en 4 ml de caldo LB-Ampicilina. Se permitió el crecimiento por 12 h a 37°C con agitación vigorosa.
- 2) En tubos de microcentrifuga se cosecharon 3 ml de cultivo bacteriano mediante dos centrifugaciones sucesivas a 5,000 rpm por 2 min y posteriormente las pastillas bacterianas se resuspendieron en 200 µl de solución de lisis.
- 3) Después de 5 min a temperatura ambiente se agregaron 400 µl de solución alcalina recientemente preparada y se mezcló fuertemente al invertir los tubos 3 a 6 veces.
- 4) Después de 5 min en hielo se agregaron 300 µl de acetato de amonio 7.5 M y se mezcló suavemente el contenido por 10 s. Se colocó nuevamente en hielo por 10 min para permitir la precipitación de proteínas, RNA de alto peso molecular y DNA cromosómico.
- 5) Se centrifugó a 10,000 rpm por 3 min y se transfirieron los sobrenadantes a otros tubos de microcentrifuga. Se agregaron 500 µl de isopropanol, se mezcló y se dejaron reposar los tubos por 10 min a temperatura ambiente.
- 6) Se centrifugó a 15,000 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se lavaron las pastillas con etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente por 3 min, se desechó el sobrenadante y se secaron las pastillas en el evaporador centrífugo al vacío (SAVANT).

- 7) Se disolvieron las pastillas en 100 μ l de TE y se les agregó 1 μ l de la solución de RNAsa (1 mg/ml). Se colocaron los tubos a 37°C por 15 min y por último se tomaron alícuotas de 5 μ l para analizar el perfil electroforético de los plásmidos obtenidos.

Hibridación de DNA en gota seca (31):

El siguiente protocolo fue realizado para verificar la presencia de plásmidos portadores del DNAC de hGH en nuestras clonas recombinantes. Para este propósito se utilizó el dispositivo VACUSYSTEM (BIORAD) y se manejó de acuerdo a las instrucciones especificadas por el proveedor.

Reactivos y soluciones:

- a) NaOH 0.4N.
- b) SSC 2 X.
- c) Solución de prehibridación (ver hibridación tipo Southern)
- d) Solución de hibridación (ver hibridación tipo Southern).

Procedimiento:

- 1) Se recortó una pieza de membrana de nylon (Zetabind) a un tamaño de 7 x 10 cm y se introdujo en agua estéril por 15 min. Se colocó la membrana sobre la placa inferior del dispositivo de BIORAD y sobre ella se colocó la parte superior. Se ensamblaron fuertemente ambas partes con la ayuda de unas pinzas especiales para este propósito.

NOTA: El dispositivo consta de dos placas de acrílico; una inferior que contiene un artefacto para hacer succión mediante vacío y una superior que presenta 96 agujeros similares a los de una placa de microtitulación.

- 2) Se seleccionaron diversos agujeros de acuerdo a la cantidad de muestras disponibles y con cinta adhesiva se cubrieron aquellos agujeros que no se utilizarían. Se aplicaron 100 μ l de agua ultrapura en cada orificio seleccionado y se abrió el vacío para succionar el líquido.
- 3) En un orden adecuado se aplicaron 200 μ l (100 ng de DNA en agua) de cada una de las muestras previamente calentadas a ebullición por 3 min y enfriadas en hielo por 5 min. En el mismo volumen se aplicaron 10 ng de phPL815 y 10 ng de pUC19 como testigos positivo y negativo respectivamente. Se abrió nuevamente el vacío.
- 4) Se agregaron 500 μ l de NaOH 0.4 N para desnaturalizar el DNA y adherirlo a la matriz de nylon. Se aplicó vacío por última vez. Se desmontó el dispositivo, se recuperó la membrana y se

colocó en 500 ml de SSC 2 X por 15 min. Se dejó secar al aire entre dos hojas de papel Whatman 3 MM.

- 5) Finalmente se realizó la hibridación y autorradiografía tal y como se mencionó en el protocolo de hibridación tipo Southern (incisos 7 a 11).

Crecimiento de plásmidos a mediana escala:

El presente método fue utilizado para obtener cantidades relativamente abundantes de los plásmidos de nuestro interés con el propósito de poder analizarlos minuciosamente mediante disecciones enzimáticas. Dicho método fue descrito por Sadhu y Gedamu en 1988 (43).

Reactivos y soluciones:

- a) Caldo LB-Ampicilina (100 µg/ml).
- b) Cloranfenicol.
- c) Solución STET (Sacarosa 8%, Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 50 mM y Tritón X-100 5%).
- d) Lisozima a 10 mg/ml.
- e) RNAsa A a 10 mg/ml.
- f) Fenol saturado con Tris 0.1 M pH 8.
- g) Solución Sevag.
- h) Acetato de amonio 6 M.
- i) Etanol absoluto y etanol al 70% fríos.
- j) PEG-6,000 (30% de polietilenglicol en NaCl 1.8 M).
- k) Acetato de sodio 3 M pH 5.2.

Procedimiento:

- 1) Cada una de las bacterias portadoras de plásmidos de nuestro interés, fue cultivada en 2 ml de caldo LB-Ampicilina por 12 h a 37°C. Posteriormente se tomaron 200 µl de este cultivo y se inocularon 25 ml de caldo LB-Ampicilina. Se permitió el crecimiento por 3 h. Posteriormente 1 ml de este cultivo fue transferido a 100 ml de LB-Ampicilina y cuando la D.O. a 600 nm alcanzó un valor de 0.5, se agregó cloranfenicol a una concentración final de 250 µg/ml. Se prolongó la incubación por 16 h con agitación vigorosa.
- 2) Las células fueron colectadas por centrifugación a 5,000 xg por 10 min y se resuspendieron en 7 ml de solución STET. En seguida la suspensión celular fue transferida a un tubo de ensaye (vidrio) de 15 ml y se agregaron 800 µl de una solución de lisozima a 10 mg/ml. Las soluciones fueron mezcladas por agitación, se colocó el tubo a 0°C por 10 min y posteriormente en un baño de agua hirviendo por 1 min.
- 3) El lisado celular fue transferido a un tubo de policarbonato de pared gruesa y el DNA cromosómico fue eliminado por

ultracentrifugación a 45,000 rpm por 30 min a 4°C.

- 4) Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo de polipropileno de 15 ml (Falcon). Se agregó RNAsa A a una concentración final de 20 µg/ml y se incubó a 37°C por 30 min. Se realizaron varias extracciones orgánicas con fenol y sevag hasta la desaparición de los productos orgánicos en la interfase. A la fase acuosa recuperada se le agregó 0.1 volumen de acetato de amonio 6 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se colocó el tubo a -20°C por 30 min.
- 5) Los ácidos nucleicos fueron colectados por centrifugación a 7,000 rpm (Beckman TJ-6) por 10 min, se lavó la pastilla con etanol al 70% y se resuspendió en 2 ml de agua ultrapura. Se agregaron 800 µl de PEG-6,000, se mezcló vigorosamente y se repartió la solución en dos tubos de microcentrífuga los cuales fueron colocados a 4°C por 12 h.
- 6) El DNA fue colectado por centrifugación a 15,000rpm por 10 min, se resuspendió cada pastilla en 200 µl de agua y posteriormente se juntaron ambas soluciones en un solo tubo. Se agregó acetato de sodio a una concentración final de 100 mM y en seguida 2 volúmenes de etanol absoluto frío.
- 7) Después de 5 min a temperatura ambiente el DNA fue centrifugado a 15,000 rpm por 10 min, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 100 µl de agua ultrapura. Finalmente se cuantificó la obtención del DNA plasmídico mediante espectrofotometría a 260 nm y se verificó su calidad por electroforesis en geles de agarosa.

Caracterización enzimática de los plásmidos portadores del DNAc de hGH:

Una vez que los plásmidos que portaban secuencias codificantes para hGH fueron crecidos a mediana escala, se sometieron a tres digestiones enzimáticas con enzimas de restricción que cortaban tanto en el vector como en el inserto. Se seleccionaron las enzimas Pvu II, Ava II y Rsa I y se realizaron las digestiones de acuerdo a las condiciones especificadas por el proveedor. El patrón de restricción esperado para cada una de las digestiones, de acuerdo a la secuencia ya publicada (22), era el siguiente:

- 3 fragmentos Pvu II de 2,113, 497 y 227 pb
- 3 fragmentos Ava II de 1,638, 963 y 222 pb
- 2 fragmentos Rsa I de 2,018 y 812 pb

Al finalizar las digestiones se verificaron los productos por electroforesis en un gel de agarosa al 2% de acuerdo a Maniatis y cols. (33).

Por otra parte, cada uno de los plásmidos fue sometido a una doble digestión con las enzimas de restricción Aat II y Xma I con el propósito de analizar el tamaño de los insertos liberados. Si dichos plásmidos portaban el DNAC de hGH desde el sitio Aat II hasta el sitio Xma I, era de esperarse la liberación de un fragmento de 640 pb. Los productos de esta digestión fueron analizados, con mayor resolución, por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 4%.

Electroforesis en geles de poliacrilamida:

Este método es ampliamente utilizado para resolver pequeños fragmentos de DNA que varían en un rango de 50 a 2,000 pb. En nuestro caso, fue utilizado para determinar con exactitud el tamaño de los insertos liberados al digerir los plásmidos recombinantes con Aat II y Xma I. Se preparó un gel de poliacrilamida al 4% de acuerdo a Maniatis y cols. (33).

Reactivos y soluciones:

- a) TAE 50 X (Tris-acetato 2 M pH 8 y EDTA 100 mM).
- b) Solución de acrilamida-bisacrilamida (30%-0.8%).
- c) Persulfato de amonio al 50%.
- d) TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina).
- e) Agua ultrapura (Milli Q).
- f) Bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

Procedimiento:

- 1) Entre dos placas de vidrio de 15x17 cm se colocaron 3 separadores (BIORAD) de 1.5 mm de espesor en las posiciones laterales y en la parte inferior de ambas placas respectivamente. Para facilitar el desprendimiento del gel al final de la electroforesis, se aplicó una ligera capa de vaselina en cada separador. Se ensamblaron fuertemente las placas con pinzas especiales para este propósito y se colocaron en posición vertical sobre la mesa de trabajo.
- 2) En un vaso de precipitados se preparó la siguiente mezcla:

-- TAE 50 X	700 µl
-- Agua ultrapura	29.5 ml
-- Acrilamida -bisacrilamida (30%-0.8%)	4.66 ml
-- Persulfato de amonio al 50%	87.5 µl
-- TEMED	28.0 ml

Se mezcló el contenido por rotación manual y se virió rápidamente en el interior de las placas de vidrio. Se colocó inmediatamente un peine (BIORAD) de tamaño apropiado y se dejó solidificar el gel por 30 min.

- 3) Se retiró el peine y se montaron las placas en una cámara vertical para electroforesis. Se utilizó TAE 1X como amortiguador de corrida. Se aplicaron las muestras con una microjeringa de 50 μ l (Hamilton 701 N) y se realizó la electroforesis a 80 volts por 4 h.
- 4) Se desmontaron las placas y cuidadosamente se virvió el gel en 200 ml de bromuro de etidio (0.5 μ g/ml). Se permitió la tinción por 10 min y posteriormente se enjuagó en agua destilada por 5 min. Finalmente se colocó el gel sobre un transiluminador (UVP, Inc.) y se interpretaron los resultados.

Electroelución de DNA a partir de geles de poliacrilamida:

La presente sección describe un eficiente método de electroseparación de DNA a partir de un gel de poliacrilamida. Fue publicado por Bogel y cols. en 1987 (44) y su aplicación requiere un dispositivo, ya comercializado, conocido como Elutrap (Schleicher & Schuell). Básicamente el Elutrap es un cilindro hueco de acrílico en el cual se coloca una serie de membranas selectivas a los ácidos nucleicos. Dicho dispositivo se introduce en una cámara de electroforesis y a través de él se genera un campo eléctrico que permite la elución del DNA y su posterior recuperación en una trampa formada por dos membranas especiales.

Este método fue utilizado para recuperar el DNAC de hGH después de digerir los plásmidos que lo portan con las enzimas de restricción Aat II y Xma I.

Reactivos y soluciones:

- a) TAE 1 X (Tris-acetato 0.04 M pH 8.2 y EDTA 0.002M).
- b) Fenol saturado con Tris 0.1 M pH 8.
- c) Sevag.
- d) Acetato de amonio 7.5 M.
- e) Etanol absoluto y etanol al 70% fríos.

Procedimiento:

- 1) En las ranuras de ambos extremos del Elutrap se colocó una membrana BT1. En el extremo positivo (+) del aparato se colocó además una membrana BT2 a una distancia de 1 cm hacia el interior de la respectiva membrana BT1. Las membranas se acoplaron en posición vertical y se sujetaron fuertemente con una cuña especialmente diseñada para este propósito.
- 2) Se introdujo el dispositivo, con la polaridad adecuada, en una cámara horizontal para electroforesis que contenía TAE 1 X como amortiguador de corrida. Se agregaron 5 ml de TAE 1 X al cilindro del Elutrap y 300 μ l a la trampa formada por las membranas BT2 y BT1 en el extremo positivo. En la parte

central del cilindro se depositó el fragmento de acrilamida que contenía la banda de interés y se permitió la electroelución por 2 h a 150 volts.

- 3) Al final de la corrida se invirtió la polaridad de los cables en la cámara de electroforesis y se aplicó el mismo voltaje por 45 s. La solución que contiene el DNA fue recuperada de la trampa y se transfirió a un tubo de microcentrífuga. Se hicieron dos extracciones orgánicas con fenol y una con sevag. Se agregó medio volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se colocó a -20°C por 1 h.
- 4) El DNA fue colectado por centrifugación a 15,000 rpm por 15 min. Se lavó la pastilla con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en $20\ \mu\text{l}$ de agua ultrapura. Se tomó una alícuota de $1\ \mu\text{l}$ y se analizó el perfil electroforético del DNA recuperado.

Caracterización del DNAC de hGH con enzimas de restricción diagnósticas (45):

Se recuperó el DNAC de hGH por electroelución y posteriormente fue sometido a diversas digestiones con enzimas de restricción diagnósticas para realizar una caracterización enzimática más fina. Para ello se seleccionaron las enzimas Rsa I, Ava II, Hinf I y Pst I y se utilizaron de acuerdo a las condiciones especificadas por el proveedor.

El patrón de restricción esperado para cada una de esas enzimas era el siguiente :

- 2 fragmentos Rsa I de 366 y 274 pb
- 2 fragmentos Ava II de 405 y 235 pb
- 2 fragmentos Hinf I de 414 y 226 pb
- 2 fragmentos Pst I de 447 y 193 pb

Después de 2 h de incubación a 37°C se analizaron los productos de las digestiones por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 4% y se interpretaron los resultados.

Subclonación en fagos M13 (46):

El presente método fue utilizado para transferir una porción del DNAC de hGH al vector fágico M13mpl8 como previo requisito a la determinación de la secuencia nucleotídica. Para este propósito es importante destacar que, debido a la capacidad de resolución de los geles de secuenciamiento, el fragmento a subclonar debe tener un tamaño entre 250 y 600 pb y que las enzimas de restricción utilizadas para generar ese fragmento deben ser compatibles con la región de sitios múltiples de clonación (47).

El DNAC de nuestro interés tiene una longitud de 640 pb partiendo desde el sitio Aat II hasta el sitio Xma I. Dichos sitios corresponden respectivamente a las posiciones 79 y 719 del DNAC de hGH (22). De acuerdo a las limitantes mencionadas anteriormente, seleccionamos un sitio de restricción en el interior de nuestra secuencia que fuera compatible con el vector fágico y que a la vez produjera un fragmento génico aceptable. Se eligió un sitio de restricción Pst I localizado sobre la posición 193 del DNAC de hGH, de manera que si se hacía una doble digestión con las enzimas Pst I y Sma I (reconoce el mismo sitio que Xma I en la posición 719 y es compatible con el vector) se produciría un fragmento de 447 pb llenándose así los requisitos estipulados.

Procedimiento:

- 1) 2 μg del DNAC de hGH fueron digeridos con las enzimas de restricción Pst I y Sma I de acuerdo a las condiciones especificadas por el proveedor.
- 2) Al término de la doble digestión se realizó una electroforesis preparativa en un gel de poliacrilamida al 4% y se recuperó el fragmento de 447 pb por el método de electroelución. Se ajustó la concentración del DNA a 100 ng/ μl .
- 3) 1 μg del fago M13mp18 (7,250 pb) fue digerido también con las mismas enzimas de restricción. El DNA fue precipitado de manera convencional con etanol y acetato de amonio y se resuspendió en agua ultrapura de tal manera que la concentración final fuese de 100 ng/ μl .
- 4) En tubos de microcentrífuga se realizaron las siguientes mezclas de reacción: a) vector e inserto sin ligasa, b) vector e inserto con ligasa y c) vector solo con ligasa.

	<u>a(μl)</u>	<u>b(μl)</u>	<u>c(μl)</u>
Vector (M13mp18, 100 ng/ μl)	2	2	2
Inserto (447 pb, 100 ng/ μl)	3.7	3.7	-----
Amotiguador de ligación 10 X	2	2	2
DNA ligasa de T4	-----	1	1
Agua ultrapura	<u>12.3</u>	<u>12.3</u>	<u>15</u>
	20.0	20.0	20.0

NOTA: en a y b se tomó una relación de 3:1 (inserto a vector).

- 5) Se colocaron los tubos a 15°C por 12 h. Posteriormente se tomó una tercera parte de cada reacción y se analizaron los productos de ligación por electroforesis en geles de agarosa al 1%. La solución remanente se trató con etanol y acetato de amonio, se recuperó el DNA por centrifugación y finalmente se resuspendió en 20 μl de agua ultrapura. Se almacenó a 4°C hasta su uso posterior.