

2 Ej. No. 4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

**DESARROLLO DE LAS TECNICAS BASICAS PARA LA
MUTAGENESIS SITIO-ESPECIFICA DIRIGIDA POR
OLIGONUCLEOTIDOS EN EL FAGO M13.**

T E S I S

Para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a

MARIA CRISTINA ARANDA FRAUSTRO

México, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

I N D I C E

I. INTRODUCCION.

1. TIPOS DE MUTACIONES Y MUTÁGENOS.	1
1.1 AGENTES FÍSICOS (RADIACIÓN).	5
1.2 AGENTES QUÍMICOS.	6
1.3 AGENTES BIOLÓGICOS.	9
2. SÍNTESIS QUÍMICA DE POLINUCLEÓTIDOS.	14
2.1 MÉTODO DE TRIESTER.	16
2.2 MÉTODO DE FASE SÓLIDA.	17
2.3 APLICACIONES DE LA SÍNTESIS QUÍMICA DE POLINUCLEÓTIDOS.	19
3. MUTAGÉNESIS SITIO ESPECÍFICA DIRIGIDA POR OLIGONUCLEÓTIDOS.	20
4. VECTORES FÁGICOS DE CADENA SENCILLA PARA EL DNA RECOMBINANTE.	22
5. FAGO M13.	25

.../

.../

.II

6. PROMOTORES (PROCARIOTES). 28

II. ANTECEDENTES.

1. SÍNTESIS Y CLONACIÓN BIOLÓGICA DE UN PROMOTOR CONSENSO. 33

2. SECUENCIA DEL GENE DE LA ACETILTRANSFERASA DE CLORANFENICOL. 34

III. OBJETIVOS. 36

IV. MATERIAL Y METODOS.

1. REACTIVOS. 39

2. CEPA Y FAGO. 40

3. MEDIOS DE CULTIVO. 41

4. ENZIMAS. 42

5. SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA. 46

.../

.../

.III

6. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA O POLIACRILAMIDA. 52
7. ELECTROELUSIÓN DE GELES DE AGAROSA PARA PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA. 54
8. TRANSFECCIÓN. 55
9. SECUENCIA DE DNA Y PREPARACIÓN DE DNA DE CADENA SENCILLA. 56
10. MICROENSAYO DE DNA DE PLÁSMIDO. 61
11. PREPARACIÓN DE DNA EN FORMA REPLICATIVA RF. 64

V. RESULTADOS.

A. PRODUCCIÓN DE LA DOBLE DELECCIÓN.

1. CONSTRUCCIÓN DEL FAGO RECOMBINANTE M13 MP7- Δ CM. 70
2. CARACTERIZACIÓN DEL M13 MP7 - Δ CM POR SECUENCIA DE DNA. 71

.../

.../

.IV

3.	CONDICIONES DE REPARACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE LA DOBLE DELECCIÓN.	72
4.	MONITOREO DE LA REACCIÓN DE REPARACIÓN.	74
5.	ELIMINACIÓN DE LA CADENA SENCILLA REMANENTE.	75
6.	TRANSFECCIÓN.	75
7.	HIBRIDIZACIÓN EN PUNTO.	76
<u>B. GENERACIÓN DEL SITIO DE <u>XBA I.</u></u>		
8.	SÍNTESIS DEL OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO REQUERIDO PARA CREAR UN SITIO DE <u>XBA I.</u>	78
9.	VERIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE 19 <u>MERO</u> EN SECUENCIA DE DNA.	79
10.	SUSTRATO UTILIZADO EN LA OBTENCIÓN DEL SITIO DE <u>XBA I.</u>	80
11.	CONDICIONES DE REPARACIÓN.	80

.../

.../	.v
12. MONITOREO DE LA REACCIÓN DE REPARACIÓN.	81
13. ELIMINACIÓN DE LA CADENA SENCILLA.	82
14. HIBRIDIZACIÓN CON COLONIA.	85
VI. DISCUSION.	87
VII. REFERENCIAS.	97

I. INTRODUCCION.

1. TIPOS DE MUTACIONES Y MUTÁGENOS.

EL INICIO DEL DESARROLLO DE LA GENÉTICA CLÁSICA Y MOLECULAR PUEDE SER MARCADA A PARTIR DEL DESCUBRIMIENTO DE LAS LEYES FUNDAMENTALES DE LA HERENCIA POR MENDEL EN 1865. CASI INMEDIATAMENTE DESPUÉS DEL REDESCUBRIMIENTO DE DICHAS LEYES, EN 1900, LOS GENETISTAS COMENZARON A ESPECULAR ACERCA DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DEL GEN Y DE SU MODO DE CONTROLAR QUÍMICAMENTE LAS CARACTERÍSTICAS CELULARES.

DE LOS TRABAJOS DE ESTOS GENETISTAS MENDELIANOS CON ORGANISMO MULTICELURARES MUTANTES COMO PLANTAS Y ANIMALES (PLANTA DEL MAÍZ, RATÓN, MOSCA DROSOPHILA, ETC.), SURGIERON LAS PRIMERAS IDEAS ACERCA DE QUE LOS GENES CONTROLAN EN FORMA DIRECTA LA SÍNTESIS DE TODAS LAS PROTEÍNAS; SIN EMBARGO, SABÍAN QUE PARA PROPORCIONAR EVIDENCIAS CONVINCENTES EN CUANTO A LA MANERA DE ACTUAR DE LOS GENES, ERA NECESARIO ENCONTRAR OBJETOS BIOLÓGICOS MÁS ACCESIBLES AL ANÁLISIS QUÍMICO (1).

EN ESE ENTONCES NO ERA POSIBLE TRABAJAR CON MICROORGANISMOS PUES ÉSTOS NO PRESENTAN CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS FÁCILMENTE RECONOCIBLES, POR LO QUE NO SE PODÍA SABER CUANDO CONTENÍAN MUTACIONES.

.../

,2

EL AVANCE FUNDAMENTAL EN EL EMPLEO DE BACTERIAS Y VIRUS BACTERIANOS O FAGOS, PARA EL ESTUDIO DE LAS FUNCIONES DE LOS GENES, SE LOGRÓ HASTA 1945 CON EL CONOCIMIENTO DE QUE SE PODÍAN LOGRAR MUTACIONES, QUE ALTERAN LA CAPACIDAD DE LAS BACTERIAS PARA SINTETIZAR METABOLITOS ESENCIALES; QUE DAN RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A FAGOS; ASÍ COMO MUTACIONES DE FAGOS QUE IMPLICAN VARIEDADES DE HUÉSPEDES Y REQUERIMIENTOS TÉRMICOS. ADEMÁS, LAS BACTERIAS Y FAGOS TIENEN LA VENTAJA DE POSEER CICLOS DE VIDA MUY BREVES Y DE CRECER FÁCILMENTE BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO CONTROLABLES (2).

LOS GENES MUTANTES CONFIEREN CARACTERÍSTICAS IDENTIFICABLES Y SON ENTIDADES CENTRALES EN EL ESTUDIO DE LA GENÉTICA CLÁSICA. DE AHÍ LA IMPORTANCIA Y EL INTERÉS DE AISLAR Y PRODUCIR MUTACIONES.

UNA MUTACIÓN ES UN PROCESO POR EL CUAL UN GENE SUFRE UN CAMBIO ESTRUCTURAL. NOSOTROS DEFINIREMOS MUTACIÓN COMO CUALQUIER ALTERACIÓN EN LA SECUENCIA DE BASES DEL ÁCIDO NUCLÉICO COMPRENDIDO EN EL GENOMA DE UN ORGANISMO, INDEPENDIEMENTE DE SI LA ALTERACIÓN CAUSA O NO UN EFECTO FENOTÍPICO.

EXISTEN VARIOS TIPOS DE MUTACIONES: UNA MUTACIÓN PUNTUAL IMPLICA EL CAMBIO DE UNA SOLA BASE DE ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEÍCO (DNA), EN CONTRASTE CON AQUELLAS QUE ENVUELVEN UN FRAGMENTO GRANDE DE UN GENE O DEL CROMOSOMA.

.../

TAMBIÉN SE CLASIFICAN LAS MUTACIONES LLAMADAS DE SUSTITUCIÓN DE BASES: 1) TRANSVERSIÓN ES LA SUSTITUCIÓN DE UNA BASE PÚRICA, ADENINA (A) O GUANINA (G), POR UNA BASE PIRIMÍDICA, CITOSINA (C) O TIMINA (T), 2) TRANSICIÓN ES EL INTERCAMBIO DE UNA BASE PÚRICA POR OTRA BASE PÚRICA (ADENINA POR GUANINA O VICEVERSA) O EL DE UNA BASE PIRIMÍDICA POR OTRA BASE PIRIMÍDICA (CITOSINA POR TIMINA O VICEVERSA). POR LO TANTO, EXISTEN CUATRO TIPOS DIFERENTES DE TRANSICIONES Y OCHO TIPOS DIFERENTES DE TRANSVERSIONES (3).

DADOS LOS MECANISMOS DE EXPRESIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO, LAS MUTACIONES (QUE AFECTAN LA FIDELIDAD DEL PROCESO DE REPLICACIÓN) DAN LUGAR A EFECTOS DIVERSOS, COMO: UN DESPLAZAMIENTO DEL PATRÓN DE LECTURA; UN CAMBIO DE UN CODÓN QUE CODIFICA PARA UN AMINOÁCIDO POR OTRO QUE CORRESPONDE A UN AMINOÁCIDO DIFERENTE; O, UN CAMBIO DE UN CODÓN QUE ESPECIFICA UN AMINOÁCIDO POR OTRO QUE NO CODIFICA PARA NINGUNO, PROVOCANDO LA TERMINACIÓN DE LA CADENA POLIPEPTÍDICA.

DENTRO DE LAS MUTACIONES QUE AFECTAN LA FIDELIDAD DEL PROCESO DE REPLICACIÓN ESTÁN LAS TRANSICIONES, TRANSVERSIONES, SUSTRACCIONES Y ADICIONES.

CUANDO SE QUITAN O SE INSERTAN UNA O MÁS BASES, TODOS LOS AMINOÁCIDOS SIGUIENTES A LA SUSTRACCIÓN O ADICIÓN PUEDEN SER INCORRECTOS (4).

.../

LAS MUTACIONES PUEDEN OCURRIR SIN INTERVENCIÓN EXPERIMENTAL, SIN UNA CAUSA CONOCIDA. ESTAS SON LLAMADAS MUTACIONES ESPONTÁNEAS.

UNA DE LAS LIMITACIONES MÁS SERIAS PARA EL ESTUDIO DE MUTACIONES, ES LA BAJA VELOCIDAD A LA CUAL LAS MUTACIONES ESPONTÁNEAS OCURREN. LA VELOCIDAD PROMEDIO DE MUTACIÓN EN BACTERIAS ES DEL ORDEN DE UNA EN 10 MILLONES POR GENERACIÓN CELULAR ----- (10^{-7}) (2). ESTA LIMITACIÓN FUE RESUELTA CON LA UTILIZACIÓN DE MUTACIONES INDUCIDAS ESPECÍFICAMENTE POR AGENTES EXTERNOS, TALES COMO RADIACIONES IONIZANTES, LUZ ULTRAVIOLETA Y CIERTAS SUSTANCIAS QUÍMICAS ESPECÍFICAS; ASÍ COMO CON AGENTES BIOLÓGICOS.

ESTOS AGENTES DENOMINADOS COLECTIVAMENTE MUTÁGENOS, INCREMENTAN NOTABLEMENTE LA RAPIDEZ CON QUE SE PUEDEN AISLAR GENES MUTANTES. TALES MUTÁGENOS PROVOCAN DIFERENTES TIPOS DE DAÑO SOBRE EL DNA DE LA CÉLULA, EL CUAL NO SIEMPRE ES REPARADO POR LOS MECANISMOS DE REPARACIÓN CELULAR.

LOS MUTÁGENOS ACTÚAN EN FORMA INDISCRIMINADA. POR LO QUE RESPECTA A LOS GENES, NINGUNO DE AQUELLOS AUMENTA LA PROBABILIDAD DE MUTACIÓN PARA UN DETERMINADO GENE, SIN AUMENTARLA A SU VEZ PARA LOS DEMÁS.

A CONTINUACIÓN SE HABLARÁ DE UNA VARIEDAD DE MUTÁGENOS Y SE DISCUTIRÁ SOBRE LOS MODOS DE ACCIÓN DE ÉSTOS.

.../

1.1 AGENTES FISICOS (RADIACIÓN).

A) RAYOS X.- LOS RAYOS X SON EXTREMADAMENTE ENÉRGICOS Y CUANDO ELLOS INTERACTÚAN CON EL DNA, EL RESULTADO ES USUALMENTE UN ROMPIMIENTO EN EL ENLACE FOSFODIESTER DEL DNA.

LA VELOCIDAD DE MUTACIÓN ES GENERALMENTE PROPORCIONAL A LA DOSIS DE IRRADIACIÓN. PEQUEÑAS CANTIDADES DE IRRADIACIÓN PRODUCEN UN LIGERO DAÑO GÉNÉTICO MIENTRAS QUE GRANDES DOSIS DE ÉSTA PROVOCAN UN DAÑO MAYOR E INCLUSO PUEDEN SER LETALES.

B) LUZ U.V.- LOS RAYOS ULTRAVIOLETA SON SIGNIFICATIVAMENTE MENOS POTENTES QUE LOS RAYOS X EN INDUCIR MUTACIONES. LA LONGITUD DE ONDA DE LOS ULTRAVIOLETA ES MAYOR, POR LO TANTO SON DE MENOR ENERGÍA Y PENETRAN MENOS QUE LOS RAYOS X.

LA LUZ ULTRAVIOLETA INDUCE LA REACCIÓN EN LA CUAL BASES PIRIMÍDICAS ADYACENTES (EN LA MISMA CADENA) FORMAN DÍMEROS.

LA PRESENCIA DE ESTOS DÍMEROS DE TIMINA IMPIDEN EL FUNCIONAMIENTO DE LAS POLIMERASAS HASTA QUE LOS DÍMEROS SON REMOVIDOS. DE AQUÍ QUE LAS ALTERACIONES DEL DNA INDUCIDAS POR RAYOS U.V. SON MÁS EVIDENTES CUANDO LA REPLICACIÓN ESTÁ EN PROCESO. --

(5).

1.2 AGENTES QUÍMICOS.

A) MUTÁGENOS AMBIENTALES QUE ACTÚAN IN VITRO.

ACIDO NITROSO.- ES UN MUTÁGENO MUY PODEROSO QUE ACTÚA - SOBRE PREPARACIONES DEL DNA IN VITRO (DE FAGOS O DE ELEMENTOS - EXTRACROMOSOMALES). EL EFECTO PRIMARIO DEL ACIDO NITROSO ES LA DESAMINACIÓN DE CITOSINA Y ADENINA; ESTA DESAMINACIÓN OXIDATIVA REPLAZA GRUPOS AMINO POR CARBONILO. LA REMOCIÓN DE UN GRUPO AMINO (NH_2) EN LA ADENINA FORMA HIPOXANTINA.

ORDINARIAMENTE LA ADENINA SE APAREA CON TIMINA EN EL -- DNA, PERO CUANDO ES CAMBIADA POR HIPOXANTINA, ÉSTA PRESENTA PROPIEDADES COMO LA GUANINA Y ESPECIFICA CITOSINA. ESTE CAMBIO DE BASES PROVOCA LA TRANSICIÓN DEL PAR AT POR GC. UNA SUSTITUCIÓN DE ESTE TIPO RESULTA EN UN CAMBIO DE CODÓN EN CADA CADENA DE DNA Y SE PUEDE ORIGINAR ASÍ UNA PROTEÍNA MUTANTE.

LA DESAMINACIÓN DE CITOSINA FORMA URACILO Y LA DE GUANINA DA XANTINA. LOS EFECTOS DE ESTAS TRANSFORMACIONES SON ANÁLOGOS AL CASO ANTERIOR.

HIDROXILAMINA.- ES UN MUTÁGENO CUYO EFECTO ES DESAMINAR A LA CITOSINA, DE TAL MANERA QUE EL PRODUCTO FORMADO SE APAREA CON LA ADENINA, EN VEZ DE CON LA GUANINA.

.../

B) AGENTES ALQUILANTES.

METANO SULFONATO DE ETILO Y METANO SULFONATO DE METILO.-- ESTOS AGENTES REACCIONAN CON EL DNA METILANDO O ETILANDO EL ANILLO DE UNA PURINA, YA SEA GUANINA O ADENINA, EN LA POSICIÓN 7. - ÉSTA REACCIÓN ES SEGUIDA POR LA HIDRÓLISIS DEL ENLACE PURINA-DESOXIRROBOSA Y POR LA PÉRDIDA POSTERIOR DE LA BASE PÚRICA DE LA CADENA POLINUCLEOTÍDICA.

ESTA PÉRDIDA PRODUCE UN HUECO EN UNA DE LAS CADENAS DEL DNA VIRAL, DONDE ANTES RESIDÍA LA PURINA. EN EL PROCESO DE REPLICACIÓN SE PUEDE INSERTAR CUALQUIERA DE LAS 4 BASES QUE PUEDE SER UNA BASE INCORRECTA O LA COMPLEMENTARIA CORRECTA EN LA CADENA EN CRECIMIENTO.

SI SE INSERTA LA BASE CORRECTA, LA INFORMACIÓN GENÉTICA ORIGINAL ES REESTABLECIDA; PERO SI SE INSERTA UNA BASE INCORRECTA, SE PRODUCE UN CAMBIO PERMANENTE EN LA SECUENCIA DE BASES Y - POR LO TANTO OCURRE UNA MUTACIÓN.

N-METIL - N' - NITRO N - NITROSOGUANIDINA - . ES UN MUTÁGENO EXTREMADAMENTE POTENTE, EL CUAL TIENDE A ACTUAR EN LOS -- FRENTEROS DE REPLICACIÓN DEL DNA PRODUCIENDO UNA 7 - METILGUANINA.

.../

.../

C) ANÁLOGOS DE LAS BASES DE DNA.

5-BROMOURACILO. ESTE MUTÁGENO ACTÚA in vivo INCORPORÁNDOSE AL DNA. ES CAPAZ DE SUSTITUIR A TIMINA PERO ESTÁ EN EQUILIBRIO CON LA FORMA ENÓLICA QUE APARECE CON GUANINA PARTE DEL TIEMPO.

2-AMINOPURINA. ESTE MUTÁGENO PUEDE FORMAR DOS PUENTES DE HIDRÓGENO CON TIMINA Y UN PUENTE DE HIDRÓGENO CON CITOSINA. LA ACCIÓN MUTAGÉNICA DE LA 2-AMINOPURINA ES DEBIDA A SU PROPENSIÓN A SER INCORPORADA EN EL DNA EN LUGAR DE ADENINA Y MÁS RARAMENTE EN LUGAR DE GUANINA.

D) AGENTES INTERCALADORES.

NARANJA DE ACRIDINA, PROFLAVINA Y MOSTAZAS NITROGENADAS. ESTOS MUTÁGENOS TIENEN ANILLOS AROMÁTICOS Y PUEDEN INTERCALARSE ENTRE 2 BASES DEL DNA DE DOBLE HÉLICE, EN FORMA ANÁLOGA AL APILAMIENTO NATURAL DE ÉSTAS.

LOS AGENTES INTERCALADORES PUEDEN INSERTARSE DURANTE LA REPLICACIÓN EN LA CADENA QUE SE VA A COPIAR, PRODUCIENDO QUE LA NUEVA CADENA TENGA UNA BASE EXTRA EN LA POSICIÓN DONDE OCURRIÓ EL INTERCALAMIENTO. (FIGURA NÚM. 1).

.../

MUTÁGENOS

ESTRUCTURA

RAYOS X

5 NM DE LONGITUD DE ONDA

LUZ U.V.

254 NM DE LONGITUD DE ONDA

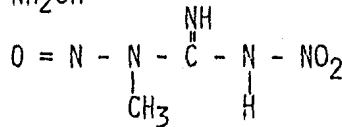
ACIDO NITROSO

H NO₂

HIDROXILAMINA

NH₂OH

N-METIL-N-NITRO-
N-NITROSOGUANIDINA



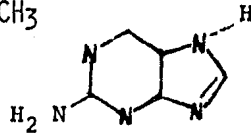
ETILMETANO SULFONATO

CH₃ - SO₃ - CH₂ - CH₃

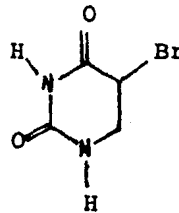
METIL-METANO-SULFONATO

CH₃ SO₃ CH₃

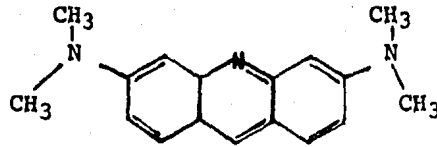
2 - AMINOPURINA



5 - BROMOURACILO



NARANJA DE ACRIDINA



ICR 191

(MOSTAZA NITROGENADA)

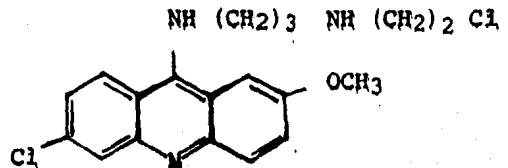


FIGURA NÚM. 1. FÓRMULAS DE LOS MUTÁGENOS MÁS COMUNES.

E) AGENTES ENTRECruzADORES.

MITOMICINA C Y TRIMETIL PSORALENO. PRODUCEN ENTRECruzAMIENTOS INTERCADENA EN EL DNA, LO QUE IMPIDE LA REPLICACIÓN DEL DNA HASTA QUE SON REPARADOS (5).

1.3 AGENTES BIOLÓGICOS.

A) FAGOS TRANSDUCTANTES. AL PROCESO POR EL CUAL LOS - FAGOS TEMPERADOS TRANSFIEREN MATERIAL GENÉTICO DE UNA BACTERIA A OTRA SE LE LLAMA TRANSDUCCIÓN. LOS FAGOS TEMPERADOS SON LOS QUE INVADEN A LA CÉLULA BACTERIANA PERO NO LA-DESTRUYEN Y PERMANECEN EN LA CÉLULA HUÉSPED POR MUCHAS GENERACIONES CELULARES.

SE PUEDEN DISTINGUIR 2 TIPOS DE TRANSDUCCIÓN: 1) TRANS-- DUCCIÓN GENERALIZADA, EN LA CUAL SE PUEDE TRANSFERIR CUALQUIER GE NE BACTERIAL Y; 2) TRANSDUCCIÓN ESPECIALIZADA, EN LA CUAL SE TRANS FIEREN SOLAMENTE LOS GENES DE UNA REGIÓN MUY PEQUEÑA DEL CROMOSO- MA DEL HUÉSPED Y QUE ESTÁN ADYACENTES AL SITIO DE INSERCIÓN DEL - FAGO (6).

ESTOS FENÓMENOS OPERAN COMO SE DESCRIBE A CONTINUACIÓN.-
TRANSDUCCIÓN GENERALIZADA: LOS FAGOS TEMPERADOS PUEDEN VOLVERSE - VIRUS INFECCIOSOS Y LISAR A LAS BACTERIAS. EN EL FINAL DE ESTE - CICLO LÍTICO, CUANDO EL DNA DEL FAGO ESTÁ SIENDO EMPACADO EN LAS PROTEÍNAS DE LA CÁPSIDE, TAMBIÉN EL CROMOSOMA BACTERIANO ESTÁ ---

.../

.10

SIENDO DEGRADADO POR LO QUE OCASIONALMENTE OCURRE QUE PEDAZOS DE DNA CROMOSOMAL, USUALMENTE DEL MISMO TAMAÑO QUE EL DNA DEL FAGO, SON EMPACADOS ERRÓNEAMENTE EN LA CÁPSIDE DEL FAGO. CUANDO ESTAS PARTÍCULAS VIRALES DEFECTUOSAS INFECTAN UNA NUEVA BACTERIA -- QUE ES GENÉTICAMENTE DISTINTA, PUEDEN RECOMBINARSE LOS GENES DE LA BACTERIA HUÉSPED ANTERIOR (GENES TRANSDUCIDOS) CON LOS GENES DE LA NUEVA BACTERIA (7).

EL TAMAÑO DEL DNA CROMOSOMAL DEBE SER SIMILAR AL DEL -- DNA DEL FAGO DEBIDO A QUE ÉSTE DEBE CABER DENTRO DE LA CABEZA -- DEL FAGO.

LA TRANSDUCCIÓN GENERALIZADA ES COMÚNMENTE REALIZADA -- POR EL FAGO P I DE E. COLI, POR EL P22 DE SALMONELLA Y POR EL --- SP10 DE B. SUBTILIS. ESTOS FAGOS TIENEN UN PROCESO DE EMPACAMIENTO DEL DNA MENOS SELECTIVO QUE EL PROCESO DE LOS FAGOS NO TRANSDUCTANTES Y, POR LO TANTO, PUEDEN INCORPORAR DNA CROMOSOMAL EN -- LA CÁPSIDE DEL FAGO.

TRANSDUCCIÓN ESPECIALIZADA. ESTE FENÓMENO ES MEDIADO POR PROFAGOS. UN PROFAGO ES UN FAGO TEMPERADO QUE ESTÁ OCUPANDO UN SITIO FIJO (SIEMPRE EL MISMO) DENTRO DEL CROMOSOMA DE LA BACTERIA. CUANDO LOS PROFAGOS SON INDUCIDOS PARA DEJAR SUS SITIOS EN EL CROMOSOMA, PUEDE OCURRIR QUE AL SALIRSE ESTE, HAYA UN ---- ERROR Y QUE EL PROFAGO SE LLEVE GENES BACTERIANOS COVALENTEMENTE UNIDOS A ALGUNOS GENES DE ÉL. ESTE DNA HÍBRIDO PUEDE SER EMPA-

.../

.../

CADO CON LAS PROTEÍNAS DE LA CÁPSIDE; EL TAMAÑO DE ESTE DNA ES - PRÁCTICAMENTE EL MISMO QUE EL DEL FAGO ORIGINAL, YA QUE EL PEDAZO DE GENOMA BACTERIANO UNIDO, ES IGUAL AL PEDAZO DE GENOMA DEL FAGO PERDIDO.

LAS PARTÍCULAS TRANSDUCTANTES ESPECIALIZADAS PUEDEN --- TRANSFERIR GENES BACTERIANOS DE UNA CÉLULA A OTRA Y LA TRANSDUCCIÓN SE DICE QUE ES ESPECIALIZADA, PORQUE SÓLO LOS GENES ADYACENTES AL SITIO DE UNIÓN DEL PROFAGO SON TRANSFERIDOS (7).

EL RANGO NATURAL DE GENES TRANSDUCIDOS ES LIMITADO AL - NÚMERO DE GENES CERCANOS AL SITIO DE UNIÓN, POR EJEMPLO, EL FAGO λ ES USADO PARA TRANSDUCIR LOS GENES DE GALACTOSA Y DE LA SÍNTESIS DE BIOTINA Y EL ϕ 80 PARA LOS GENES DE TRIPTOFANO.

SIN EMBARGO, SE HA DEMOSTRADO QUE EL RANGO PUEDE SER -- AMPLIADO HASTA CUBRIR ESENCIALMENTE TODO EL GENOMA BACTERIANO, - OBTENIENDO LOS FAGOS TRANSDUCTANTES DE CÉLULAS QUE TENGAN UN EPI SOMA F' INTEGRADO CERCA DEL SITIO DE UNIÓN DEL FAGO Y QUE ESTE - EPISOMA LLEVE LOS GENES DESEADOS. UN EPISOMA ES UN ELEMENTO GENÉTICO QUE PUEDE EXISTIR LIBREMENTE, O COMO PARTE DEL CROMOSOMA CELULAR NORMAL.

LAS INSERCIONES ASÍ COMO LAS SUSTRACCIONES DE GENES POR MEDIO DE LOS FAGOS TRANSDUCTANTES, HAN PERMITIDO ESTUDIAR LA REGULACIÓN DE LOS GENES BACTERIANOS Y CONOCER MÁS ACERCA DE LA ORGANIZACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO DE LOS FAGOS.

.../

B) TRANSPOSONES. LOS TRANSPOSONES SON UNIDADES DE DNA QUE TIENEN LA HABILIDAD DE MOVERSE DE UNA MOLÉCULA DE DNA A OTRA, INSERTÁNDOSE ELLOS MISMOS AL AZAR. ESTAS MOLÉCULAS DE DNA PUEDEN SER EL CROMOSOMA DE UNA BACTERIA, EL DNA DE ELEMENTOS EXTRACROMOSMALES (PLÁSMIDOS) E INCLUSO EL DE ORGANISMOS SUPERIORES.

TOIOS LOS TRANSPOSONES ESTUDIADOS PRESENTAN EXTREMOS CONSISTENTES EN SECUENCIAS INVERTIDAS-REPETIDAS, LAS CUALES PUEDEN TENER UN LARGO DE POCOS NUCLEÓTIDOS O PUEDEN SER SECUENCIAS HASTA DE 1 400 NUCLEÓTIDOS.

EL RESULTADO DEL PROCESO DE TRANSPOSICIÓN ES QUE UN SEGMENTO DE DNA, PRESENTE ORIGINALMENTE EN UNA MOLÉCULA, ES TRANSFERIDO A UNA MOLÉCULA DIFERENTE QUE NO ES GENÉTICAMENTE HOMÓLOGA AL TRANSPOSON, NI AL DNA DE LA MOLÉCULA DONADORA.

LOS TRANSPOSONES PUEDEN PROMOVER EL REARREGLO DE INFORMACIÓN GENÉTICA EN EL CROMOSOMA, CATALIZANDO REARREGLOS COMO DELECCIONES, INVERSIONES, FUSIONES, ETC.

UN EXCELENTE EJEMPLO ES EL BACTERIÓFAGO MU, EL CUAL ACTÚA COMO MUTÁGENO DEBIDO A LA PROPENSIÓN DE INSERTARSE POR ÉL MISMO EN MEDIO DE LA REGIÓN ESTRUCTURAL DEL DNA EN UNA FORMA AZAROSA, DURANTE LA LISOGENIZACIÓN, CAUSANDO LA PÉRDIDA DE LA FUNCIÓN GENÉTICA CODIFICADA POR UN SEGMENTO DE DNA. TAMBIÉN PUEDE CATALI

.../

ZAR LA FUSIÓN DE MOLÉCULAS DE DNA QUE SE REPLICAN INDEPENDIENTE--
 MENTE O "REPLICONES"; TRANSPONER SEGMENTOS DE CROMOSOMA BACTERIA--
 NO A PLÁSMIDOS. EN TODOS ESTOS REARREGLOS PARECEN ESTAR INVOLU--
 CRADAS LAS SECUENCIAS INVERTIDAS-REPETIDAS DE LOS EXTREMOS DEL --
 DNA DE MU, PUES ESTAS SON REQUERIDAS PARA LA EXPRESIÓN DE UN GENE
 DE MU Y PARECEN SER NECESARIAS TANTO PARA LA TRANSPOSICIÓN COMO --
 PARA LA REPLICACIÓN DE ESTE COMO VIRUS INFECCIOSO.

EXISTEN OTROS VIRUS QUE PUEDEN ACTUAR COMO TRANSPOSONES
 COMO EL FAGO λ PERO A DIFERENCIA DEL FAGO MU ESTE TIENE UN SI--
 TIO MUY ESPECÍFICO PARA SU INTEGRACIÓN AL DNA (8).

TODAS ESTAS HERRAMIENTAS (AGENTES FÍSICOS, QUÍMICOS Y --
 BIOLÓGICOS) HAN PERMITIDO OBTENER ENORMES AVANCES EN EL CONOCI--
 MIENTO DE LA FUNCIÓN Y REGULACIÓN DE LOS GENES.

PARA CONTESTAR ALGUNA PREGUNTA SOBRE UN GENE DETERMINA--
 DO, ES NECESARIO NO SOLAMENTE OBTENER UNA MUTANTE ADECUADA, SINO TAM--
 BIÉN SE REQUIERE DISEÑAR EXPERIMENTOS INGENIOSOS QUE NOS MUESTREN LA --
 FUNCIÓN DEL GEN ETC.. ALGUNAS VECES ESTA METODOLOGÍA PUEDE SER BASTANTE
 COMPLICADA; SIN EMBARGO, LOS GENETISTAS HAN LOGRADO RESPONDER --
 MUCHAS DE LAS DUDAS ACERCA DE LOS GENES POR MEDIO DE ESTOS MÉTODOS.

A PARTIR DEL SURGIMIENTO DE LAS TÉCNICAS DEL DNA RECOM--
 BINANTE, SE HA HECHO POSIBLE LA MUTAGÉNESIS ESPECÍFICA EN SITIOS
 O REGIONES PREDETERMINADOS DEL MATERIAL GENÉTICO.

.../

HUTCHISON ET AL (9) Y RAZIN ET AL (10), FUERON LOS PRIMEROS EN DEMOSTRAR QUE SE PODÍAN OBTENER ESPECÍFICAMENTE --- TRANSICIONES EN EL DNA DE FAGOS UTILIZANDO OLIGONUCLEÓTIDOS.

GILLAM Y SMITH (11) DESARROLLARON LOS MÉTODOS PARA LA SELECCIÓN DE LA CLONA MUTANTE Y WALLACE ET AL (12), HIZO EXTEN SIVO ESTE MÉTODO CON DNA DE DOBLE CADENA (PLÁSMIDOS) Y MOSTRÓ -- QUE SE PUEDEN HACER DELECCIONES ESPECÍFICAS.

OTROS GRUPOS HAN DESARROLLADO TÉCNICAS PARA MUTAGENIZAR EXTENSAMENTE REGIONES ESPECÍFICAS DEL DNA (13, 14).

COMO SE VERÁ ADELANTE, LA SÍNTESIS QUÍMICA DE DNA ES -- AMPLIAMENTE UTILIZADA EN ESTUDIOS DE RECOMBINACIÓN IN VITRO DE DNA Y ES UNA HERRAMIENTA MUY IMPORTANTE PARA LA MUTAGÉNESIS SI-- TIO ESPECÍFICA.

2. SÍNTESIS QUÍMICA DE POLINUCLEÓTIDOS.

LA SÍNTESIS QUÍMICA DE POLINUCLEÓTIDOS PUEDE DESCRIBIR-- SE EN UNA FORMA SENCILLA COMO LA FORMACIÓN SUCESIVA DE ENLACES - ENTRE LOS CUATRO DIFERENTES NUCLEÓTIDOS: DESOXIADENILATO, DESOXI CITIDILATO, DESOXIGUANILATO Y TIMIDILATO. LA FORMACIÓN DE ESTOS ENLACES DEBE SER ESPECÍFICA, TANTO EN LO QUE SE REFIERE A LAS -- POSICIONES DEL NUCLEÓTIDO QUE REACCIONAN, COMO EN LO QUE SE RE-- FIERE AL ORDEN O SECUENCIA EN LA FORMACIÓN DE ESTOS ENLACES.

.../

EXISTEN DIFERENTES MÉTODOS PARA REALIZAR LA SÍNTESIS DE POLINUCLEÓTIDOS, DE LOS CUALES MENCIONAREMOS LAS CARACTERÍSTICAS MÁS IMPORTANTES.

A) MÉTODO DEL FOSFODIESTER. EL MÉTODO DEL DIESTER FUE DESARROLLADO POR KHORANA ET AL (15). LA ETAPA BÁSICA DE ESTE MÉTODICO ES LA UNIÓN DE 2 DESOXINUCLEÓTIDOS PROTEGIDOS ADECUADAMENTE PARA FORMAR UN DINUCLEÓTIDO CONTENIENDO UN ENLACE FOSFODIESTER.

B) MÉTODO DE LA POLINUCLEÓTIDO FOSFORILASA. ESTE MÉTODO ENZIMÁTICO DE SÍNTESIS DE DNA FUE DESARROLLADO POR SMITH --- Y COLLABORADORES (16). EN ESTE MÉTODO LA ENZIMA POLINUCLEÓTIDO FOSFORILASA ADICIONA UN NUCLEÓTIDO A UN OLIGONUCLEÓTIDO PEQUEÑO. - CADA NUEVO OLIGONUCLEÓTIDO ES PURIFICADO POR CROMATOGRAFÍA. PARA EMPEZAR ESTE PROCEDIMIENTO ES NECESARIO TENER UN TRÍMERO POR LO MENOS Y ESTE DEBE SER OBTENIDO POR ALGÚN OTRO MÉTODO.

ESTE MÉTODO DE POLINUCLEÓTIDO FOSFORILASA TRABAJA BIEN Y TIENE LA VENTAJA DE QUE LOS PROCEDIMIENTOS INVOLUCRADOS SON FAMILIARES PARA LA MAYORÍA DE LOS BIOQUÍMICOS. NO OBSTANTE SU APLICACIÓN, EN LA ACTUALIDAD ES LIMITADA DADO EL PROGRESO DE TÉCNICAS - ALTERNATIVAS.

C) MÉTODO DE FOSFOTRIESTER. LA PRINCIPAL DIFERENCIA ENTRE EL MÉTODO DEL DIESTER Y EL DEL TRIESTER ES LA PRESENCIA EN ESTE ÚLTIMO DE UN GRUPO PROTECTOR EXTRA SOBRE EL ÁTOMO DE FÓSFORO

.../

.../

.16

QUE UNE 2 NUCLEÓTIDOS. EL GRUPO PROTECTOR EXTRA ES USUALMENTE UN GRUPO CLOROFENILO EL CUAL PRODUCE NUCLEÓTIDOS Y POLINUCLEÓTIDOS - INTERMEDIARIOS SOLUBLES EN SOLVENTES ORGÁNICOS.

D) MÉTODO DE FASE SÓLIDA. EN ESTE MÉTODO EL NUCLEÓTI- DO INICIAL SE UNE A UN SOPORTE SÓLIDO Y SE PROCEDE A LA ADICIÓN, - PASO POR PASO, DE NUCLEÓTIDOS. LAS ETAPAS DE LAVADO Y MEZCLADO - SIMPLIFICAN LA SÍNTESIS, AL SUSTITUIR PROCEDIMIENTOS DE PURIFICA- CIÓN USADOS EN LOS MÉTODOS EN SOLUCIÓN.

E) MÉTODO DEL FOSFITO. ESTE MÉTODO UTILIZA NUCLEÓSI-- DOFOSFITOS COMO INTERMEDIARIOS REACTIVOS. SUBSECUENTEMENTE SE -- EFECTÚA UNA OXIDACIÓN. EL MÉTODO LO ENSAYÓ PRIMERAMENTE ----- KABANICK ET AL (17) EN 1971 UTILIZANDO UN NUCLEÓSIDOFOSFITO UNI DO A UN SOPORTE SÓLIDO, AL CUAL LE ADICIONÓ UN SEGUNDO NUCLEÓTIDO, OBTENIENDO UN DINUCLEÓSIDOFOSFITO, EL QUE POSTERIORMENTE SE OXI-- DÓ CON CLORURO DE MERCURIO PARA LLEGAR AL DINUCLEÓTIDO. LA VENTA JA FUNDAMENTAL DE ESTE MÉTODO SE ENCUENTRA EN LOS ALTOS RENDIMIEN TOS Y TIEMPOS CORTOS DE ACOPLAMIENTO.

2.1 MÉTODO DEL TRIESTER.

COMO YA SE MENCIONÓ EL OBJETIVO EN LA SÍNTESIS QUÍMICA DE POLINUCLEÓTIDOS ES LA UNIÓN SUCESIVA DE NUCLEÓTIDOS HASTA FORMAR EL OLIGONUCLEÓTIDO DESEADO.

.../

PARA PODER FORMAR EL ENLACE INTERNUCLEOTÍDICO ENTRE 2 - NUCLEÓSIDOS, DEBEN ESTAR ÉSTOS PROTEGIDOS DEBIDO A QUE TIENEN -- GRUPOS FUNCIONALES COMO LOS HIDROXILOS DE LA POSICIÓN 3', 5' DEL AZÚCAR DESOXIRRIBOSA Y AMINO EXOCÍCLICO DE LAS BASES, QUE REAC-- CIONARÍAN DURANTE LA SÍNTESIS DE LAS CADENAS DE DNA DANDO ORIGEN A PRODUCTOS INDESEABLES.

EL GRUPO PROTECTOR MÁS USADO EN EL BLOQUEO DE LAS FUN-- CIONES AMINO DE LA ADENINA Y LA CITOCINA ES EL BENZOILO, Y EL -- DE LA GUANINA ES ISOBUTIRILO.

PARA PROTEGER EL HIDROXILO 5' SE USA EL GRUPO DIMETOXI-- TRILO, EL CUAL ES ESTABLE AL ÁLCALI PERO SE HIDROLIZA FÁCILMENTE EN CONDICIONES ÁCIDAS SUAVES.

A TRAVÉS DE UNA SERIE DE PROCEDIMIENTOS SE PUEDEN PREPA-- RAR LOS BLOQUES "COMPLETAMENTE PROTEGIDOS" (18) CUYA FÓRMULA GE-- NERAL SE MUESTRA EN LA FIGURA NÚM. 2.

LOS BLOQUES (DINUCLEÓTIDOS O TRINUCLEÓTIDOS) SE PUEDEN DESE-- LOQUEAR SELECTIVAMENTE Y USARSE PARA LA SÍNTESIS DE POLINU-- CLEÓTIDOS DE ELEVADO PESO MOLECULAR (19).

2.2 METODO EN FASE SOLIDA.

PARA LA SÍNTESIS DE POLINUCLEÓTIDOS EN FASE SÓLIDA, UN NUCLEÓSIDO SE UNE COVALENTEMENTE A UNA RESINA DE POLIESTIRENO -- QUE ACTÚA COMO SOPORTE.

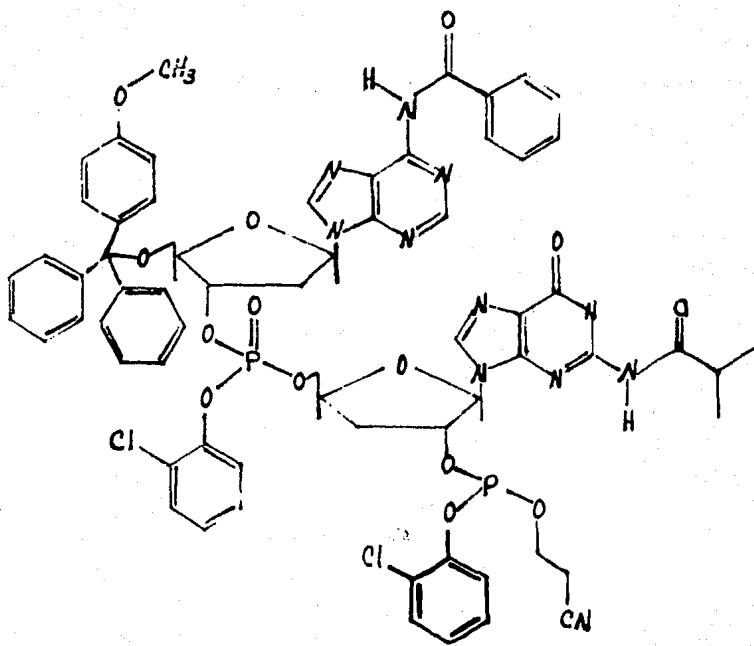


FIGURA N.º. DINUCLEÓTIDO "COMPLETAMENTE PROTEGIDO".

.../

DESPUÉS SE VAN AGREGANDO LOS BLOQUES (TRINUCLEÓTIDOS O DINUCLEÓTIDOS) PREVIAMENTE FORMADOS E HIDROLIZADOS DEL GRUPO - CIANOETILO (CE), EN EL ORDEN APROPIADO PARA OBTENER LA SECUENCIA REQUERIDA.

LA EXTENSIÓN DE LA CADENA OLIGONUCLEOTÍDICA SE HACE EN DIRECCIÓN 3' A 5' HIDROXILO FINAL, UTILIZANDO UN REACTIVO ACOPLA DOR COMO EL NITROTRIAZÓLIDO DE MESITILENSUFONÍLO (MSNT) (AGENTE CONDENSANTE) PARA LA FORMACIÓN DEL ENLACE INTERNUCLEOTÍDICO. -- (FIGURA NÚM. 3).

EN ESTE MÉTODO LA PURIFICACIÓN DE LOS INTERMEDIARIOS Y DEL PRODUCTO FINAL SE SIMPLIFICA, PUES EL EXCESO DE REACTIVOS Y SUBPRODUCTOS SE ELIMINA POR MEDIO DE LAVADOS Y POSTERIOR FILTRACIÓN DE LA RESINA EN QUE LA CADENA VA CRECIENDO (20).

AL FINAL DE LA SÍNTESIS, EL POLÍMERO PUEDE REMOVERSE --- APROPIADAMENTE (CON HIDRÓXIDO DE AMONIO) PARA OBTENER EL PRODUCTO ESPERADO.

LA PURIFICACIÓN DEL OLIGONUCLEÓTIDO FINAL SE HACE POR - CROMATOGRAFÍA EN SEPHANDEX G 50 Y POSTERIORMENTE, POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (HPLC).

.../

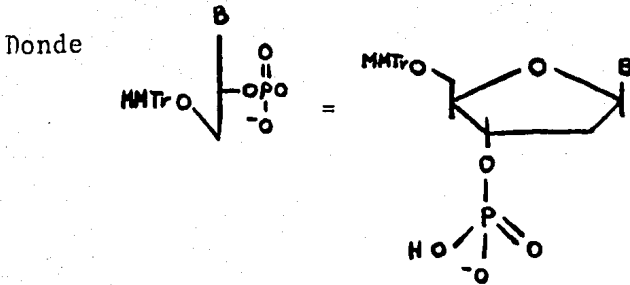
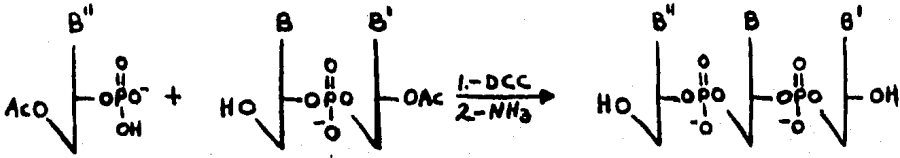
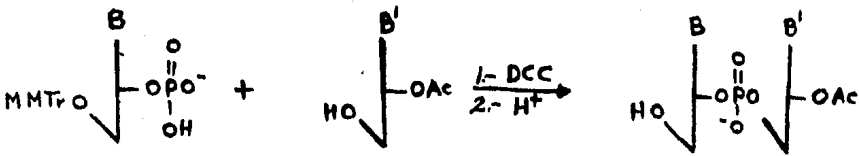


FIGURA NÚM. 3. SÍNTESIS DE POLINUCLEÓTIDOS EN FASE SÓLIDA.

2.3 APLICACIONES DE LA SINTESIS QUIMICA DE POLINUCLEOTIDOS.

DENTRO DE LAS APLICACIONES MÁS RELEVANTES DE ESTA METODOLOGÍA ESTÁN LAS SIGUIENTES:

- A) CONSTRUCCIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES SINTÉTICOS (21).
- B) ESTUDIO DE REGIONES REGULATORIAS (SÍNTESIS DE ESTAS REGIONES) (22).
- C) CONFORMACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS (OBTENCIÓN DE CRISTALES DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA SU ESTUDIO POR CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X) (23).
- D) AISLAMIENTO DE GENES ESPECÍFICOS (CON RASTREADORES SINTÉTICOS MARCADOS RADIOACTIVAMENTE) (24).
- E) OBTENCIÓN DE ADAPTADORES "LINKERS" QUE CONTIENEN UNA SECUENCIA DE DNA QUE ES RECONOCIDA POR UNA O MÁS ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN Y QUE PUEDEN SER LIGADOS A FRAGMENTOS DE DNA PARA FACILITAR SU CLONACIÓN (25).
- F) MUTAGÉNESIS SITIO ESPECÍFICA; QUE SE DESCRIBE A CONTINUACIÓN (26).

3. MUTAGÉNESIS SITIO ESPECÍFICA DIRIGIDA POR OLIGONUCLEÓTIDOS.

ESTA TÉCNICA CONSISTE EN TENER UN OLIGONUCLEÓTIDO QUE SEA COMPLEMENTARIO A LA REGIÓN BLANCO QUE SE QUIERE MUTAR, PERO QUE PRESENTE UNA O MÁS BASES DESIGUALES SOBRE LAS CUALES SE QUIERE EFECTUAR LA MUTACIÓN.

ESTE OLIGONUCLEÓTIDO ES HIBRIDIZADO CONTRA UN DNA DE CADENA SENCILLA QUE LLEVA LA REGIÓN BLANCO.

DESPUÉS SE HACE UNA REACCIÓN DE REPARACIÓN EN PRESENCIA DE LA ENZIMA DNA POLIMERASA I DE ESCHERICHIA COLI (FRAGMENTO - GRANDE) (27) Y LOS CUATRO DEOXINUCLEÓSIDOS TRIFOSFATO.

EN ESTA REACCIÓN EL OLIGONUCLEÓTIDO FUNCIONA COMO CEBADOR A PARTIR DEL CUAL LA DNA POLIMERASA I VA UNIENDO EL NUCLEÓTIDO ADECUADO, UTILIZANDO COMO MOLDE EL DNA DE CADENA SENCILLA, -- OBTENIÉNDOSE UN DNA DE DOBLE CADENA QUE POSTERIORMENTE ES SELLADO CON LA LIGASA DE T4. ESTE DNA DE DOBLE CADENA COVALENTEMENTE CERRADO ES USADO PARA TRANSFECTAR A ESCHERICHIA COLI.

EN LA CÉLULA SE COPIAN AMBAS CADENAS DE DNA DURANTE --- LA REPLICACIÓN DEL FAGO, OBTENIÉNDOSE EL DNA QUE LLEVA LA MUTACIÓN DESEADA (FIGURA NÚM. 4). PARA DETERMINAR AQUELLAS CLONAS

ESTRATEGIA DE LA MUTAGENESIS

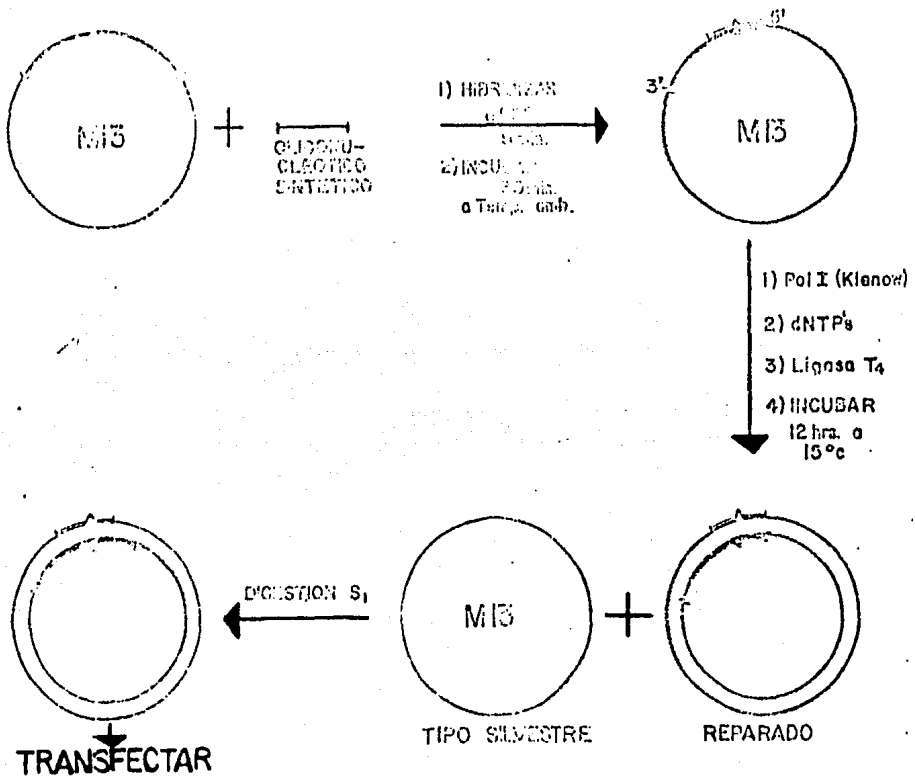


FIGURA NOM. 4 ESQUEMA DE LA TÉCNICA DE MUTAGÉNESIS SITIO ESPECÍFICA DIRIGIDA POR OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS EN FAGO.

.../

.21

DE FAGOS QUE CONTENGAN EL DNA CON LA MUTACIÓN DE INTERÉS, SE REALIZA UNA HIBRIDIZACIÓN EN COLONIA O HIBRIDIZACIÓN EN PUNTO, UTILIZANDO CONDICIONES EN LAS CUALES HIBRIDICE PREFERENCIALMENTE EL -- OLIGONUCLEÓTIDO CON AQUELLOS DNAs QUE SEAN TOTALMENTE COMPLEMENTARIOS Y SE PUEDA DISTINGUIR EL EFECTO DE UNA BASE DESIGUAL AL HIBRIDIZAR (28).

PARA CONFIRMAR QUE LA MUTACIÓN ESTÁ EN LA O LAS BASES -- DESEADAS SE OBTIENE UNA SECUENCIA DE DNA EN LA REGIÓN BLANCO.

UNA DE LAS PRINCIPALES VENTAJAS DE ESTE MÉTODO ES QUE NO SE REQUIERE UN FENOTIPO SELECCIONABLE PARA DETECTAR LA CLONA MUTANTE, DEBIDO A QUE EL MISMO OLIGONUCLEÓTIDO QUE SE USA COMO MUTÁGENO SE USA COMO RASTREADOR PARA LOCALIZAR LAS PLACAS QUE LLEVEN LA MUTACIÓN.

DEBIDO A QUE CON ESTA TÉCNICA SE PUEDEN REALIZAR TRANS-- SIONES, TRANSVERSIONES, INSERCIONES Y DELECCIONES HASTA DE ----- 300 P. B. (29) NO ES DIFÍCIL IMAGINARSE TODAS LAS APLICACIONES QUE PUEDE TENER ESTA TECNOLOGÍA. SE PUEDEN CONECTAR O UNIR GENES A NUEVOPROMOTORES POR MEDIO DE LA INTRODUCCIÓN DE DELECCIONES PRECISAS; SEGMENTOS DE DNA DEFINIDOS PUEDEN SER SUSTITUIDOS O --- SUSTRAÍDOS CON EL PROPÓSITO DE CAMBIAR LA ESTRUCTURA DE UNA PRO-- TEÍNA; SE PUEDEN OBTENER GENES HÍBRIDOS; ES POSIBLE REPARAR MUTACIONES; CREAR SITIOS DE RESTRICCIÓN, ETC.

.../

.../

ADEMÁS, ESTE MÉTODO RESULTA MUY ADECUADO PARA EL ESTU--
DIO SISTEMÁTICO Y DETALLADO DE REGIONES CORTAS DE DNA.

EN LA MUTAGÉNESIS DIRIGIDA, SE HAN UTILIZADO COMO VECTO
RES A FAGOS DE CADENA SENCILLA Y PLÁSMIDOS QUE LLEVAN LA REGIÓN
BLANCO QUE SE QUIERE MUTAR. EN EL CASO DE LOS FAGOS, COMO EL -
DNA ES DE CADENA SENCILLA ÉSTE SE PUEDE UTILIZAR DIRECTAMENTE
COMO MOLDE EN UNA REACCIÓN DE REPARACIÓN; SIN EMBARGO, CON LOS -
PLÁSMIDOS ES NECESARIO OBTENER PRIMERO DNA RELAJADO, A PARTIR --
DEL DNA SUPERENROLLADO POR MEDIO DE LA UTILIZACIÓN DE UNA ENDONU
CLEASA EN PRESENCIA DE BROMURO DE ETIDIO, PARA PRODUCIR LA MELLA
EN EL DNA Y DESPUÉS OBTENER DNA DE CADENA SENCILLA CIRCULAR TRA-
TANDO ÉSTE DNA RELAJADO CON LA EXONUCLASA III DE E.COLI.

4. VECTORES FÁGICOS DE CADENA SENCILLA PARA EL DNA -- RECOMBINANTE.

LOS FAGOS DE DNA DE UNA SOLA HEBRA, PEQUEÑOS COMO LOS -
POLIÉDRICOS (Ø x 174, S13) Y LOS FILAMENTOSOS (F1, FD, M13) HAN
SIDO UTILIZADOS COMO VECTORES PARA LA CLONACIÓN DE FRAGMENTOS --
DE DNA. LOS ÚLTIMOS SON PARTICULARMENTE ADECUADOS PARA LA MUTA-
GÉNESIS DIRIGIDA, ASÍ COMO PARA ANÁLISIS DE SECUENCIA DE DNA EN
EL CASO DEL M13.

AMBAS VARIETADES TIENEN GENOMAS CIRCULARES; LOS GENOMAS

.../

.../

.23

DE LA PRIMERA CONTIENEN APROXIMADAMENTE 5 500 NUCLEÓTIDOS Y LOS -
DE LA SEGUNDA ALREDEDOR DE 6 000 A 7 000,

ESTOS FAGOS SÓLO PUEDEN INFECTAR CEPAS DE E. COLI QUE TEN-
GAN EL PILI F (FACTOR SEXUAL), DEBIDO A QUE ES POR ESTA ESTRUC-
TURA POR DONDE ESTOS FAGOS TRANSMITEN SU DNA HACIA DENTRO DE LA -
CÉLLULA.

EXISTEN VARIOS MODELOS PARA EXPLICAR EL PROCESO DE ADSOR-
CIÓN DE LOS FAGOS FILAMENTOSOS. UNO DE ELLOS PROPONE QUE EL DNA
FILAMENTOSO ES CONDUcido A LO LARGO DEL CANAL CENTRAL DEL -----
PILI F HASTA LA SUPERFICIE DE LA CÉLLULA; OTRA POSIBILIDAD ES QUE
EL FAGO SEA GUIADO POR EL PILI AL RECEPTOR DE MEMBRANA QUE SE --
ENCUENTRA EN LA BASE DE ÉSTE, EL RECEPTOR QUEDARÍA EXPUESTO CUAN-
DO EL PILI ES MUDADO.

LA REPLICACIÓN INTRACELULAR DE LOS FAGOS POLIÉDRICOS Y
DE LOS FILAMENTOSOS PROCEDE EN UNA FORMA SIMILAR UNA A LA OTRA;-
ASÍ, INMEDIATAMENTE DESPUÉS DE LA INFECCIÓN CON ESTOS FAGOS A --
CÉLLULAS DE E. COLI, EL DNA SE REPLICA PRODUCIENDO UNA CADENA COM-
PLEMENTARIA. LA CADENA INYECTADA ES LLAMADA "POSITIVA" Y LA --
NUEVA CADENA SINTETIZADA "NEGATIVA". AMBAS CADENAS FORMAN UN -
DNA DE DOBLE CADENA LLAMADO FORMA REPLICATIVA (RF).

EL RF SIRVE ENTONCES TANTO COMO TEMPLADO PARA LA TRANS-
CRIPCIÓN DE MOLÉCULAS DE ÁCIDO RIBONUCLÉICO MENSAJERO (RNAM), CO

.../

.../

MO PARA LA REPLICACIÓN SIMÉTRICA Y ASIMÉTRICA PARA GENERAR MOLÉCULAS DE RF ADICIONALES Y TAMBIÉN PARA SINTETIZAR MOLÉCULAS DE CADENA SENCILLA POSITIVAS.

CUANDO LAS PROTEÍNAS DEL FAGO SE ACUMULAN, EL DNA DE CADENA SENCILLA POSITIVA ES ENSAMBLADO EN LAS PROTEÍNAS DE LA CÁPSIDE PRODUCIÉNDOSE VARIOS CIENTOS DE VIRIONES POR BACTERIA POR GENERACIÓN.

UNA DE LAS DIFERENCIAS MÁS IMPORTANTES ENTRE EL FAGO \emptyset X 174 Y LOS FAGOS FILAMENTOSOS, ES QUE EL PRIMERO ES LIBERADO POR MEDIO DE LA LISIS DE LAS CÉLULAS Y LOS SEGUNDOS SON EXPULSADOS O SECRETADOS, A TRAVÉS DE LA MEMBRANA CELULAR AL MEDIO DE CULTIVO, SIN CAUSAR LISIS DE LA BACTERIA.

LOS FAGOS FILAMENTOSOS TIENEN UNA REGIÓN INTERGÉNICA DE ALREDEDOR DE 500 NUCLEÓTIDOS NO TRADUCIDA. ESTE HECHO PERMITE LA INSERCIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA EXTRAÑOS AL GENOMA DE ÉSTOS -- HASTA DE 10 KILOBASES (KB) SIN DESTRUIR LA VIABILIDAD DEL FAGO. UN SEGUNDO HECHO CRÍTICO ES QUE LA NATURALEZA FILAMENTOSA DEL VIRION PERMITE EMPACAR DIFERENTES TAMAÑOS DEL DNA (30).

EXISTEN NUMEROSOS TRABAJOS REPORTADOS EN DONDE UTILIZAN EL FAGO \emptyset X 174 PARA PRODUCIR MUTACIONES DIRIGIDAS ----- SITIO ESPECÍFICAS: TRANSICIONES (31), TRANSVERSIONES (32), - DELECCIONES DE UNA SOLA BASE (33). TAMBIÉN EXISTEN INVESTIGA-

.../

,25

CIONES CON LOS FAGOS FILAMENTOSOS DIFERENTES A M13 (34). DEBEN SU VERSATILIDAD COMO VEHÍCULOS MOLECULARES AL DESARROLLO HECHO -- POR MESSING Y COLABORADORES (35). EL FAGO M13 HA RECIBIDO MA-- YOR ATENCIÓN EN LOS ÚLTIMOS TIEMPOS Y SU USO ESTÁ AMPLIAMENTE --- EXTENDIDO.

5. FAGO M13.

EL FAGO M13 PRESENTA TODAS LAS CARACTERÍSTICAS DE UN FAGO FILAMENTOSO COMO SER ESPECÍFICO PARA CEPAS DE E. COLI B. Y NO PRODUCIR LISIS CELULAR.

EN EL DNA DEL FAGO EN FORMA REPLICATIVA PUEDEN CLONARSE FRAGMENTOS DE DNA QUE SE REINTRODUCE POR TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS DE E. COLI. LAS CÉLULAS INFECTADAS EXPULSAN LAS PARTÍCULAS DEL - FAGO CADA UNA DE LAS CUALES CONTIENE UNA MOLÉCULA DE DNA CIRCU-- LAR DE CADENA SENCILLA, POR LO QUE SE PUEDE OBTENER DNA DE CADE-- NA SENCILLA CONTENIENDO UN INSERTO DE UNA MANERA SIMPLE.

LA CLONACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA EN EL RF DEL M13 HA - SIDO FACILITADA POR UNA SERIE DE MEJORÍAS PRODUCIDAS POR INGENIE RÍA GENÉTICA EN ESTE VIRUS POR MESSING ET AL 1978 (35).

EL FAGO RESULTANTE M13 MP7 TIENE VARIAS CARACTERÍSTICAS QUE LO HACEN UN BUEN VEHÍCULO DE CLONACIÓN, TALES COMO SU TAMAÑO PEQUEÑO DE 7 238 PARES DE BASES Y SU ALTO NÚMERO DE COPIAS (CASI 200 POR CÉLULA).

.../

ESTE FAGO M13 MP7 TIENE INSERTADO DENTRO DE LA REGIÓN - INTERGÉNICA ENTRE LOS GENES IV Y II, UN FRAGMENTO DEL OPERÓN DE LACTOSA (LAC) DE E. COLI QUE COMPRENDE LA SECUENCIA DE DNA DEL - PROMOTOR, EL OPERADOR Y PARTE DEL GENE ESTRUCTURAL DE β -GALACTOSIDOSA QUE CODIFICA PARA LOS PRIMEROS 145 AMINOÁCIDOS.

EL PRODUCTO CODIFICADO POR ESTE SEGMENTO DE OPERÓN DE - LACTOSA ES COMPLEMENTARIO AL CODIFICADO POR EL EPISOMA CONTENIDO EN LA CEPA JM101. ESTA CEPA PRODUCE SOLAMENTE EL SEGMENTO CARBOXILO TERMINAL DE LA β -GALACTOSIDOSA POR LO QUE LA ENZIMA ES INACTIVA.

LOS PRODUCTOS POLIPEPTÍDICOS DE LA REGIÓN LAC DEL EPISOMA DE LA JM101 Y DEL FAGO FORMAN UNA PROTEÍNA QUE PRESENTA ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDOSA CUANDO UNA CÉLULA ES INFECTADA; A ÉSTE FENÓMENO SE DENOMINA α -COMPLEMENTACIÓN (36).

EL FENOTIPO LAC ES IDENTIFICADO POR PLACAS AZULES EN UN MEDIO QUE CONTenga EL SUSTRATO 5-BROMO-4-CLORO-3-INDOLIL- β -D-GALACTÓSIDO (X-GAL) Y EL INDUCTOR GRATUITO DEL OPERÓN LAC ISOPROPIL- β -D-TIO-GALACTOPIRANOSIDO (IPTG).

ADEMÁS DENTRO DE LA REGIÓN ESTRUCTURAL DEL GENE DE ---- B-GALACTOSIDOSA SE INSERTÓ UN FRAGMENTO DE 42 PB SINTETIZADO - IN VITRO QUE CONTIENE VARIOS SITIOS PARA ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

.../

,27

(BAM HI, SAL I, Pst I, Acc I y Hinc II; ver figura N.º 5). Después de la inserción de este fragmento el M13 mp7 sigue siendo infectivo y capaz de sintetizar β -galactosidosa funcional.

La inserción de un fragmento de DNA dentro de uno de estos sitios, es fácilmente monitoreado porque de la clonación se produce la pérdida de la actividad de la β -galactosidosa (se produce un péptido no funcional), observándose un cambio de placas azules a placas blancas).

El M13 mp7 tiene una gran aplicación en el método de secuencia de DNA de Sanger et al (37).

Este método de terminadores o del "dideoxi" es simple y rápido. El método consiste en la clonación del fragmento de DNA que se desea secuenciar en el fago M13 mp7 en alguno de los sitios del fragmento de 42 p.b. El DNA del fago de cadena sencilla funcionará como templado para la DNA polimerasa I (Klenow) la cual ha perdido la actividad de exonucleasa 5'-----3' de la enzima intacta. Esta enzima se utiliza para sintetizar una copia radioactiva complementaria al templado a partir de un fragmento de DNA o cebador hibridizado al templado justo antes de la secuencia blanco.

La reacción es incubada en presencia de desoxirribonucleótidos (uno de ellos radioactivo) y de un dideoxirribonu-

.../

ATGACCATGATTACGAATTC CCCGGATCCGTCGACCTGCAGGTCGACGGATCCGGGGAATTC ACTGGCC

M13 MP7

Eco RI

BAM HI

SAL I

PST I

SAL I

BAM HI

Eco RI

HINC II

HINC III

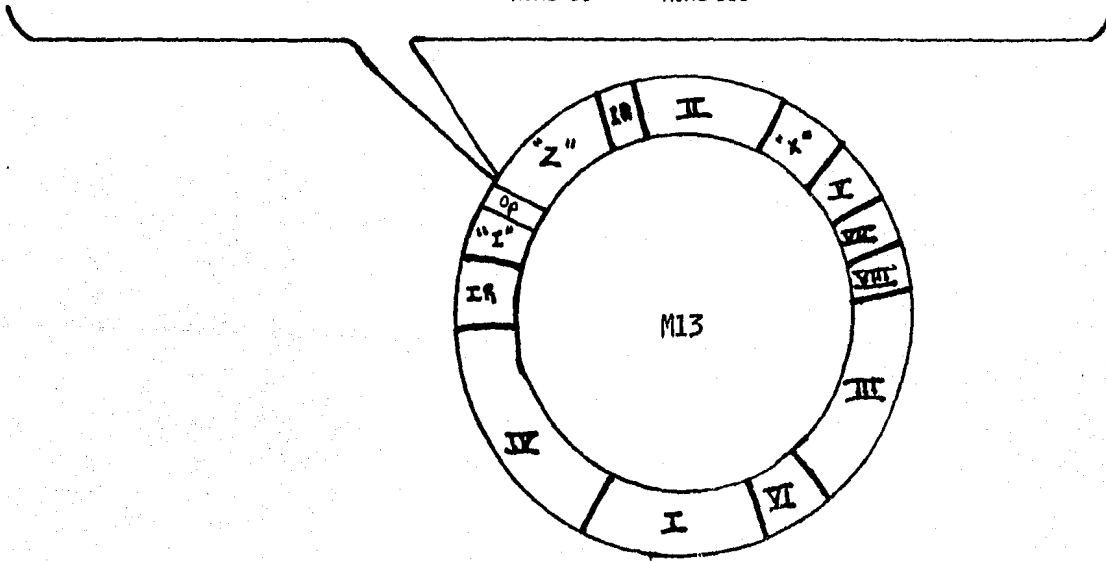


FIGURA NÚM. 5

MAPA GENÉTICO DEL M13 MP7.

.../

CLEOTIDO PARA CADA BASE QUE SE DESEA LEER (4 INCUBACIONES SEPARADAS), DE TAL MANERA QUE EXISTE LA PROBABILIDAD QUE EL DIDESOXIRIBONUCLEÓTI--
DO SEA INCORPORADO EN CADA UNA DE LAS POSICIONES, -
EN LAS CUALES ES COMPLEMENTARIO. AL SER INCORPORADO EL DIDESOXIRIBONUCLEÓTI--
DO, ÉSTE YA NO ES SUSTRATO PARA LA DNA POLIMERASA
I Y, POR LO TANTO, LA REACCIÓN SE PARA EN ESTA POSICIÓN, RESULTAN
DO UNA POBLACIÓN DE MOLÉCULAS DE DIFERENTE TAMAÑO, QUE CORRESPON
DEN A LA POSICIÓN DONDE FUE INCORPORADO EL DIDESOXIRIBONUCLEÓTI--
DO ESPECÍFICO.

LA SECUENCIA ES DEDUCIDA AL CORRER UNA ELECTROFORESIS
CON LAS 4 REACCIONES (UNA POR CADA LETRA) EN UN GEL DESNATURALI--
ZANTE CON LA POSTERIOR AUTORADIOGRAFÍA DEL GEL.

6. PROMOTORES (PROCARIOTES).

PROMOTOR ES UNA SECUENCIA DE DNA QUE ES RECONOCIDA POR
LA DNA POLIMERASA, FORMANDO UN COMPLEJO A PARTIR DEL CUAL LA ENZI
MA INICIA LA SÍNTESIS DE RNA EN FORMA DEPENDIENTE DE DNA. -----
(38).

ESTUDIOS COMPARATIVOS DE LA SECUENCIA DE APROXIMADAMEN--
TE 60 PROMOTORES, HAN REVELADO LA EXISTENCIA DE SECUENCIAS ALTA--
MENTE CONSERVADAS ALREDEDOR DE LAS POSICIONES -10 Y -35 DEL PRO--
MOTOR, (LOS NÚMEROS NEGATIVOS SE REFIEREN A LA POSICIÓN HACIA --
ARRIBA A PARTIR DEL PRIMER NUCLEÓTI--DO TRANSCRITO EN EL DNA).

LA SECUENCIA DE -10 ES UN HEXÁMERO FRECUENTEMENTE NOMBRADO COMO "PRIBNOW BOX" (39), TIENE UNA SECUENCIA PROTOTÍPICA TATAAI EN LA CUAL LA ÚLTIMA POSICIÓN (OCUPADA POR UNA TIMINA SUBRAYADA), ES IDÉNTICA EN TODOS LOS PROMOTORES INVESTIGADOS. LAS 2 PRIMERAS POSICIONES TAMBIÉN ESTÁN MUY CONSERVADAS.

LA REGIÓN DE -35 ES TTGACA EN DONDE EL TRINUCLEÓTIDO --TTG ES ALTAMENTE CONSERVADO, SEGUIDO POR 3 BASES QUE SE HAN MANTENIDO UN POCO MENOS EN LA SECUENCIA DEL PROMOTOR.

TAMBIÉN SE OBSERVA PREFERENCIA EN EL NUCLEÓTIDO CON EL CUAL SE INICIA LA TRANSCRIPCIÓN YA QUE LA CADENA DE RNA COMIENZA PREDOMINANTEMENTE CON UNA PURINA, DONDE A ES MÁS FRECUENTE QUE G. EN ALGUNOS CASOS PUEDE INICIAR CON C. SIGUIENDO ESTA ESPECIFICIDAD, EL SITIO DE INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN ESTÁ LOCALIZADO DENTRO DE UNA SECUENCIA POCO CONSERVADA (CAT) A 6 O 9 PARES DE BASES HACIA ABAJO DE LA REGIÓN -10. FIGURA NÚM. 6.

EL NÚMERO DE NUCLEÓTIDOS QUE SEPARA LAS REGIONES DE --- -10 Y -35 ES IMPORTANTE PARA LA EFICIENTE FUNCIÓN DEL PROMOTOR. LA DISTANCIA ÓPTIMA ENTRE ESTAS SECUENCIAS CONSERVADAS ES DE --- 17 P.B.

SE SABE QUE DISTINTOS PROMOTORES TRABAJAN CON DIFERENTE EFICIENCIA. LA PRUEBA MÁS DIRECTA PARA SABER LA EFICIENCIA DE UN PROMOTOR, ES MEDIR LA FRECUENCIA CON LA CUAL LA SÍNTESIS DEL

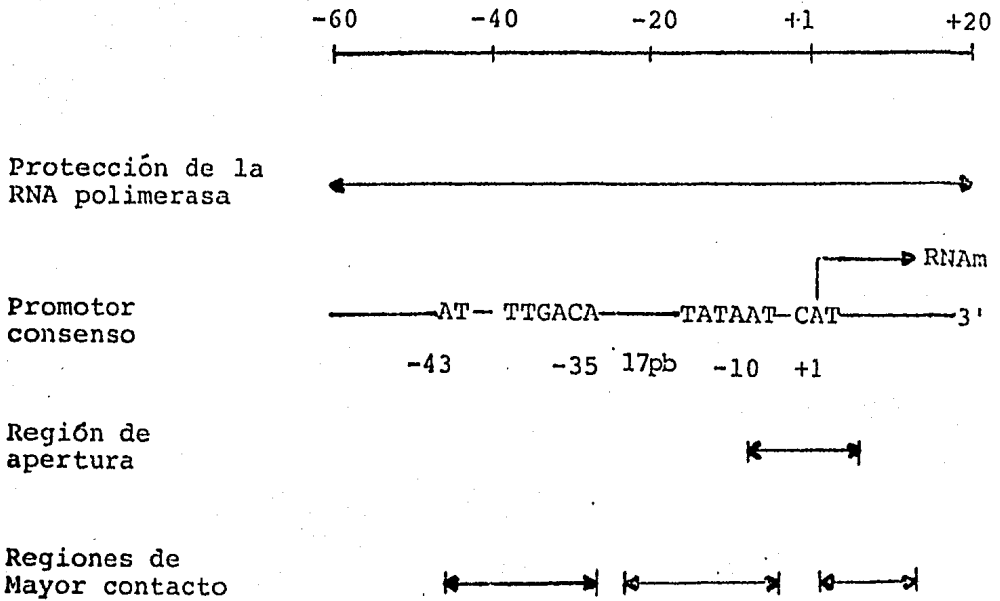


FIGURA 6. ESQUEMA DE LAS CARACTERÍSTICAS DE UN PROMOTOR DE E. COLI.

- A) EL NÚMERO DE PARES DE BASES QUE ES PROTEGIDO POR LA RNA POLIMERASA EN EXPERIMENTOS DE PROTECCIÓN CONTRA DIGESTIONES DE DNA ASA I.
- B) SECUENCIA DE UN PROMOTOR PROCARIOTE.
- C) REGIÓN EN LA CUAL OCURRE ISOMERIZACIÓN.
- D) REGIONES DE MAYOR CONTACTO EN EL COMPLEJO DNA POLI-MERASA PROMOTOR.

.../
 RNA M APROPIADO ES INICIADA. DEBIDO A QUE ESTE VALOR ES DIFÍCIL DE OBTENER EN ESTUDIOS in vivo, SE RECURRE A UNA PRUEBA INDIRECTA QUE CONSISTE EN MEDIR LA EFICIENCIA DE UN PROMOTOR COMO EL NIVEL AL CUAL SON EXPRESADAS PROTEÍNAS RELEVANTES; AUNQUE SABEMOS QUE EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA PUEDE DEBERSE, ADEMÁS DE LA EFICIENCIA DEL PROMOTOR, A LA COMPOSICIÓN Y LARGO DE SECUENCIAS NO TRADUCIDAS, ASÍ COMO OTROS FACTORES A NIVEL DE TRADUCCIÓN.

UN PROMOTOR FUERTE INICIA LA SÍNTESIS RNA M CON ALTA FRECUENCIA.

EXISTEN 3 PARÁMETROS QUE DEBEN ESTAR RELACIONADOS CON LA FUERZA DE UN PROMOTOR.

- A) LOCALIZACIÓN DEL PROMOTOR.
- B) VELOCIDAD DE FORMACIÓN DEL COMPLEJO CERRADO RNA - POLIMERASA-PROMOTOR Y POSTERIOR FORMACIÓN DEL COMPLEJO ABIERTO.
- C) VELOCIDAD CON LA CUAL EL COMPLEJO ABIERTO PUEDE INICIAR LA TRANSCRIPCIÓN.

EN VARIOS PROMOTORES LA VELOCIDAD DE INICIACIÓN DE LA SÍNTESIS DE RNA ES ALTAMENTE RÁPIDA COMPARADA CON LA VELOCIDAD

.../

DE FORMACIÓN DEL COMPLEJO CERRADO. POR OTRA LADO, LA ESTABILIDAD DEL COMPLEJO, COMO LA VELOCIDAD DE FORMACIÓN DE ÉSTE, VARIAN CONSIDERABLEMENTE ENTRE PROMOTORES Y PUEDEN CONTRIBUIR A LA FUERZA DE ESTOS (40),

POR FORMACIÓN DE COMPLEJO CERRADO ENTENDEREMOS UNA INTERACCIÓN ESPECÍFICA DE LA POLIMERASA CON EL PROMOTOR DE DOBLE CADENA (CUANDO LA POLIMERASA SE ANCLA AL PROMOTOR). ESTE COMPLEJO SIERVE COMO UN INTERMEDIARIO PARA LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO ABIERTO, QUE ES CUANDO LA RNA POLIMERASA SE ENCUENTRA A PUNTO DE INICIAR LA TRANSCRIPCIÓN EN UN ESTADO VIRTUALMENTE IRREVERSIBLE, EN EL QUE TIENE CONTACTOS ESPECÍFICOS CON EL PROMOTOR EN LAS REGIONES CONSENSO DE -10 Y -35 DE DOBLE CADENA Y CON DNA DE CADENA SENCILLA, QUE COMPRENDE EL DNA ABIERTO POR ELLA MISMA EN LA REGIÓN ENTRE -9 Y +3 (LA RNA POLIMERASA ACTÚA EN ESTE PUNTO COMO UNA PROTEÍNA DESESTABILIZANTE DE LA HÉLICE).

W. MCKLURE (41) HA CALCULADO LAS CONSTANTES DE EQUILIBRIO PARA LA FORMACIÓN DE CADA UNO DE LOS COMPLEJOS EN ALGUNOS PROMOTORES. HA DETERMINADO QUE PARA UNOS LA EFICIENCIA ESTÁ DADA POR LA CONSTANTE DE EQUILIBRIO DE FORMACIÓN DE COMPLEJO ABIERTO Y QUE, PARA OTROS, LA VELOCIDAD DE UNIÓN DE LA RNA POLIMERASA AL PROMOTOR ESTÁ MÁS RELACIONADA CON LA FUERZA DE ÉSTE.

PARA EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA ENZIMA Y EL DNA, SE AISLARON FRAGMENTOS DE DNA PROTEGIDOS POR LA RNA POLIME-

.../

RASA CONTRA LA DIGESTIÓN DE LA ENZIMA DNA ASA I. EL TAMAÑO DE ESTE DNA PROTEGIDO ES APROXIMADAMENTE DE 80 NUCLEÓTIDOS Y CUBRE LAS REGIONES DE -60 A +20 DEL PROMOTOR (SCHIMITZ Y GALAS).

INTERESANTEMENTE UNA DE LAS 2 CADENAS DE DNA ES PROTEGIDA CON MENOR EFICIENCIA QUE LA OTRA, INDICANDO UNA ORIENTACIÓN DE UNIÓN DE LA PROTEÍNA AL TEMPLADO.

EXPERIMENTOS DE PROTECCIÓN CON RNA POLIMERASA CONTRA -- REACTIVOS QUE MODIFICAN CIERTAS BASES EN EL DNA Y QUE POSTERIOR-- MENTE SENSIBILIZAN A LOS ENLACES FOSFODIESTER A LA HIDRÓLISIS -- (GILBERT ET. AL 42), HAN PODIDO SUGERIR QUE LA REGIÓN DE -10 ES IMPORTANTE PARA EL RECONOCIMIENTO DEL PROMOTOR POR LA RNA POLIME-- RASA Y QUE LAS REGIONES DE -35 Y -10 SON IMPORTANTES PARA LA ISO-- MERIZACIÓN.

DEBIDO A QUE LOS PROMOTORES SON UN PUNTO IMPORTANTE EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA, ES NECESARIO DETERMINAR LA RELACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE ESTOS. EN RELA--- CIÓN A ESTO, BASTANTES LOGROS SE HAN ALCANZADO CON EL USO DE MU-- TACIONES PRODUCIDAS CON MUTÁGENOS; SIN EMBARGO SE REQUIERE QUE -- ESTAS MUTACIONES PROPORCIONEN UN FENOTIPO QUE PERMITA DETECTAR -- LA MUTACIÓN, LO CUAL PUEDE SER ALTAMENTE COMPLICADO.

ES POR ESTO QUE SE HA UTILIZADO YA EN VARIAS OCASIONES LA MUTAGÉNESIS DIRIGIDA (43) PARA COMPRENDER UN POCO MÁS LA -- RELACIÓN ENTRE ESTRUCTURA Y FUNCIÓN.

II. ANTECEDENTES.

1. SÍNTESIS Y CLONACIÓN BIOLÓGICA DE UN PROMOTOR CONSENSO.

TRATANDO DE INDAGAR EL NIVEL MÁS FUNDAMENTAL DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA; EL RECONOCIMIENTO DE LA RNA POLIMERASA POR EL PROMOTOR; X. SOBERÓN EN COLABORACIÓN CON J. ROSSI Y K. ITAKURA (44), CONSTRUYERON POR MEDIO DE SÍNTESIS QUÍMICA UN SEGMENTO DE DNA QUE CONTIENE LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS PROMEDIO DE UN PROMOTOR DE E.COLI. DICHA SECUENCIA FUE BASADA EN EL CONOCIMIENTO DE 50 SECUENCIAS DE PROMOTORES REPORTADAS Y DADO QUE REGIONES DE ALTA HOMOLOGÍA HAN SIDO DETERMINADAS, SE CONSTRUYÓ UN PROMOTOR CONSENSO, COMO UN MODELO DE PROMOTOR. CABE SEÑALAR QUE UN PROMOTOR PROCARIOTE QUE CONTenga LA SECUENCIA CONSENSO NO HA SIDO ENCONTRADO EN LA NATURALEZA.

EL PROMOTOR CONSENSO FUE SINTETIZADO USANDO EL MÉTODO DEL FOSFOTRIESTER Y PRESENTA LAS SIGUIENTES CARACTERÍSTICAS: -- ES UN SEGMENTO DE 42 PARES DE BASES QUE CONTIENE EN LA REGIÓN DE -35 LA SECUENCIA CONSENSO (TTGACA), EN LA REGIÓN DE -10 LA SECUENCIA TATAATG; UN SITIO DE Eco RI INMEDIATAMENTE HACIA ARRIBA DE LA REGIÓN DE -35, UNA DISTANCIA PROMEDIO DE 17 PARES DE BASES ENTRE -10 Y -35 Y EXACTAMENTE EN MEDIO DEL PROMOTOR UN SITIO DE HPAI, QUE FACILITARÁ MANIPULACIONES TALES COMO DELECIÓN

DE NUCLEÓTIDOS O INTERCAMBIO DE REGIONES FUNCIONALES. HAY QUE MENCIONAR QUE EL PROMOTOR NO INCLUYE LA SECUENCIA CONSENSO ALREDEDOR DEL SITIO DE INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN.

EL PROMOTOR CONSENSO FUE INTRODUCIDO A LAS CELULAS BACTERIANAS CLONÁNDOLO EN PLÁSMIDOS. EN ESTAS MOLÉCULAS RECOMBINANTES EL PROMOTOR SE ENCUENTRA DIRIGIENDO LA TRANSCRIPCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS (TETRACICLINA O CLORANFENICOL) CON OBJETO DE SEGUIR Y CUANTIFICAR SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

EN EL TRABAJO REPORTADO POR X. SOBERÓN Y COLABORADORES (45), SE DEMOSTRÓ CONCLUYENTEMENTE QUE EL PROMOTOR CONSENSO ES FUNCIONAL in vivo, LO QUE FAVORECE SU USO COMO MODELO DE PROMOTOR PARA ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON LA RNA POLIMERASA.

2. SECUENCIA DEL GENE DE LA ACETILTRANSFERASA DE CLORANFENICOL.

EL ELEMENTO GENÉTICO "TRANSPONIBLE" Tn 9, CONSISTE DE DOS SECUENCIAS REPETIDAS DIRECTAS DE INSERCIÓN (IS1) QUE FLANQUEAN UNA REGIÓN DE 1102 P.B. LAS CUALES DETERMINAN LA RESISTENCIA A CLORANFENICOL.

LA RESISTENCIA A CLORANFENICOL DETERMINADA POR Tn 9 ES DEBIDA A LA SÍNTESIS DE LA ENZIMA ACETILTRANSFERASA DE CLORANFENICOL (CAT).

.../

.35

LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE CAT FUE OBTENIDA POR ALTON Y VAPNEK (46) POR EL MÉTODO DEL "DIDEOXI" DESARROLLADO POR -- SANGER.

LOS FRAGMENTOS DE DNA QUE CODIFICAN PARA EL PROMOTOR -- SINTÉTICO Y PARA EL GENE DE LA ACETILTRANSFERASA DE CLORANFENI COL SE CLONARON EN UN DERIVADO DEL PLÁSMIDO PBR322, DANDO ORI-- GEN AL PLÁSMIDO P Δ 36CM. LAS UNIONES RESULTANTES DE ESTAS MANI-- PULACIONES FUERON TAMBIÉN SECUENCIADOS POR SOBERÓN ET AL (47)-- Y SE MUESTRAN EN LA FIGURA NÚM. 7.

.../

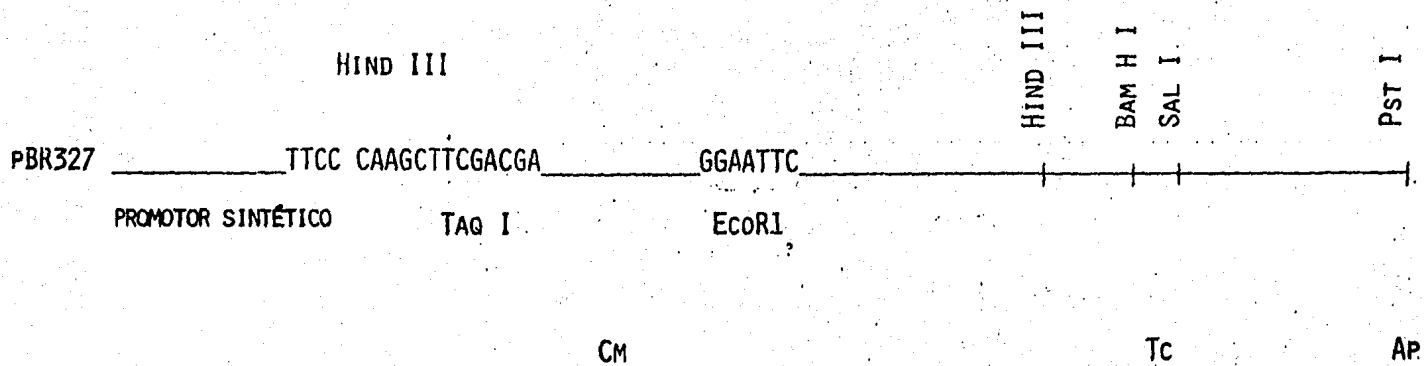


FIGURA NÚM. 7 DIAGRAMA GENERAL DE LA CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE DNA QUE CODIFICAN PARA EL - PROMOTOR SINTÉTICO Y PARA EL GENE DE LA ACETIL TRANSFERASA DE CLORANFENICOL.

III. OBJETIVOS.

1. MONTAR LA TÉCNICA MUTAGÉNESIS SITIO ESPECÍFICA DIRIGIDA POR OLIGONUCLEÓTIDOS EN EL FAGO M13.

COMO YA SE MENCIONÓ, CON ESTA TÉCNICA SE PUEDE CONECTAR GENES A NUEVOS PROMOTORES, POR MEDIO DE LA INTRODUCCIÓN DE DELECCIONES ESPECÍFICAS; SE PUEDEN OBTENER GENES HÍBRIDOS; CREAR SITIOS DE RESTRICCIÓN ETC. POR LO QUE ES DE GRAN UTILIDAD PARA UN LABORATORIO DE INGENIERÍA GENÉTICA MANEJAR ESTA TÉCNICA EN FORMA RUTINARIA PARA DIRIGIR MUTACIONES ESPECÍFICAS DESEADAS.

ESTA TÉCNICA ES CONTEMPLADA, COMO UNA APLICACIÓN DE LA SÍNTESIS DE POLINUCLEÓTIDOS Y DENTRO DE LOS PROYECTOS DE TRABAJO DEL LABORATORIO DE SÍNTESIS QUÍMICA DE OLIGONUCLEÓTIDOS DEL CEINGEB.

2. PRODUCIR UNA DELECCIÓN (ELIMINACIÓN DE 2 BASES) EN LA DISTANCIA ENTRE -10 Y -35 DEL PROMOTOR CONSENSO.

SE SABE QUE EN CASI TODOS LOS PROMOTORES FUERTES LA DISTANCIA ENTRE LA REGIÓN DE -35 Y -10, ES DE 17 P.B. Y QUE SI SE AUMENTA O SE ACORTA ESTA, DISMINUYE LA FUERZA DEL PROMOTOR. SIN EMBARGO, FALTA ESCLARECER LA VERDADERA IMPORTANCIA DE ESTA DISTANCIA EN EL FUNCIONAMIENTO DE UN PROMOTOR.

EN EL PROMOTOR CONSENSO ES POSIBLE PRODUCIR INSERCIONES O ELIMINACIONES DE BASES ESPECÍFICAS EN LA REGIÓN ENTRE -10 Y -35 Y RECOMBINAR LAS MUTACIONES OBTENIDAS POR MEDIO DEL SITIO DE HPA I, QUE ESTÁ LOCALIZADO A LA MITAD DEL PROMOTOR, DE AHÍ QUE ÉSTE RESULTE UN MODELO IDEAL PARA COMPRENDER LA RELACIÓN ENTRE LA SECUENCIA INTERMEDIA DE -10 A -35 Y EL FUNCIONAMIENTO DEL PROMOTOR.

DEBIDO A QUE EL PRINCIPAL OBJETIVO DE ESTA TESIS ES MONTAR LA MUTAGÉNESIS SITIO ESPECÍFICA, SE EMPLEARÁ ESTA TÉCNICA PARA PRODUCIR UNA DELECCIÓN DE 2 P.B. EN EL LADO DERECHO DEL SITIO DE HPA I DEL PROMOTOR CONSENSO, LA CUAL ES 1 MUTACIÓN IMPORTANTE PUES SE PUEDE RECOMBINAR POSTERIORMENTE CON UNA DOBLE INSERCIÓN EN EL LADO IZQUIERDO DEL SITIO DE HPA I. FIGURA NÚM. 8.

3. CREAR UN SITIO DE RESTRICCIÓN INMEDIATAMENTE ANTES DEL CODÓN DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN DEL GEN DE LA ACETILTRANSFERASA DE CLORANFENICOL.

SE DECIDIÓ CREAR UN SITIO PARA LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN XBA I ANTES DEL CODÓN QUE CODIFICA PARA EL 1er AMINOÁCIDO DE LA ACETILTRANSFERASA DE CLORANFENICOL, CON EL FIN DE TENER ESTA ENZIMA EN FORMA DE UN "CASSET O MÓDULO TRADUCCIONAL"; ES DECIR, EN FORMA DE UN FRAGMENTO DE DNA QUE PUEDA SER CORTADO CON 2 ENZIMAS DE RESTRICCIÓN PARA POSTERIORMENTE SER COLOCADO

IV. MATERIAL Y METODOS.

1. REACTIVOS.

LOS REACTIVOS FUERON OBTENIDOS EN LAS SIGUIENTES CASAS COMERCIALES:

- J. T. BAKER, USA: AZUL DE BROMOFENOL, XILENCIANOL.
- BIO-RAD LABORATORIES, USA: AGAROSA, β -MERCAPTOETANOL, PERSULFATO DE AMONIO, POLIACRILAMIDA, BIS, RESINA A-50, RESINA DOWER 50X-X8, SODIO-DODECIL-SULFATO (SDS), -- TRITÓN X-100, TEMED (N,N,N',N'-TETRAMETILETILENDIAMINA).
- BIOXÓN DE MÉXICO: AGAR BACTERIOLÓGICO, PEPTONA DE CASEÍNA PURIFICADA (TRIPTONA),
- CALBIOCHEMI LABORATORIES, USA: YODURO DE PROPIDIO.
- MERCK DE MÉXICO: EXTRACTO DE LEVADURA, TRIS (HIDROXIMETIL-AMINOMETANO), UREA.
- PL BIOCHEMICAL USA: ddNTP (DIDEOXIRIBONUCLEÓSIDOS -- TRIFOSFATO).
- NEW ENGLAND NUCLAR, USA: [P ³²] ATP.
- SIGMA DE MÉXICO: ACEITE MINERAL, ALBÚMINA, BROMURO DE ETIDIO, CLORURO DE CESIO, NUCLEÓSIDOS TRIFOSFATO, X-GAL (5-BROMO, 4-CLORO, 3-INDOLIL β -D-GALACTÓSIDO).
- J. T. BAKER DE MÉXICO: TODOS LOS DEMÁS.

- DI Y. TRINUCLEÓTIDOS FUERON PROPORCIONADOS POR EL LABORATORIO DE SÍNTESIS QUÍMICA DE DNA DEL C.E.I.N.G.E.B., UNAM (47).

2. CEPA Y FAGO.

E. COLI K12-JM101.

Δ LAC-PRO-SUP E, THI [F' TRA D36, PRO AB, LAC I^Q]. CONTIENE UNA DELECIÓN DE LA REGIÓN LAC-PRO DEL CROMOSOMA. EL EPISOMA LLEVA EL OPERÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE PROLI NA, EL OPERÓN LAC CON LAS SIGUIENTES MUTACIONES: UNA MUTACIÓN EN EL PROMOTOR DEL GEN LAC I, QUE SOBREPONDE REPRESOR; UNA DELECIÓN EN EL GEN ESTRUCTURAL DE LA β -GALACTOSIDASA QUE RESULTA EN LA PRODUCCIÓN DE UN SEGMENTO CARBOXIL TERMINAL DE LA ENZIMA INACTIVA. (48).

FAGO M3MP7.

EL FAGO LLEVA UNA PEQUEÑA PARTE DEL OPERÓN DE LAC. ESTA PARTE INCLUYE UNA REGIÓN REGULADORA Y TAMBIÉN LA INFORMACIÓN PARA LOS PRIMEROS 146 RESIDUOS DE AMINOÁCIDOS DEL GEN ESTRUCTURAL DE LA

β -GALACTOSIDASA, QUE ES EL SEGMENTO COMPLEMENTARIO A LA DELECCIÓN DE LA REGIÓN DE LA β -GALACTOSIDASA DEL EPISOMA CONTENIDO EN LA CEPA JM101. (49).

LOS PRODUCTOS POLIPEPTIDICOS, DE LA REGIÓN LAC DEL EPISOMA DE LA JM101 Y DEL FAGO, FORMAN UNA PROTEÍNA QUE PRESENTA ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA, CUANDO UNA CÉLULA ES INFECTADA. EL FENOTIPO LAC ES IDENTIFICADO POR PLACAS AZULES EN UN MEDIO QUE CONTENGAXGAL E IPTG. (INDUCTOR GRATUITO DEL OPERÓN LAC).

3. MEDIOS DE CULTIVO.

MEDIO YT LIQUIDO.

- 8G TRIPTONA.
- 5G EXTRACTO DE LEVADURA
- 5G NACL
- 1 LITRO DE H₂O

β -GALACTOSIDASA, QUE ES EL SEGMENTO COMPLEMENTARIO A LA DELECCIÓN DE LA REGIÓN DE LA β -GALACTOSIDASA DEL EPISOMA CONTENIDO EN LA CEPA JM101. (49).

LOS PRODUCTOS POLIPEPTIDICOS, DE LA REGIÓN LAC DEL EPISOMA DE LA JM101 Y DEL FAGO, FORMAN UNA PROTEÍNA QUE PRESENTA ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA, CUANDO UNA CÉLULA ES INFECTADA. EL FENOTIPO LAC ES IDENTIFICADO POR PLACAS AZULES EN UN MEDIO QUE CONTENGAXGAL E IPTG. (INDUCTOR GRATUITO DEL OPERÓN LAC).

3. MEDIOS DE CULTIVO.

MEDIO YI LÍQUIDO.

- 8G TRIPTONA.
- 5G EXTRACTO DE LEVADURA
- 5G NaCl
- 1 LITRO DE H₂O

MEDIO YT AGAR SUAVE.

- 8G TRIPTONA
- 5G EXTRACTO DE LEVADURA
- 5G NaCl
- 6G AGAR
- 1 LITRO DE H₂O

CAJAS DE PETRI.

AGREGAR 15 G DE AGAR POR LITRO DE CULTIVO.

4. ENZIMAS.

4.1 ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.

ESTAS ENZIMAS FUERON ADQUIRIDAS A BETHESDA ---
RESEARCH LABORATORIES, O PREPARADAS EN EL LABORATORIO SEGÚN EL -
MÉTODO DE GREEN ET AL (42). LAS CONDICIONES DE REACCIÓN PA-
RA CADA UNA DE LAS ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN SE DESCRIBEN A -
CONTINUACIÓN:

- EcoRI 0.1 M TRIS PH 7.5
- 5.0 MM MgCl₂
- 0.1 M NaCl
- 0.0002% NP₄₀

- PAEIII 6 mM $MgCl_2$
 6 mM TRIS PH 7.5
 6 mM -MERCAPTOETANOL

- PINDIII 6.6 mM TRIS PH 7.5
 6.6 mM $MgCl_2$

LAS INCUBACIONES SE LLEVAN A CABO A 37°C DURANTE 60 MINUTOS.

4.2 POLIMERASA I DE DNA (FRAGMENTO KLENOW).

SE OBTUVO DE BOEHRINGER MANNHEIM Y SUS CONDICIONES DE REACCIÓN ESTÁN DADAS POR LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DEL MÉTODO DE SANGER ET AL (51). ESTAS CONDICIONES SON:

- 6.6 mM TRIS PH 7.5
- 6.6 mM NaCl
- 6.6 mM $MgOAc_2$
- 6.6 mM DTT
- 20°C

4.3 LIGASA DE T4.

ESTA ENZIMA SE PURIFICÓ EN EL LABORATORIO, A PARTIR DE CÉLULAS INFECTADAS CON EL BACTERIOFAGI T4. SUS CONDICIONES:

- 20 mM TRIS PH 7.6
- 10 mM DITIOREITOL (DTT)
- 10 mM $MgCl_2$
- 5 mM ATP EN 0.1 TRIS PH 7.4
- 12°C

4.4 CINASA DE POLINUCLEÓTIDOS.

ESTA ENZIMA SE ADQUIRIÓ DE NEW ENGLAND NUCLEAR USA. SUS CONDICIONES SON:

- 50 mM TRIS-HCl PH 7.6
- 10 mM $MgCl_2$
- 5 mM DITHIOREITOL (DTT)
- 0.1 mM ESPERMIDINA
- 0.1 mM EDTA
- 37°C

.../

4.5 NUCLEASA SI.

- 30 mM ACETATO DE SODIO PH 4.6
- 50 mM NaCl
- 1 mM: $ZnSO_4$
- 5% GLICEROL

LA INCUBACIÓN SE LLEVA A CABO A 18°C DURANTE DIFERENTES TIEMPOS.

4.6 NUCLEASA, MUNG BEAN.

ESTA NUCLEASA SE ADQUIRIÓ DE P.L.BIOCHEMICAL, INC. Y SUS CONDICIONES SON:

- 30 mM ACETATO DE SODIO PH 4.6
- 50 mM NaCl
- 1 mM: $ZnCl_2$
- 5% GLICEROL

LA INCUBACIÓN SE LLEVA A CABO A TEMPERATURA AMBIENTE.

4.7 RNasa A

ESTA ENZIMA SE OBTUVO DE SIGMA DE MÉXICO. SUS CONDICIONES DE REACCIÓN SON, A 20°C:

- 10 MG/ML DE ENZIMA EN POLVO EN 0.1 M ACETATO DE SODIO.
 - 3.3×10^{-5} M EDTA PH 5
- CALENTAR A 85°C POR 10 MINUTOS.

4.8 LISOZIMA.

SE OBTUVO DE SIGMA DE MÉXICO. LAS CONDICIONES DE REACCIÓN SON:

5 MG/ML EN 25 mM TRIS PH 8, SE INCUBA A 20°C.

5. SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA.

5.1 DESTRITILACIÓN.

- 1) LAVAR LA NUCLEORESINA PREPARADA DE ANTEMANO CON CLOROFORMO-METANOL 7:3 (DEJARLA HINCHAR POR MEDIA HORA CON PIRIDINA).
- 2) LAVAR NUEVAMENTE Y AGREGAR ÁCIDO BENZENSULFÓNICO (ABS) AL 2% DISUELTO EN CLOROFORMO-METANOL 7:3 V/V A 0°C.
- 3) LAVAR CON CLOROFORMO-METANOL 7:3 A 0°C.

- 4) REPETIR LOS PASOS 2 Y 3 HASTA QUE NO APAREZCA COLORACIÓN (GUARDAR LOS LAVADOS).
- 5) AGREGAR PIRIDINA Y CUANTIFICAR LA REACCIÓN CON LOS LAVADOS.
- 6) TOMAR DE 5 A 10 EQUIVALENTES DEL BLOQUE -- ADECUADO QUE SE ADICIONARÁ, COLOCARLO EN UN TUBO DE CENTRÍFUGA Y DESCIANOETILARLO -- COMO SIGUE:
- A) AGREGAR 1,5 ml DE PIRINA.
 - B) AGREGAR 0,5 ml DE AGUA.
 - C) AGREGAR 0,5 ml DE TRIETILAMINA.
 - D) DEJAR LA REACCIÓN A TEMPERATURA AMBIENTE DE 15 A 20 MINUTOS.
 - E) EVAPORAR LA MEZCLA DE DISOLVENTES A SEQUEDAD.

5.2 ACOPLAMIENTO.

- 1) LAVAR CON PIRIDINA 2-3 VECES Y 2 VECES CON-- TETRAHIDROFURANO (THF).
- 2) SECAR LA RESINA AL VACÍO 10-15 MINUTOS.
- 3) SECAR TRES VECES POR COEVAPORACIÓN CON PIRIDINA EL BLOQUE DESCIANOETILADO QUE SE ADICIONARÁ.

- 4) AGREGAR AL TUBO DE CENTRÍFUGA, 2 EQUIVALENTES DE NITROTRIAZÓLIDO DE MESITILENSULFONÍLO (CON RESPECTO AL BLOQUE) Y 1 ML DE PIRIDINA .
- 5) TRANSFERIR LA MEZCLA A LA RESINA.
- 6) TAPAR HERMÉTICAMENTE Y DEJAR LA REACCIÓN DOS HORAS A TEMPERATURA AMBIENTE Y CON AGITACIÓN CONTROLADA.
- 7) TRANSCURRIDO EL TIEMPO, LAVAR CON PIRIDINA DOS VECES.

5.3 ENMASCARAMIENTO.

- 1) AGREGAR 2-3 ML DE UNA SOLUCIÓN DE THF-PIRIDINA-- ANHÍDRIDO ACÉTICO (7:2:1) Y UN POCO DE DIMETILAMINOPIRIDINA, DEJAR POR 15-30 MINUTOS.
- 2) LAVAR CON PIRIDINA.
- 3) INICIAR NUEVAMENTE CON LA REACCIÓN DE DESTILACIÓN.

5.4 DESBLOQUEO DEL OLIGONUCLEÓTIPO Y LIBERACIÓN DEL SOPORTE SÓLIDO.

- 1) ADICIONAR A UN TUBO DE CENTRÍFUGA APROXIMADAMENTE 50 MG DE RESINA QUE CONTIENE EL OLIGONUCLEÓTIPO

RO SINTETIZADO, Y PONER 60 μ l (O LA CANTIDAD - SUFICIENTE PARA CUBRIR LA RESINA) DE UNA SOLU--- CIÓN DE N¹N¹N²N² -TETRAMETILGUANIDINA-P-NITROBEN CENALDOXIMATO EN DIOXANO-AGUA (1:1 V/V) A TEMPE- RATURA AMBIENTE Y DEJAR POR 12-16 HORAS.

- 2) TRANSCURRIDO EL TIEMPO, ADICIONAR 2-3 ml DE HI-- DRÓXIDO DE AMONIO CONCENTRADO Y 0.5 ml DE PIRIDI NA Y COLOCAR A 50°C POR 5 HORAS CON AGITACIÓN.
- 3) FILTRAR A TRAVÉS DE LANA DE VIDRIO EN UNA PIPETA PASTEUR Y LAVAR EL FILTRO CON PIRIDINA-AGUA 1:1.
- 4) EVAPORAR A SEQUEDAD.
- 5) DISOLVER EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE BICARBONA TO DE TRIETILAMONIO (TEAB) 20 mM. PH=8.

5.5 PURIFICACIÓN DE UN OLIGONUCLEÓTIDO.

UNA VEZ QUE EL OLIGONUCLEÓTIDO HA SIDO DESBLOQUEADO, SE PROCEDE COMO SE INDICA A CONTINUACIÓN:

- 1) EVAPORAR LA SOLUCIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDO EN TEAB A SEQUEDAD.
- 2) DISOLVER NUEVAMENTE EN TEAB Y HACER TRES EXTRAC CIONES CON ÉTER ETÍLICO ANHÍDRO.

- 3) EVAPORAR A UN VOLUMEN NO MAYOR A 0.5 ml Y APLICAR EN UNA COLUMNA DE SEPHADEX G-50 (FINO) DE 2.5 X 50 CM; COLECTAR FRACCIONES DE 5 ml.
- 4) LEER LAS FRACCIONES COLECTADAS EN EL UV (260 nm), EL OLIGONUCLEÓTIDO ES EL PRIMER COMPUESTO EN SALIR, JUNTAR LAS FRACCIONES APROPIADAS Y EVAPORAR LAS A UN VOLUMEN PEQUEÑO (0.5ml).
- 5) PURIFICAR EL OLIGONUCLEÓTIDO EN EL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS DE ALTA PRESIÓN, USANDO UNA COLUMNA-FASE INVERSA μ -BONDAPAK (WATERS) Y BAJO LAS SIGUIENTES CONDICIONES:
- A) TEMPERATURA = 70°C.
- B) VELOCIDAD DE FLUJO = 4 ml/MIN.
- C) FASE MÓVIL:

TIEMPO MIN.	%A	%C
0.0	95.0	5.0
10.0	75.0	25.0
12.5	75.0	25.0
15.0	95.0	5.0

- A- SOLUCIÓN ACUOSA DE TEAB 20 mM.
- C- ACETONITRILLO.

- 6) COLECTAR EL PICO ADECUADO Y DESTRITILAR COMO SIGUE:
- A) EVAPORAR A SEQUEDAD.
 - B) AGREGAR 0.2 ml DE AGUA Y 0.8 ml DE ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL GRADO HPLC.
 - C) DEJAR POR 15 MINUTOS.
 - D) EVAPORAR A SEQUEDAD.
 - E) RESUSPENDER EN SOLUCIÓN REGULADORA DE TEAB - 20 mM.
 - F) EXTRAER DOS VECES CON ÉTER.
 - G) CONCENTRAR HASTA 0.1 ml.
 - H) INYECTAR NUEVAMENTE EN EL CROMATÓGRAFO DE LLÍQUIDOS Y PURIFICAR BAJO LAS SIGUIENTES CONDICIONES:

I) TEMPERATURA = 70°C.

II) VELOCIDAD DE FLUJO = 4 ml/min.

III) FASE MÓVIL:

TIEMPO MIN.	%A	%C
0.0	100.0	0.0
8.0	80.0	20.0
10.0	80.0	20.0
12.0	100.0	0.0

A = SOLUCIÓN ACUOSA DE TEAB 20 mM.

C = ACETONITRILO.

7) SE COLECTA EL PICO MAYOR, ESTE SE CONCENTRA Y - SE PUEDE UTILIZAR EN EXPERIMENTOS DE BIOLOGÍA - MOLECULAR.

6. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA O POLIA-- CRILAMIDA.

LA ELECTROFORESIS SE LLEVÓ A CABO EN PLACAS, CONFORME A LAS CONDICIONES DESCRITAS POR BOLÍVAR ET AL. (52).

- 1) AGAROSA EN POLVO (BIO-RAD) AL 1% SE DISUELVE POR- EBULLICIÓN DURANTE 1-2 MIN. EN SOLUCIÓN TRIS-BORA TOS-EDTA (TRIS-BASE 90 mM; EDTA 2.5 mM; H₃BO₃ - 90 mM PH 8.2).
- 2) SE VACÍAN LOS GELES Y SE DEJAN SOLIDIFICAR.
- 3) LAS MUESTRAS, EN UN VOLUMEN FINAL DE 15-30 µl POR CARRRIL (0.3-1 µg DE DNA POR CARRIL) SE DISUELVEN EN 6 µl DE MEZCLA DE PARADO SM (PARA 10 ml; 6 g - DE UREA; 1 ml DE 0.5% AZUL DE BROMOFENOL EN AGUA; 1 ml 0.5% X XILENCIANOL EN AGUA) Y SE COLOCAN EN- LOS CARRILES.

- 4) LA ELECTROFORESIS SE LLEVA A CABO A UN VOLTAJE -
CONSTANTE DE 150 V A TEMPERATURA AMBIENTE POR --
60 MIN. UTILIZANDO AMORTIGUADOR TRISBORATOS-EDTA.

LOS GELES DE POLIACRILAMIDA PARA DNA (FRAGMENTOS DE-
DNA DE PESO MOLECULAR MENOR DE 1 μ D) SE PREPARAN DE LA SIGUIENTE-
FORMA:

- 1) SE MEZCLAN 6 ml DE TRIS-BORATOS-EDTA 5X, 7.5 ml
DE SOLUCIÓN DE ACRILAMIDA BISACRILAMIDA (29.2%-
Y 0.8% RESPECTIVAMENTE).
16.4 ml DE AGUA Y 0.5 ml DE PERSULFATO DE SODIO AL
10% EN AGUA.
- 2) SE DESGASIFICA LA MEZCLA Y SE LE ADICIONAN 15 --
ml TEMED Y SE VACÍA RÁPIDAMENTE EN LAS PLACAS.
- 3) LA ELECTROFORESIS SE LLEVA A CABO A 150 V POR -
60 MINUTOS.
DESPUÉS DE TERMINADA LA ELECTROFORESIS, LOS GELES
SE SUMERGEN EN UNA SOLUCIÓN DE BROMURO DE ETIDIO
(4 mg/ml) Y AL SOMETERLOS A LUZ ULTRAVIOLETA SE-
OBSERVAN LAS BANDAS.

PARA FOTOGRAFIAR LOS GELES SE UTILIZA UN FILTRO DE -
GELATINA AMARILLO No. 9 KODAK-WRATTEN Y PELÍCULA POLAROID NPTIPO-
SS CON UNA CÁMARA MP-5 POLAROID.

7. ELECTROELUSIÓN DE GELES DE AGAROSA PARA PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA.
- 1) EL DNA DIGERIDO CON LA ENDONUCLEASA CORRESPONDIENTE, SE SOMETE A ELECTROFORESIS EN UN GEL DE AGAROSA (0.8%). UNA VEZ IDENTIFICADA LA BANDA DE DNA QUE SE DESEA AISLAR, EL GEL SE CORTA CON UN BISTURÍ Y SE COLOCA EN UNA CÁMARA DE ELECTROELUSIÓN (EN FRAGMENTOS DE 0.5 X 0.5 CM APROXIMADAMENTE) Y SE CUBREN CON AMORTIGUADOR TĒ.
 - 2) SE ESTABLECE UN PUENTE DE CORRIENTE ELÉCTRICA ENTRE 2 CÁMARA UTILIZANDO AMORTIGUADOR TĒA:
 - 193.6 g TRIS-BASE
 - 65.6 g ACETATO DE SODIO ANHIDRO
 - 29.6 g Na₂ EDTASE AJUSTA AL PH A 3.1 CON ÁCIDO ACÉTICO Y SE LLEVA A UN VOLUMEN FINAL DE 4 LITROS. PARA USAR ESTA SOLUCIÓN SE DILUYE 1:1.
 - 3) SE MANTINE EN 50 V CONSTANTES POR 3 HORAS A 4°C.

EL DNA ELECTROELUIDO SE RECUPERA DIRECTAMENTE DE LA CÁMARA, SOLUBLE EN EL AMORTIGUADOR TĒ.

.../

.55

CON EL FIN DE ASEGURARSE QUE TODO EL DNA HA SIDO ELECTROELUÍDO, UN FRAGMENTO DEL GEL COLOCADO EN LA CÁMARA PUEDE TEÑIRSE EN UNA SOLUCIÓN DE BROMURO DE ETIDIO (0.5 $\mu\text{G}/\text{ML}$), SE SOMETE A LUZ ULTRAVIOLETA Y SI NO SE OBSERVA FLOURESCENCIA QUIERE DECIR QUE TODO EL DNA HA SIDO ELECTROELUÍDO. SI SE OBSERVA FLOURESCENCIA, SE DEJA QUE LA ELECTROELUSIÓN CONTINÚE HASTA QUE LA FLOURESCENCIA DESAPAREZCA.

EL DNA OBTENIDO SE PRECIPITA CON 1/20 VOLUMEN DE 5 M KACl Y 2.2 VOLÚMENES DE ETANOL A -20°C .

ESTE DNA SE MANTIENE A -20°C AL MENOS POR 2 HORAS. POSTERIORMENTE SE CENTRIFUGA Y EL PRECIPITADO SE SECA PARA ELIMINAR EL ETANOL (CON UNA CORRIENTE LEVE DE AIRE). EL PRECIPITADO SE DISUELVE EN AGUA O EN AMORTIGUADOR TE.

8. TRANSFECCIÓN.

DE 1/NG DE FORMA REPLICATIVA CIRCULAR, CASI 1 000 TRANSFORMANTES PUEDEN SER OBTENIDAS. UN DNA EN FORMA REPLICATIVA DIGERIDO Y VUELTO A LIGAR, DA UNA EFICIENCIA DE TRANSFORMACIÓN DEL 50%. EL MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN ES EL SIGUIENTE:

- 1) LAS CÉLULAS SON CRECIDAS HASTA 0.6 DE DENSIDAD ÓPTICA A 660 NM.

.../

- 2) LAS CÉLULAS SE CENTRIFUGAN (30 ML. A 7 000 RPM. DURANTE 5 MINUTOS).
- 3) SE RESUSPENDEN EN 15 ML. DE CaCl_2 50 MM Y ALMACENADAS EN HIELO DURANTE 20 MINUTOS.
- 4) SE CENTRIFUGAN A 7 000 RPM. DURANTE 5 MINUTOS Y SE RESUSPENDEN EN 3 ML. DE CaCl_2 50 MM.
- 5) SE TOMAN 0.3 ML DE LAS CÉLULAS COMPETENTES Y SE --- AGREGAN APROXIMADAMENTE 2 NG DEL VEHÍCULO, SE INCUBAN EN HIELO 40 MINUTOS.
- 6) SE DA UN CHOQUE TÉRMICO DE 42°C DURANTE 2 MINUTOS - Y SE ADICIONAN DIRECTAMENTE 0.01 ML. DE IPTG 100 MM, 50 μL DE XGAL (2%), 0.2 ML. DE CÉLULAS EN FASE --- EXPONENCIAL Y 3 ML. DE AGAR DE SUPERFICIE.
- 7) SE VACÍA ESTO DIRECTAMENTE SOBRE CAJAS DE MEDIO YT SÓLIDO, SE DEJA QUE EL AGAR SE SOLIDIFIQUE TOTALMENTE Y SE INCUBA A 37°C DURANTE 12 HORAS.

9. SECUENCIA DE DNA Y PREPARACIÓN DE DNA DE CADENA SENCILLA.

LA CLONACIÓN EN EL M13, PROVEE TEMPLADO DE DNA DE CADENA SENCILLA PARA SÍNTESIS IN VITRO. ESTO PERMITE LA PRODUCCIÓN DE UN DNA DE CADENA SENCILLA, PARA DETERMINAR LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA, USANDO EL SISTEMA DE DIDEOXINUCLEÓTIDOS COMO TERMINADORES DE POLIMERIZACIÓN.

9.1 PREPARACIÓN DE DNA TEMPLADO DE CADENA SENCILLA.

LAS PLACAS RECOMBINANTES OBTENIDAS EN LA TRANSFORMACIÓN, SE TOMAN CADA UNA DE ELLAS CON UN PALILLO ESTÉRIL Y SE PONEN A CRECER EN MEDIO LÍQUIDO YT 2X. LAS CÉLULAS CON LOS FAGOS SON INCUBADAS A 37°C. EN AGITACIÓN FUERTE DURANTE 7 HORAS. DESPUÉS DE ESTE TIEMPO, SON TRANSFERIDAS A TUBOS EPPENDORF Y LAS CÉLULAS SON BAJADAS CON UNA MICROFUGA. EL SOBRENADANTE ES RECUPERADO Y SE SUMAN 250 μ L DE UNA SOLUCIÓN DE PEG AL 40% EN NACL 5 M.

SE MEZCLA POR INVERSIÓN EL TUBO Y SE DEJA PRECIPITANDO EL FAGO A TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE 15 MINUTOS, SE CENTRIFUGA 5 MINUTOS Y EL SOBRENADANTE ES DESECHADO. EL PRECIPITADO ES RESUSPENDIDO EN 200 μ L DE AMORTIGUADOR TE Y SON SUMADOS 200 μ L DE FENOL SATURADO, SE AGITA FUERTEMENTE DURANTE 10 SEGUNDOS, SE REMUEVE EL FENOL Y SUMAN 200 μ L DE UNA MEZCLA DE FENOL/CLOROFORMO (1:1). SE AGITA VIGOROSAMENTE 10 MINUTOS Y SE REMUEVE LA FASE ACUOSA. SE SUMAN 20 μ L DE ACETATO DE SODIO 3M PH 5 Y 0.5 ML DE ETANOL, SE PONE A PRECIPITAR EL DNA A -20°C DURANTE 20 MINUTOS Y SE CENTRIFUGA 5 MINUTOS. EL PRECIPITADO ES RESUSPENDIDO EN 10 μ L DE AMORTIGUADOR TE. LA PRODUCCIÓN VA DE 2 A 10 μ G DE DNA DE CADENA SENCILLA.

9.2 SECUENCIA DE DNA POR EL MÉTODO DE TERMINADORES.

LA REACCIÓN DE TERMINACIÓN DE CADENA ES UTILIZADA COMO LA DESCRIBE SANGER CON LAS MODIFICACIONES SIGUIENTES: MEZCLAR

EL TEMPLADO (2 μ L) CON 10 NG DE PRIMERO Y 1.5 μ L DE AMORTIGUADOR HIN (HIN 10X: 60 M^l DE TRIS-HCL PH 7.5, 60 MM DE MgCL₂, 10 M^l DE DTT Y 500 M^l DE NaCL) Y LLEVAR A UN VOLUMEN FINAL DE 10 μ L. SE INCUBA A 55°C DURANTE 3 MINUTOS Y SE DEJA APAREANDO A TEMPERATURA AMBIENTE. SE SUMAN 15 μ CI (550 CI/MMOL) DE DATP [α -P³²] POR TEMPLADO. TRES SOLUCIONES DE NUCLEÓTIDOS TIENEN QUE SER PREPARADAS: MEZCLAS DE DESOXINUCLEÓSIDOS TRIFOSFATOS, SOLUCIÓN DE DIDESOXINUCLEÓSIDOS TRIFOSFATOS Y SOLUCIÓN CAZA. LAS MEZCLAS O DE DESOXINUCLEÓTIDOS TRIFOSFATO MARCADOS COMO G°, A°, T° Y C° SON PREPARADAS DE LA SIGUIENTE FORMA:

	G°	A°	T°	C°
0.5 MM DGTP	1 μ L	7.5 μ L	10 μ L	10 μ L
0.5 MM DTTP	10 μ L	7.5 μ L	1 μ L	10 μ L
0.5 MM DCTP	10 μ L	7.5 μ L	10 μ L	1 μ L
AMORTIGUADOR HIN				
10 X	7.5 μ L	7.5 μ L	7.5 μ L	7.5 μ L

LAS SOLUCIONES DE 0.5 MM DE LOS DNTP'S SON PREPARADAS A PARTIR DE LOTES DE 10 MM DE CADA UNO. LAS SOLUCIONES LOTE DE DDNTP'S SON LAS SIGUIENTES: 1 MM DDGTP, 0.25 MM DDATP, 2 MM DDTP Y 1 MM DDCTP; CADA UNO ES PREPARADO A PARTIR DE

STOCKS 10 mM. LA SOLUCIÓN PARA COMPLETAR LA REACCIÓN ES 0.5 mM - DATP.

LAS REACCIONES SON EFECTUADAS EN TUBOS DE POLIPROPILENO SILICONIZADOS. EL COMPLEJO CEBADOR-TEMPLADO ES PUESTO EN HIELO Y MEZCLADO CON LA MARCA. DE ESTE SE AGREGAN 2 μ L PARA CADA TUBO DE LA REACCIÓN EL CUAL CONTIENE 1 μ L DE LA SOLUCIÓN 0 CORRESPONDIENTE, 1 μ L DEL ddNTP CORRESPONDIENTE, 0.4 μ L DE AMORTIGUADOR HIN 10X 1.5 μ L DE AGUA Y 1 μ L DE POLIMERASA DE DNA (FRAGMENTO KLENOW); APROXIMADAMENTE SE PONEN 0.1 UNIDADES DE ENZIMA POR REACCIÓN. LA REACCIÓN ES INCUBADA 15 MINUTOS Y AL FINAL DE ESTE TIEMPO SE ADICIONAN 2 μ L DE LA SOLUCIÓN 0.5 mM DATP. SE INCUBA 10 MINUTOS Y LA REACCIÓN ES TERMINADA, POR LA SUMA DE 4 μ L DE UNA SOLUCIÓN QUE CONTIENE XILEN CIANOL AL 3%, AZUL DE BROMOFENOL AL 3%, - FORMAMIDA DESIONIZADA AL 99% Y EDTA 10 mM PH 7.5 DESPUÉS DE -- AÑADIR LA MEZCLA QUE PARA LA REACCIÓN ÉSTA ES INCUBADA 3 MINUTOS A 95°C Y 2 μ L SON USADOS POR CARRIL EN EL GEL DE SECUENCIA.

1) GELES DE POLIACRILAMIDA-UREA.

SE UTILIZAN GELES AL 8% DE PROLIACRILAMIDA DE DIMENSIONES: 35 CM X 43 CM X 0.2 MM. LA SOLUCIÓN PARA EL GEL SE PREPARA DE LA SIGUIENTE FORMA:

- UREA 40.2 g
- POLIACRILAMIDA-BIS (40%-2%) 20 ml

- TRIS BORATOS 10X 10 ML
- $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 1.0 ML
- AGUA DESTILADA HASTA 100 ML

LA SOLUCIÓN SE DISUELVE CON AGITACIÓN. SE AÑADEN - 50 μL DE TERNED Y EL GEL POLIMERIZA EN APROXIMADAMENTE 5 MINUTOS, - POR LO QUE DEBE VACIARSE RÁPIDAMENTE. LOS VIDRIOS NO DEBEN TENER GRASA YA QUE SI NO SE QUEDAN BURBUJAS ATRAPADAS Y EL GEL NO SIRVE. UNA VEZ VACIADO EL GEL SE COLOCA EL PEINE ADECUADO PARA HACER LOS CARRILES.

UNA VEZ POLIMERIZADO EL GEL, SE RETIRA EL PEINE Y - LOS CARRILES SE LAVAN PERFECTAMENTE PARA EVITAR QUE SE QUEDE ---- ACRILAMIDA EN LOS POZOS.

SE MONTA EL GEL EN UNA CÁMARA VERTICAL Y SE LLENA - CON AMORTIGUADOR TRIS BORATOS 1X.

CADA CARRIL DEBE TENER 2 μL DE SOLUCIÓN DE REACCIÓN.

EL GEL SE CORRE CON UN VOLTAJE INICIAL DE 2.0 KV -- POR 15-20 MINUTOS, Y POSTERIORMENTE SE CORREN A 65 WATTS CONSTANTES HAS TA QUE EL AZUL DE BROMOFENOL SALGA DEL GEL.

2) AUTORADIOGRAFÍA DEL GEL.

UNA VEZ CORRIDO EL GEL, SE LE QUITA UNO DE LOS VIDRIOS Y EL GEL SE CUBRE CON UNA PELÍCULA DE PLÁSTICO DELGADA (KLEEN PACK) EVITANDO QUE QUEDEN BURBUJAS O ARRUGAS. EN COMPLETA OSCURIDAD SE EXPONE EL GEL A UNA PLACA DE RADIOGRAFÍA (KODAK) Y SE ENVUELVE EN PAPEL OSCURO PARA EVITAR QUE LE ENTRE LUZ.

EL FILME SE EXPONE 12 HORAS A UNA TEMPERATURA DE -20°C PARA EVITAR DIFUSIÓN DE LAS BANDAS.

PARA REVELAR LA PELÍCULA SE UTILIZAN REACTIVOS DE KODAK PARA REVELADO Y FIJACIÓN DE PELÍCULAS.

10. MICROENSAYO DE DNA DE PLÁSMIDO.

SE UTILIZÓ EL MÉTODO MODIFICADO DE EXTRACCIÓN ALCALINA DE DNA DE PLÁSMIDO REPORTADO POR BIRNBOIN Y DOLY (53). SE PREPARAN LAS SIGUIENTES SOLUCIONES:

I. 2 MG/ML LISOZINA DE 50 mM GLUCOSA, 10 mM EDTA Y 25 mM TRIS-HCL pH 8.

II. 0.2 N NA OH Y 1% SODIO-DODECIL-SULFATO (SDS).

III. 3 M ACETATO DE SODIO PH 4.8 (EL PH SE AJUSTA CON --
ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL).

IV. 0.1 M ACETATO DE SODIO EN 0.05 M TRIS-HCl PH 8.

V. 1 MG DE RNASA A EN 1 ML DE AGUA CON 5 M^M TRIS-HCL -
PH 8 (LA MEZCLA SE HIERVE POR 10 MINUTOS).

EL PROCEDIMIENTO ES COMO SIGUE:

1. 2 ML DE CULTIVO INCUBADO 07 HRS SE CENTRIFUGAN EN -
TUBOS EPPENDORF Y LAS CÉLULAS SE LAVAN CON -----
10 MM NaCl.
2. SE CENTRIFUGAN LAS CÉLULAS Y POSTERIORMENTE SE RESUS
PENDEN EN 100 μ L DE SOLUCIÓN I Y SE MANTIENEN A ---
0°C POR 30 MINUTOS.
3. SE AGREGAN 200 μ L DE SOLUCIÓN II Y LOS TUBOS SE --
AGITAN SUAVEMENTE.
LA SUSPENSIÓN SE TORNA TRANSPARENTE Y LIGERAMENTE -
VISCOSA.
4. DESPUÉS DE 5 MINUTOS A 0°C, SE AGREGAN 150 μ L DE SO
LUCIÓN III Y EL TUBO SE INVIERTE CUIDADOSAMENTE HAS
TA QUE SE FORME UNA MALLA DE DNA.

5. EL TUBO SE MANTIENE 60 MINUTOS A 0°C. DURANTE ESTE TIEMPO SE PRECIPITA EL DNA CROMOSOMAL, PROTEÍNAS Y RNA DE ALTO PESO MOLECULAR.
6. LA CENTRIFUGACIÓN POR 5 MINUTOS PRODUCE UN SOBRENADANTE CLARO. SE EXTRAEN 0.4 ML DE ESTE SOBRENADANTE Y SE TRANSFIEREN A OTRO TUBO.
7. 1 ML DE ETANOL A -20°C SE AGREGA CON EL FIN DE PRECIPITAR EL DNA DE PLÁSMIDO, EL TUBO SE MANTIENE A -20°C POR 30 MINUTOS.
8. EL PRECIPITADO SE COLECTA POR CENTRIFUGACIÓN Y POSTERIORMENTE SE DISUELVE EN 100 µL DE SOLUCIÓN IV Y SE REPRECIPITA CON 200 µL, DE ETANOL A -20°C.
9. SE REPITE LA OPERACIÓN NÚMERO 8.
10. SE CENTRIFUGA DE NUEVO Y EL PRECIPITADO SE SECA PARA ELIMINAR LOS RESIDUOS DE ETANOL.
11. EL PRECIPITADO SE DISUELVE EN 36 µL DE AGUA DESTILADA Y SE AGREGA A ESTA SOLUCIÓN 4 µL DE LA SOLUCIÓN V. EL TUBO SE INCUBA A 37°C POR 20 MINUTOS.

UNA VEZ OBTENIDO DE ESTE MODO EL DNA, PUEDE TRATARSE CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN O BIEN PUEDE UTILIZARSE PARA TRANSFORMACIÓN DE OTRAS CEPAS.

11. PREPARACIÓN DE DNA EN FORMA REPLICATIVA RF.

LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN SE HIZO CONFORME AL MÉTODO DE LISADO CLARO DESCRITO POR BETLACH ET AL. (54) Y CONSTA DE - LOS SIGUIENTES PASOS PARA 1 LITRO DE CULTIVO:

1. TOMAR ALGUNAS CÉLULAS INFECTADAS DE UNA PLACA AZUL O DE UNA PLACA BLANCA, CON UN PALILLO ESTÉRIL Y PONERLOS EN 1 ML DE MEDIO YT 2X LÍQUIDO.
2. DEJARLAS CRECER A 37°C DURANTE 3 HORAS EN AGITACIÓN. AL MISMO TIEMPO SE PONEN A CRECER CÉLULAS NO INFECTADAS (CEPA Jfil01) EN 10 ML DE MEDIO YT.
3. AGREGAR A 1 LITRO DE MEDIO YT, 1 ML DE CÉLULAS INFECTADAS Y 10 ML DE LAS CÉLULAS NO INFECTADAS. INCUBAR DURANTE 7 HORAS A 37°C.
4. SE CENTRIFUGAN LAS CÉLULAS EN EL ROTOR GSA (SORVALL) A 6000 RPM POR 10 MINUTOS.
5. CONGELAR LAS PASTILLAS DE CÉLULAS.
6. SUSPENDER LAS CÉLULAS EN UN TOTAL DE 10 ML/L DE SACAROSA AL 25% EN TRIS-HCL 50 mM, PH8, EDTA 1MM PH8, Y MANTENER EN HIELO.

.../

7. AGREGAR, EN EL ORDEN INDICADO:
2 ML EDTA 0.25 M, PH 8
1 ML LISOZINA (5 MG/ML EN TRIS-HCL 0.025 M, PH8)
0.1 ML RNASA (10 MG/ML EN ACETATO DE SODIO 0.1 M, --
EDTA 3.3×10^{-5} M, PH 7; PRECALENTADA A 10 MIN.
A 85°C PARA QUITAR LA DNASA).
8. MEZCLAR SUAVEMENTE Y DEJAR REPOSAR EN HIELO 15 MIN.
9. AGREGAR 3 ML DE MEZCLA LÍTICA TRITÓN 3 X (3 ML ---
TRITÓN X -100 AL 10%, 75 ML DE EDTA 0.25 M, 15 ML
DE TRIS-HCL 1 M PH 8, 7 ML DE AGUA), MEZCLAR SUAVE-
MENTE Y DEJAR REPOSAR EN HIELO 15 MIN.
10. CENTRIFUGAR EN TUBOS DE POLIPROPILENO EN EL ROTOR -
SS34 (SORVALL) A 17 K POR 40 MIN.
11. DECANTAR EL SOBRENADANTE EN UNA PROBETA INMEDIATA--
MENTE. ANOTAR EL VOLUMEN Y VACIAR EN UNA BOTELLA -
DE PLÁSTICO DE 250 ML.
12. AGREGAR UN VOLUMEN DE AGUA DESIONIZADA.
13. AGREGAR UN VOLUMEN (RESPECTO AL TOTAL) DE FENOL ---
FRÍO SATURADO (FENOL SATURADO EN AMORTIGUADOR; MEZ-

.../

.../

CLA 1:1 DE FENOL, DESTILADO SOBRE ZINC, Y TRIS-HCL 50 mM, NA₂CO₃ 100 mM PH 7.5. EQUILIBRAR 16 HRS. CON AGITACIÓN A 4°C), MEZCLAR Y AGREGAR UN VOLUMEN DE - CLOROFORMO IGUAL AL DE FENOL Y AGITAR.

14. CENTRIFUGAR EN ROTOR HS-4 (SORVALL) A 6.5K, 10 MIN.
15. REMOVER LA FASE ACUOSA (SUPERIOR) Y PASARLA A OTRA BOTELLA, CUIDANDO DE NO ACARREAR LA PELÍCULA DE --- PROTEÍNAS DE LA INTERFASE.
16. AGREGAR 1/20 DEL VOLUMEN TOTAL DE 5M NA₂CO₃ Y AGITAR. AGREGAR 2.2 VOLÚMENES DE ETANOL A -20°C UNA HORA -- Y MEDIA CUANDO MENOS PARA QUE EL DNA PRECIPITE.
17. CENTRIFUGAR EN ROTOR HS-4, A 6.5K, POR 60 MIN. DES CARTAR EL SOBRENADANTE Y SECAR LA BOTELLA CON UNA - CORRIENTE DE AIRE FRÍO Y SUAVE.
18. RESUSPENDER EL PRECIPITADO EN 5 ML DE AGUA. ADICIONAR 1 ML DE GLICEROL ESTÉRIL Y MEZCLAR SUAVEMENTE.
19. COLOCAR LA SUSPENSIÓN EN UNA COLUMNA DE A50 (PARTÍCULAS DEL GEL DE AGAROSA PARA CROMATOGRFÍA POR FILTRACIÓN; BIO-RAD DE 2 X 35 CM. SE CORRE CON AMOR-

.../

TIGUADOR A50 (TRIS-HCL 50 MM, NAOL 0.5 M, PH8; -
- NAN₃ 1 MM; EDTA 1 MM, PH8). SE COLECTAN FRACCIO--
- NES DE 4 ML.

20. DETERMINAR LA DENSIDAD ÓPTICA (D.O) A 260 NM PARA -
- CADA FRACCIÓN. EL DNA DE FORMA RF SE ENCUENTRA --
- USUALMENTE ENTRE LOS TUBOS 12 Y 20. (UNA DO DE 0.1
- EQUIVALE A 50 µg DE DNA/ML).

21. REUNIR LAS FRACCIONES QUE CONTIENEN EL DNA Y AGRE-
- GARLES 2.2 VOLÚMENES DE ETANOL A -20°C. MANTENER A
- -20°C AL MENOS 1.5 HRS.

22. CENTRIFUGAR EN ROTOR HS-4 A 6.5 K POR 60 MIN. DE-
- CANTAR Y SECAR CON UNA CORRIENTE DE AIRE SUAVE.

23. RESUSPENDER EL PRECIPITADO EN 2.1 ML DE AMORTIGUA-
- DOR TEN (TRIS-HCL 10 MM, PH 7.6; NAOL 10MM; EDTA -
- 1 MM) POR CADA 0.5 MG DE DNA.

24. SE PREPARA UN GRADIENTE ISOPÍCNICO A EQUILIBRIO EN
- CLORURO DE CESIO Y YODURO DE PROPIDIO (PdI. PARA ESTO:
- AGREGAR EN TUBOS DE 5 ML DE NITRATO DE CELULOSA --
- (1/2" X 2"). POR TUBO:
- - 2.2 G DE CsCL SÓLIDO
- - 2.1 ML DE DNA EN TEN

(DEBE TRABAJARSE EN PENUMBRA A PARTIR DE ESTE MOMENTO YA QUE EL PDI REACCIONA CON LA LUZ).

- 0.150 ML DE PDI (SOLUCIÓN DE 2 NG/ML).
- 2.3 ML DE ACEITE MINERAL PARA BALANCEAR LOS TUBOS DE CENTRÍFUGA.

25. CENTRIFUGAR EN EL ROTOR SW50.1 (BECKMAN) A 38K POR 20 HRS. A 20°C.

26. EL DNA SERÁ VISIBLE CON LUZ ULTRAVIOLETA (UV) DADO QUE EL PDI FLOURECE AL ILUMINARSE CON ELLA. SE OBSERVAN 2 BANDAS; LA SUPERIOR QUE CORRESPONDE AL DNA DE FORMA RF ROTO RELAJADO Y LA INFERIOR QUE CORRESPONDE AL DNA (RF) SUPERENROLLADO, COVALENTEMENTE CERRADO.

27. BAJO LUZ UV SE PICA EL FONDO DE LOS TUBOS Y SE COLECTA LENTAMENTE EL DNA DE CADA UNA DE LAS BANDAS.

28. CORRER EL DNA A TRAVÉS DE UNA COLUMNA DE INTERCAMBIO IÓNICO (DOWEX 50W-X8, BIO-RAD; TRATADA CON ÁCIDO Y LUEGO BASE, IN CADA UNO, NEUTRALIZADA Y ALMACENADA EN TRIS-HCL 0.1 M, PH 8; NACL 0.5M). SE COLOCAN 2-3 ML DE RESINA EN UNA COLUMNA PEQUEÑA, Y SE EQUILIBRA CON 10 ML DE AMORTIGUADOR DE RESINA DOWEX

(TRIS-HCL 50 mM PH 8; NACL 1M; EDTA 1mM), POR CADA ML DE RESINA.

29. COLOCAR LA MUESTRA, DILUÍDA 1:1 EN AMORTIGUADOR DE DOWEX, ELUIR Y LUEGO LAVAR LA COLUMNA CON OTRO VOLUMEN DE AMORTIGUADOR. REVISAR CON LUZ UV QUE TODO EL PDÍ HAYA QUEDADO EN LA RESINA; SI ALGO QUEDO, -- VOLVER A LAVAR Y PASAR POR LA COLUMNA.
30. DIALIZAR EL DÑA CONTRA 4 LITROS DE TRIS-HCL 10mM; - EDTA 1 mM; PH 8; POR MÍNIMO 12 HORAS A 4°C. CAMBIAR EL AMORTIGUADOR Y REPETIR LA OPERACIÓN.
31. SACAR DE LA BOLSA DE DIÁLISIS Y PRECIPITAR AÑADIENDO 1/20 VOLUMEN DE NACL 5M, Y 2.2 VOLÚMENES DE ETANOL A -20°C POR MÍNIMO 3 HRS.
32. CENTRIFUGAR EN EL ROTOR HS-4, A 6.5 K POR 60 MIN.
33. RESUSPENDER EN 0.5 - 1 ML DE AGUA Y MEDIR LA DO A - 260 NM PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE DÑA ---- (USUALMENTE 0.5 MG/ML).

V. RESULTADOS.

A. PRODUCCIÓN DE LA DOBLE DELECCIÓN.

1. CONSTRUCCIÓN DEL FAGO RECOMBINANTE M13 MP7 Δ CM.

ESTE FAGO SE CONTRUYÓ CON EL FIN DE TENER UN SISTEMA -- ADECUADO PARA PRODUCIR UNA DOBLE DELECCIÓN EN EL PROMOTOR CONSENSO.

EL PLÁSMIDO p Δ 36 CM SE UTILIZÓ COMO FUENTE DEL PROMOTOR Y DE UN FRAGMENTO DEL GEN DE LA ACETILTRANSFERASA DE CLORANFENICOL PARA LO CUAL SE DIGIRIERON 2 μ G DE DNA DE ESTE PLÁSMIDO CON LA ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN Eco RI, PRODUCIÉNDOSE UN FRAGMENTO DE 297 PARES DE BASES; MÁS EL VECTOR. CON LA REACCIÓN DE DIGESTIÓN SE REALIZÓ UNA ELECTROFESIS PREPARATIVA EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 7.5%; SE CORTÓ LA BANDA DE 297 P.B. Y SE ELECTROLUYÓ.

ESTE FRAGMENTO DE Eco RI FUE CLONADO EN EL FAGO M13 -- MP7 COMO SE MUESTRA EN LA FIGURA 9, EN DONDE .4 μ G DEL FAGO DIGERIDOS CON LA ENZIMA Eco RI, FUERON MEZCLADOS CON .1 μ G DEL FRAGMENTO Y SOMETIDOS A UNA REACCIÓN DE LIGASA DE DNA CON LA ENZIMA LIGASA DE T^L.

CON LA MEZCLA DE LIGASA SE TRANSFECTÓ LA CEPA JM101 DE E.COLI, Y SE OBTUVIERON 2 PLACAS BLANCAS Y ALREDEDOR DE 100 PLACAS AZULES.

CLONACION EN EL Fago M13

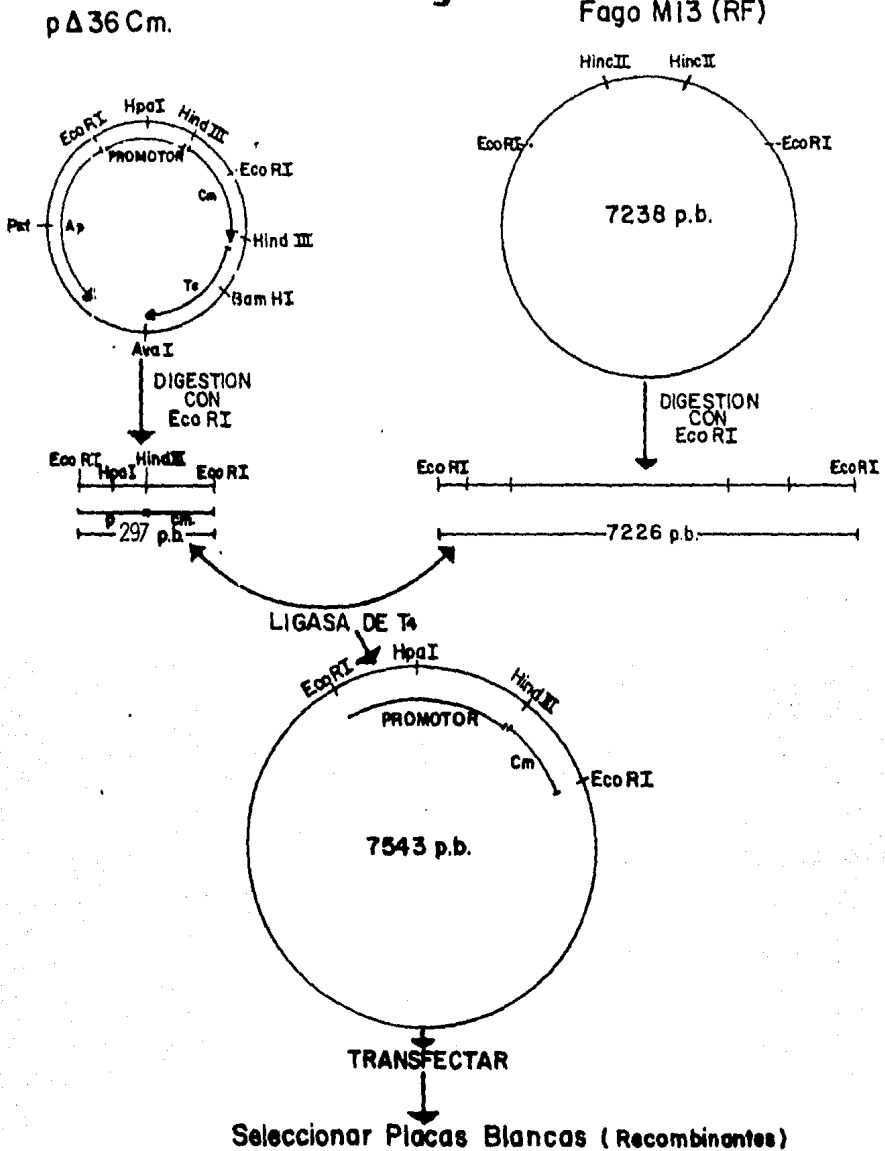


FIGURA NÚM. 9. ESQUEMA DE LA CLONACIÓN DEL FRAGMENTO QUE CODIFICA PARA EL PROMOTOR SINTÉTICO Y PARTE DEL GENE DE CAT EN EL FAGO M13.

PARA DETERMINAR SI ESTAS 2 PLACAS CONTENÍAN EL FRAGMENTO CLONADO EN DIFERENTE ORIENTACIÓN SE REALIZÓ UNA PRUEBA DE "C", LA CUAL CONSISTE EN MEZCLAR 20 μ L DE SOBRENADANTE (EN 1 ML DE SOBRENADANTE HAY 10^{12} FAGOS) DE CADA UNA DE LAS PLACAS RECOMBINANTES; AGREGARLES 2 μ L DE SDS 2%, Y 6 μ L DE AMORTIGUADOR DE CORRIDA (AZUL DE BROMOFENOL AL 2%, .2 M EDTA PH = 8.3 Y 50% DE GLICEROL). ESTA MEZCLA SE INCUBA A 67°C POR 1 HORA.

CON LA REACCIÓN SE CORRE UNA ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL .7% A 100 VOLTS DURANTE 5 HORAS.

EL DNA DE LAS PLACAS QUE TIENEN EL INSERTO DE DIFERENTE ORIENTACIÓN HIBRIDIZAN Y FORMAN UNA ESTRUCTURA EN FORMA DE OCHO QUE MIGRA MÁS LENTO EN UN GEL QUE EL DNA DE FAGO DE CADENA SENCILLA CIRCULAR. ESTO SE OBSERVA EN LA FIGURA 10.

2. CARACTERIZACIÓN DEL M13 MP7 - Δ CM POR SECUENCIA DE DNA.

PARA DETERMINAR CUAL DE LAS 2 PLACAS RECOMBINANTES ES LA QUE TIENE EL INSERTO EN LA ORIENTACIÓN DESEADA Y ADEMÁS CONFIRMAR QUE EL FRAGMENTO CLONADO ES EL REQUERIDO, SE REALIZÓ UNA SECUENCIA DE DNA POR EL MÉTODO DE SANGER (37). EN LA FIGURA 11 SE PUEDE OBSERVAR LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE LA CLONA ADECUADA DONDE SE PUEDE LEER APROXIMADAMENTE 100 P.B. QUE CORRESPONDEN AL PROMOTOR CONSEN-

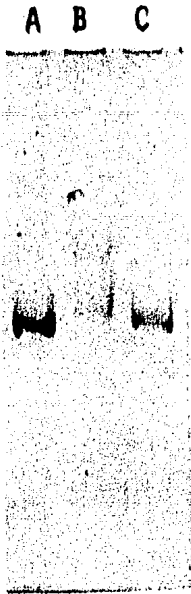
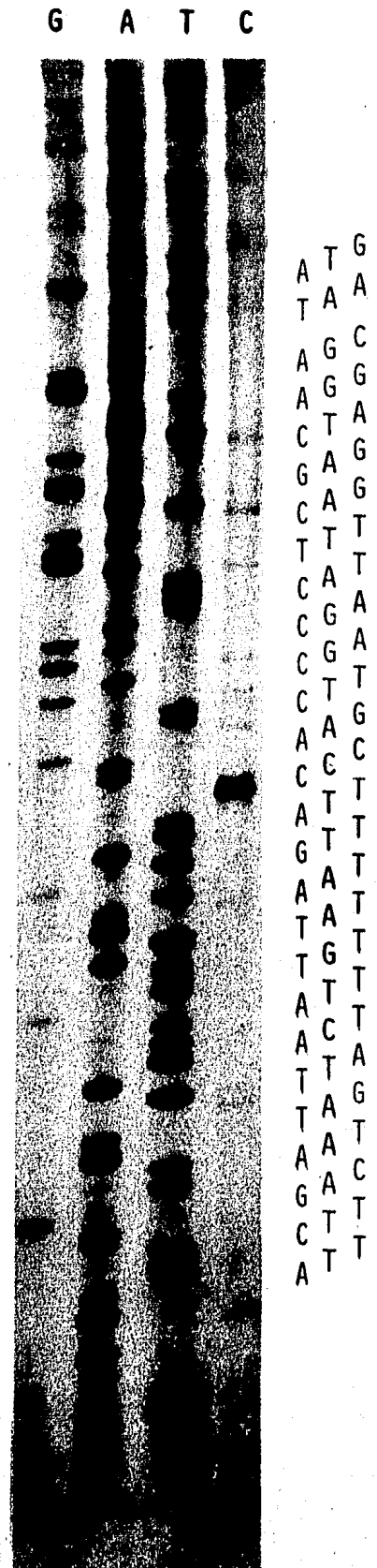


FIGURA NÚM. 10 PRUEBA DE "C "

- A) SOBRENADANTE SÓLO. CONTROL NEGATIVO.
- B) MEZCLA DEL SOBRENADANTE DE 2 PLACAS CON DIFERENTE ORIENTACIÓN.
- C) MEZCLA DEL SOBRENADANTE DE 2 PLACAS CON LA MISMA ORIENTACIÓN.

FIGURA NÚM. 11 SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL PROMOTOR SINTÉTICO Y PARTE DEL GENE DE CAT.



.../

.72

SO DESDE EL SITIO DE ECO RI Y A UNA PEQUEÑA PARTE DEL GEN DE LA ACETILTRANSFERASA DE CLORAFENICOL.

PARA HACER ESTA SECUENCIA SE UTILIZÓ UN SEGMENTO DE DNA DE CADENA SENCILLA QUE CONSTITUYE UN PRÍMERO Ó CEBADOR UNIVERSAL QUE HIBRIDIZA CON EL M13 MP7 Y CUYA SECUENCIA ES:

5'CCAGTCACGACGT^{3'}

3. CONDICIONES DE REPARACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE LA -- DOBLE DELECCIÓN.

PARA PRODUCIR ESTA MUTACIÓN SE USÓ INICIALMENTE UN UNDECAMERO (11 MERO) SINTETIZADO POR X. SOBERÓN (55) SIGUIENDO LAS CONDICIONES DE REPARACIÓN REPORTADAS POR G. MIYADA ET AL (56).

ESTE OLIGONUCLEÓTIDO TIENE UNA SECUENCIA ----- 5'TTAACATGTT^{3'} QUE ES COMPLEMENTARIA A LA SECUENCIA DEL PROMOTOR EXCEPTO EN DOS BASES DONDE SE VA A PRODUCIR LA DELECCIÓN.

AL MONITOREAR LA REACCIÓN DE REPARACIÓN, SE OBSERVÓ UNA MUY BAJA EFICIENCIA DE FORMACIÓN DE DNA DE DOBLE CADENA. UNA MUY PROBABLE CAUSA DE ESTO, ES QUE EL TAMAÑO PEQUEÑO DEL OLIGONUCLEÓTIDO Y SU RIQUEZA EN BASES A Y T LO HACEN TENER UNA TEMPERATURA DE HIBRIDIZACIÓN DE 26°C CON UN TEMPLADO TOTALMENTE COMPLEMENTARIO (SEGÚN LA REGLA DE QUE CADA PAR AT = 2°C Y CADA CG = 4°C). - (BRUCE WALACE, NO PUBLICADO).

.../

EN ESTE CASO EL 11 MERO PRESENTA 2 BASES MENOS QUE EL TEMPLADO POR LO QUE SU TEMPERATURA DE DESHIBRIDIZACIÓN ES BASTANTE MENOR, LO QUE LO HACE SER POCO ESTABLE EN SU HIBRIDIZACIÓN CON EL TEMPLADO.

PARA EVITAR ESTE INCONVENIENTE EL 11 MERO SE CONVIRTIÓ EN UN 15 MERO AGREGANDO 4 BASES MÁS EN SU EXTREMO 5'; SU SECUENCIA ES 5'TTAGTTAACTATGTT^{3'} AUMENTANDO ASÍ SU TEMPERATURA DE HIBRIDIZACIÓN A 36°C.

CON ESTE NUEVO OLIGONUCLEÓTIDO LA REACCIÓN DE REPARACIÓN SE REALIZÓ SEGÚN LAS CONDICIONES PROPUESTAS POR M. SMITH (57) CON PEQUEÑAS MODIFICACIONES:

A) REACCIÓN DE FOSFORILACIÓN: SE FOSFORILARON 100 P MOLAS DEL 15 MERO EN SU EXTREMO 5' USANDO 5 UNIDADES DE LA ENZIMA POLINUCLEÓTIDO CINASA DE T4 Y ATP 5MM. DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN A 37°C DURANTE 30 MIN., LA REACCIÓN ES INACTIVADA A 70°C DURANTE 10 MIN.

B) REACCIÓN DE HIBRIDIZACIÓN: SE MEZCLARON 3 µg (1.2 P MOLAS) DE TEMPLADO CON 50 P MOLAS DEL 15 MERO EN BUFFER POLYNAACL (25 MM TRIS HCL PH = 7.5; 10 MM MgCl₂; 50 MM NAACL Y 1 MM D.T.T.). LA MEZCLA ES INCUBADA A 55°C DURANTE 5 MIN., POSTERIORMENTE SE DEJA ENFRIAR A TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE 30 MIN.

c) REACCIÓN DE POLIMERIZACIÓN; DESPUÉS DE ESTE TIEMPO SE ADICIONAFON A LA REACCIÓN: CADA UNO DE LOS DESOXINUCLEÓSIDOS TRIFOSFATO EN UNA CONCENTRACIÓN FINAL DE 0.5 MM; 10 UNIDADES DE POLIMERASA DEPENDIENTE DE DNA (FRAGMENTO GRANDE); 5 UNIDADES DE LIGASA DE DNA DE T4; 1 MM ATP CONC. FINAL Y 2.5 μ L DE 10 X -- BUFFER POL (1 X CONTIENE 20 MM TRIS HCL PH = 7.5, 10 MM $MgCl_2$, - 10 MM D.T.T.) PARA UN VOLUMEN FINAL DE 50 μ L.

TODO ESTO SE MEZCLA Y SE DEJA A TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE 5 MIN.; DESPUÉS SE INCUBA A 15°C DURANTE 12 HORAS.

4. MONITOREO DE LA REACCIÓN DE REPARACIÓN.

PARA OBSERVAR LA FORMACIÓN DE DNA DE DOBLE CADENA (DNA REPARADO), SE REALIZÓ UNA ELECTROFORESIS CON 1 μ G DE LA MEZCLA DE REPARACIÓN, ADEMÁS DE 2 CONTROLES DE UN GEL DE AGAROSA A ---- 60 VOLTS DURANTE 6 HORAS. LOS RESULTADOS SE MUESTRAN EN LA FIGURA NÚM. 12.

DE ESTA PRUEBA SE PUDO DETERMINAR QUE SÍ HABÍA FORMACIÓN DE DNA DE DOBLE CADENA A PARTIR DE DNA DE CADENA SENCILLA; SIN EMBARGO. LA EFICIENCIA DE REPARACIÓN FUE BAJA. EL CONTROL DE REPARACIÓN SIN LIGASA NOS INDICÓ QUE LA ENZIMA FUE FUNCIONAL Y EL CONTROL DE REPARACIÓN SIN PRÍMERO, QUE LA DNA POLIMERASA - UTILIZÓ ÉSTE ESPECÍFICAMENTE COMO INICIADOR.

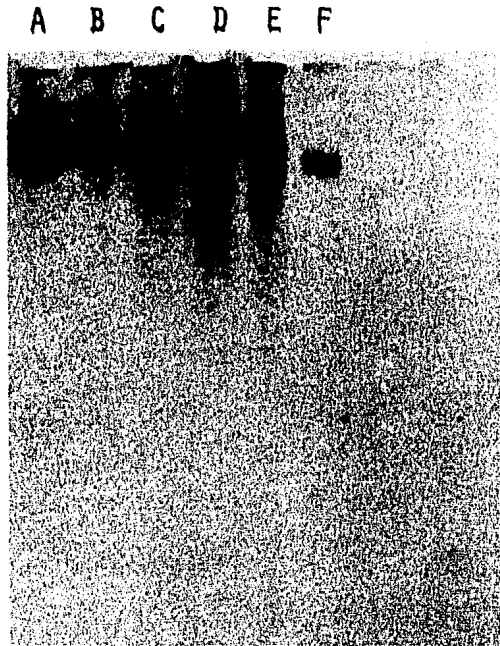


FIGURA NÚM. 12 MONITOREO DE LA REACCIÓN DE REPARACIÓN,

- A) DNA DE DOBLE CADENA DEL FAGO M13 MP7.
- B) DNA DE DOBLE CADENA CON UNA MELLA DEL FAGO M13 MP7.
- C) DNA DESPUÉS DE LA REACCIÓN DE REPARACIÓN CON PRÍMERO Y LIGASA.
- D) DNA DESPUÉS DE UNA REACCIÓN DE REPARACIÓN SIN LIGASA.
- E) DNA DESPUÉS DE UNA REACCIÓN DE REPARACIÓN SIN PRÍMERO Y SIN LIGASA.
- F) DNA DE CADENA SENCILLA DEL FAGO M13 MP7 Δ CM. (TEMPLADO ANTES DE LA REACCIÓN DE REPARACIÓN),

5. ELIMINACIÓN DE LA CADENA SENCILLA REMANENTE.

ES IMPORTANTE ELIMINAR EL TEMPLADO NO REPARADO DEBIDO A QUE EL DNA DE CADENA SENCILLA TRANSFECTA CON GRAN EFICIENCIA DANDO ORIGEN A UN GRAN FONDO Ó EXCESO DE CLONAS TIPO SILVESTRE.

PARA ESTO SE UTILIZÓ LA NUCLEASA SI QUE ES UNA ENZIMA -- QUE DIGIERE DNA DE CADENA SENCILLA EN FORMA ESPECÍFICA; DIFERENTES CANTIDADES DE LA ENZIMA DILUÍDA (3 A 10 UNIDADES) SE ADICIONARON A 1 μ G DE LA MEZCLA DE REPARACIÓN Y SE INCUBÓ A 18°C DURANTE 1 HORA.

DNA TRATADO CON SI Y SIN TATAR FUE TRANSFECTADO, PERO -- NO SE OBSERVÓ UNA DIFERENCIA EVIDENTE ENTRE EL NÚMERO DE PLACAS -- OBTENIDAS CON ESTOS 2 DNAS.

6. TRANSFECCIÓN.

CON 1 μ G DE DNA TRATADO CON SI (.1 μ G POR CAJA) Y 0.1 -- μ G DE DNA SIN TRATAR SE TRANSFECTÓ LA CEPA JM101. SE OBTUVIERON ALREDEDOR DE 400 PLACAS BLANCAS CON DNA TRATADO CON SI Y 500 PLACAS BLANCAS EN LA CAJA CON DNA SIN TRATAR.

TAMBIÉN SE TRANSFECTÓ EL CONTROL DE DNA DE CADENA SENCILLA, OBTENIÉNDOSE 1 000 PLACAS CON .1 μ G CON LO QUE SE APRECIÓ -- QUE LA EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN FUE BUENA.

7. HIBRIDIZACIÓN EN PUNTO.

ESTE MÉTODO SE UTILIZÓ PARA LA DETECCIÓN DE LA CLONA MUTANTE.

LA PRUEBA DE HIBRIDIZACIÓN, SE BASA EN EL HECHO DE QUE - BAJO CONDICIONES MÁS ERICTAS QUE LAS EMPLEADAS EN LA REACCIÓN - DE REPARACIÓN, EL OLIGONUCLEÓTIDO HIBRIDIZA ÚNICAMENTE CON EL DNA TOTALMENTE COMPLEMENTARIO (DNA MUTADO), AUNQUE LA DIFERENCIA ENTRE EL DNA SILVESTRE Y EL MUTADO SEA COMO EN ESTE CASO DE SOLAMENTE 2 BASES.

DE ACUERDO A LAS CONDICIONES REPORTADAS POR W.BENTON(58) PARA EL MÉTODO DE HIBRIDIZACIÓN EN PUNTO SE ANALIZARON 340 PLACAS.

A) SE COLOCAN 2 μ L DE DNA DE CADA UNA DE LAS PLACAS EN UN FILTRO DE NITROCELULOSA ZERBRECHLICH DE SCHLEICHER Y SCHUEL EN FORMA DE PUNTOS.

B) LOS FILTROS FUERON HORNEADOS AL VACÍO A 80°C DURANTE 2 HORAS Y PREHIBRIDIZADOS EN 6 X SSC (SSC 1X ES 0.15 M NaCl, ---- 0.015 M CITRATO DE SODIO), 10 X DENHARDT'S (DENHARDT'S 1 X CONTIENE FICOLL, POLIVINILPIROLIDONA Y ALBÚMINA SÉRICA BOVINA EN UNA -- CONCENTRACIÓN DE 0.02%) Y S.D,S AL 0.2% A 67°C POR 1 HORA EN BOLSAS DE PLÁSTICO SELLADAS HERMÉTICAMENTE.

C) LA HIBRIDIZACIÓN DE LOS FILTROS SE LLEVA ACABO CON EL OLIGONUCLEÓTIDO MARCADO RADIOACTIVAMENTE CON P^{32} γ -ATP EN UNA CONCENTRACIÓN DE 2 A 3 NG/ML; EN 6 X SSC Y 10 X DENHART'S. ESTOS SE INCUBARON A TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE 3 A 4 HORAS.

D) DESPUÉS DE ESTE TIEMPO LOS FILTROS SE LAVARON CON -- 6 X SSC INCREMENTANDO 5°C LA TEMPERATURA EN CADA NUEVO LAVADO, -- OBTENIÉNDOSE LAS AUTORADIOGRAFIAS CORRESPONDIENTES HASTA OBSER-- VAR LA DESAPARICIÓN DE LA HIBRIDIZACIÓN INESPECÍFICA.

LOS RESULTADOS DE ESTA PRUEBA FUERON 2 PLACAS CLARAMENTE POSITIVAS Y UNA DUDOSA (PUNTOS QUE APARECEN MARCADOS DEPUÉS DE -- LOS LAVADOS). VER FIGURA 13.

LAS PLACAS POSITIVAS PUEDEN CONTENER UNA MEZCLA DE MOLÉ-- CULAS MUTANTES Y TIPO SILVESTRE POR LO QUE ES NECESARIO VOLVER A TRANSFECTAR A E.COLI CON DNA DE ESTAS PLACAS POSITIVAS. ESTA VEZ SE OBTUVIERON ALREDEDOR DE 200 PLACAS NUEVAS DE CADA UNA DE LAS 2 POSITIVAS Y SE ANALIZARON NUEVAMENTE 60 PLACAS POR HIBRIDIZA--- CIÓN EN PUNTO (30 DE CADA POSITIVA ORIGINAL).

LO QUE SE ENCONTRÓ FUE QUE UNA DE ELLAS ERA UNA FALSA PO-- SITIVA, PUES NINGUNA DE LAS NUEVAS PLACAS QUE SE OBTUVIERON FUE PO-- SITIVA Y, DE LA OTRA, SE LOGRARON 13 POSITIVAS, FIGURA 14.

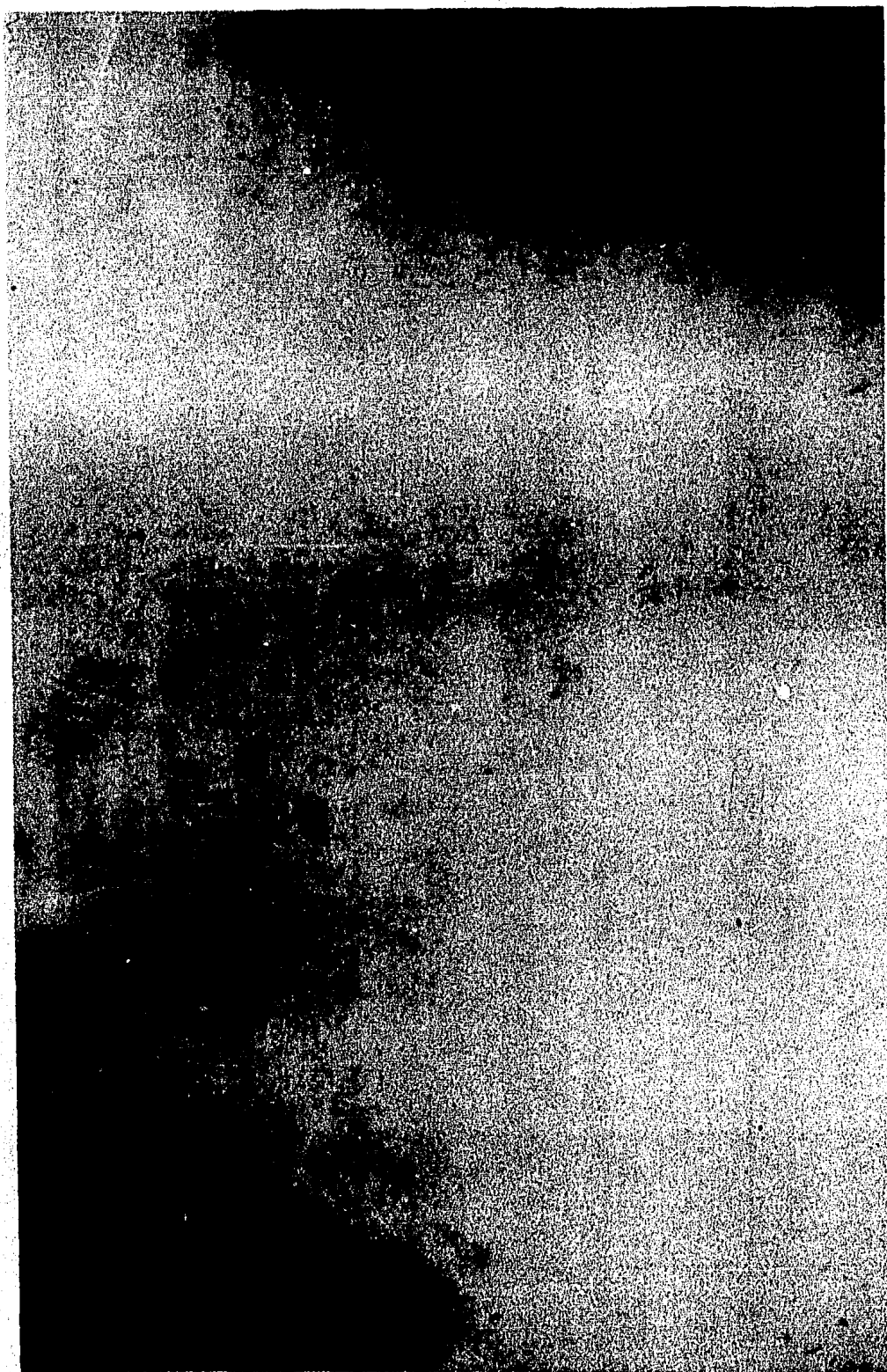


FIGURA N^oM. 13 HIBRIDIZACIÓN EN PUNTO. LOS LAVADOS FINALES SE REALIZARON A 33°C.

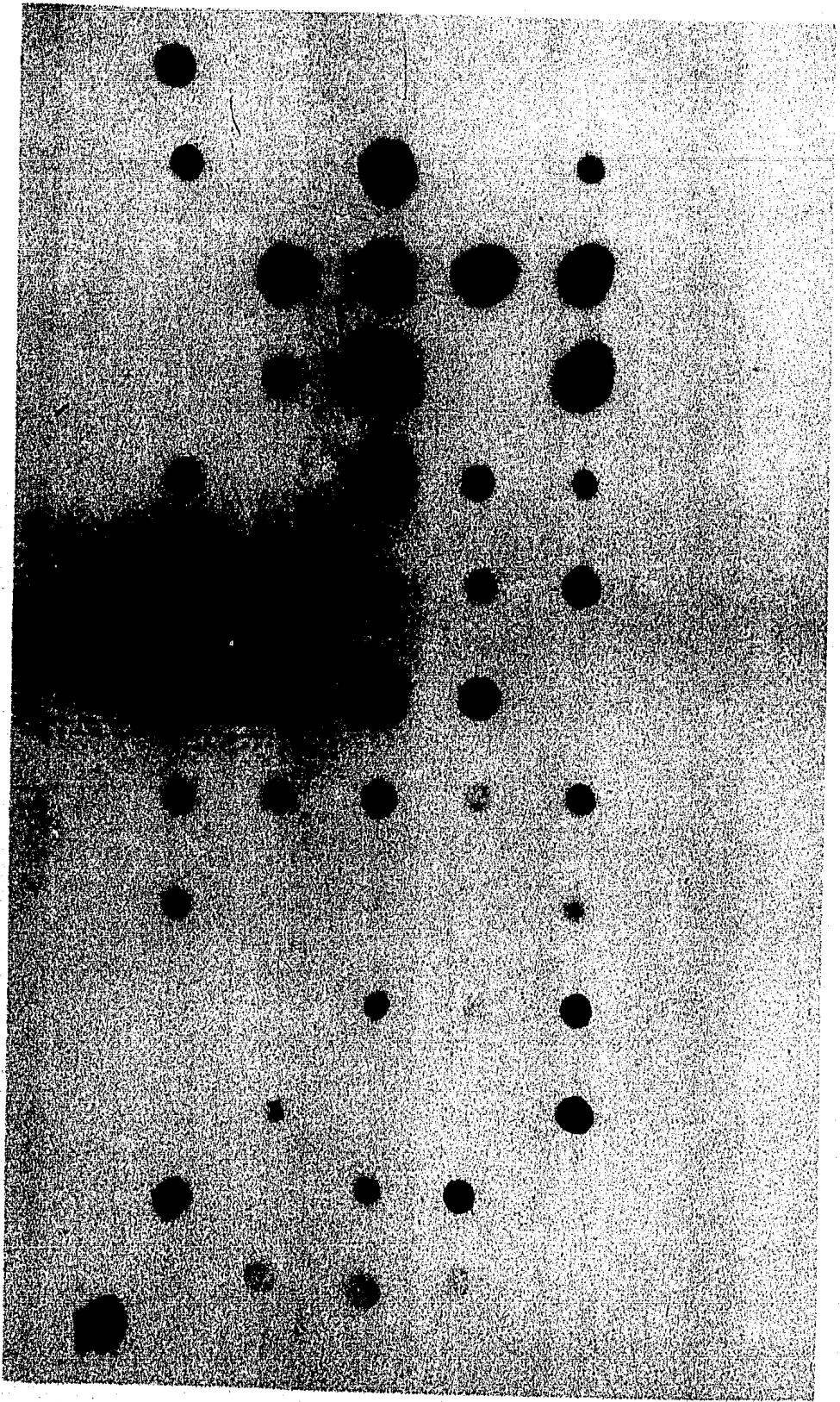


FIGURA NÚM. 14 HIBRIDIZACIÓN EN PUNTO. LOS LAVADOS FINALES SE REALIZAN A 35°C.

.../

PAPA SABER SI ALGUNA DE ESTAS CLONAS POSITIVAS LLEVABA - LA MUTACIÓN DESEADA, SE REALIZÓ UNA SECUENCIA DE DNA (SANGER) DE 3 DE LAS PLACAS ESCOGIDAS AL AZAR.

EL RESULTADO DE LA SECUENCIA DE UNA CLONA SE MUESTRA EN LA FIGURA 15; NINGUNA DE LAS CLONAS LLEVABA LA MUTACIÓN DESEADA - PERO LAS TRES CONTENÍAN UNA DUPLICACIÓN DE LA SECUENCIA BLANCO A MUTAR.

B. GENERACIÓN DEL SITIO DE XBA I.

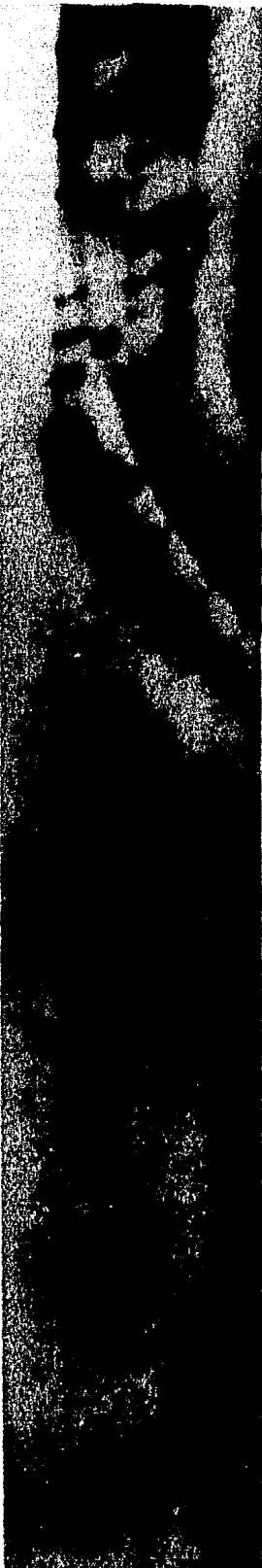
8. SÍNTESIS DEL OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO REQUERIDO PARA CREAR UN SITIO DE XBA I.

ESTE OLIGONUCLEÓTIDO FUE SINTETIZADO POR EL MÉTODO DEL - FOSFOTRIESTER EN FASE SÓLIDA. CON ÉL SE QUIERE PRODUCIR UNA ---- TRANSVERSIÓN DE UNA G POR T; UNA TRANSICIÓN DE UNA A POR G Y UNA DELECIÓN DE UNA A COMO SE PRESENTA EN LA FIGURA 16.

LA SECUENCIA DE BASES DE ESTE POLINUCLEÓTIDO ES ----- 5'CTAAGGAATCTAGATGGAG^{3'} Y SU SÍNTESIS SE REALIZÓ A PARTIR DE 7 ACOPLAMIENTOS A UNA RESINA G, DE 4 TRINUCLEÓTIDOS Y 3 DIMEROS --- (TODOS PROPORCIONADOS POR EL LABORATORIO DE SÍNTESIS QUÍMICA DE - POLINUCLEÓTIDOS).

LA ADICIÓN DE ESTOS BLOQUES SE HIZO EN EL SIGUIENTE ORDEN:

.../



C
CTGTTTTCAGTTTTCAG ←
CTTAAATTCATATGTTCTA
CAATAATTAATTAATTA
←

**FIGURA NÓM. 15 SECUENCIA DE DNA
DE LA CLONA APARENTEMENTE
POSITIVA QUE LLEVA LA DU-
PLICACIÓN DE LA SECUENCIA
BLANCO A MUTAR.**

SITIO DE LA MUTACION

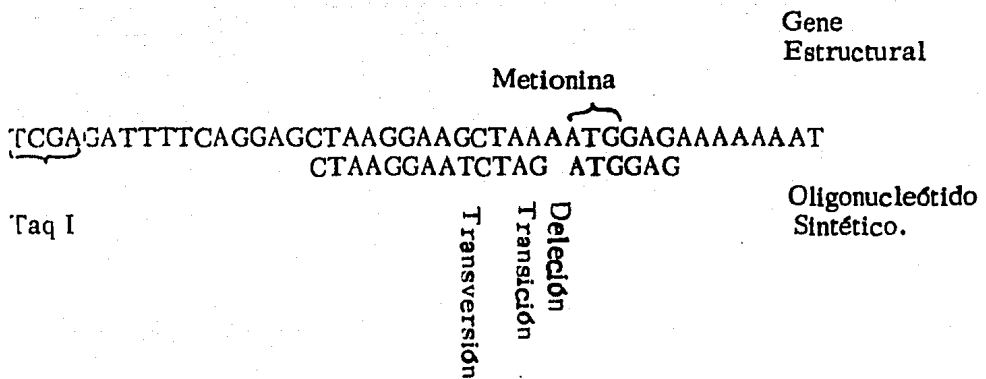


FIGURA Núm. 16 Esquema del Sitio de la Mutación en el Gene De la Acetiltransferasa de Cloranfenicol

.../

,79

NÓM. DE ACOPLAMIENTO	BLOQUE	CANTIDAD EN MG
1	RESINA G	100
2	GCA	155
3	AT	105
4	AG	113
5	TCT	137
6	GAA	154
7	AAG	154
8	CT	104

UNA VEZ TERMINADOS LOS 7 ACOPLAMIENTOS, EL OLIGONUCLEÓTI
DO SE LIBERÓ DE LA RESINA Y DE LOS GRUPOS PROTECTORES, EN SEGUI-
DA SE PASÓ POR UNA COLUMNA DE SEPHADEX Y POR UNA COLUMNA DE FASE
INVERSA EN EL CROMATÓGRAFO DE HPLC.

EL OLIGONUCLEÓTIPO YA PURO SE FOSFORILÓ CON LA CINASA DE
T4 Y γ -ATP P^{32} PARA PROBAR SU IDENTIDAD QUÍMICA, COMO SE MUESTRA
EN LA FIGURA NÚM. 17.

9. VERIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL 19 ^{MERO} EN SE--
CUENCIA DE DNA.

UTILIZANDO COMO INICIADOR (PRÍMERO) EL 19 ^{MERO} Y COMO
TEMPLADO EL N13 MP 7 - Δ CM SE REALIZÓ UNA SECUENCIA DE DNA POR --
EL MÉTODO DE SANGER.

.../



FIGURA NÚM. 17 FOSFORILACIÓN CON LA POLINUCLEÓTIDO CINASA DE T4.

- A) CONTROL DE PESO MOLECULAR (17 MERO)
- B) OLIGONUCLEÓTIDO SINTETIZADO EN FASE SÓLIDA (19 MERO).

LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA SE PUEDE OBSERVAR EN LA FIGURA 18. ÉSTA NO FUE UNA SECUENCIA MUY ADECUADA; SIN EMBARGO, DE ELLA SE PUEDE AFIRMAR QUE EL 19 MERO SINTETIZADO FUNCIONA COMO PRIMER ESPECÍFICO.

10. SUSTRATO UTILIZADO EN LA OBTENCIÓN DEL SITIO DE ----
XBA I.

EL MISMO TEMPLADO M13 Δ CM FUE EMPLEADO COMO DNA POSEEDOR DE LA SECUENCIA BLANCO PARA CREAR EL SITIO DE XBA I. ESTE SUSTRATO LLEVA EL SITIO DE UNIÓN A RIBOSOMA Y LA REGIÓN ESTRUCTURAL DEL GEN DE LA ACETILTRANSFERASA DE CLORANFENICOL HASTA EL SITIO DE ECO RI INTERNO.

11. CONDICIONES DE REPARACIÓN.

SE SIGUIERON LAS CONDICIONES REPORTADAS POR M. SMITH CON LAS SIGUIENTES MODIFICACIONES:

A) REACCIÓN DE FOSFORILACIÓN: SE FOSFORILARON 20 P MOLAS DEL 19 MERO CON CINASA DE T4 Y γ -ATP P³² (19 MERO MARCA DO RADIOACTIVAMENTE). DESPUÉS DE 30 MINUTOS DE INCUBACIÓN CON LA MARCA, SE ADICIONÓ ATP 10 mM, Y SE INCUBÓ 20 MINUTOS MÁS.

B) REACCIÓN DE HIBRIDIZACIÓN. LA MODIFICACIÓN INTRODUCIDA EN ESTE PASO FUE PROPUESTA POR EL DR. H. HEYNEKER PARA AUMENTAR LA EFICIENCIA DE REPARACIÓN.

.../

ESTA CONSISTE EN ADICIONAR JUNTO CON EL TEMPLADO DE CADENA SENCILLA Y EL 19 MERO, DNA DE DOBLE CADENA RF DE M13 MP7 DIGERIDO CON LA ENDONUCLEASA ECO RI, DE TAL FORMA QUE AL DESNATURALIZAR TÉRMICAMENTE ESTA MEZCLA Y LUEGO RENATURALIZARLA, UNA DE LAS CADENAS DEL RF HIBRIDIZA CON EL TEMPLADO, QUEDANDO LA REGIÓN DEL INSERTO SIN APAREARSE.

EL OLIGONUCLEÓTIDO HIBRIDIZA CON LA REGIÓN DEL INSERTO - QUEDANDO SÓLO ALREDEDOR DE 270 BASES POR REPARAR Y, DE ESTA MANERA, OBTENER EL DNA DE DOBLE CADENA CIRCULAR COVALENTEMENTE CERRADO.

EN ESTA REACCIÓN SE MEZCLARON 3 μ G DE TEMPLADO, 20 pM - DEL 19 MERO (FOSFORILADO RADIOACTIVAMENTE) 5 μ G DE RF M13 MP7 EN BUFFER POL NaCl; LA MEZCLA SE INCUBÓ A 85°C DURANTE 5 MINUTOS Y SE DEJÓ ENFRIAR LENTAMENTE.

C) REACCIÓN DE POLIMERIZACIÓN. ESTA REACCIÓN SE LLEVÓ A CABO EN UN VOLUMEN FINAL DE 90 μ L EN LA MISMA MANERA QUE PARA EL CASO DE LA DOBLE DELECIÓN.

12. MONITOREO DE LA REACCIÓN DE REPARACIÓN.

PARA MONITOREAR LA REACCIÓN DE REPARACIÓN EN ESTE CASO - SE USÓ EL OLIGONUCLEÓTIDO MARCADO RADIOACTIVAMENTE.

.../

LA MEZCLA DE REPARACIÓN SE DIRIGIÓ CON LAS ENZIMAS DE --
RESTRICCIÓN Eco RI Y HIND III PRODUCIÉNDOSE UN FRAGMENTO DE AL-
REDEDOR DE 254 BASES DE Eco RI - HIND III.

ESTE FRAGMENTO LLEVA LA SECUENCIA CON LA CUAL HIBRIDIZA
EL MERO POR LO QUE AL REALIZAR UNA ELECTROFORESIS EN GEL DE
ACRILAMIDA AL 7.5% CON LA REACCIÓN DE DIGESTIÓN, SE ESPERABA OB--
SERVAR UNA BANDA RADIOACTIVA DE 254 P.B. SI EL TEMPLADO HABÍA SI-
DO REPARADO Y POR LO TANTO SE HABÍA FORMADO UN FRAGMENTO DE DOBLE
CADENA.

ESTA BANDA SE OBSERVA EN LA FIGURA 19; LA BANDA DEL CON-
TROL DE PESO MOLECULAR NO SE OBSERVA YA QUE SE UTILIZÓ UN DNA ---
(P Δ 37 DIGERIDO CON HIND III Y Eco RI) SIN MARCAR.

13. ELIMINACIÓN DE LA CADENA SENCILLA.

EN ESTE CASO SE UTILIZÓ LA NUCLEASA MUNG BEAN, QUE ES -
UNA ENZIMA QUE DEGRADA DNA DE CADENA SENCILLA EN FORMA ESPECÍFI-
CA Y QUE ES MENOS SEVERA QUE LA NUCLEASA SI.

PARA ESTA DIGESTIÓN A .75 μ G DE DNA REPARADO, SE LE ADI-
CIONÓ UNA UNIDAD DE NUCLEASA MUNG BEAN Y SE INCUBÓ A 25°C. A --
DIFERENTES TIEMPOS SE SACARON VARIAS ALÍCUOTAS QUE FUERON INMEDIA
TAMENTE EXTRAÍDAS CON FENOL Y CLOROFORMO PARA POSTERIORMENTE PRE-
CIPITAR EL DNA.

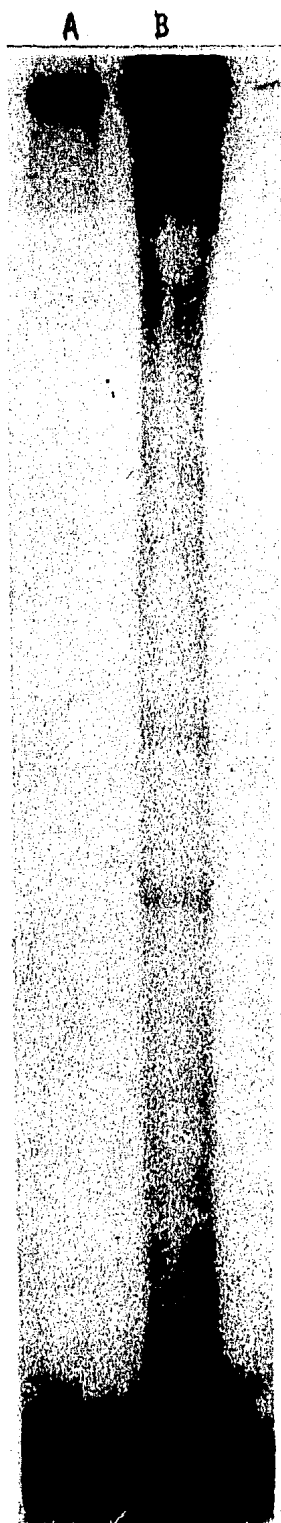


FIGURA NOM. 19 MONITOREO DE LA REACCIÓN
DE REPARACIÓN.

- A) REACCIÓN DE REPARACIÓN SIN LIGASA, -
DIGERIDA CON Eco RI Y HIND III.
- B) REACCIÓN DE REPARACIÓN CON LIGASA, -
DIGERIDA CON Eco RI Y HIND III.

CON ESTE DNA SE TRANSFECTÓ UNA CEPA DE E. COLI OBTENIÉNDOSE LOS SIGUIENTES RESULTADOS:

RESULTADO DE LA TRANSFECCIÓN CON DNA TRATADO CON LA NUCLEASA MUNG-BEAN.

TIEMPO DE INCUBACION.	CANTIDAD Y TIPO DE DNA	NÚM. DE PLACAS - OBTENIDAS EN LA TRANSFECCION.
0 ¹	100 NG DNA REPARADO	500
0 ²	100 NG DNA REPARADO	500
1 MIN.	100 NG DNA REPARADO	300
10 MIN.	100 NG DNA REPARADO	100
30 MIN.	100 NG DNA REPARADO	90
60 MIN.	100 NG DNA REPARADO	90
0 ¹	100 NG DNA MELLADO	800
30 MIN.	100 NG DNA MELLADO	850
60 MIN.	100 NG DNA MELLADO	700
0 ¹	100 NG DNA DE CADENA SENCILLA	600
30 MIN.	100 NG DNA DE CADENA SENCILLA	20
60 MIN.	100 NG DNA DE CADENA SENCILLA	NINGUNA

(.2 UNIDADES DE ENZIMA POR TUBO).

DONDE 0¹ ES EL TIEMPO ANTES DE AGREGAR LA ENZIMA Y 0² ES EL TIEMPO INMEDIATAMENTE DESPUÉS DE AGREGAR LA ENZIMA,

TAMBIÉN SE UTILIZÓ LA PROTEÍNA 32 CODIFICADA POR EL BACTERIÓFAGO T4 DE E. COLI PARA ELIMINAR LA CADENA SENCILLA, YA QUE ESTA PROTEÍNA SE UNE ESPECÍFICAMENTE A DNA DE HÉLICE SENCILLA, IMPIDIENDO QUE ESTE DNA SEA TRANSFECTADO EN UNA CEPA DE E. COLI. (59).

SE PROBARON VARIAS CONCENTRACIONES DE PROTEÍNA 32 QUE FUERON MEZCLADAS CON DNA REPARADO E INCUBADAS A TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE 15 A 30 MINUTOS.

CON ESTE DNA SE TRANSFECTÓ LA CEPA JM101 Y LOS RESULTADOS SE MUESTRAN EN EL SIGUIENTE CUADRO:

RESULTADO DE LA TRANSFECCIÓN CON DNA TRATADO
CON PROTEINA 32.

CANTIDAD DE PROTEÍNA 32.	CANTIDAD Y TIPO DE DNA	NÚM. DE PLACAS - OBTENIDAS EN LA TRANSFECCIÓN.
400 NG	100 NG DNA REPARADO	600
800 NG	100 NG DNA REPARADO	100
1 200 NG	100 NG DNA REPARADO	80
400 NG	100 NG DNA MELLADO	800
800 NG	100 NG DNA MELLADO	800
1 200 NG	100 NG DNA MELLADO	780
400 NG	100 NG DNA CADENA SENCILLA	200
800 NG	100 NG DNA CADENA SENCILLA	15
1 200 NG	100 NG DNA CADENA SENCILLA	NINGUNA
1 200 NG	100 NG DNA DE DOBLE CADENA	SE LLENÓ TODA LA CAJA DE PLACAS.

.../

14. HIBRIDIZACIÓN CON COLONIA.

LAS PLACAS RESULTANTES DE LA TRANSFECCIÓN, SE CRECIERON EN UNA PLACA DE MICROTÍTULO CON 300 μ L DE MEDIO YT 2X Y 30 μ L DE CÉLULAS EN FASE EXPONENCIAL DE LA CEPA JM101 DURANTE 12 HORAS A 37°C. DESPUÉS DE ESTE TIEMPO LAS CÉLULAS INFECTADAS FUERON TRANSFERIDAS A UN FILTRO DE NITROCELULOSA (MILIPORE HATF090).

LAS CÉLULAS EN LOS FILTROS SE DEJAN CRECER SOBRE UNA CAJA DE MEDIO YT DURANTE 10 A 12 HORAS Y POSTERIORMENTE SON ANALIZADAS POR EL MÉTODO DE HIBRIDIZACIÓN EN COLONIA REPORTADO POR E. WALACE (60), EL CUAL BREVEMENTE CONSISTE EN LISAR LAS COLONIAS CON UNA SOLUCIÓN DE NaOH 0.5 M, NEUTRALIZAR LOS FILTROS CON TRIS HCL PH= 8 Y SECARLOS AL AIRE PARA DESPUÉS HORNEARLOS AL VACIO A 60°C DURANTE 2 HORAS. POSTERIORMENTE SON PREHIBRIDIZADOS EN DENHART'S 5 X A -- 60°C DURANTE 1 HORA.

LOS FILTROS SE HIBRIDIZAN CON EL OLIGONUCLEÓTIDO MARCADO CON P³² (5 PM) ALREDEDOR DE 3 NG/ML EN NET 6 X (NET 1X ES 0.15 -- M NaCl, 0.015 TRIS HCL PH = 7.5, 0.001 M C.D.T.A.). DENHART'S 5 X, SULFATO DE DEXTRANO 10% Y NP40 AL 0.5% A TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE 4 HORAS.

LOS FILTROS FUERON LAVADOS CON 6 X SSC 3 VECES A TEMPERATURA AMBIENTE INICIALMENTE Y LA TEMPERATURA SE INCREMENTÓ POSTERIORMENTE HASTA LLEGAR A 45°C. DE CADA LAVADO SE OBTUVO LA AUTO--

.../

RRADIOGRAFÍA DE LOS FILTROS.

POR ESTE MÉTODO SE ANALIZARON 230 COLONIAS Y NINGUNA DIO RESULTADO POSITIVO.

VI. DISCUSION.

1. VECTOR UTILIZADO.

EL FAGO M13 MP7, COMO SISTEMA EMPLEADO PARA MONTAR LA MUTAGÉNESIS SITIO ESPECÍFICA PRESENTA UNA SERIE DE VENTAJAS. DENTRO DE ESTAS QUIZÁS LA MÁS IMPORTANTE ES QUE APARTIR DE CÉLULAS DE E. COLI INFECTADAS CON ESTE FAGO SE PUEDE OBTENER DNA DE CADENA SENCILLA EN FORMA RÁPIDA Y FÁCIL, CENTRIFUGANDO SIMPLEMENTE LAS CÉLULAS, YA QUE EL FAGO EXCRETADO AL MEDIO DE CULTIVO QUEDA EN EL SOBRENADANTE EN UN ELEVADO TÍTULO (10^{12} FAGOS POR ML), Y ES POSIBLE PURIFICAR EL DNA DEL FAGO POR MEDIO DE VARIOS PASOS SIMPLES.

POR OTRO LADO REALIZAR SECUENCIAS DE DNA POR EL MÉTODO DE "DIDEOXI" CON ESTE FAGO RESULTA MUY SENCILLO, POR LO QUE FUE POSIBLE SECUENCIAR RÁPIDAMENTE NO SÓLO EL SUSTRATO PARA LA MUTAGÉNESIS, SINO TAMBIÉN ALGUNAS DE LAS CLONAS POSITIVAS OBTENIDAS POR HIBRIDIZACIÓN EN PUNTO.

POR OTRA PARTE ESTE SISTEMA (M13 MP7) PRESENTA LA DESVENTAJA DE QUE EL DNA DE CADENA SENCILLA NO REPARADO TRANSFECTA CON GRAN EFICIENCIA, POR LO QUE ES NECESARIO ELIMINAR ESTE DNA COMO SE DISCUTIRÁ ADELANTE.

.../

2. CONDICIONES DE REPARACIÓN.

LAS CONDICIONES DE REPARACIÓN QUE INICIALMENTE SE UTILIZARON FUERON LAS REPORTADAS POR MIYADA (56). EL UTILIZÓ EL M13 MP2 Y UN OLIGONUCLEÓTIDO DE 18 BASES PARA PRODUCIR DELECCIONES ESPECÍFICAS EN EL PROMOTOR ARABAD DE E. COLI.

POSTERIORMENTE, SMITH PUBLICÓ UN PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA MUTAGÉNESIS DIRIGIDA USANDO VECTORES DERIVADOS DE M13; ESTE ES UN MÉTODO GENERAL REPORTADO TANTO PARA OLIGONUCLEÓTIDOS PEQUEÑOS (8 BASES) COMO PARA OLIGONUCLEÓTIDOS MÁS GRANDES (20 BASES). EL OLIGONUCLEÓTIDO UTILIZADO PARA PRODUCIR LA DOBLE DELECCIÓN A PESAR DE SER DE 15 BASES, DEBIDO A SU RIQUEZA EN A Y T, PRESENTA UNA BAJA TEMPERATURA DE HIBRIDIZACIÓN POR LO QUE SE DECIDIÓ CAMBIAR A LAS CONDICIONES PROPUESTAS POR SMITH ET AL (61).

LAS DIFERENCIAS ENTRE UN MÉTODO Y OTRO, SE LIMITAN A LA TEMPERATURA DE HIBRIDIZACIÓN, AL TIPO DE SALES UTILIZADAS EN LOS BUFFERS Y A LA CONCENTRACIÓN DE NaCl UTILIZADA EN EL BUFFER DE HIBRIDIZACIÓN.

UTILIZANDO EL 15 MERO Y LAS CONDICIONES DE SMITH SE PUDO OBTENER UNA MAYOR EFICIENCIA DE REPARACIÓN QUE FUE MONITOREADA DE LA MISMA MANERA PROPUESTA POR MIYADA.

3. SÍNTESIS Y VERIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL OLIGONUCLEÓTIDO.

LOS RENDIMIENTOS ALCANZADOS EN LA SÍNTESIS DEL OLIGONUCLEÓTIDO UTILIZADO PARA CREAR EL SITIO DE XBA I, NO FUERON BUENOS; SIN EMBARGO, SE OBTUVIERON ALREDEDOR DE 2 500 P MOLAS QUE ES UNA CANTIDAD SUFICIENTE PARA HACER BASTANTES EXPERIMENTOS (APROXIMADAMENTE 50).

EL MERO 19 MERO PRODUJO UNA SECUENCIA DE DNA ACEPTABLE UTILIZANDO COMO TEMPLADO EL M13 MP7 - Δ CM LO CUAL ES UNA PRUEBA FEFACIENTE DE QUE EL OLIGONUCLEÓTIDO SIRVE COMO PRÍMERO ESPECÍFICO Y QUE PUEDE SER EMPLEADO PARA REALIZAR UNA REACCIÓN DE REPARACIÓN.

LAS CONDICIONES DE REPARACIÓN EMPLEADAS EN ESTE CASO --- TAMBIÉN FUERON LAS REPORTADAS POR SMITH.

4. MONITOREO DE LA REACCIÓN DE REPARACIÓN.

EL MONITOREO DE LA REPARACIÓN POR GEL PRESENTA CIERTAS - LIMITACIONES, COMO QUE LA FORMACIÓN DE DNA DE DOBLE CADENA, SEGUIDA DE UNA ELECTROFORESIS EN GEL, NO PERMITE DARSE CUENTA DE LA -- INTEGRIDAD FÍSICA DEL DNA. LA POLIMERASA DEPENDIENTE DE DNA, --

.../

PUEDE TENER ABORCIONES POR LO QUE, ES PROBABLE OBTENER UNA SERIE DE MOLÉCULAS DE DOBLE CADENA A LAS QUE LES FALTAN ALGUNAS BASES.- ÉSTAS MOLÉCULAS PUEDEN ENMASCARAR LA FORMACIÓN DE VERDADERAS MOLÉCULAS DE DOBLE CADENA COVALENTEMENTE CERRADAS, YA QUE BAJO LAS -- CONDICIONES USADAS EN ESTE GEL NO PUEDEN DIFERENCIARSE.

POR OTRA PARTE, EL MÉTODO NO ES ÚTIL CUANDO SE UTILIZA - DNA DE DOBLE CADENA DESDE EL INICIO DE LA REPARACIÓN. POR ESTAS RAZONES SE DECIDIÓ IMPLEMENTAR UN NUEVO MÉTODO PARA SEGUIR LA FORMACIÓN DE DNA DE DOBLE CADENA. LA UTILIZACIÓN DEL OLIGONUCLEÓTI- DO MARCADO RADIOACTIVAMENTE EN LA REACCIÓN DE REPARACIÓN, NOS --- PERMITE OBSERVAR DESPUÉS DE LA DIGESTIÓN DE LA REACCIÓN Y LA --- ELECTROFORESIS DE ÉSTA, UNA BANDA RADIOACTIVA EN UNA AUTORADIO-- GRAFÍA. ESTA BANDA RADIOACTIVA PROVIENE ÚNICAMENTE DE AQUELLAS MOLÉCULAS DE DOBLE CADENA REPARADAS A PARTIR DE OLIGONUCLEÓTI- DO Y QUE ESTÁN COVALENTEMENTE CERRADAS.

5. ELIMINACIÓN DE LA CADENA SENCILLA REMANENTE.

LA ELIMINACIÓN DE LA CADENA SENCILLA RESULTA IMPORTANTE PARA DISMINUIR EL "FONDO" DE MOLÉCULAS TIPO SILVESTRE, PARA LO -- CUAL SE USARON CONDICIONES DILUIDAS DE LA NUCLEASA SI PORQUE ESTA ENZIMA ES CAPAZ DE DEGRADAR EL DNA DE DOBLE CADENA A PARTIR DE -- UNA MELLA O RUPTURA DEL ENLACE FOSFODIESTER PRESENTE EN ESTE DNA,

AL HIBRIDIZAR EL OLIGONUCLEÓTIDO CON EL TEMPLADO, 2 BASES NO SE APAREAN (LAS QUE SE VAN A MUTAR) Y FORMAN "2 BURBUJAS" A PARTIR DE LAS CUALES LA NUCLEASA SI PUEDE EMPEZAR A DIGERIR -- EL DNA REPARADO.

ESTA FUE LA RAZÓN POR LA QUE NO SE AUMENTÓ LA CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA SI A PESAR DE QUE LA ELIMINACIÓN DE DNA DE CADENA SENCILLA EN EL CASO DE LA DOBLE DELECCIÓN NO FUE CLARA.

AL CONTAR EN EL LABORATORIO CON LA NUCLEASA MUNG BEAN, SE DECIDIÓ UTILIZAR DICHA ENZIMA. ESTA, A DIFERENCIA DE LA SI, NO RECONOCE MELLAS EN EL DNA Y SÓLO ES CAPAZ DE DEGRADAR EL DNA CUANDO ÉSTE PRESENTA UN HUECO POR LA PÉRDIDA DE VARIAS BASES. (62).

CON ESTA ENZIMA SE PUDO ENCONTRAR LAS CONDICIONES EN -- LAS CUALES SE ELIMINA TOTALMENTE EL DNA DE CADENA SENCILLA, SIN UNA APARENTE DEGRADACIÓN DEL DNA DE DOBLE CADENA CON UNA MELLA.

LA PROTEÍNA 32, DEL FAGO T4 FUE PROBADA COMO UN MÉTODO MÁS PARA LA ELIMINACIÓN DE LA CADENA SENCILLA. LA PROTEÍNA 32 FUE PROPORCIONADA POR RICARDO ROSALES Y LA IDEA UTILIZAR ÉSTA -- FUE POR ANALOGÍA A UN TRABAJO REPORTADO EN EL CONGRESO DE MUTAGÉNESIS "in vitro". (COLD SPRING HARBOR, NEW YORK, MAYO DE 1982). (63).

.../

EL USO DE LA PROTEÍNA 32 RESULTÓ MEJOR QUE LA ENZIMA -- MUNG BEAN YA QUE ES UN MÉTODO MÁS RÁPIDO Y NO SE REQUIERE DE UNA POSTERIOR MANIPULACIÓN QUE PUDIERA SER FUENTE DE PÉRDIDA O DETE-- RIORO DEL DNA.

CON LA PROTEÍNA 32 TAMBIÉN SE ENCONTRARON CONDICIONES - EN QUE EL DNA DE CADENA SENCILLA NO TRANSFECTA Y, SIN EMBARGO, - EL DNA DE DOBLE CADENA CON UNA MELLA PARECE NO TENER NINGUNA DIS-- MINUCIÓN EN SU EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN.

TODAS LAS TRANSFECCIONES REALIZADAS CON EL DNA REPARA-- DO, TRATADO CON LAS ENZIMAS S1 Y MUNG BEAN, ASÍ COMO EL DNA TRA-- TADO CON PROTEÍNA 32, FUERON EFICIENTES.

6. DETECCIÓN DE LA CLONA MUTANTE POR HIBRIDIZACIÓN.

PARA LA PRUEBA DE HIBRIDIZACIÓN EN PUNTO, MIYADA UTILI-- ZA 1 μ L DE SOBRENADANTE (CON FAGO) DE CADA UNA DE LAS PLACAS POR ANALIZAR. EL TÍTULO DEL FAGO QUE NOSOTROS OBTENÍAMOS DES--- PUÉS DE INFECTAR CÉLULAS DE LA CEPA JM101 ERA MENOR QUE EL ----- EMPLEADO POR MIYADA, POR LO QUE AÚN ANTES DE REALIZAR LOS LAVA-- DOS, OBSERVÁBAMOS Poca HIBRIDIZACIÓN. POR ESTA RAZÓN, SE DECI-- DIÓ EMPLEAR EN VEZ DE FAGO, EL DNA DE CADA PLACA PRECIPITADO CON PEG, LO CUAL NOS PERMITÍA FIJAR UNA MAYOR CANTIDAD DE DNA AL FIL-- TRO Y POR LO TANTO OBTENER UNA MAYOR HIBRIDIZACIÓN INICIALMENTE.

.../

UTILIZAR DNA DE FAGO TIENE LA DESVENTAJA DE REPRESENTAR UN GASTO MAYOR DE MATERIAL Y TIEMPO YA QUE ES NECESARIO CULTIVAR FAGO DE CADA PLACA POR SEPARADO, CENTRIFUGAR LAS CÉLULAS, DECAN--TAR EL SOBRENADANTE EN UN TUBO, ADICIONAR PEG, VOLVER A CENTRI--FUGAR, DECAN--TAR Y RESUSPENDER.

POR ESTAS RAZONES SE DECIDIÓ CAMBIAR Y UTILIZAR LA ---PRUEBA DE HIBRIDIZACIÓN EN COLONIA QUE ES UTILIZADA YA EN OTROS LABORATORIOS (DR. H. HEYNEKER, COMUNICACIÓN PERSONAL).

EN LA HIBRIDIZACIÓN EN COLONIA LAS CÉLULAS INFECTADAS - SON CRECIDAS SOBRE EL FILTRO DE NITROCELULOSA HASTA OBTENER UNA COLONIA, EN DONDE CADA CÉLULA CONTIENE VARIAS MOLÉCULAS DE DNA - DE FAGO EN FORMA REPLICATIVA Y SECRETA GRAN NÚMERO DE FAGO AL -- EXTERIOR. DE ESTA MANERA SE ASEGURA TENER SUFICIENTE DNA PARA LA HIBRIDIZACIÓN CON EL OLIGONUCLEÓTIDO.

UNA DE LAS MEJORES VENTAJAS QUE PRESENTÓ ESTE MÉTODO -- FUE QUE, PARA TRANSFERIR LAS CÉLULAS INFECTADAS AL FILTRO, SE -- USÓ UNA PLACA DE MICROTÍTULO A LA QUE SE PEGARON CLAVOS EN EL - CENTRO DEL POZO, CON LA CUAL SE PUDO TRANSFERIR RÁPIDAMENTE LAS CÉLULAS INFECTADAS CRECIDAS EN OTRA PLACA DE MICROTÍTULO A VA---RIOS FILTROS. PARA ESTERILIZAR ESTA PLACA CON CLAVOS, SIMPLE--MENTE SE FLAMEA CON ETANOL.

.../

ESTE REPLICADOR DE COLONIAS SIGNIFICÓ UN GRAN AHORRO DE TIEMPO Y MATERIAL.

EN EL CASO DE LA DOBLE DELECCIÓN SE OBTUVO UN RESULTADO INTERESANTE, AUNQUE NO FUE EL ESPERADO.

AL LEER LA SECUENCIA DE DNA OBTENIDA DE LAS PLACAS POSITIVAS, SE ENCONTRÓ QUE HABÍA OCURRIDO UNA DUPLICACIÓN DE LA SECUENCIA BLANCO A MUTAR.

AUNQUE SE ESPERABA QUE LA DOBLE DELECCIÓN DISMINUYERA LA FUERZA DEL PROMOTOR NO SABÍAMOS SI ÉSTA ANULARA COMPLETAMENTE SU ACTIVIDAD. UNA POSIBLE EXPLICACIÓN A ESTE FENÓMENO DE DUPLICACIÓN ES QUE LA DISMINUCIÓN DE LA DISTANCIA ENTRE -35 Y -10 RESULTARA SER LETAL Y POR ESO NO FUERA POSIBLE ENCONTRAR LA MUTACIÓN.

POR LO QUE RESPECTA A LA HIBRIDIZACIÓN FUENTE DE LA DUPLICACIÓN, PARECE FACTIBLE PROPONER UN EFECTO COOPERATIVO DE LA HIBRIDIZACIÓN ADYACENTE DE DOS MOLÉCULAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS PERFECTAMENTE CONTIGUAS. EL EFECTO CONFORMACIONAL DE LA UNIÓN DE UN OLIGONUCLEÓTIDO PUEDE ESTABILIZAR LA UNIÓN DEL OTRO.

ESTA ESTABILIDAD PERMITIÓ QUE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS AUNQUE NO ERAN TOTALMENTE COMPLEMENTARIOS, NO SE DESPEGARAN CON LOS LAVADOS CAPACES DE ELIMINAR LA ASOCIACIÓN DE UNA SÓLA MOLÉCULA.

.../

AL OBTENER ESTE RESULTADO Y ESPECULAR QUE QUIZÁS NUNCA FUERA POSIBLE OBTENER UNA DOBLE DELECCIÓN EN ESTA REGIÓN DEL PROMOTOR, SE DECIDIÓ CAMBIAR DE SISTEMA PARA MONTAR LA TÉCNICA DE - MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.

CREAR UN SITIO PARA LA ENZIMA XBA I INMEDIATAMENTE --- ANTES DEL 1ER. CODÓN DE TRADUCCIÓN DE LA ACETILTRANSFERASA DE -- CLORANFENICOL, TIENE LA VENTAJA DE SER UNA MUTACIÓN SILENCIOSA; - ES DECIR, NO SE ESPERA PRODUCIR NINGÚN CAMBIO EN LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA, NI EN SU EXPRESIÓN; ADEMÁS DE QUE ESTA MUTACIÓN ES ÚTIL PARA EL LABORATORIO DE INGENIERÍA GENÉTICA.

DESAFORTUNADAMENTE PARA ESTE CASO DEL SITIO DE XBA I - NO SE OBTUVO NINGUNA CLONA POSITIVA EN LA PRUEBA DE HIBRIDIZA--- CIÓN. DEBIDO A QUE EL MONITOREO DE LAS REACCIONES DE REPARA--- CIÓN Y ELIMINACIÓN DEL FONDO SILVESTRE, MOSTRÓ QUE AMBAS MANIPULACIONES FUERON SATISFACTORIAS, SE PIENSA QUE EL PROBLEMA DE LA OBTENCIÓN DE RESULTADOS NEGATIVOS ESTÁ EN EL MÉTODO DE DETECCIÓN.

MONTAR LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE HIBRIDIZACIÓN, ASÍ CO MO LA TEMPERATURA ADECUADA DE LOS LAVADOS, SE FACILITARÍA MUCHO SI SE CONTARA CON UN CONTROL POSITIVO; PERO DEBIDO A QUE POR EL MOMENTO NO SE CUENTA CON ÉSTE, EXISTE LA OPCIÓN EN ESTE CASO PAR TICULAR DEL SITIO DE XBA I, DE SELECCIONAR LAS CLONAS MUTANTES POR UN MÉTODO ALTERNATIVO, APROVECHANDO QUE LAS MOLÉCULAS MUTAN-

.../

TES PRESENTAN EL FENOTIPO DE DIGERIRSE CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN XBA I.

ESTE MÉTODO ALTERNATIVO CONSISTE EN OBTENER DNA DE DOBLE CADENA RF PROVENIENTE DE TODAS LAS PLACAS, OBTENIDAS AL TRANSFECTAR LA MEZCLA DE REPARACIÓN, TRATADA CON LA NUCLEASA MUNG BEAN Y LA PROTEÍNA 32. SE ESPERA QUE ALGUNAS MOLÉCULAS DE ESTE DNA RF LLEVEN LA MUTACIÓN; POR LO QUE, AL DIGERIR ÉSTE CON LA ENZIMA XBA I Y CORRER UNA ELECTROFORESIS, SE PUEDAN SEPARAR LAS MOLÉCULAS DE DNA DE DOBLE CADENA SILVESTRE, DE LAS MOLÉCULAS MUTADAS, YA QUE ÉSTAS MIGRARÁN COMO DNA DE DOBLE CADENA LINEAL.

POSTERIORMENTE, SI SE ELUYE ESTE DNA LINEAL, AUNQUE NO SEA APRECIABLE AL TEÑIRLO CON BROMURO DE ETIDIO Y BAJO LA LUZ ULTRAVIOLETA, PUEDE SER DESPUÉS LIGADO Y USADO PARA TRANSFECTAR LA JM101.

PARA DETERMINAR SI ALGUNAS DE LAS PLACAS RESULTANTES CONTIENEN EL SITIO DE XBA I, SE ANALIZARÁN POR EL MÉTODO DE MICROENSAYO DE DNA Y POSTERIORMENTE SE PUEDE CONFIRMAR CON UNA SECUENCIA DE DNA.

.../

VII. REFERENCIAS.

1. WATSON, J.D. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL GEN 3RA. ED. - FONDO EDUCATIVO INRRAMERICANO, S.A.- MÉXICO, 1978.
2. CALENDAR, R. Y STENT, G.S. MOLECULAR GENETICS ---- 2DA. ED. FREEMAN, W.H., SAN FRANCISCO - 1978.
3. GARDNER, E.J. PRINCIPLES OF GENETICS 5TA. ED. 1975 COPYRIGHT BY WILEY AND SONS, INC.
4. LEHNINGER, A.L. BIOCHEMISTRY 2DA. ED. WORTH PUBLISHERS, INC. NEW YORK 1975.
5. BIRGE, E.A. BACTERIAL AND BACTERIOPHAGE GENETICS.- AN INTRODUCTION. SPRINGER-VERLAG, --- NEW YORK, U.S.A. (1981).
6. DAVIS, D.B.; DULBECCO R.; EISEN, N.H.; GINSBERG, S.H.- Y WOOD W.B. MICROBIOLOGY 2DA. ED. HARPER INTERNATIONAL EDITION NEW --- YORK-LONDON 1973.
7. GOODENOUGH, URSULA. GENETICS. SAUNDERS COLLEGE. - PHILADELPHIA, E.U.A. (1978).

8. SHAPIRO, A. Y COHEN, N.S. TRANSPOSABLE GENETIC ---
ELEMENTS SCIENTIFIC AMERICAN.
9. HUTCHISON, C.A.; PHILLIPS, S. Y EDGELL, M.H. GILLAM;
SMITH, M. J.BIOL. CHEM. 253, 6551-
60 (1978).
10. RAZIN, A.; HIROSE, T.; ITAKURA K. Y RIGGS, A.D. -
PROC NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 75, 4268
(1978).
11. GILLAM, S. Y SMITH, M. GENE 8, 99-106 (1979).
12. WALLACE, R.B.; JOHNSON, P.F., S. TANAKA, M. SCHOLD; -
ITAKURA, J. ABELSON. SCIENCE 209,-
1396 (1980).
13. SHORTLE, D.; DI MAIO, D. Y NATHANS, D. MUTAGÉNESIS
DIRIGIDA. ANN. REV. GENET. 1981. ---
15:265-94.
14. SHORTLE, D.; GRISAFI, P. BENKOVIC, J.S. Y BOTSTEIN, -
D. PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. -
VOL. 79, PP 1588-1592, MARCH 1982 -
GENETIC.

15. KHORANA, H.G. SCIENCE 203, 614 (1979).
16. GILLAM, S.; JAHNKE, P.; ASTELL, C.; PHILLIPS, S.; --
HUTCHISON, A. Y SMITH, M. NUCLEIC
ACID RESEARCH 6, 2973 (1979).
17. KABACKNIK, M.; POTAPOV, V.K.; SHABAROVA, Z.A. Y PRO-
KOFIEV, M.A. DOKLADY AHAD NAUK, -
SSSR 201, 858 (1971).
18. ITAKURA, K; BAHL, C.P. Y NARANG, S.A. CAN. J. CHEM
3649 (1973).
19. BROKA, C.; HOZUMI, T.; ARENTZEN, R. E ITAKURA, K. -
NUCLEIC ACIDS RESEARCH 8 5461 (1980).
20. MIYOSHI, K.; ARENTZEN, R.; HUANG, T. E ITAKURA, K. -
NUCLEIS ACIDS RESEARCH 8 5507 (1980).
21. GOEDDEL, D.; HEYNEKER, H.; HOZUMI, T.; ARENTZEN, R.;-
ITAKURA, K.; YANSURA, D.; S, M.; -
MIOZZARI, G.; CREA, R. Y BURG, ---
P.H. (1979) NATURE 282 4-548.
22. KAWASHIMA, E.H.; GADEC, T. Y CARUTHERS, P (1977)
BIOCHEMISTRY 16: 4209-42

- .../
23. WING, R.; DREW, H.; TAKANO, T.; BROKA, C.; TANAKA, S.;
ITAKURA, K. Y DICKERSON, R. (1980)
NATURE, 287 : 755-758.
24. AGARWAL, A.; BRUMSTEDT, J. Y NOYES, B. J. BIOL ---
CHEM. 256 : 1023-1028 (1981).
25. ITAKURA, K. Y RIGGS, A. (1978) SCIENCE VOL. 29;
1401-1405.
26. GILLAM, S. Y SMITH, M. (1979) GENE 8: 81-97.
27. KLENOW, H. Y HENNINGSEN, I. PROC. NATL. ACAD. SCI.
U.S.A., 65 (1970) 168-175.
28. WALLACE, B.; JOHNSON, M.; HIROSE, T.; HIYAKE, T.; ---
KAWASHIMA, K. E ITAKURA, K. (1981)
NUCLEIC ACID RESEARCH. VOL. 9, --
4; 879-894.
29. ROSSI, J.J.; SOBERÓN, X.; MARUMOTO, Y.; Mc.MALTON, J.
E ITAKURA, R. PROC. NATL. ACAD. --
SCI. U.S.A. VOL. 80, PP 3203-3207, --
JUNE 1983.
- .../

30. ZINDER, D.N. Y BOCKE, D.J. GENE, 19 (1982) 1-10.
31. RAZIN, A.; HIROSE, T.; ITAKURA K. Y RIGGS, A.D. - - -
PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 75, ---
4268 (1978).
32. GILLAM, S.; JAHNKE, C.; ASTELL, C.; PHILLIPS, S.; ---
HUTCHISON, C.A.; SMITH, M. (1979) -
NUCL. ACIDS. RES. VOL. 6 NÚM. 9 -----
2973-2985.
33. GILLAM, S.; ASTELL, C.R. Y SMITH, M. GENE 12 (1980)
129-137.
34. WASYLYK, B.; DERBYSHINE, R.; GUY, A.; NOLKO, D.; ----
ROGET, A.; TEOVLE, R. Y CHAMBON, P. -
(1980) PROC. NAT. ACAD. SCI. U.S.A.
77, 7024-7028.
35. MESSING, J. Y GRONENBORN, B.: THE FILAMENTOUS PHAGE
M13 AS A CARRIER DNA FOR OPERON FU---
SIONS IN VITRO, IN DENHARDT, D.T.; --
DRESSLER, D. Y RAY, D.S. (EDS.) THE
SINGLE-STRANDED DNA PHAGES. COLD ---
SPRING HARBOR LABORATORY, COLD SPRING
HARBOR, N.Y. 1978 PPP 449-453.

36. LANGLEY, R.E.; VILLAREJO, M.R.; FOWLER, A.V.; ZAME--
NHOF, P.J. Y ZABIN, I. PROC. NATL.
ACAD. SCI. U.S.A. 72 (1975) 1254---
1257.
37. SANGER, F.; NICKLEM, S. Y COULSEN, A.R. PROC. NATL.
ACAD. SCI. U.S.A. 74 (1977) -----
5463-5467.
38. GOLDBERGER, R.F. (1979) EN BIOLOGICAL REGULATION AN -
DEVELOPMENT. PLENUN PRESS. N.Y.
39. PRIBNOW, D. (1975) PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. --
VOL. 72; 784-787.
40. GAVIN, V.A. Y BUJARD, H. (1979). PROC. NATL. ACAD. -
SCI. U.S.A.; VOL. 76, 189-193.
41. HAWLEI, D.R. Y Mc.CLURE, W.R. (1982) JOURNAL OF ----
MOLECULAR BIOLOGY. 157. 493-525.
42. SIEBENLIST, U.; SIMPSGN, R. Y GILBERT, W. 1980. --
CELL, VOL. 20; 269-281.
43. GILLAM, S.; JAHNKE, P. Y SMITH, M. (1978) J. BIOL --
CHEM. 2532.

44. SOBERÓN, X.; ROSSI, J.; LARSON, G. E ITAKURA, K. (DATOS NO PUBLICADOS).
45. SOBERÓN, X.; ROSSI, J.J.; LARSON, G.P. E ITAKURA, K.-
A SYNTHETIC, CONSENSUS SECUENCE, PRO-
CARYOTIC PROMOTERS IS FUNCIONAL. --
PROMOTERS, STRUCTURE AND FUNTION, RO-
DRIGUEZ, R.L. Y CHAMBERLIN, M.J. ----
(EDS.) PRAEGER SICIENTIFIC, NEW YORK
(1982) PP 510-511.
46. ALTON, K.N. Y VAPNEK, D. NATURE VOL. 282 20/27 --
DECEMBER 1979.
47. TESIS. CUEVAS, M. ALBERTO. "SÍNTESIS DE POLINUCLEÓTI-
DOS MEDIANTE TÉCNICA ESTANDARIZADA".-
ADAPTADOR PARA LA ENDONUCLEASA BGL II.
UNAM. ENEP. "ZARAGOZA" 1983.
48. MESSING, V. RECOMBINANT DNA TECHNICAL BULLETIN NIH
PUBLICACIÓN NÚM. 79-99, 2 NÚM. 2 ---
(1979) 43-48.
49. LANGLEY, K.R.; VILLAREJO, M.R.; FOWLER, A.V.; ZAMENHOF
P. Y ZABIN, I. PROC,NATL, ACAD.SCI
U.S.A. 72 (1975) 1254-1257.

50. GREENE, P.J.; HEYNEKER, H.; BETLACH, M.; BOLIVAR, F.;
RODRÍGUEZ, R.; COVARRUBIAS, A.; BACK-
MAN, K. Y BOYER, H. (1978) NUCLEIC
ACIDS RESEARCH 5, 2773-2780.
51. ROSENBERG, M. Y COURT, D. (1978) ANN.REV. GENETIC.
13; 319-353.
52. BOLIVAR, F.; RODRÍGUEZ, R.; GREENE, P.; BETLACH, M.--
C.; HEYNEBER, H.; BAYER, H.; CROSP, J.
Y HALKOW, S. (1977) GENE, 3; 95-113.
53. BIRNBOIM, H. Y DOLY, J. (1979) NUCLEIC ACIDS RESEARCH
VOL. 7, 6: 1513-1523.
54. BETLACH, M.; HERSCHFELD, V.; CHOW, B.; BROWN, W.; --
GOODMAN, H. Y BOYER, H. (1979) FED.
PROD. 35: 2037-2043.
55. TESIS DE MAESTRÍA: SOBERÓN, X. USO DE VEHÍCULOS MO-
LECULARES DE CLORACIÓN Y DE SÍNTESIS
QUÍMICA DE POLINUCLEÓTIDOS PARA EL --
ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA. ---
UNAM. 1982.

56. MIYADA, G.C.; SOBERÓN, X.; ITAKURA, K. Y WILCOX, G.
GENE, 17 (1982) 167-177.
57. ZOLLER, M. J. Y SIMITH, M. NUCLEIC ACID RESEARCH -
VOL. 10 NÚM. 20 (1982),
58. BENTON, W.D. Y DAVIS, R.W. SCIENCE 196 (1977) ---
180-182,
59. BRUCE, M.A. Y FREY, L. NATURE VOL. 227 SEPTEMBER 26
1970.
60. WALLACE, B.; SCHAFFER, J.; MURPHY, J.; BONMER, J.; -
HIROSE, T. E ITAKURA, K. (1979) ---
NUCLEIC ACIDS RESEARCH. VOL. 6 ---
NÚM. 11, 3543-3557.
61. ZOLLER, M.J. Y SMITH, M. DETAILED PROCEDURES: OLI-
GONUCLEOTIDE DIRECTED SITE SPECIFIC -
MUTAGENESIS OF CLONED FRAGMENTS IN --
M13 VECTORS. DEPARTMENT OF BIOCHE--
MISTRY UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA
VANCOUVER, B.C. CANADA MAYO 1982.

62. KROEKER, W. D. Y KOWALSKI, D. BIOCHEMISTRY 17, ---
3236 (1978).
63. HAYRS, R. C.; LECLERE, J. E.: A SIMPLE METHOD USING
SINGLE-STRAND DNA BINDING PROTEIN TO
PREFERENTIALLY TRANSFECT REPLICATED -
DNA MOLECULES. ABSTRACTS OF PAPERS
PRESENTED AT THE MEETING ON IN VI--
TRO MUTAGENESIS DNA. MAY, 1982. ----
ARRANGED BY SCHLEIF, R. SHORTLED D. Y
WALLACE, B. COLD SPRING HARBOR, NEW
YORK.