

2 G. 26. 102



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**SEPARACION Y PURIFICACION DE LAS DOS SUBUNIDADES
DE LA ENZIMA GLUTAMATO SINTASA EN
Escherichia coli K-12.**

T E S I S

Para obtener el título de:
QUIMICO FARMACENTICO BIOLOGO

Presenta:
LETICIA SAHAGUN ROJAS



México, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**SEPARACION Y PURIFICACION DE LAS DOS SUBUNIDADES DE
LA ENZIMA GLUTAMATO SINTASA EN Escherichia coli K-12.**

INDICE

	Pag.
I. INTRODUCCION	1
1) Generalidades.	1
2) Características de la enzima Glutamato Sintasa (GOGAT).	7
II. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	10
III. MATERIALES Y METODOS	12
IV. RESULTADOS	27
a) Mapa físico de los plásmidos pGOL3 y pGOL7.	27
b) Purificación de la enzima Glutamato Sintasa.	31
c) Separación de las dos Subunidades de la enzima Glutamato.	37
d) Análisis de aminoácidos.	41
V. DISCUSION	44
VI. CONCLUSIONES	49
VII. BIBLIOGRAFIA	56

INTRODUCCION

1) Generalidades.

La gran mayoría de los organismos vivos obtienen el nitrógeno en forma combinada como amonio, nitritos, nitratos y aún compuestos más complejos como lo son los aminoácidos (1), excepto algunos microorganismos como las bacterias fijadoras de nitrógeno molecular de la atmósfera.

Existen dos procesos importantes en el metabolismo nitrogenado.

a) La asimilación de este elemento a partir de los compuestos disponibles en el medio en donde la forma de esta asimilación depende del organismo y

b) La utilización de este nitrógeno en la biosíntesis de los compuestos necesarios para la supervivencia del organismo.

Los aminoácidos glutamato y glutamina son fundamentales en la asimilación y biosíntesis de los compuestos nitrogenados ya que estos actúan como donadores de nitrógeno en reacciones biosintéticas.

El glutamato es donador primario del grupo amino para la biosíntesis de aminoácidos principalmente por la vía de transaminación.

La glutamina puede donar su grupo amido para la biosíntesis de aminoácidos, purinas, pirimidinas, amonozucros así como otros compuestos.

Tanto la formación de aminoácidos así como la distribución del nitrógeno en la célula se ha estudiado profundamente en procariones y aquí trataremos esencialmente sobre la formación de glutamato y glutamina en enterobacterias en general.

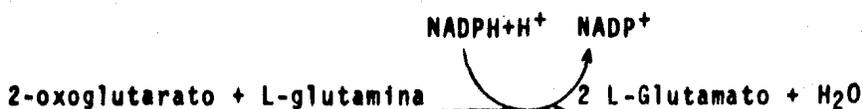
Se sabe que las enterobacterias utilizan glucosa como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno, para crecer en un medio mínimo, en estas condiciones el metabolismo intermedio funciona principalmente con los grupos nitrogenados que provienen de glutamato y glutamina.

El glutamato se produce por tres vfas dependiendo de la o las disponibilidades de nitrógeno orgánico que se encuentren en el medio, teniendo así las vfas que utilizan 2-oxoglutarato en reacciones como son:

a) Reacción catalizada por la enzima deshidrogenasa glutámica (L-glutamato: NADP⁺ oxidoreductasa: E(1.4.1.4) (GDH).



b) Reacción catalizada por la enzima glutamato sintasa (L-glutamato: NADP⁺ oxidoreductasa E(1.4.13) (GOGAT) que funciona en forma acoplada con la reacción dependiente de ATP que es catalizada por la enzima glutamino sintetasa.

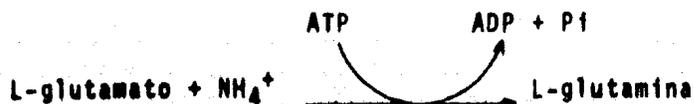


c) La vfa que utiliza 2-oxoglutarato y los grupos amino de otros aminoácidos por transaminación teniendo la reacción general:



La formación de glutamina se realiza por una sola vfa mediante la reacción catalizada por la enzima glutamino sintetasa (L-glutamato: amonio-ligasa E (6.3.1.2) (GS).

Esta enzima esta sujeta a varias formas de regulación tanto en su concentración como en su actividad (2).



En estos microorganismos se han observado reacciones catalizadas por deshidrogenasas glutámicas pero que utilizan NADH y estas parecen estar involucradas en procesos catabólicos como la desaminación oxidativa, mientras que las deshidrogenasas glutámicas dependientes de NADPH realizan principalmente la función biosintética (aminación reductiva) del glutamato. En las enterobacterias se ha descrito solamente la GDH biosintética.

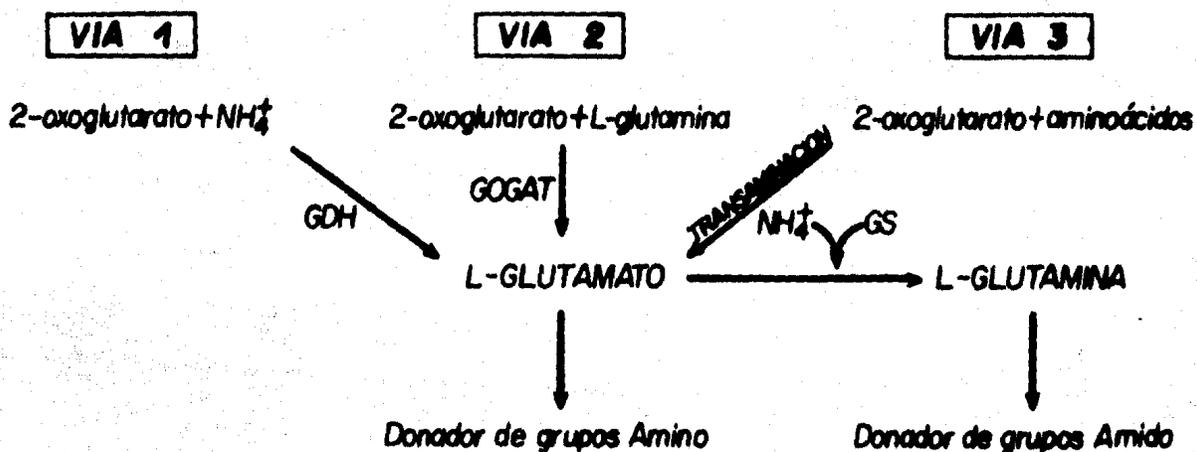


FIG 1

En la figura 1 se esquematizan las formas de incorporación del amonio a moléculas orgánicas y las tres principales vías de formación del glutamato para llegar a la biosíntesis de glutamina.

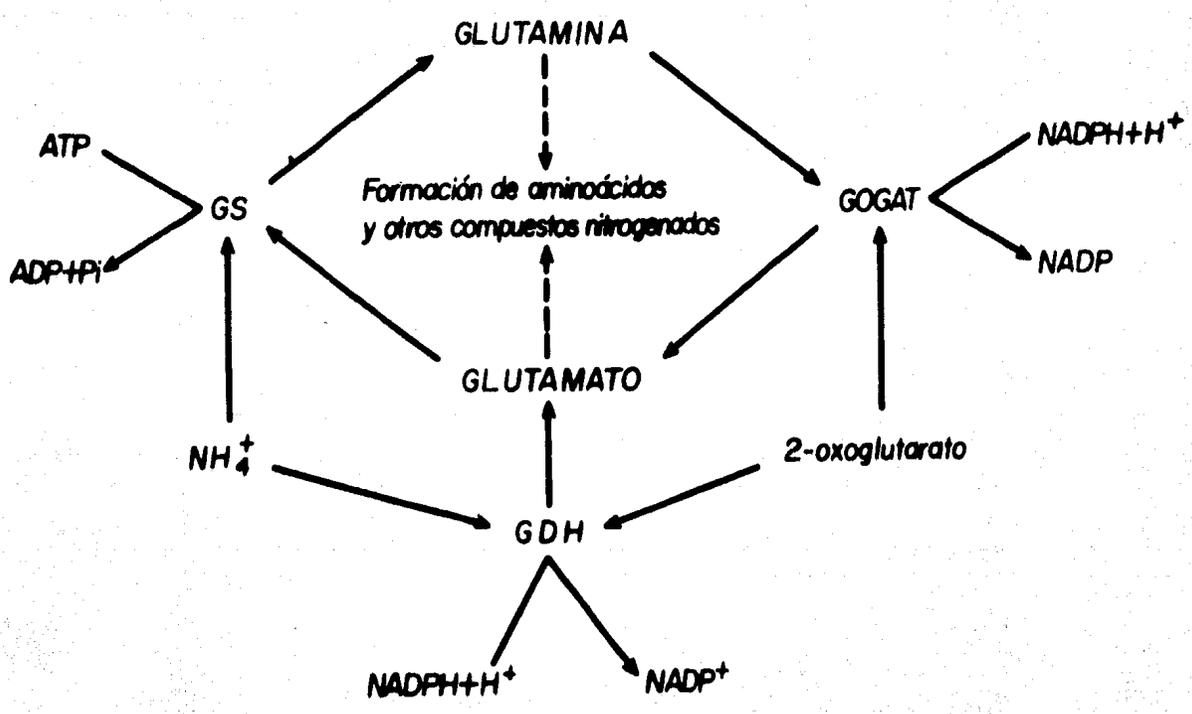


FIG 2

Puede observarse que la asimilación de amonio y su utilización para la formación de glutamato en las enterobacterias está controlada por las tres enzimas antes mencionadas: GDH, GOGAT, GS y la relación entre ellas se esquematiza en la figura 2.

De las enzimas mencionadas trataremos en particular de la glutamato sintasa (GOGAT).

Se ha descrito que el mecanismo primario para la síntesis de aminoácidos a partir de amonio y metabolitos intermedios es realizado por la enzima GDH; o bien, en aquellos organismos que carecen de esta enzima, por algunas deshidrogenasas de aminoácidos analogas como la alanina deshidrogenasa. Sin embargo, Tempest y colaboradores (3), realizaron observaciones que apuntaban hacia una vía alternativa de la asimilación del amonio en las bacterias. Estas observaciones son las siguientes:

- a) Mutantes de Bacillus subtilis que habfan perdido tanto la alanina deshidrogenasa como la deshidrogenasa glutámica eran aún capaces de crecer en medio mínimo.
- b) La síntesis de deshidrogenasa glutámica en Klebsiella aerogenes podía ser reprimida casi totalmente sin afectar la capacidad de estos microorganismos de asimilar amonio y crecer en un medio mínimo. Una investigación detallada de este hecho reveló la existencia de una enzima que utilizaba glutamina para sintetizar glutamato y que era desconocida hasta entonces.

Se estableció claramente que la síntesis de glutamato en cultivos de Klebsiella aerogenes limitados en amonio podía efectuarse por un proceso que involucra dos etapas: Primeramente la síntesis de glutamina donde se utiliza una molécula de ATP, y posteriormente la transferencia reductiva del grupo amido a la posición 2 del 2-oxoglutarato formándose así dos moléculas de glutamato consumiéndose en esta última reacción NADPH, teniendo como resultado la siguiente reacción.

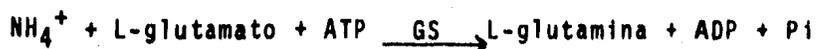


FIG 3

Tempest y colaboradores (3) realizaron un estudio del contenido y distribución de GOGAT y de GDH en varias especies de bacterias y levaduras encontrando que GDH estaba ampliamente distribuida, no siendo el caso de GOGAT.

Este estudio incluye a organismos fijadores de nitrógeno, varias especies de algas azul-verdes, algunos anaerobios, bacterias termofílicas y criofílicas.

Por otro lado recientemente se ha descrito actividad de GOGAT en ciertos organismos eucariotes tales como Schizosaccharomyces y Neurospora crassa (4).

Respecto a las plantas se sabe que las dos enzimas importantes para la síntesis de glutamina así como para la transferencia de su nitrógeno amido a otros aminoácidos son la glutamino sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT) respectivamente.

Estas dos enzimas se han aislado, encontrándose a la glutamino sintetasa tanto en el citosol como en los plástidos, a diferencia de la glutamato sintasa que sólo esta presente en los plástidos (5).

Por lo mencionado anteriormente es claro que la enzima glutamato sintasa (GOGAT) juega un papel muy importante en el metabolismo nitrogenado de los organismos.

2) Características de la enzima Glutamato Sintasa (GOGAT).

El nombre de la enzima se debe a que ésta cataliza la síntesis de glutamato pero no utiliza ATP, las siglas GOGAT provienen de "Glutamino (amido): 2-oxoglutarato amino transferasa (óxido reductasa NADP)" nombre sugerido inicialmente por Tempest (3).

GOGAT es una flavoproteína que contiene 7.8 moles de flavina, 38.4 moles de hierro 30.4 moles de azufre por mol de proteína.

Su coeficiente de sedimentación es de 20 S. Su peso molecular es de 800,000 d por equilibrio de sedimentación y filtración en gel. Los tres espectros de absorción máxima que posee la enzima son a 278, 380 y 440 nm. Por espectros de absorción y de resonancia electrónica paramagnética del NADPH reducido se sugiere la formación de un intermediario flavina semiquinona estable.

La proteína pura migra como banda única en electroforesis en geles de poliacrilamida a pH 7.2 y 8.5 y cuando se trata esta enzima con S.D.S urea o guanidina, aparecen dos polipéptidos de 135,000 y 53,000 de peso molecular en E.coli, y de 51,000 y 175,000 d en Klebsiella aerogenes.

Las constantes de Michaelis-Menten (Km's) son las siguientes:

Para NADPH 7.7 mmol, 2-oxoglutarato 7.3 mmol y para L-glutamina 250 mmol.

Según Miller (6) se puede mantener la enzima pura a 80°C en presencia de 2-oxoglutarato y EDTA por más de un año conservando su actividad total. El pH óptimo es 7.6 y entre los más potentes inhibidores de la actividad de la enzima están L-aspartato, L-metionina, D-glutamato y NADP⁺. En la subunidad pesada es donde se une la glutamina, para la formación de glutamato, y esta actividad es dependiente de flavinas y del Fe-S contenidos en esta subunidad; se determinó también actividad de glutaminasa en esta misma (7,8).

En cuanto a la subunidad ligera, se observó que también podía formar glutamato a partir de amonio, en reacción similar a la de GDH.

Pudiera pensarse que la GDH y la subunidad ligera de GOGAT son la misma proteína pero esta posibilidad queda descartada ante la falta de reacción cruzada entre los anticuerpos anti-GDH y la subunidad ligera de GOGAT (7).

Poco se conoce sobre la regulación de la formación de la enzima GOGAT (2). En trabajos realizados con Klebsiella aerogenes se observan algunas contradicciones ya que algunos trabajos reportan altos niveles de la enzima en cultivos limitados de amonio (9). En contraste, al utilizar otra cepa diferente de K. aerogenes se encontraron que los niveles de GOGAT eran más bajos al crecer las células en las mismas condiciones limitantes de amonio o glutamina (10).

Brenchley y col. (11) reportaron en un extenso estudio con S. typhimurium la existencia de altos niveles de GOGAT en células silvestres crecidas en medio mínimo con glucosa y exceso de amonio a pesar de la presencia de glutamato y glutamina. Sin embargo se encontró una actividad baja en cultivos crecidos con caldo nutritivo o en medio de glucosa y amonio suplementados con aspartato o una combinación de aminoácidos que inhiben la actividad de GS (glutamino sintetasa). O crecidos en condiciones limitantes suplementados con glutamato y glutamina.

En suma, células crecidas con glutamato como única fuente de nitrógeno dan por resultado una muy baja actividad de GOGAT.

La Pointe (12), reporta un incremento de cinco veces en el nivel de GOGAT en cepas de E.coli, con una mutación termosensible de la glutamil-tRNA sintetasa, cuando se crecen a una temperatura parcialmente restrictiva y donde la velocidad de crecimiento se veía reducida. En este caso los niveles de GS se incrementaron 50 veces lo cual podía alterar el nivel intracelular de glutamina.

Aunque no es posible establecer aún un panorama definitivo acerca de la regulación de GOGAT, es claro que la síntesis de esta enzima está regulada.

Sobre la genética de la formación de GOGAT se han descrito cepas mutantes en K.pneumoniae, K.aerogenes, E.coli y S.typhimurium, que son incapaces de crecer en medio mínimo con glucosa conteniendo una baja concentración de amonio o una variedad de compuestos nitrogenados como única fuente de nitrógeno. Estas cepas fueron descritas como Asm^- o negativas para la asimilación de amonio (13).

El locus genético involucrado en la biosíntesis de GOGAT denominado gltB, se reportó originalmente unido al locus mal P,Q, sin embargo, Pahel y col. (14) han relocalizado este locus (gltB) en la cercanía del gene argG en el cromosoma de E.coli. Tyler ha propuesto (2) que el fenotipo Asm^- podría resultar de mutaciones de cualquiera de los genes estructurales ya que la enzima GOGAT está formada por dos subunidades diferentes, o bien que este fenotipo podría resultar también de alteraciones en una o más proteínas regulatorias.

Sin embargo aun no se ha reportado cepas Asm^- que pierdan la actividad de GOGAT por una mutación no ligada a argG lo que sugiere que los genes para ambas subunidades están cercanos a argG.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Ante la cantidad de datos obtenidos por cepas mutantes se ha pensado en estudiar los genes de esta enzima desde un punto de vista más directo y una alternativa interesante para estudiar a estos genes se ha presentado con el aislamiento de plásmidos que complementan mutaciones presentes en el cromosoma de E.coli K-12 (15).

Estos plásmidos se han aislado a partir de un banco de genes de E.coli (16). Esto ha abierto la posibilidad de estudiar la organización física, transcripción en multicopia y regulación de estos genes.

Los plásmidos aislados son pACR1 que complementa la mutación glnA20 de la cepa MX705 auxótrofa para glutamina, con este plásmido se presenta actividad de glutamino sintetasa (GS). Los plásmidos pRSP1 y pRSP20 que complementan las mutaciones gdh-1 y glt-B31 respectivamente de la cepa PA-340. Células de esta cepa conteniendo estos dos plásmidos por separado, pierden ahora la auxotrofia por glutamato. En el caso de la cepa MX729 (pRSP1/PA340) se detectó actividad de GDH pero no de la enzima GOGAT y en el caso de la cepa MX730 (pRSP20/PA340) se tiene ahora actividad de GOGAT pero no de GDH (15).

Actualmente sabemos que el plásmido pRSP20 contiene los genes que codifican para las dos subunidades de la enzima GOGAT. Esto se ha demostrado por medio de experimentos de complementación, inmunoprecipitación y minicélulas conteniendo el plásmido pRSP20 en donde se observa la producción de dos polipéptidos de 135,000 y 53,000 d de peso molecular en electroforesis de acrilamida-SDS.

De este plásmido pRSP20 se han obtenido derivados, que por medio de técnicas como el sistema de minicélulas, se ha demostrado que contienen cada una de las subunidades de la enzima GOGAT(19).

Es de gran interés entonces tener la caracterización de estos genes de GOGAT y tratar de entender la regulación de los mismos. Para esto se ha pensado en dos estrategias; por un lado la determinación de la secuencia nucleotídica de estos genes para lo que es conveniente tener un mapeo fino de los sitios reconocidos por diversas endonucleasas de restricción en las regiones de DNA cromosomal contenidos en los plásmidos derivados del pRSP 20, y por otro lado purificar las dos subunidades de la enzima GOGAT para determinar la secuencia de aminoácidos tratando así de definir las regiones regulatorias y estructurales de los genes de la enzima GOGAT.

Los objetivos específicos de esta tesis son : por un lado realizar un mapeo fino de los sitios para enzimas de restricción en algunos derivados del pRSP20 dentro de los genes de GOGAT y, por otro lado la purificación de las subunidades de esta enzima por separado.

MATERIALES Y METODOS

1) Cepas.

Cepa CS520 - Genotipo - Hfr, trp A58, metB1, glyV50, suuF58 relA1 (16).

Cepa P678-54 Genotipo - F⁻, thr, leu, thi-1, supE, lac Y, tonA, gal, mal, xyl, ara, mtl, min (20).

2) Medios de cultivo.

2.1 Los inóculos se hicieron en caldo Luria (LB), el cual contiene:

Bacto-Triptona (Difco) al 1%, extracto de levadura (Difco) al 0.5%, NaCl al 1% y NaOH 2.5 mol. Para aislar cepas se usó agar Luria, el cual contiene: agar (Difco) al 2% y ampicilina (100 mg/l), tetraciclina y cloranfenicol (30 mg/l) cuando fué necesario.

2.2 El medio mínimo M-9 para la purificación de plásmido, está constituido por: 20 ml de glucosa al 20%, 4g de casamino - ácidos (Difco), 10 ml de MgSO₄ 0.1 mol, 10 ml CaCl₂ 0.01 mol, 100 ml de sales 10X (diez veces concentrada) compuestas por: 132 g de Na₂HPO₄·7H₂O, 30 g de KH₂PO₄, 5 g de NaCl 10 g de NH₄Cl, todos los requerimientos de la cepa P678-54 son: 4 ml de prolina al 4%, leucina al 1%, histidina al 1% treonina al 2%, y 0.2 ml de vitamina B1 al 1%. Los amino - ácidos fueron esterilizados por filtración y la glucosa y sales 10X esterilizados por separado en autoclave (120°C, 15 lb, 20 min).

2.3 El medio empleado para cultivar la cepa CS520 de la cual se parte para llevar a cabo la purificación de la enzima glutamato sintasa GOGAT fué el siguiente: 150 ml de NN10X (por litro KH₂PO₄ 136 g, K₂SO₄ 26.1 g, FeSO₄·7H₂O (0.5 mg) KOH 10 mol 100 ml), más 15 ml de cada uno de los siguientes componentes: CaCl₂ 0.01 mol, glucosa 20%, MgSO₄ 0.1 mol. NH₄Cl 8%, triptofano 0.5%, metionina 0.7% y aforar a 15 l.

con agua destilada estéril.

3) Mapeo de sitios reconocidos por endonucleasas de restricción.

Las endonucleasas de restricción son enzimas que reconocen secuencias específicas dentro de la doble hélice de DNA y han sido divididas en tres grupos. Las endonucleasas clase dos son las más útiles ya que reconocen regiones específicas de 4, 5, 6, 7, u 8 pares de bases.

corte	moléculas resultantes	denominación de los extremos
①	$\begin{array}{l} -A-OH \\ -\underset{\cdot}{\underset{\cdot}{\underset{\cdot}{T}}TAA}_3-O(P) \end{array} \quad \textcircled{P} \begin{array}{l} O-5'-AATTT-3' \\ HO-\underset{\cdot}{\underset{\cdot}{\underset{\cdot}{A}}} \end{array}$	5' salientes
②	$\begin{array}{l} -AAA^3-OH \\ -\underset{\cdot}{\underset{\cdot}{\underset{\cdot}{T}}T}_3-O(P) \end{array} \quad \textcircled{P} \begin{array}{l} O-5'-TTT- \\ HO-\underset{\cdot}{\underset{\cdot}{\underset{\cdot}{A}}}AAA- \end{array}$	rosos
③	$\begin{array}{l} -AAATT^3-OH \\ -\underset{\cdot}{\underset{\cdot}{\underset{\cdot}{T}}}_3-O(P) \end{array} \quad \textcircled{P} \begin{array}{l} -O-T- \\ HO-\underset{\cdot}{\underset{\cdot}{\underset{\cdot}{T}}}TAAA- \end{array}$	3' salientes

Fig 4

En la figura 4 se esquematizan las tres formas de cortes efectuados por endonucleasas de restricción y los extremos que genera.

Cuando un DNA es hidrolizado con una endonucleasa de restricción, éste es roto en varios fragmentos los cuales al ser separados en geles de agarosa o poliácridamida, según su peso molecular forman una serie de bandas (patrón de restricción), el cual es característico de cada DNA tratado con esa endonucleasa. De esta manera se pueden localizar sitios para endonucleasas de restricción y poder tener un mapeo físico de un DNA (21).

Con excepción de PvuI (P.L. Biochemicals) las otras enzimas de restricción usadas en este trabajo fueron purificadas de acuerdo al procedimiento de Green (22). Se adicionó a la mezcla de reacción 1/10 del volumen de amortiguador 10X de la enzima usada. Las reacciones con endonucleasas fueron incubadas a 37°C (a excepción de taqI que fué incubada a 60°C) durante el tiempo requerido de acuerdo con la actividad de cada enzima, y posteriormente se detuvo la actividad mediante calentamiento a 65°C durante 10 min, ó adicionando 1/3-1/5 del volumen de reacción de la siguiente mezcla (urea 10 mol, cianol de xileno 0.05%, azul de bromofenol 0.05% en agua). Cuando fué necesario, las mezclas fueron extraídas con un volumen de fenol saturado y un volumen de cloroformo (este tratamiento elimina la protefna adicionada) y precipitadas con dos volúmenes de etanol frío y 1/25 de NaCl 5 mol.

4) Electroforesis en geles de agarosa y acrilamida y acrilamida-SDS.

La electroforesis se llevó a cabo en placas conforme las condiciones descritas por Bolivar et.al. (23). Agarosa (Bio-Rad) al 1% disuelta por calor en amortiguador Tris-Boratos-EDTA (Trizma Base (Sigma) 90 mol, EDTA 2.5 mol, H_3BO_3 90 mol, pH 8.2). Las muestras, con un contenido de 0.5-2.5 μ g de DNA, se colocaron en los carriles en un volumen de 10-40 μ l cada una. La electroforesis se llevó a cabo a 1500 V y a temperatura ambiente durante 1 hora, este tipo de gel fué usado cuando se trató de fragmentos de peso molecular alto (1-4 Md) (Megadalton).

Los geles de poliácridamida al 7.5% se prepararon mezclando 3 ml de amortiguador Tris-Boratos EDTA 10X, 7.5 ml de solución acrilamida-bisacrilamida (Bio-Rad) al 28% y 0.6% respecti-

vamente, 150 μ l de $\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$ (Persulfato de amonio). Después de desgasificar al vacfo se adicionaron 15 μ l de TEMED (N,N,N',N' tetrametiletilendiamina) (Bio-Rad) y se vació esta mezcla a la placa. Estos geles se usaron para fragmentos de DNA de tamaño pequeño de 0.015-1 Md.

Después de terminada la electroforesis, los geles se sumergieron en una solución de bromuro de etidio (0.4 mg/ml Stock se toma una dilución de 1:1000 para teñir los geles) (Calbiochem) y se iluminaron con una lámpara U.V. de onda corta (254-257) (Products, San Gabriel Cal, U.S.A.).

Para fotografiar los geles se usó un filtro de gelatina amarilla No.9 Kodak Wratten y película TriX-Pan Kodak con una cámara MP 5 Polaroid y con una exposición de 5-10 min.

Los geles de poli(acrilamida) al 11% en presencia de (SDS) dodecilsulfato de sodio, fueron preparados de acuerdo al método de Laemmli (24).

Gel inferior (gel separador).- 8.25 ml de Acril-Bis (29.2% acrilamida, 0.8% bisacrilamida) 4.5 ml de Tris 2mol pH 8.8, 0.113 ml de SDS al 10%, 0.3 ml de persulfato de amonio (10 mg/ml) 15 μ l de TEMED y 8.93 ml de H_2O , desgasificar al vacfo. Esta mezcla se vacía entre las placas de vidrio de la cámara de electroforesis. Una vez polimerizado el gel se procede a preparar el siguiente gel.

Gel superior (gel empacador).- 1.75 ml de Acril-Bis, 0.325 ml de Tris 2 mol pH 6.8, 0.05 ml de SDS al 10%, 5.75 ml de H_2O , 0.1ml de persulfato de amonio (10mg/ml) y 5 μ l de TEMED. Esta mezcla se vacía sobre el gel separador (inferior) hasta polimerización.

La muestra se debe tratar con el amortiguador de disolución de proteínas el cual contiene lo siguiente: 0.1 g de SDS, 100 μ l de B-mercaptoetanol, 0.0074 g de EDTA, 1 ml de glicerol, añadir esto a 10 ml de Tris pH 6.8 y un poco de azul de bromofenol. Adicionar de esta mezcla aproximadamente 1/3 del volumen de la muestra y hervir por 5 min. Colocar las muestras ya frías en los carriles.

La electroforesis se llevó a cabo a 10 mA/gel cuando la muestra está en el gel superior, y a 20 mA/gel cuando pasa al gel inferior.

Buffer de corrida (12 g de Tris, 57.6 g de glicina, llevar a un litro , pH 8.4).

Tomar 200 ml de la solución stock, añadir 8 ml de SDS al 10% y llevar a un litro.

Terminada la electroforesis sumergir el gel en tinción de Azul de Coomassie R-250 (bio-Rad) (30 ml metanol, 10 ml de ácido acético, 0.06% Azul de Coomassie 100 ml de H₂O), por 15 min. a 65°C con agitación lenta, desteñir el gel con ácido acético al 10%, 15 min a 65°C (llevar a cabo tantos cambios como sea necesario).

Secar el gel sobre papel filtro Whatman 3MM con vacío y calor por una hora.

5) Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Reactivos.

- 1) Etanol al 95% (50 ml).
- 2) H₃PO₄ al 85% (100 ml).
- 3) Disolver 100 mg de Azul de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 95%.
- 4) Agregar 100 ml de H₃PO₄ al 85%.
- 5) Diluir la solución hasta 1 litro con H₂O bidestilada.
- 6) Filtrar en papel Whatman 3MM.

Ensayo: (25)

- a) Se ajusta la muestra de proteína con solución salina 0.15 mol NaCl o amortiguador adecuado hasta 100 µl
- b) Agregar 5 ml de reactivo de Bradford y mezclar.
- c) Medir a 595 nm inmediatamente.

Se hace una curva estándar con albúmina de la siguiente manera:

Solución stock de Albúmina de suero bovino (BSA) (1mg/ml)
solución de NaCl (0.15 mol).

Tubo 1.- 100 µl de NaCl.

Tubo 2.- 95 µl de NaCl, 05 µl de BSA.

Tubo 3.- 90 µl de NaCl, 10 µl de BSA.

Tubo 4.- 80 µl de NaCl, 20 µl de BSA.

Tubo 5.- 70 µl de NaCl, 30 µl de BSA.

Tubo 6.- 60 µl de NaCl, 40 µl de BSA.

Añadir 5 ml de reactivo de Bradford a cada uno de los tubos. Mezclar y leer a 595 nm.

6) Microensayo del DNA de plásmido.

Este método consiste en la semipurificación de pequeñas cantidades del DNA de plásmido con el fin de caracterizarlo parcialmente, llevado a cabo por el método de Maniatis (21). Los pasos son los siguientes:

- 1.- Cultivar 5 ml de células toda la noche en caldo Luria.
- 2.- Transferir 1.5 ml del cultivo a un tubo de 1.5 ml de plástico (Eppendorf) y centrifugar un minuto a 12000 rpm (revoluciones por minuto).
- 3.- Decantar y agregar al paquete celular 100 μ l de la solución I (50 mmol glucosa, 10 mmol EDTA, 25 mmol Tris pH 8, 4 mg/ml lisozima (Sigma) agitar mecánicamente (vortex) y mantenerlo 5 min a temperatura ambiente.
- 4.- Añadir 200 μ l de solución II (0.2 N NaOH, SDS 1%) frío y mezclar por inversión, colocar en hielo por 5 min.
- 5.- Agregar 150 μ l de solución III (Acetato de sodio 5 mol, 1.15 ml de ac. acético glacial, 2.85 ml de H₂O, pH 4.8) agitar mecánicamente en vortex por 10 segundos y mantenerlo 5 min a 0 °C.
- 6.- Centrifugar por 5 min a 12000 rpm.
- 7.- Decantar y tomar el sobrenadante para agregarle a éste, un volumen de fenol, agitar y agregar inmediatamente un volumen de cloroformo y agitar por dos minutos.
- 8.- Tomar fase acuosa (superior) y agregar dos volúmenes de etanol absoluto, agitar y mantener dos min a temperatura ambiente.
- 9.- Centrifugar 5 min a 12000 rpm y decantar.
- 10.- Lavar el precipitado con 1 ml de etanol al 70%, y agitar.
- 11.- Centrifugar 5 min a 12000 rpm.
- 12.- Decantar y secar el paquete celular en vacío (Savant).
- 13.- Resuspender el DNA en 50 μ l de amortiguador TE (1 ml de Tris 1 mol pH 8, 0.4 ml EDTA 0.25 mol a 100 ml) + 2 μ l de Ribonuclease-A (tipo 1-A Sigma) (10 mg/ml).

- 14.- Tomar 10 μ l y digerir con endonucleasas de restricción por 1-2 horas según actividad de la enzima.
- 15.- Llevar a cabo la electroforesis de agarosa o acrilamida según el caso.

7) Preparación de DNA de plásmido.

El DNA de plásmido se preparó mediante la amplificación de cultivos (incremento del número de copias del plásmido) (26).

Añadiéndose 200 mg/l de cloranfenicol, ó 300 mg/l de especificina según el siguiente protocolo.

- 1.- Inocular medio Luria con la cepa correspondiente toda la noche (P678-54).
- 2.- Agregar 0.04 ml de este cultivo de toda la noche a 100 ml del siguiente medio:
CaCl₂ 10 mmol 1 ml, sales M-9 10X 10 ml, medio de Luria 10 ml, glucosa 50% 0.5 ml, MgSO₄ 0.1 mol 1 ml, CAS aminoácidos 20% 0.5 ml, requerimientos de la cepa en el volumen necesario, H₂O destilada 76 ml. Crecer en agitación (180 rpm) a 37°C hasta una densidad óptica D₀=1 a una longitud de onda de 660 nm.
- 3.- Añadir 1 ml de glucosa 50%, 0.5 ml de CAS aminoácidos y 10 ml de medio de Luria.
- 4.- Dejar en agitación 30 min a 37°C.
- 5.- Amplificar con el antibiótico correspondiente e incubar 16h a 37°C con agitación con el fin de incrementar el número de copias.
- 6.- Se centrifugan las células en el rotor GSA (Sorvall) a una velocidad de 5000 rpm por 5 min.
- 7.- Suspender bien las células en 150 ml de NaCl 10 mol y centrifugar a 5000 rpm por 5 min.
- 8.- Suspender en 2 ml de la solución I (Tris 25 mmol pH 8, EDTA 10 mmol, glucosa 50 mmol, lisozima 2 mg/ml) y colocar en hielo por 45 min.
- 9.- Añadir 4 ml de la solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) mezclar por inversión y colocar en hielo por 15 min.

- 10.- Añadir 1.3 ml de solución III (acetato de sodio 3 mol pH 4.8) mezclar por inversión y colocar en hielo por 60 min.
- 11.- Centrifugar a 17000 rpm en rotor SS-34 (Sorvall).
- 12.- Decantar el sobrenadante y añadirle a este 0.1 ml de RNasa (10 mg/ml) y dejar reposar a temperatura ambiente por 15 min.
- 13.- Agregar un volumen (con respecto al total) de fenol saturado (fenol saturado en amortiguador Tris-HCl 50 mmol, NaCl 100 mmol pH 7.5, equilibrar 16 h con agitación a 4°C) mezclar y agregar un volumen de cloroformo igual al de fenol y agitar. Centrifugar a 5000 rpm por 15 min en rotor de columpio HS-4 (Sorvall).
- 14.- Remover la fase superior (acuosa) y pasarla a otro recipiente (evitar la película de proteína desnaturalizada de la interfase).
- 15.- Agregar 2.5 volúmenes de etanol a -20 °C y 1/25 parte del volumen total NaCl 5 mol, dejar precipitando toda la noche.
- 16.- Centrifugar 45 min a 8000 rpm en rotor HS-4.
- 17.- Decantar y resuspender el precipitado en 0.5 ml de solución IV (acetato de sodio 0.3 mol pH 8).
- 18.- Precipitar con 1.25 ml de etanol a -20°C y centrifugar a 12 000 rpm por 5 min.
- 19.- Resuspender en amortiguador TE y añadir 50 µl de RNasa para incubar por 2 horas a 37°C.
- 20.- Determinar la concentración de DNA a una longitud de onda de 260 nm.
- 21.- Gradiente isopícnico a equilibrio en cloruro de cesio/ioduro de propidio.
Preparación del gradiente.
Agregar en tubos de 5 ml de nitrato de celulosa (1/2" x 2"), por tubo:
 - a) 2.2 g de CsCl (sólido).
 - b) 2.1 ml de DNA en amortiguador TE (los tubos no deben contener más de 500 µg de DNA c/u). El trabajo debe ser hecho a partir de este momento en la oscuridad. (El ioduro de propidio reacciona con la luz visible).
 - c) Añadir 150 µl de una solución de 2 mg/ml de ioduro de propidio.

- d) Cubrir con 2.3 ml de aceite mineral. Se balancean los tubos dentro de las camisas con aceite mineral.
- 22.- Centrifugar en rotor SW 50.1 (Beckman) a 38000 rpm 20 h a 20 °C.
- 23.- El DNA en el gradiente será visible con luz ultravioleta U.V ya que el yoduro de propidio fluoresce. (El yoduro de propidio se intercala en el DNA de doble cadena).
El complejo DNA yoduro de propidio es menos denso en el caso del DNA lineal (cromosoma roto) que el del plásmido superenrollado, entonces las formas lineales adquieren una densidad más baja relativa al DNA del plásmido covalentemente cerrado (superenrollado) en presencia del compuesto. Se observarán dos bandas: la superior, formada por DNA cromosomal bacteriano y plásmido roto; y la inferior, formada por el plásmido superenrollado (los intermediarios de replicación del plásmido producen un barrido tenue entre las dos bandas).
- 24.- En la obscuridad y bajo luz U.V picar el fondo de los tubos y coleccionar lentamente el DNA (plásmido) en un tubo de plástico.
- 25.- Usar una columna de intercambio iónico (Dowex 50W-X8, Bio-Rad almacenada en Tris-HCl 0.1 mol, NaCl 0.5 mol pH 8), para eliminar el yoduro de propidio. Colocar 2.3 ml de resina en una pequeña columna y se equilibra con 10 ml de amortiguador (Tris-HCl 50 mol pH 8, NaCl 1 mol, EDTA 1 mol) por cada ml de resina.
- 26.- Colocar la muestra diluida 1:1 con amortiguador Dowex, en la obscuridad y eluir lentamente, añadir por lo menos un volumen de columna de amortiguador para lavar el DNA remanente. Revisar con luz U.V si todo el yoduro de propidio se ha eliminado, de no ser el caso se debe correr el eluido a través de otra columna.
- 27.- Dializar el DNA contra 2-4 l de Tris-HCl 10 mmol, EDTA 1 mmol pH 8.
- 28.- Sacar el DNA de la bolsa de diálisis y precipitar añadiendo 1/25 del volumen de NaCl 5 mol y dos volúmenes de etanol absoluto frío y dejar por dos horas a -20°C.

- 29.- Centrifugar en rotor HS-4 (Sorvall) a 6500 rpm, por 60 min a -5°C .
- 30.- Resuspender en 0.5-1 ml de amortiguador TE. Medir la densidad óptica a 260 nm para determinar concentración de DNA (generalmente de 0.5-1 mg/ml) tomando en cuenta que $1\text{D.0 a } 260\text{ nm} \approx 50\text{ }\mu\text{g de DNA}$.
- 31.- Almacenar a -20°C .

8) Técnica Ouchterloni Inmunodifusión.

Las placas sobre las que se va hacer la inmunodifusión se lavan con SDS al 10% y después se lavan varias veces con agua destilada. Colocar agarosa sobre la placa al 1% disuelta en amortiguador PBS (10^{-2} mol Na_2HPO_4 pH 7.5, 50 mmol NaCl) (La agarosa se debe calentar a 60°C para hacer una solución homogénea) esperar a que la agarosa solidifique y formar los pozos con un molde. Llenar los pozos con las muestras correspondientes (colocar primero en el pozo central el antígeno (proteína) y en los periféricos diluciones del anticuerpo) el volumen varia de 3-20 μl .

Guardar la placa formada en una caja (102-104 mm), conteniendo en el fondo un papel filtro Whatman 3MM humedecido con amortiguador PBS.

Se incuba toda la noche a temperatura ambiente y se observa la precipitación del complejo Antígeno-Anticuerpo. Secar el gel con aire y posteriormente teñirlo con una solución de Amido Negro al 1% en ácido acético al 10% por 5 min. Desteñir en en una solución de ácido acético al 10% y glicerol al 11%. Secar a temperatura ambiente.

9) Purificación de la enzima Glutamato Sintasa (GOGAT).

La purificación de la enzima se llevó a cabo por el método descrito por Sakamoto et.al. (27). El procedimiento fué el siguiente:

- 1.- Incubar 3.5 ml de cultivo de la cepa CS520 en NNc (completo), toda la noche.

- 2.- Tomar 10 μ l de este cultivo e inocular los siguientes tubos:
 - a) 2 ml de medio NN completo.
 - b) 2 ml de medio NN sin triptofano.
 - c) 2 ml de medio NN sin metionina.Esto se lleva a cabo con el objeto de revisar auxotrofias para estos aminoácidos y tener así la seguridad de trabajar la cepa correcta.
- 3.- Inocular 50 ml de medio NNc con la cepa, y dejar crecer de 8-10 horas a 37°C con una agitación de 200 rpm.
- 4.- Inocular en matraces con 1.5 l de este medio NNc con 7.5 ml de cultivo e incubar de 12-14 h con una agitación de 200 rpm a 37°C.
- 5.- Centrifugar en rotor GSA (Sorvall) a 8000 rpm por 10 min.
- 6.- Suspender las células en una solución isotónica de NaCl (0.85%) para lavarlas y centrifugar a 1000 rpm en rotor GSA por 5 min.
- 7.- Decantar y suspender en amortiguador A (KHPO_4 10 mmol. EDTA 1 mmol, β -mercaptoetanol 10 mmol pH 7.2), Desintegrar células por ultrasonido (Soniprep 150), en tres intervalos, cada uno de tres minutos a 20 u y a temperatura de 12°C.
- 8.- Centrifugar en rotor SS-34 (Sorvall) a 15000 rpm por 30 min.
- 9.- Tomar el sobrenadante y dializar contra amortiguador A.
- 10.- Tomar el dializado y precipitar el DNA con sulfato de estreptomicina (1:10 en amortiguador de fosfatos pH 7.2), y dejar agitando en hielo por una hora.
- 11.- Centrifugar a 15000 rpm por 30 min en rotor SS-34.
- 12.- Tomar el sobrenadante y dializar contra amortiguador A.
- 13.- Precipitar protefinas del dializado a 32.5% de saturación con solución de sulfato de amonio concentrado (135 g de sulfato de amonio y añadir 162 ml de KHPO_4 0.1 mol, pH 7.2).
- 14.- Dejar en agitando en hielo por una hora y centrifugar a una velocidad de 15000 rpm por 30 min en rotor SS-34.
- 15.- Decantar y tomar el sobrenadante para precipitar la enzima llevando a 52.5% de saturación con sulfato de amonio.
- 16.- Dejar agitando en hielo por una hora y centrifugar a 15000 rpm por 30 min en rotor SS-34.
- 17.- Decantar y resuspender el precipitado (donde se encuentra

la enzima GOGAT) en amortiguador B (KHPO_4 20 mmol, KCl 100 mmol, 2-cetoglutarato 2 mmol. EDTA 1 mmol, β -mercaptoetanol 10 mmol pH 7.2).

- 18.- Dializar contra amortiguador B y pasar este dializado por una columna de DEAE-Sephadex A-50 equilibrada previamente con amortiguador B.
- 19.- Ya aplicada la muestra en la columna lavar ésta con 200 ml de amortiguador B con un flujo de 15 ml/h.
- 20.- Eluir la enzima aplicando un gradiente de KCl (0.1 mol de KCl a 0.7 mol) en amortiguador B. Colectar fracciones de 5.5 ml cada una.
- 21.- Monitorear la enzima en los tubos colectados una vez terminado el gradiente. Esto se llevó a cabo determinando actividad enzimática en estos tubos colectados. Actividades enzimáticas fueron determinadas espectrofotométricamente por la medición de la velocidad de oxidación del NADPH a 340 nm. El método descrito por Meers et. al. (28) fué el siguiente:
 - a) Preparar una mezcla (0.1 ml de glutamina 0.05 g/ml , 0.167 ml de 2-cetoglutarato 0.034 g/ml, 1.5 ml Tris-HCl 0.1 mol pH 7.6, y 1.4 ml de H_2O . Se usaron dos controles; el coctel sin 2-cetoglutarato, y el coctel completo sin glutamina.
 - b) Mezclar en las celdas del espectrofotómetro (Beckman DU-8 Spectrophotometer) 0.45 ml de mezcla, 0.45 ml de H_2O . 0.05 ml del extracto problema, y 0.05 ml de NADPH 0.006 g/ml en Tris-HCl 0.1 mol).
 - c) Agitar inmediatamente y tomar la primera medición; posteriormente tomar la segunda medición a los 5 min.
 - d) Tomar el (Δ) de absorción. Una unidad de actividad de glutamato sintasa fué definida como la actividad de enzima que oxida $1 \mu\text{mol}$ de NADPH por min.
- 22.- Colectar los tubos que contengan la enzima y añadir la cantidad de sulfato de amonio necesaria para tener una solución al 37.5% de saturación.
- 23.- Agitar una hora en hielo y centrifugar a 15000 rpm por 30 min.
- 24.- Decantar y agregar al sobrenadante la cantidad de sulfato de amonio necesaria para tener una solución al 47.5% de sa

turación.

- 25.- Agitar una hora en hielo y centrifugar a 15000 rpm por 30 min.
- 26.- Decantar y tomar el precipitado que es donde se encuentra la enzima y resuspender en amortiguador C (NaPO_4 20 mmol pH 7.2 2-cetoglutarato 2 mmol, EDTA 1 mmol, β -mercaptoetanol 10 mmol).
- 27.- Calentar la muestra 10 min a 60°C.
- 28.- Centrifugar a 11000 rpm por 15 min.
- 29.- Decantar, tomar el sobrenadante y pasarlo por una columna de Sepharosa 6-B equilibrada previamente con amortiguador C.
- 30.- Eluir protefina con amortiguador B con un flujo de 3.5 ml/h y coleccionar fracciones de 2.7 ml cada una.
- 31.- Coleccionar las fracciones que presenten actividad de glutamato sintasa y concentrar todas estas fracciones en una celda de Amicon Diaflo equipada con una membrana PM-10, y conservar la enzima a 4°C.

10) Purificación de la enzima GOGAT por columna de Anticuerpos-anti-GOGAT-Protefina A-Sepharosa.

El procedimiento es el siguiente (29).

- 1.- Agregar a 5 ml (1.5 g) de Protefina A-Sepharosa 4B (Pharmacia), 2.5 mg (5 ml) de anticuerpos anti-GOGAT (18) e incubar por una hora a 4°C con agitación lenta y constante.
- 2.- Dejar sedimentar el gel y retirar la fracción no retenida (para estimación de título).
- 3.- Suspender en 2 ml de amortiguador PBS (150 mmol NaCl, 10^{-2} mol de Na_2HPO_4 pH 7.5), y montar el gel en la columna.
- 4.- Pasar 3 ml de extracto bacteriano, conteniendo la enzima con un flujo de 2 ml/h.
- 5.- Lavar dos veces con amortiguador PBS.
- 6.- Eluir la enzima con 3 ml de amortiguador PBS (1.2 mol NaCl).
- 7.- Coleccionar la enzima eluida en fracciones de 0.5 ml.
- 8.- Volver a equilibrar la resina con amortiguador PBS (150 mmol NaCl) (3 volúmenes).
- 9.- Mantener la columna a 4°C.

11) Separación de las subunidades de la enzima GOGAT.

Las subunidades grande y chica de la enzima glutamato sintasa GOGAT de E.coli fueron separadas por el método de Mäntsälä (7) y se detalla a continuación.

- 1.- Equilibrar tanto la muestra como la columna Sephacril S-300 con el amortiguador que contiene 0.1 mol Tris-acetato, pH 7.7, 0.3% de SDS, 10 mmol 2-cetoglutarato, 10 mmol de glutamina, y 10 mmol de β -mercaptoetanol.
- 2.- Calentar a ebullición la muestra antes de aplicarla a la columna por 5 min.
- 3.- Aplicar la muestra a la columna (Sephacril S-300) y eluir con el mismo amortiguador a temperatura ambiente.
- 4.- Colectar fracciones de 2 ml c/u y localizar las subunidades por medio de la medición de proteína a 280 nm con un graficador LKB adaptado al UVICORD S11 LKB.
- 5.- Por medio de geles de proteínas (acrilamida -SDS desnaturalizante al 1%) comprobar la presencia de las subunidades llevando a cabo la electroforesis.

12) Electroelución de las subunidades de la enzima GOGAT.

La electroelución de las subunidades de la enzima glutamato sintasa se llevó a cabo por el método de Gerton et.al.(30) y consiste en lo siguiente.

- a) Por medio de electroforesis en un gel de Acrilamida-SDS al 11% preparativo se separaron las bandas pertenecientes a cada una de las subunidades.
- b) Terminada la electroforesis, teñir ligeramente el gel con Azul de Coomassie.
- c) Identificadas las bandas correspondientes cortarlas cuidadosamente con una navaja o bisturí.
- d) Colocar estas bandas por separado en cámaras de electroelución (en fragmentos pequeños), y se cubren con amortiguador que contiene lo siguiente: 0.48 mol glicina, 6 mmol Tris, 0.1% de SDS, pH 8.3.

- e) Establecer un puente de corriente eléctrica entre los dos compartimentos de la cámara utilizando el mismo amortiguador.
- f) La electroelución se lleva a cabo a un voltaje constante de 100 V durante toda la noche a 4°C.
- g) La proteína electroeluida se recupera directamente de la cámara, soluble en el amortiguador.
- h) Dializar contra H₂O bidestilada estéril.
- i) Determinar cantidad de proteína recuperada por medio del método de Bradford.

13) Análisis de aminoácidos.

La composición de las subunidades de la enzima GOGAT fué determinada de acuerdo a la técnica de Moore (31) empleando hidrólisis ácida.

La separación de los aminoácidos dentro del analizador es llevada a cabo por medio de una resina de intercambio iónico (catiónico) y su detección se lleva a cabo colorimétricamente después de reaccionar con ninhidrina dentro del mismo. El método es el siguiente: Se hidrolizan de 20-30 µg de la muestra en tubos lavados con ácido (HNO₃/HCl 1:1) en presencia de HCl 6 N (Pierce) con 0.5 % de fenol, sellar a presión 20 uHg, esta hidrólisis se lleva a cabo por 20 h a 110°C. Posteriormente evaporar el HCl, y el residuo se disuelve en 60 µl de amortiguador de aplicación (citrato de sodio 0.2 N pH 2.2).

Centrifugar en una microfuga B (Beckman) por 5 min. Aplicar 50 µl al analizador de aminoácidos Durrum D-500 Mark1 (Dionex Corporation) calibrado previamente.

RESULTADOS

a.- Mapa físico de los plásmidos pGOL3 y pGOL7.

La estrategia que se utilizó para elaborar el mapa físico de los plásmidos pGOL3 y pGOL7 los cuales están formados por el vehículo pBR327 y un fragmento de DNA cromosomal del plásmido pRSP20, correspondiente a la subunidad chica de la enzima GOGAT (32), se basó en la comparación de los patrones generados por varias enzimas de restricción en estos plásmidos con los generados por el vector pGR327.

En carriles paralelos de un gel de agarosa o acrilamida se colocaron los productos de digestión de los plásmidos pGOL3, y pGOL7 así como del vehículo pBR327 con una enzima de restricción empleada y se llevó a cabo la electroforesis. Terminada ésta, se observaron los patrones y se pudo inferir a partir de ellos los tamaños de los fragmentos resultantes para cada una de las enzimas usadas.

Cada patrón de restricción del pGOL3 y pGOL7 está constituido por una serie de bandas correspondientes al vehículo pBR327 (menos una banda de DNA que fue alterada por la inserción) y una serie de bandas nuevas que corresponden a los fragmentos de DNA que forman parte del inserto. Se observaron también patrones de las dobles digestiones (éstas se llevan a cabo en forma sucesiva primero una enzima, y posteriormente otra distinta teniendo cuidado de ajustar la concentración de sales de los amortiguadores adecuados para cada enzima), así se localizan los sitios reconocidos por endonucleasas de restricción teniendo así un mapeo de los sitios en los plásmidos. Figuras 5 y 6

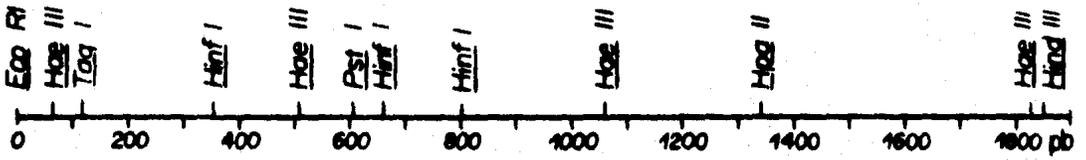
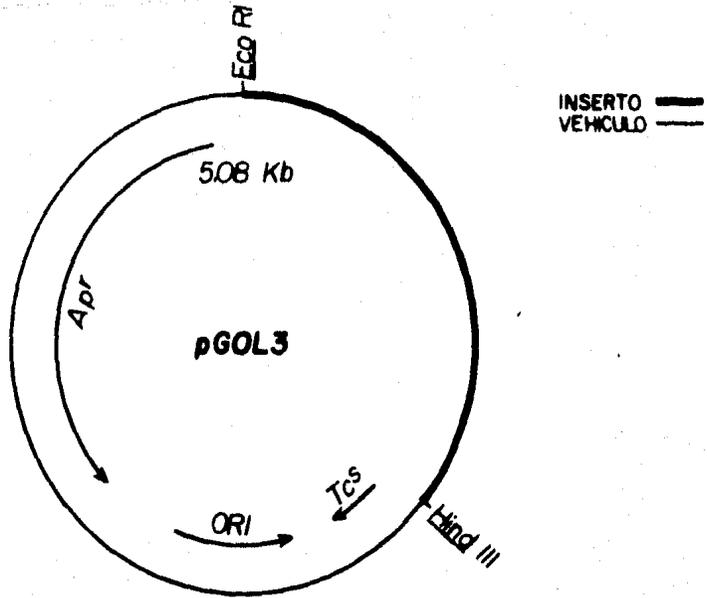


Fig 6A

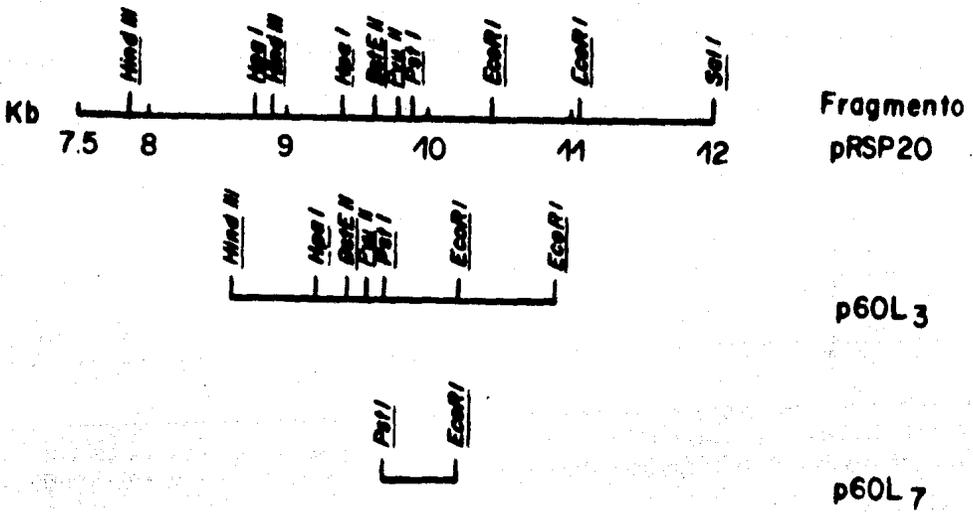


Fig 6C

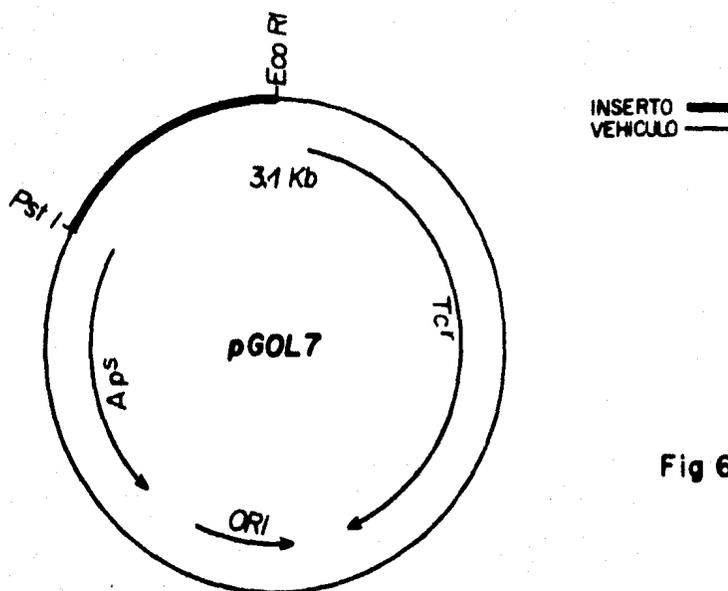
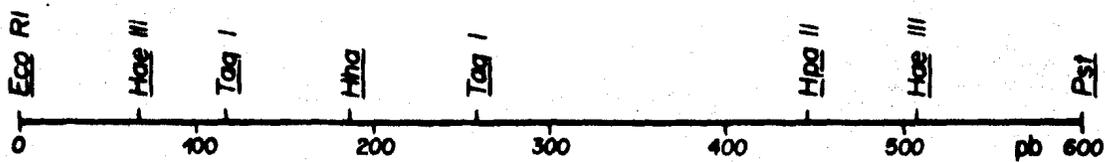


Fig 6B



En la figura 6A y 6B se muestran los sitios encontrados para las distintas endonucleasas de restricción. Figura 6C localización de los fragmentos con respecto al plásmido pRSP20.

b.- Purificación de la enzima GOGAT.

1.- Por cromatografía de afinidad Anticuerpos-Anti-GOGAT-Proteína A-Sepharosa.

En el laboratorio se contaba con un lote de anticuerpos anti GOGAT (18). Primero se les determinó el contenido de proteína por el método de Bradford, dando como resultado una estimación de 0.5 mg/ml. Posteriormente se realizó la técnica de Ouchterlony (Inmunodifusión) para observar la reacción Ag-Ac Figura 7.

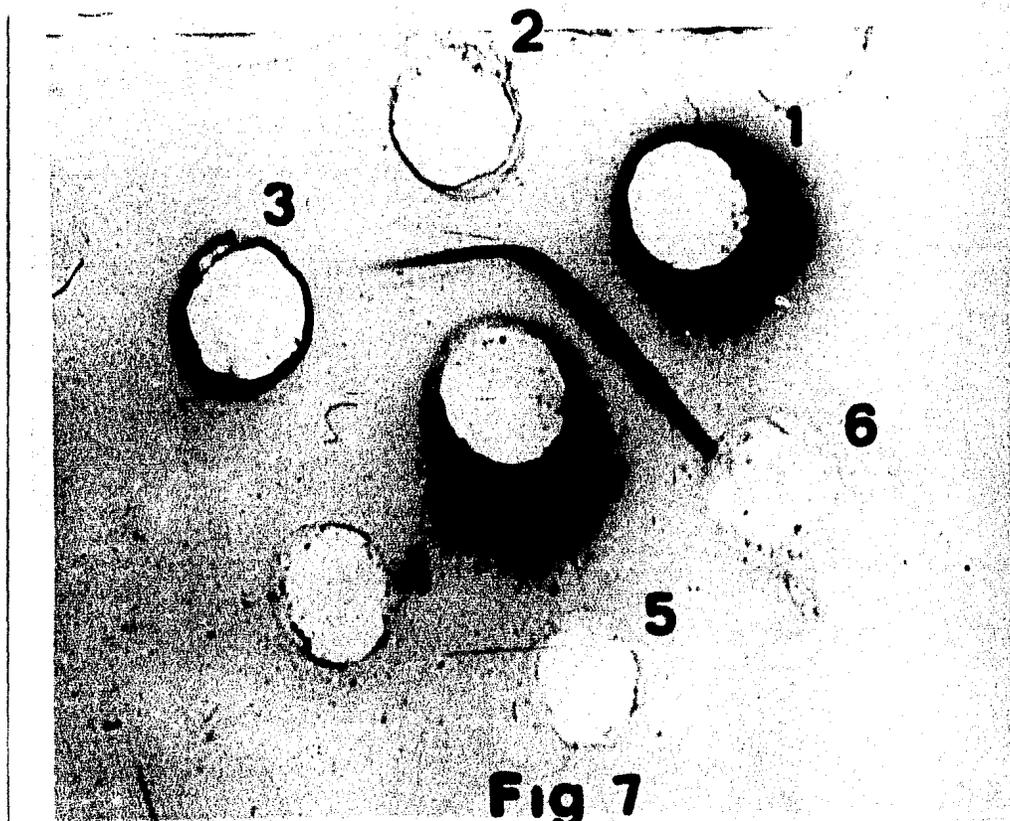


Figura 7 Inmunodifusión. 20 μ l del lote de anticuerpos anti-GOGAT sin diluir (pozo 1), 20 μ l anticuerpos anti-GOGAT diluidos 1:2, 1:4, 1:8, y 1:6 (pozos 2, 3, 4, y 5 respectivamente), 20 μ l del control negativo (suero de conejo sin inmunizar) (pozo 6).

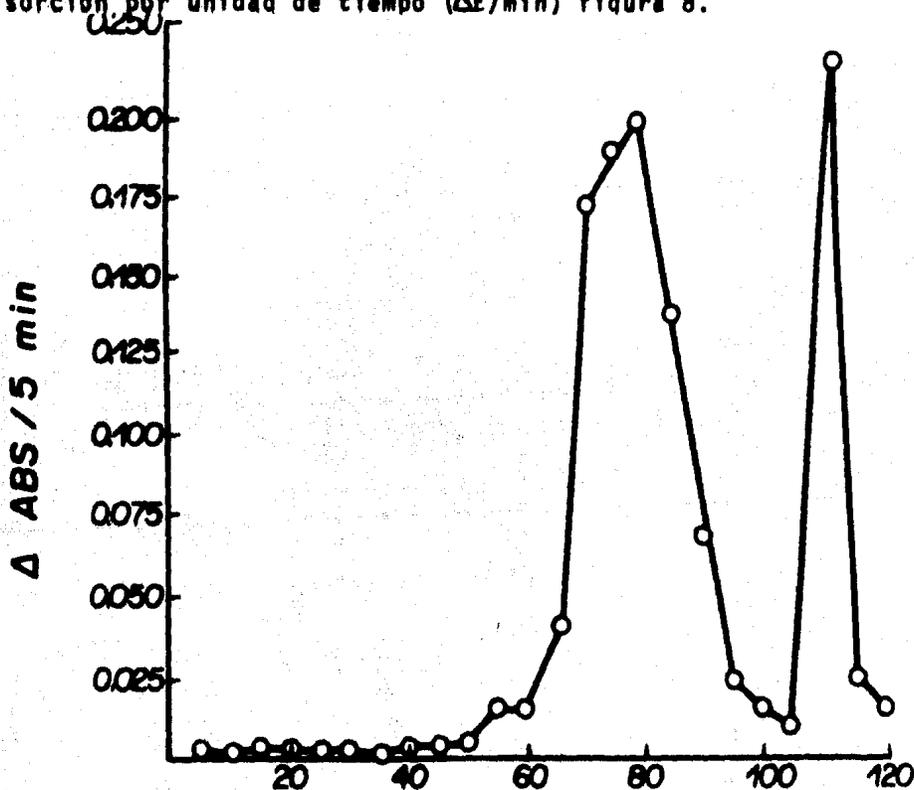
Por otro lado se hidrataron 300 mg de gel Sepharosa 4B-Proteína A en 1 ml de amortiguador PBS y se agregaron 5 ml (2.5 mg) de anticuerpos anti-GOGAT, se incubaron por una hora a 4°C con agitación lenta para facilitar la unión de los anticuerpos al gel.

Se montó el gel tratado a una columna pequeña (0.6*10.5 cm) y se lavó con amortiguador PBS. Se pasó entonces un extracto bacteriano (3ml) a la columna a un flujo de 2 ml/h. Se lavó la columna con amortiguador PBS y posteriormente se eluyó la muestra con amortiguador PBS (1.2 mol NaCl). Se colectaron fracciones de 0.5 ml y se les determinó la absorción a 280 nm, colectándose los tubos que presentaban mayor absorción; los cuales se dializaron contra amortiguador PBS (150 mmol NaCl) se concentró la muestra en una celda Amicon hasta 1 ml de volumen final y se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford dando como resultado 0.06 mg/ml. Se realizó una electroforesis en gel de acrilamida-SDS al 11% tomando 33 μ l (2 μ g) y 50 μ l (3 μ g), observándose una banda de proteína no correspondiente a ninguna de las dos subunidades de la enzima GOGAT.

2.- Purificación de la enzima GOGAT por el método de Sakamoto(27).

- a) Se obtuvieron 97.9 g de peso húmedo de células partiendo de 36 l de cultivo de la cepa CS520. Las cuales se desintegraron por ultrasonido en 200 ml de amortiguador A (en tres intervalos de 3 min cada uno), se centrifugó a 15000 rpm por 30 min.
- b) El sobrenadante color amarillento (250 ml) se dializó contra amortiguador A.
- c) El dializado (290 ml) se trató con 29 ml de solución de sulfato de estreptomina y se centrifugó a 15000 rpm por 30 min el sobrenadante se dializó contra amortiguador A.
- d) El dializado se trató con 58.22 g de sulfato de amonio, para dar 32.5% de saturación, esta muestra se centrifugó a 15000 rpm por 30 min.
- e) Al sobrenadante se le agregaron 40.37 g de sulfato de amonio para llevar la solución a una saturación de 52.5%, se centrifugó a 15000 rpm por 30 min.

- f) El precipitado se resuspendió en 3 ml de amortiguador B y se dializó contra este.
- g) Se midió conductividad al dializado (45 ml) así como al amortiguador de la columna para comprobar que estaban en equilibrio dando los dos una conductividad (conductímetro tipo CDM 2d) de 7 mmhos.
- h) La muestra (45 ml) se pasó por la columna DEAE-Sephadex A-50 y ésta se lavó con 200 ml de amortiguador B.
- i) Se aplicó un gradiente de KCl y se colectaron fracciones de 3.5 ml/tubo.
- j) Se midieron actividades enzimáticas de GDH y GOGAT de los tubos colectados, tomando 50 μ l por tubo más 0.45 ml de mezcla 0.45 ml de H₂O y 50 μ l de NADPH. Se calculó el cambio de absorción por unidad de tiempo ($\Delta E/\text{min}$) figura 8.



FRACCION No

Fig 8

Figura 8 fracciones eluidas de la columna de intercambio iónico DEAE-Sephadex-A-50.

Como se puede observar en la figura 8, se obtienen dos picos el primero perteneciente a la enzima GOGAT y el segundo a la enzima GDH.

Para corroborar la actividad se efectuaron mediciones enzimáticas.

Al primer pico se le valoró la actividad enzimática con mezcla completa, mezcla sin 2-cetoglutarato y por último la mezcla sin glutamina, al segundo pico se le determinó la actividad enzimática con las siguientes mezclas por separado: coctel completo para GDH (25 ml Tris-HCl 0.1 mol pH 7.6, 1 ml NH_4Cl 1 mol, 1.5 ml 2-cetoglutarato 0.2 mol pH 7.6) con otra mezcla sin NH_4Cl y por último mezcla sin 2-cetoglutarato usando en todos los casos las mismas relaciones en volúmenes.

- k) Una vez comprobado que la actividad presentada correspondía a las dos enzimas que se buscaron se colectaron las fracciones correspondientes (65-90) dando un volumen final de 130 ml.
- l) Se añadieron 29.11 g de sulfato de amonio para tener una solución al 37.5% de saturación, se centrifugó a 15000 rpm por 30 min. Al sobrenadante se le añadieron 8.9 g de sulfato de amonio para dar 47.5% de saturación, se centrifugó a 15000 rpm por 30 min.
- m) El precipitado resultante se resuspendió en 6 ml de amortiguador C, se calentó a 60°C por 10 min y se centrifugó a 11000 rpm por 15 min. Este extracto se pasó por una columna de exclusión molecular Sepharosa 6-8 con un flujo de 3.5 ml/h. Midiendo previamente la actividad enzimática que dió como resultado en $\Delta\text{Abs } 340 \text{ nm} = 0.2014$ de 5 μl de extracto.
- n) Se colectaron 90 fracciones de 2.7 ml cada una, a las cuales se les determinó actividad enzimática. Figura 9.
- o) Se tomaron fracciones de la número 44 a 58, dando un volumen final de 40 ml. Los cuales se concentraron en una celda Amicon (membrana PM-10) hasta un volumen final de 9 ml. Los rendimientos se muestran en la tabla I.

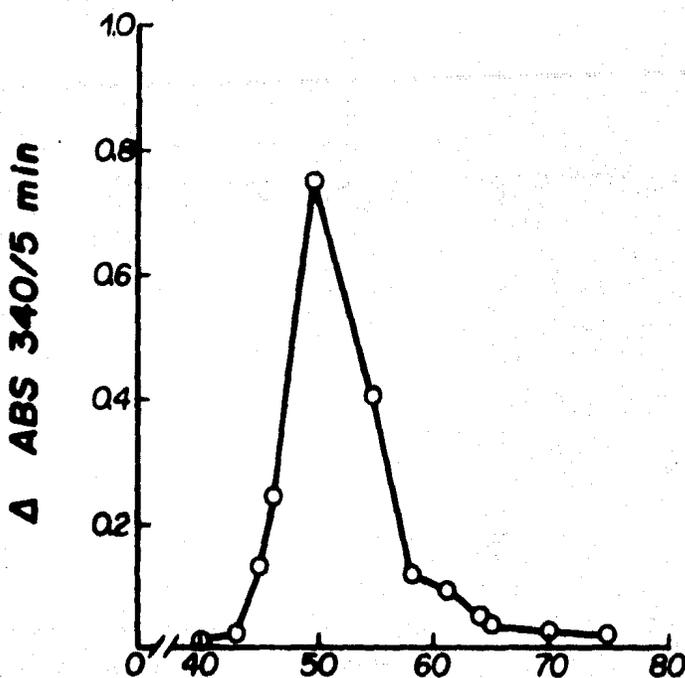


Fig 9 FRACCION No

Figura 9 fracciones colectadas de la columna de exclusión molecular Sepharosa 6-B.

MUESTRA	CONCENTRACION TOTAL (mg de protefna)
Antes de aplicar a la columna de DEAE.	234.9
Antes de aplicar a la columna Sepharosa 6-B.	49.55
Muestra semipura.	8.131

TABLA I

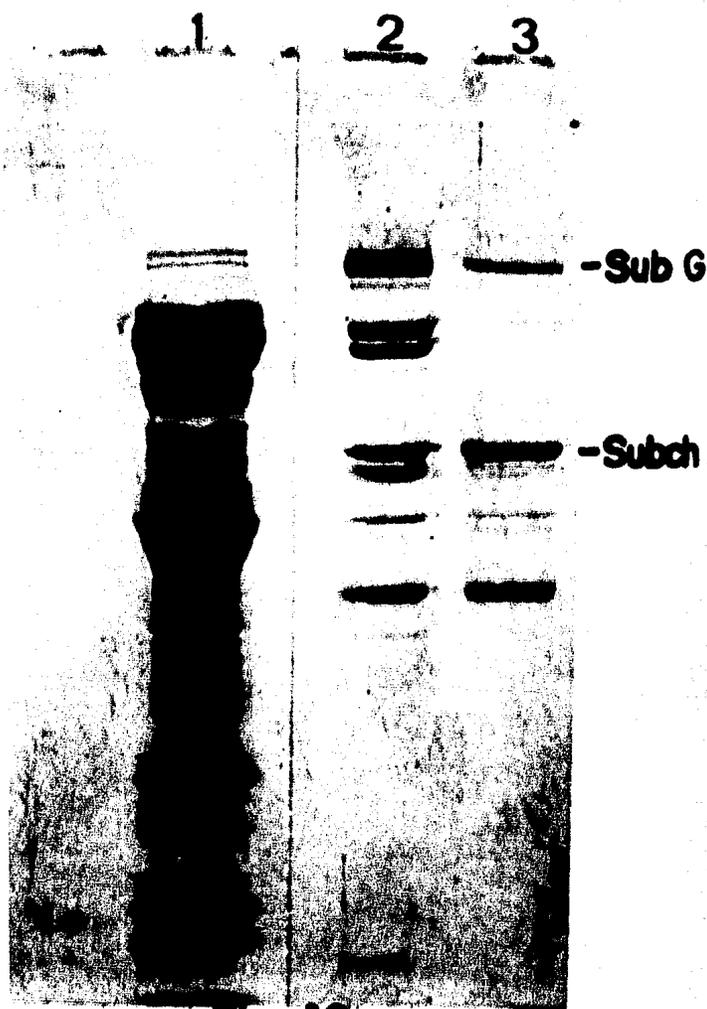
**Fig. 10**

Figura 10 gel desnaturizante Acrilamida-SDS al 11% .
10 μ l de extracto antes de pasar columna DEAE, carril 1), 50 μ l
de extracto el eluido por columna DEAE, carril 2), 10 μ l de ex-
tracto pasado por columna Sepharosa 6-B, carril 3). En todos
los casos se usaron 30 μ l de amortiguador de disolución de pro-
teínas BDP.

c.-Separación de las dos subunidades de la enzima Glutamato Sintasa.

1.- Por electroforesis en Acrilamida-SDS y electroelución de las subunidades.

Se tomó una alícuota de la enzima purificada (0.5 mg/0.5 ml) y se llevó a cabo una electroforesis en gel de Acrilamida-SDS preparativo; una vez terminada la electroforesis y detectadas las bandas por tinción con azul de Coomassie, se cortaron éstas en pequeños fragmentos de 0.5 * 0.5 cm aproximadamente. Y se electroeluyeron toda la noche a 4°C (ver materiales y métodos). Se colectó el amortiguador de la cámara donde se encontraban los fragmentos de acrilamida y se determinó la concentración de proteína. No se detectó ésta en el amortiguador por lo que se tificaron los trozos de gel para comprobar que en éstos sí se encontraba la proteína, por lo que se repitió la electroelución y al término de ésta se detectó en el amortiguador muy poca cantidad de proteína (aproximadamente 70 µg).

2.- Separación de las subunidades de la enzima GOGAT por el método de Mantsala.

Se aplicó la muestra de la enzima (8.131 mg totales) previamente equilibrada con el amortiguador de la columna, con un flujo de 15 min/tubo colectándose 2 ml/tubo. Figura 11.

Por medio de electroforesis en geles desnaturalizantes-SDS al 11% para proteínas se observaron las subunidades de la enzima glutamato sintasa, figura 12.

Se colectaron por separado cada una de las subunidades pertenecientes a la subunidad grande y a la subunidad chica. Se realizó una electroforesis con cada una de estas subunidades junto con marcadores de peso molecular Albúmina de suero bovina (66 000) B-galactosidasa (130000), y ovoalbúmina (45000). Figura 13.

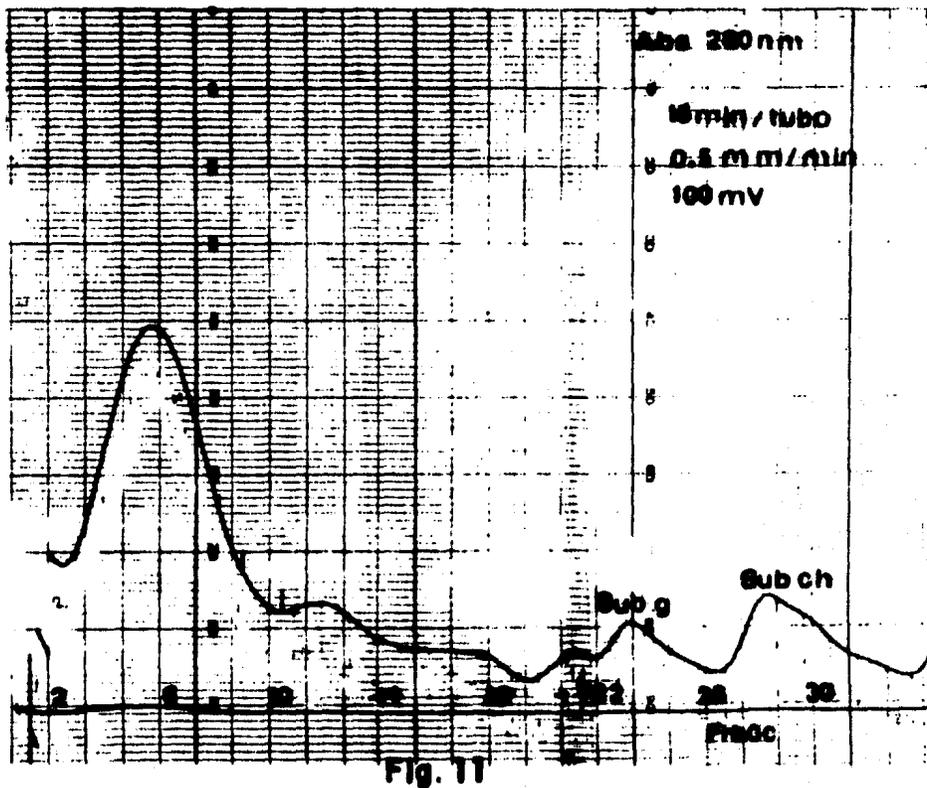


Fig. 11

Figura 11 separación cromatográfica por columna de exclusión molecular Sephacril-S300.

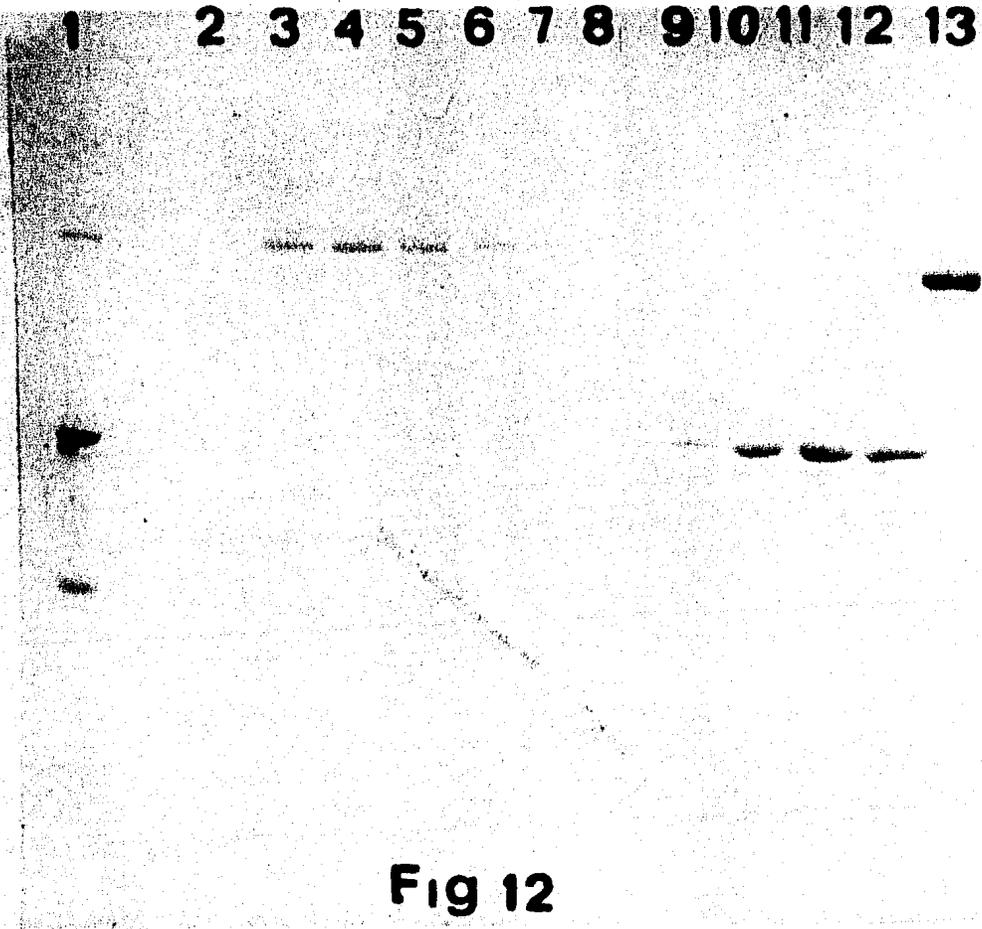


Fig 12

Figura 12. Gel desnaturizante Acrilamida-SDS al 11%. Muestra antes de aplicar a la columna Sepharil S-300 carril 1) fracciones # 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, carriles; 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8) pertenecientes a la subunidad grande de la enzima G0 gat. Fracciones 27, 28, 29, y 30, carriles 9, 10, 11, y 12. subunidad chica de la enzima G0GAT. 2 µg β -galactosidasa (Sigma), carril 13).

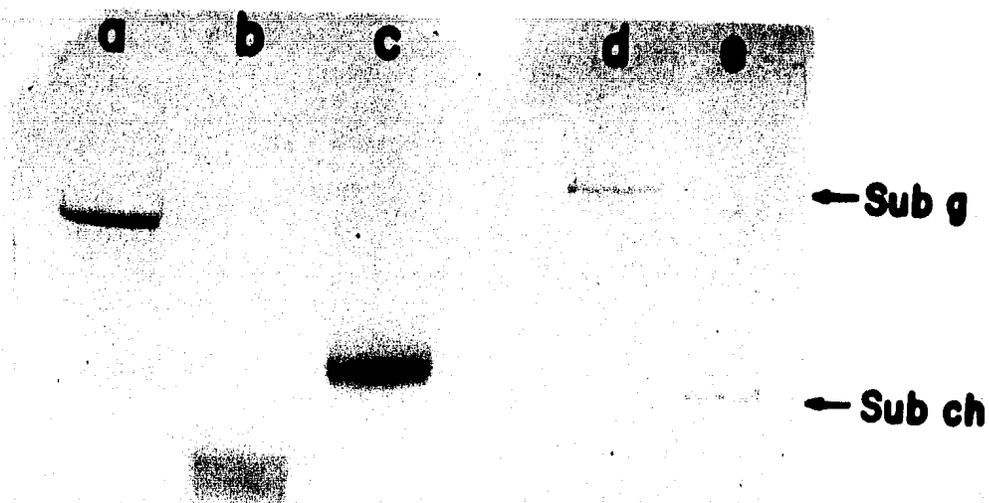


Fig. 13

Figura 13. Electroforesis gel de Acrilamida-SDS-11%.
 β -galactosidasa (130000 d) (2 μ g) carril a), ovoalbúmina (45000)
 (2 μ g) carril b), albúmina de suero bovino (66000) (2 μ g) carril
 c), subunidad grande de la enzima GOGAT (135000) (53 μ g), carril
 e). Se aplicaron todas las muestras junto con los marcadores de
 peso molecular (Sigma) con 15 μ l de BDP.

d.- Análisis de aminoácidos.

Se dializaron por separado cada una de las subunidades contra acetato de amonio 5 mmol llevando a cabo varios cambios de amortiguador. Se concentró la muestra en una celda Amicon. Se hidrolizaron alícuotas conteniendo aproximadamente 30 $\mu\text{g}/124 \mu\text{l}$ para la subunidad grande, y 30 $\mu\text{g}/115 \mu\text{l}$ para la subunidad chica (ver materiales y métodos). Se aplicaron 55 μl de los 60 μl totales de cada una de las muestras al analizador de aminoácidos Durrum D-50 (33), previamente calibrado con tres estándares (10 nmoles) de proteínas (Beckman) (AA Std Mixture 2.5 μmoles de cada aminoácido/ml diluido 1:5, por lo que se aplican 20 μl). El promedio de estos tres estándares dados en cuentas analógicas digitales (area bajo la curva) por una computadora digital PDP8a, se muestra en la tabla II.

AMINOACIDO	SIMBOLO DE TRES LETRAS	SIMBOLO DE UNA LETRA	FACTOR PROMEDIO
Asn + Asp	Asx	B	21918
Treonina	Tre	T	22993
Serina	Ser	S	23769
Gln + Glu	Glx	Z	23897
Prolina	Pro	P	49886
Glicina	Gli	G	24082
Alanina	Ala	A	24487
Valina	Val	V	26128
Metionina	Met	M	17409
Isoleucina	Ile	I	19707
Leucina	Leu	L	19623
Tirosina	Tir	Y	21101
Fenilalanina	Fen	F	18639
Histidina	His	H	20560
Lisina	Lis	K	23493
Arginina	Arg	R	19091

TABLA II

Una vez obtenidos los datos anteriores se prosiguió al cálculo de nanomolas.

Como primer paso se llevó a cabo el cálculo de la cantidad de nanomolas tomando en cuenta la siguiente relación:

$$\text{nanomolas recalculadas} = \text{Area} / \text{Factor}$$

Donde:

Area = representada en la gráfica

Factor = promedio del area de los estándares (tabla II).

Por otro lado se sabe que es necesario corregir la cantidad de nanomolas de los aminoácidos serina y treonina añadiendo un 10% y 5% respectivamente por deaminación ocurrida en el lapso de 20-24 h de la hidrólisis (34).

Estos datos se procesaron con un programa de computadora (Apple 2 plus) para obtener el número de aminoácidos (residuos).
Tabla III.

Una vez obtenidos los resultados se calculó la concentración real real de cada una de las subunidades de la enzima GOGAT obteniéndose lo siguiente:

Al sumar el total de nanomolas obtenidos por el análisis (ver tabla III). Se obtuvieron 13.6 nmol en 55 μ l de muestra por lo tanto en 60 μ l de volumen total de reacción se tienen 14.8 nmol, teniendo en cuenta que el peso molecular promedio de un aminoácido es de 110 d. Podemos calcular el número de residuos ó aminoácidos de la subunidad grande donde su peso molecular es de 135000 d, teniendo un resultado de aproximadamente 1227 residuos o aminoácidos promedio lo que representa el total de la subunidad grande. Al dividir la cantidad de nanomolas obtenidas entre el número de aminoácidos nos da un valor de 12 pmol de la proteína de la subunidad grande contenidos en la alícuota original (124 μ l) que a su vez ésta fué tomada de la muestra total de 15.7 ml por lo tanto se tienen 1.51 nmoles totales de la subunidad grande. Los cálculos para la subunidad chica fueron llevados a cabo de la misma manera.

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE UTILIZANDO FEN
COMO 14 RESIDUOS POR MOLECULA
REALIZADO EL POR LETICIA

Sub ch

NUMERO DE ANALISIS DE AMINOACIDOS : 2180

NMOLES	RESIDUOS	ENTEROS
ASX= 1.517	50.57	51
TRE= 1.023	34.1	34
SER= 1.369	45.6	46
GLY= 2.153	71.77	72
PRO= 0	0	0
GLI= 2.479	82.63	83
ALA= 1.877	62.57	63
VAL= .851	28.37	28
MET= .404	13.47	13
ILE= .987	19.57	20
LEU= 1.006	33.53	34
TIR= 0	0	0
FEN= .42	14	14
HIS= .233	7.77	8
LIS= .492	16.4	16
ARG= .692	23.07	23
CIS= NO		NO
TRP= NO		NO

Subunidad chica=3.429 nmoles
=0.1869 mg de
protefna.

PESO MOLECULAR APROXIMADO = 51035.28
PESO MOLECULAR INTEGRAL APROX= 51163

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE UTILIZANDO MET
COMO 16 RESIDUOS POR MOLECULA
REALIZADO EL POR LETICIA

Sub g

NUMERO DE ANALISIS DE AMINOACIDOS : 2179

NMOLES	RESIDUOS	ENTEROS
ASX= 1.687	163.99	164
TRE= .979	94.93	95
SER= 1.178	114.23	114
GLY= 1.707	165.93	166
PRO= 0	0	0
GLI= 2.046	198.4	198
ALA= 1.99	192	192
VAL= .796	77.19	77
MET= .165	16	16
ILE= .509	49.36	49
LEU= 1.048	101.62	102
TIR= .2	19.39	19
FEN= .2	19.39	19
HIS= .238	23.08	23
LIS= .44	42.67	43
ARG= .433	41.99	42
CIS= NO		NO
TRP= NO		NO

Subunidad grande=1.51 nmoles
=0.2038 mg de
protefna.

PESO MOLECULAR APROXIMADO = 132612.06
PESO MOLECULAR INTEGRAL APROX= 132585

DISCUSION

I.- Caracterización de los plásmidos pGOL3 y pGOL7 por medio de endonucleasas de restricción.

Una de las estrategias utilizadas para el estudio de la regulación de un gen consiste en la clonación del mismo, así como su caracterización física. Utilizando el mapa se pueden llevar a cabo varios tipos de experimentos, como la subclonación de fragmentos de DNA para su estudio directo (expresión), y por otro lado, el diseño de estrategias para obtener la secuencia nucleotídica de los mismos. En este caso se caracterizaron dos plásmidos derivados del pRSP20 (ver figura 6 A, B, y C) los cuales como se mencionó contienen un fragmento de DNA cromosomal correspondiente a la subunidad chica de la enzima GOGAT.

La importancia de la caracterización de estos derivados es comprobar la existencia de un promotor que como se puede observar en la figura 6B es probable encontrarlo cercano a los sitios mapeados Pst I y Pvu II (19).

Se tenía evidencia que el plásmido pGOL3, aunque no codificaba para la subunidad chica completa (por no contar con la cantidad suficiente de nucleótidos), sí codificaba para un fragmento de este péptido (26000 d) (700 pares de bases) por lo que este fragmento de DNA podría contener algún promotor. En el caso del plásmido pGOL7 se quiso restringir la cantidad de DNA, para de esta forma delimitar el promotor, pero por medio de la técnica de minicélulas (datos no publicados) no se detectó ninguna proteína lo cual nos podía sugerir que en este fragmento de DNA contenido en el plásmido pGOL7 no existía ningún promotor, y apoyaba la evidencia que este promotor posiblemente se podría encontrar muy cercano al sitio de Pvu II (el cual no estaba contenido en el plásmido pGOL7).

Con estos datos una estrategia interesante podría ser el clonar fragmentos cercanos al sitio Pvu II ya mapeados como son

los siguientes fragmentos:

de Hae III (510 pb) - Pvu II (670 pb)

Pvu II (670 pb) - Hae III (1670 pb)

Hinf I (350 pb) - Hinf I (800 pb)

Con estos datos se pueden diseñar varios experimentos; obtener la secuencia nucleotídica, así como el clonar estratégicamente fragmentos en los vehículos probadores de promotores (35). Por otro lado con el mapeo se pueden llevar a cabo experimentos de fusiones de genes y deleciones de los fragmentos de interés.

2.- Columna Proteína A-Sepharosa.

Aún cuando en la técnica de doble inmunodifusión (36), se observaron bandas de precipitación en los pozos 1 y 2; en el momento que estos anticuerpos se adsorbieron por la región Fc a la columna Proteína A-Sepharosa (esto se comprobó llevando a cabo la determinación del título de anticuerpos de la fracción no retenida) estos anticuerpos no tuvieron la capacidad de retener a la enzima GOGAT. Hay que tomar en cuenta que estos anticuerpos se mantuvieron congelados durante 4 años por lo que su actividad debe haber disminuido grandemente, y por lo tanto la concentración de anticuerpos con capacidad de retener la enzima debió haber sido muy baja, por lo mismo la concentración de proteína no pudo ser detectada por el método empleado. En cuanto a la banda observada, esta pudo haberse debido a una población de anticuerpos contaminantes que tuvieron la capacidad de retener esta fracción (37).

3.- Purificación de la enzima GOGAT por el método Sakamoto.

Cabe mencionar que aún cuando se montaron las mismas condiciones no se lograron obtener los mismos rendimientos reportados (1.21 mg/30 g de células). En este caso las pérdidas se obtuvieron básicamente en los pasos de precipitación con sulfato de amonio saturado, por otro lado éstas fueron necesarias pa

ra evitar contaminaciones con otras proteínas dentro de la purificación. Además fue necesario repetir la técnica para obtener la cantidad suficiente de enzima y posteriormente separar las subunidades.

Para la obtención de grandes cantidades de la enzima es necesario el escalamiento del método. En este caso no se optó el escalamiento ya que como se mencionó anteriormente el objetivo de la purificación de la enzima era el poder realizar la separación de las subunidades para así llevar a cabo análisis de aminoácidos y en un momento dado la secuencia de los fragmentos mapeados para su posterior comparación con la secuencia de aminoácidos.

4.- Electroelución de las subunidades de la enzima GOGAT.

A pesar de que se han descrito en la literatura una recuperación de hasta el 85% para diferentes proteínas (30) (β -galactosidasa, albúmina de suero bovino, lactato deshidrogenasa) en la metodología usada en este trabajo, la recuperación fue muy baja (14%). La razón de esto podría ser porque aunque se usaron condiciones muy similares, el aparato de electroelución no fue el mismo, ya que el reportado en la literatura se reciclaba el amortiguador de electroelución y éste puede ser un parámetro importante para la recuperación de la proteína. Además como se tiñó con azul de Coomassie y éste está disuelto en ácido acético y metanol, este último precipita las proteínas y de esta forma se puede atrapar en la malla del gel la proteína evitando así una buena recuperación. Existen otros factores importantes a tomar en cuenta, como el peso molecular, ya que entre más grande sea la proteína más difícil su electroelución teniendo reportados rendimientos más altos para las proteínas más pequeñas y los bajos para las grandes. Por lo tanto este método es bastante eficiente si se toman en cuenta toda clase de factores, así como el contar con una cámara para reciclar o agitar el amortiguador, y por otro lado llevar a cabo la visualización de las proteínas con acetato de sodio 4 mol ya que este método de visualización es más sensible que el método de Coomassie.

5.- Separación de las subunidades de GOGAT por cromatografía.

La metodología usada para separar las subunidades (7) está diseñada para 400-500 g de células sin embargo en este trabajo el total de células que se llegó a obtener fué de 200 g lo cual fué suficiente para obtener una cantidad adecuada de la enzima oligomérica para la separación posterior en sus respectivas subunidades. Desafortunadamente no se puede estimar un rendimiento comparativo con la metodología reportada ya que esta no incluye rendimientos.

6.- Análisis de aminoácidos.

Fué importante llevar a cabo el análisis de aminoácidos de las dos subunidades de la enzima GOGAT, no sólo como análisis previo para en un futuro determinar la secuencia de aminoácidos, sino también para obtener una estimación real de la cantidad de proteína obtenida, y calcular la recuperación para así saber con cuanto se va a contar para la secuenciación de aminoácidos. Y para ésto hay que tomar en cuenta varios factores importantes como los siguientes:

No se detecta comunmente la cisteína ya que los grupos sulfhidrilo de ésta son inestables y tienden a oxidarse. La determinación de la cisteína se puede llevar a cabo oxidando esta a ácido cístico con ácido perbórmico (39). La prolina no absorbe a 570 nm como los demás aminoácidos por ser una imina (color amarillo con ninhidrina) por lo que se debe leer a 440 nm. El triptófano se destruye por el tratamiento con HCl y el calor, entonces se puede detectar con hidrólisis ácida usando mercaptoetano sulfónico 3 N (40), se pierde algo de serina y treonina por esta misma razón, las cuales como se mencionó anteriormente se deben corregir aumentando un 10% y 5% respectivamente.

También hay que tomar en cuenta que el grupo amino de la asparagina y de la glutamina se degrada, dando ácido aspártico y glutámico por lo que se reportan juntos como Asx y Glx respectivamente. Tomando en cuenta todos estos factores, esta información es muy importante ya que da el número y tipo de aminoácidos que son esperados durante la secuencia.

CONCLUSIONES

A partir del hallazgo de la enzima GOGAT y del papel importante que juega ésta en el metabolismo nitrogenado, se han llevado a cabo varios estudios para tratar de entender su regulación así como su relación con la enzima glutamino sintetasa (GS) (41), glutamato deshidrogenasa (GDH), y aún con otras enzimas como por ejemplo con la enzima Fumarato reductasa de E.coli (42) la cual también está constituida por dos subunidades, así como por Hierro-azufre. En el caso de esta enzima Fumarato reductasa (la cual se relaciona también con la flavoenzima succinato deshidrogenasa), se han llevado a cabo estudios similares a los realizados con la enzima GOGAT (estudios en plásmidos derivados, expresión en minicélulas, secuencia nucleotídica, secuencia de aminoácidos, etc.) y se encontró que la subunidad ligera de la enzima Fumarato reductasa se comenzaba a transcribir a partir del final de la secuencia de la subunidad grande, y en la misma dirección, por lo que estas dos subunidades están sobrelapadas (el codón de terminación usado para la subunidad grande es un componente del sitio de unión de ribosoma para la subunidad ligera. Este hallazgo puede reflejar un intento de la célula de mantener poco genoma, una situación que conduce a un crecimiento rápido del microorganismo en un medio, dando ventaja sobre otros microorganismos cuando se encontraran en un ambiente competitivo o una forma de regular estos genes, Este pudiera ser el mismo caso de la enzima GOGAT donde la subunidad ligera pudiera estar traslapada con la subunidad grande.

Así pues con los datos obtenidos en esta tesis se pueden diseñar experimentos encaminados a tratar de encontrar regiones regulatorias, fases abiertas de transcripción, codones de terminación, y sobre todo buscar el promotor de la subunidad ligera ya que los estudios realizados hasta el momento apuntan hacia el hecho de que cada una de las subunidades de la enzima GOGAT contenga su propio promotor, ya que como se mencionó se cuenta con plásmidos independientes que codifican tanto para la subunidad

grande como para la subunidad chica de la enzima GOGAT.

Todo esto podrá ser descifrado determinando la secuencia nucleotídica de los fragmentos mapeados en este trabajo y la comparación de ésta con la secuencia de aminoácidos.

Cabe mencionar que también es importante el estudio de esta enzima en otros organismos como por ejemplo en eucariotes como en el caso de los estudios realizados en Neurospora crassa (4).

BIBLIOGRAFIA

- 1) Lehninger, A. L., *Biochemistry*, 2nd ed., (1975) Worth Publ. Inc., New York, U.S.A.
- 2) Tyler, B., (1978). "Regulation of assimilation of nitrogen compounds"., Ann. Rev. Biochem., 47: 1127-62
- 3) Tempest, D. W. Meers, J. L. and Brown, C. M., (1973). "The enzymes of glutamine metabolism", Prusnier, S. and Stadtman E. R. eds., Academic Press, New York 167-82.
- 4) Hummelt, G. and Mora, J., (1980). "NADPH-Dependent Glutamate Synthase and nitrogen metabolism in Neurospora crassa". Biochem. Biophys. Res. Commun., 92: 127-33
- 5) Mifflin, B. J., Lea, O.J. and Walsgrove, R. M., (1980). "Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation" ., Mora, J. and Palacios, R. eds., Academic Press, New York. 213-34.
- 6) Miller, R. E., (1983). "The enzymes of Glutamine Metabolism". Prusiner, s. and Stadtman, E. R. eds., Academic Press, New York. 183-205.
- 7) Mantsala, P., and Zalkin, H., (1976), "Active Subunits of Escherichia coli. Glutamate Synthase"., J.Bacteriol., 126: 539-41.
- 8) Geary, L. E. and Mesister, A., (1977),. "On the mechanism of glutamine-dependent reductive amination of 2-ketoglutarate catalized Glutamate Synthase". J. Biol. Chem., 252: 3501-08.
- 9) Meers, J. L., Tempest, D. W. and Brown, C. M., (1970). "Glutamine (amide): 2-oxoglutarate amino transferase" synthesis of glutamate by some bacteria., J.Gen.Microbiol., 64: 187-94

- 10) Brenchley, J. E., Prival, M. J. and Magasanik, A., (1973). "Regulation of the synthesis of enzymes responsible for glutamate formation in Klebsiella aerogenes". J. Biol., 248: 6122-28.
- 11) Brenchley, J. E., Baker, C. A. and Patil, L. G., (1970). "Regulation of the ammonia assimilatory enzymes in Salmonella typhimurium". J. Bacteriol., 124: 182-89
- 12) La pointe, J., Delcuve, G. and Duplain, L., (1975). "Depressed levels of Glutamate Synthase and Glutamine Synthetase in Escherichia coli mutants altered in Glutamyl-transfer ribonucleic acid Synthetase.". J. Bacteriol., 123: 843-50.
- 13) Nagatani, H., Shimizu, M. and Valentine, R. C., (1971). "The mechanism of ammonia assimilation in nitrogen fixing bacteria Arch. Microbiol., 79: 164-75.
- 14) Pahel, G., Zelenetz, A. and Tyler, B., (1978). "gltB gene and regulation of nitrogen metabolism by Glutamine Synthetase in Escherichia coli". J. Bacteriol., 133: 139-48.
- 15) Covarrubias, A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolívar, F. and Bastarrachea, F., (1980). "Col E1 hybrid plasmids containing Escherichia coli genes involved in the biosynthesis of glutamate and glutamine.". Plasmid, 3: 150-64.
- 16) Clarke, L. and Carbon, J., (1975). "Biochemical construction and selection of hybrid plasmids containing specific segments of Escherichia coli genome". Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72: 4361-65.
- 17) Covarrubias, A., Sanchez-Pescador, R., Lozoya, E. Bastarrachea, F. Bolívar, F., (1980), "Glutamine Metabolism, Enzymology and regulation"., Mora, J. and Palacios, P. eds., Academic Press, New York. 123-37.

- 18) Lozoya, E., Sánchez-Pescador, R., Covarrubias, A., Vichido, I. and Bolivar, F., (1980). "Tight linkage of genes that encode the two Glutamate Synthase subunits of Escherichia coli K-12." J. Bacteriol., 144: 616-21.
- 19) Garcíarrubio, A., Lozoya, E., Covarrubias, A., and Bolivar, F. (1983). "Structural organization of the genes that encode two glutamate synthase subunits of Escherichia coli. Gene 26: 165-170.
- 20) Meagher, R. B., R. O. Tait, M. Betlach, and H. W. Boyer. (1977) "Protein expression in E.coli minicells by recombinant plasmids" Cell 10: 521-536.
- 21) Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sanbrook, J. 1^a ed., (1982). Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory.
- 22) Greene, P., Heyneker, H., Betlach, M., Bolivar, F., Rodríguez, E., Covarrubias, A., Fodor, Backam, K. and Boyer, H., (1978). "general Method for Restriction Endonuclease Purification; Nucleic Acid Research 5: 2373-2380.
- 23) Bolivar, F., Rodríguez, R., Betlach, M. C. and Boyer, H. W. (1977). "Construction and Characterization of New Cloning Vehicles, I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9". Gene 2: 75-93.
- 24) Laemmli, V. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature (London) 227: 680-685.
- 25) Bradford, M. (1979). "A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the principle of Protein-Dye Binding". Anal. Biochem. 72: 248-254.
- 26) Hamilton, P. B. (1967). Methods in Enzymology, XI, Hirs, C. H. W., Ed. New York: Academic Press. 3-15.

- 27) Sakamoto, N. Kotr, A. M. and Savegeou, M. A. (1975). "Glutamate dehydrogenase from Escherichia coli: Purification and Properties ". J. Bacteriol. 124: 775-783.
- 28) Meers, J. L. Tempest, D. W. and Brown, C. M. (1970). "Glutamine (amide): 2-oxoglutarate amino transferase" synthesis of glutamate by some bacteria., J. Gen. Microbiol., 64: 187-94.
- 29) Gervey, S. J. Cremer, E. N. Susdorf, H. D. (1977). Methods in Immunology. Third Edition W, A. Benjamin INC.
- 30) Gerton, L. G. Wardrip, J. N. Hedrick, L. J. (1982). "A gel Eluter for Recovery of Proteins Separated by Polyacrylamide Gel Electroforesis". Analytical Biochemistry. 126: 116-121.
- 31) Moore, S. Chemistry and Biology of Peptides. (1972). Ann. Arbor Science Publishers.
- 32) Lozoya, G. E. (1982). "Aislamiento y Caracterización de los genes que codifican para las subunidades de la Enzima Glutamato Sintasa de Escherichia coli K-12". Tesis para obtener el grado de Maestro en Investigación Biomédica Básica. UNAM. México.
- 33) Hare, E. (1966). "Automatic Multiple Column Amino Acid Analysis-The use of Pressure Elution in small Bore Ion-Exchange Columns". Federatin Proc. 25: 709.
- 34) Rees, M. W. (1946). "The estimation of the Threonine and Serine in Proteins". Biochem, J. 40: 632.
- 35) McKenney, K., Shimatake, H., Court. D., Shmeissner, U., Brady, C. and Rosenberg, M. (1982). "A system to study promoter and terminator signals recognized by Escherichia coli RNA polymerase". Gene Amplification and Analysis. Vol. II. Structural Analysis of Nucleic Acids (Chirijian, J. G. and Papas, T. S. Eds) Elsevier/North Holland, New York.

- 36) Davis, D. B; Dulbecco, R., Eisen, M. H. ; Ginsberg, S. H. and Wood, W. B. (1973). Microbiology 2 Ed. Harper International Edition New York-London.
- 37) Ey, P. L. Prowse, S. J. and Jenkin, C. R. (1978). "Isolation of pure IgG1, IgG2 and IgG2b Immunoglobulin from mouse serum use Protein-A-Sepharose". Immunochimistry. 15: 429-436.
- 38) Mantsala, P., and Zalkin, H. (1976). "Glutamate Synthase, Properties of the Glutamine-Dependent Activity". J. Biol. Chem. 251: 3294-3299.
- 39) Moore, S. (1963). "On the determination of cysteine as cysteic acid". J. Biol. Chem. 238: 235-237.
- 40) Penke, B., Ferenczi, R. y Kovacs, K. (1974). "A new acid hydrolysis method for the determination of tryptophan in peptides and proteins". Anal. Biochem. 60; 45.
- 41) Garcíarrubio, A. (1984). "Caracterización del gen para la subunidad pesada de la enzima GOGAT de E.coli". Tesis para obtener el grado de licenciatura en Investigación Biomédica Básica. UNAM. México.
- 42) Cole, S. T. Grundstromt. Jarín, B. Robinson, J. J. and Weiner J. H. (1982). "Location Nucleotide Sequence of the Fumarate Reductase of Escherichia coli". J. Biochem. 126: 211-216.