

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA

APORTE A LA PURIFICACION DE GENES TRANSCRIPCIONALES DE VIRUS DE SIMIO 40
(SV40).

TESIS:

Que para obtener el Título de Biólogo.

PRESENTA:

RICARDO ROSALES LEDEZMA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*El trabajo experimental de esta Tesis, se
llevó a cabo en el Centro de Investigación
y de Estudios Avanzados del Instituto - -
Politécnico Nacional.*

Bajo la supervisión del

DR. PATRICIO GARIGLIO VIDAL.

Objetivo

El objetivo de este proyecto es tratar de montar una metodología, o una serie de sistemas para la purificación de un gen activo en transcripción. Para lo cual se emplea el sistema del virus de simio 40 (SV40) el cual se tiene bien caracterizado y es de fácil manejo.

El trabajar con este virus da la ventaja de tener más de una copia de un gen activo transcripcionalmente (5000 copias) y poderlos estudiar más fácilmente de todo el resto de copias no activas transcripcionalmente (el 99% restante) , además representa un sistema modelo, ya que tiene la misma estructura y composición de la Cromatina Eucariota.

Este trabajo representa parte de otros sistemas trabajados en el laboratorio para el aporte al estudio de mecanismos de transcripción y regulación en células de organismos eucariotas.

JUSTIFICACIONES:

El presente trabajo dará lugar al seguimiento de una línea de trabajo, la cual básicamente servirá para entender como se lleva a cabo el control de la regulación de la expresión genética en eucariotes de una manera muy directa; ya que, se tendrán los genes activos, separados de los genes inactivos transcripcionalmente.

Algunas evidencias que se tienen de la regulación de la transcripción, como son, cambios en los niveles de fosforilación en algunas subunidades de la RNA polimerasa II, acetilación en histonas, o la unión de otras proteínas a la RNA polimerasa (33), sólo se han obtenido por métodos indirectos, utilizando a toda la cromatina, ó fragmentos de DNA que contienen partes activas e inactivas transcripcionalmente (34) -; esto a dado lugar a interpretar con dificultad los resultados obtenidos (ver Introducción: Transcripción).

Por estas evidencias es necesario montar un sistema para poder caracterizar mejor a los genes activos e inactivos transcripcionalmente.

INDICE DE MATERIAS.

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Introducción | 2 |
| Medios y Reactivos | 32 |
| Células , Virus y Cepas | 36 |
| Material y Métodos | 37 |
| Obtención De Fago T ₄ | 38 |
| Titulación De Fago T ₄ | 39 |
| Infección De Bacterias <u>E. coli</u> B con ϕT_4 Para La Obtención De Proteína - 32 (P ₃₂) | 41 |
| Cuenta viable De Bacterias | 42 |
| Datos Sobre Las Columnas Usadas En La Purificación De P ₃₂ | 43 |
| Preparación De Resina DNA- Celulosa | 45 |
| Purificación De Proteína 32 | 48 |
| Cuantificación De Proteínas Por El Método De Bradford | 51 |
| Tratamiento De Bolsas De Diálisis | 52 |
| Preparación De Virus De Simio 40 (SV 40) | 53 |
| Titulación De Virus SV40 Por El Método De PFU (Unidades Formadoras De - Placa) | 54 |
| Obtención De DNA De SV40 Por El Método De Hirt | 56 |
| Purificación De DNA De Células CV ₁ y De SV40, Para Ensayos De Precipita- ción De Acidos Nucleicos | 57 |
| Determinación De DNA por El Método De Burton | 59 |
| Corte y Desnaturalización De DNA De SV40 | 61 |
| Calendario De Inmunizaciones | 62 |
| Preparación De Inyacción Para Conejos | 63 |
| Obtención y Preservación Del Suero | 64 |
| Técnica Ouchterlony | 65 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Purificación De Anticuerpos (Globulinas Totales De Suero: IgG) Libres- De RNAasas | 67 |
| Electroforésis De Proteínas En Geles De Poliacrilamida- SDS (Geles En - Gradiente) | 70 |
| Geles De Agarosa | 72 |
| Purificación De RNA ribosomal (RNAr) | 73 |
| Purificación De RNA polimerasa De <u>E. coli</u> RNAasa III ⁻ | 75 |
| Ensayo De Actividad De RNA polimerasa De <u>E. coli</u> | 78 |
| Síntesis De cRNA De SV40 | 79 |
| Purificación De Complejo De Transcripción De SV40 | 80 |
| Columna Sepharosa 4B Para Experimentos De Purificación De Complejos De Transcripción De SV40 | 82 |

Indice De Resultados:

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Parte 1 (General)..... | 83 |
| Perfil De Elución De LaColumna DeDNA-Celulosa Usada Para Purificar Proteí- na 32 | 88 |
| Cromatografía De Columna De DEAE-Celulosa Y Fosfo-Celulosa | 90 |
| Etapas De Purificación De Proteína 32 En Gel En Gradiente De Acrilamida .. | 92 |
| Ensayo Título De Anticuerpos Por Inmunodifusión | 94 |
| Purificación De Anticuerpos (Anti IgG- De Conejo). Por Proteína A -Sepha rosa | 96 |
| Purificación De Anticuerpos (Anti-P ₃₂) Por Proteína A- Sepharosa | 98 |
| Ensayo De Actividad De RNAasas En Anticuerpos Contra P ₃₂ y Proteína A- Se- pharosa | 100 |
| Espectro De Absorción De DNA De Timo De Ternera | 102 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Espectro De Absorción De t-RNA De Levadura | 104 |
| Curva Patrón Para Cuantificación De Proteína | 106 |
| Patrón De Sedimentación De $[^3\text{H}]$ -rRNA | 108 |
| Ensayo De Actividad De RNAasas Contaminantes en P_{32} Antes Y Despues De Pasar Por Sephadex G-50 | 110 |
| Precipitación De DNA Células CV_1 Con P_{32} , Anti P_{32} - Y Proteína A- Sepharosa..... | 112 |
| Precipitación De DNA De SV40 De Doble Y Simple Cadena. Con Suero Blanco Control | 114 |
| Precipitación DNA- CV_1 Con P_{32} , IgG anti P_{32} y anti IgG | 116 |
| Precipitación Diferencial De DNA De SV40 De Doble Y Simple Cadena Con P_{32} y Anti- P_{32} | 118 |
| Patrón De Sedimentación De cRNA De SV40 | 120 |
| Precipitación De $[^3\text{H}]$ -cRNA Con P_{32} , anti- P_{32} y Proteína A- Sepharosa | 122 |
| Precipitación Diferencial De $[^3\text{H}]$ -cRNA y $[^{14}\text{C}]$ DNA Con P_{32} , anti P_{32} Y anti - IgG | 124 |
| Patrón De Sedimentación De Cromatina Viral | 126 |
| Precipitación De Una Mezcla De $[^3\text{H}]$ cRNA Y Minicromosoma Con P_{32} -anti P_{32} -- Y anti IgG | 128 |
| Patrón De Sedimentación De $[^3\text{H}]$ Minicromosoma y $[^{32}\text{P}]$ Complejo De Transcripción De SV40 | 130 |
| Patrón De Elución De Complejo De Transcripción De SV40 Por Columna De Sepharosa 4B | 132 |
| | |
| <u>Parte II</u> . Intentos De Purificación De Complejo De Transcripción Viral De Sv40 | 134 |
| Tablas De Purificación De Complejo De Transcripción De SV40 | 138, 140 |
| Discusión Y Conclusiones | 141 |
| Apendice A (Abreviaturas) | 146 |

INTRODUCCION

Nosotros conocemos que el desarrollo de todos los organismos depende de la selectividad del prendido y apagado de genes individuales en algún tiempo particular de su desarrollo (77).

Para poder entender el desarrollo de los organismos eucariotas es necesario entender el control de la expresión de genes.

Y la manera de abordar el control de la expresión de genes es estudiarlos en cromosomas aislados, en estado de interfase; un estado en el cual los cromosomas se expresan por medio de la transcripción en RNAs mensajeros o RNAs premensajeros.

Durante los últimos 20 años se han estudiado los cromosomas aislados en interfase (llamada Cromatina) para el entendimiento del control celular a nivel molecular (79).

ESTRUCTURA DE LA CROMATINA

La Cromatina aislada de hígado de rata (11) y que sirve como modelo de la cromatina en general, posee una proporción de DNA a histonas (proteínas básicas que se encuentran unidas al DNA) de 1:1. También posee proteínas cromosomales no histónicas en una proporción de proteína a DNA de 0.6:1.

La Cromatina y en especial la de organismos eucariotas está organizada en pequeñas subunidades repetitivas de 100\AA de diámetro llamadas nucleosomas o cuerpos "nu" (27,62,63,80); formado cada nucleosoma por un octámero de histonas $(H_2A, H_2B, H_3, H_4)_2$ las cuales están rodeadas por 146 pares de bases de DNA y una pequeña porción de DNA de 40 a 60 pares de bases (llamado linker) -- que une un nucleosoma con otro.

Esta organización del DNA llevó tiempo en conocerse llegando a establecer que el DNA presenta una estructura repetitiva a lo largo de toda su longitud.

Estudios bioquímicos posteriores realizados por Lutter (1981) (72) muestra que digiriendo el DNA extraído de riñón de ternera con alguna de las enzimas DNAasa I, o DNAasa II, se obtienen sólo pequeñas subunidades llamadas el core del nucleosoma (formado por el octámero de histonas y los 146 pares de bases) y que no hay diferencia en los patrones de digestión (observados en geles de agarosa) obtenidos con ambas enzimas; concluyendo que no importa la enzima usada, y que el patrón obtenido en geles con la digestión enzimática depende únicamente de la estructura en que está organizado el DNA.

Más tarde algunos estudios (82) mostraron que el arreglo de nucleosomas en el DNA presentaba una localización al azar y que no importaba la secuencia de p.b* del DNA para que éstos se formaran; con lo cual se daba por sentada la verdadera estructura que presenta el DNA en los organismos vivos.

Después de esto y teniendo el conocimiento que cada tipo celular desempeña algunas funciones específicas, y posee las proteínas y enzimas necesarias para su funcionamiento, resultaron algunas preguntas: ¿cuáles serían las partes del genoma -- que funcionaría para cada célula? y, si ¿existiría alguna diferencia entre el arreglo conformacional del genoma o diferencias en la regulación de la expresión para cada tipo celular?.

* Ver Índice de abreviaturas.

Los estudios realizados hasta este entonces (1975) no mostraban cual era la estructura que presentan aquellas partes del DNA que se encuentran activas en transcripción y más aún las diferencias que existen entre aquellas partes activas e inactivas transcripcionalmente.

El estudio de la Cromatina eucariota representa un alto grado de dificultad ya que está empaquetado de una manera nucleosomal, y aún más estos nucleosomas se enrollan en una hélice formando fibras de 20 a 30 nm de diámetro (84). Fibras las cuales se compactan más y forman los llamados Cromosomas observados en una célula en estado de metafase.

Esta estructura probablemente representa la conformación natural de la cromatina inactiva transcripcionalmente. Se ha estimado por estudios bioquímicos el número de funciones que realiza algún tipo específico de célula y relacionándolo con el tamaño de su genoma, se ha encontrado que sólo una mínima fracción del genoma es activa en transcripción, siendo ésta aproximadamente el 1%.

Algunos autores han sugerido la presencia de nucleosomas en estos genes, pero quizá en una conformación alterada (64,97).

Realizando estudios en genes ribosomales en ovocitos de anfibio de Xenopus laevis con la enzima nucleasa micrococcal se postuló que aquellos genes transcripcionalmente activos deben presentar una estructura diferente a los genes inactivos, ya que la hidrólisis con la nucleasa presentaba una considerable diferencia entre ambas poblaciones de genes (genes ribosomales y el resto de la cromatina).

O sea que los genes activos (genes ribosomales) son más sensibles a la enzima que los genes inactivos, (83).

Los datos sobre estos estudios permitieron postular 2 hipótesis alternativas:

1) Los genes transcripcionalmente activos y que presentan una alta sensibilidad a la nucleasa micrococcal no deben presentar histonas y en su caso estar ausentes de nucleosomas; para que la enzima sea capaz de actuar.

Esta hipótesis es apoyada por estudios de microscopía electrónica en los cuales se muestra claramente que aquellos genes en estado transcripcional no presentan una estructura nucleosómica; y en su caso presentan una conformación más extendida (90, 30, 73, 93, 31, 89, 42), sin histonas en toda su longitud.

2) La segunda hipótesis postula que la digestión con enzimas no necesariamente significa la ausencia de nucleosomas y que probablemente el DNA en estado activo presenta las histonas unidas pero no tan firmemente como los genes inactivos. Y su conformación debe ser alterada, pero sólo en pequeña proporción para que éstos puedan ser transcritos. (72).

Para apoyar alguna de estas hipótesis más firmemente, se han utilizado algunos sistemas que estudian la organización del DNA en eucariotes; una de ellas, y empleada por muchos investigadores es el estudio del virus de simio 40 (SV40), que como se sabe infecta a células de riñón de mono.

Se ha demostrado por evidencias bioquímicas que este virus posee un genoma con estructura similar a la cromatina eucariota (21) ya que su DNA es circular y formado en pequeños cromosomas (llamados minicromosomas), constituido cada uno de ellos por aproximadamente 21 nucleosomas distribuidos al azar en toda su longitud. Además se tiene conocimiento que usa toda la maquinaria celular para su replicación, transcripción y posee todas las proteínas de la célula huésped como son las histonas (H_2A , H_2B , H_3 , H_4 y H_1) y no histonas como la RNA polimerasa II, (94).

Por estas características SV40 representa un sistema adecuado para estudiar los mecanismos de regulación a nivel genómico en organismos eucariotas.

SV40 (Tomado del DNA Tumor Viruses, 1981) (94).

Características generales:

a) El virus SV40 fue descubierto por Sweet y Hilleman en 1960 en cultivos de células de riñón de mono, del tipo usado para producir y probar vacunas contra la poliomielitis. Es un virus perteneciente a la familia de los Papovavirus, la cual está compuesta de 2 grupos de virus.

- | | |
|--------------------|----------------------|
| a) Grupo Polyoma | } Poliovirus SV40 |
| b) Grupo Papilloma | |

Composición:

Todos están compuestos únicamente de DNA y proteína, teniendo el primer grupo un DNA de peso aproximado de 3.6×10^6 daltones, constituyendo éste aproximadamente el 12% de la masa del virus.

b) Los virus del 2o. grupo (Papilloma) son más grandes que los virus del grupo Polyoma y contienen cerca de 5×10^6 daltones de peso en DNA, representando el 10% de la masa del virus.

DNA:

Compuesto de moléculas circulares superenrolladas que están formando complejos con proteínas (histonas y no histonas).

Presentando el genoma de SV40 5243 pares de bases de DNA- y teniendo 5 genes que codifican para 5 proteínas; VP_1 , VP_2 , VP_3 y 2 antígenos, T (antígeno T mayor) y t (antígeno t pequeño).

Las cantidades relativas de cada uno de los nucleótidos - en SV40 es de 41% dGMP-dCMP y 59% dAMP-dTMP.

Tamaño:

SV40 tiene un diámetro de $45 \mu m$ y un coeficiente de sedimentación de 240S.

Estructura de DNA:

Se ha demostrado bioquímicamente que el DNA de SV40 se encuentra in vivo en 3 formas estructurales diferentes, las cuales son fácilmente separables por gradientes de densidad- (de bromuro de etidio con cloruro de cesio) , y son las siguientes:

DNA Forma I .- Consta de DNA circular enrollado sobre sí mismo unas quince veces y se le encuentra básicamente en virus nativos o en células infectadas con el mismo virus.

DNA Forma II .- Este componente de DNA se forma al realizarle un pequeño corte al DNA, y fácilmente se obtiene de extracciones de DNA , se ha encontrado que se produce debido a la acción de algunas nucleasas contaminantes presentes en-

la extracción. Observándolo al microscopio electrónico presenta una forma circular.

Componente III .- Se obtiene de algunas preparaciones de DNA y es llamado componente lineal; se le encuentra en las células huésped durante el proceso de maduración, o bien encerrado en cápsulas virales de formas llamadas pseudoviriones.

Proteínas del virus SV40:

El 88% de la totalidad del virus SV40 está formado de proteína y el 12% de DNA. No se ha detectado en lo absoluto para este virus y algunos de la misma familia, como poliovirus, la presencia de lípidos o carbohidratos., (94).

Las proteínas de la cápside externa del virus SV40 son las siguientes:

| Proteína | Peso molecular (daltones) |
|-----------------|-----------------------------|
| VP ₁ | 45,000 |
| VP ₂ | 42,000 |
| VP ₃ | 30,000 |

Un análisis de las proteínas de SV40 por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS ha revelado la presencia de histonas en los virus, y se ha observado que estas proteínas son las mismas y codificadas por el genoma de la célula huésped; hecho que se demuestra con el siguiente experimento:

Cuando células de embrión de ratón o células CV₁ son marcadas con [³H] lisina y subsecuentemente son infectadas con SV40 o virus Polioma, estas proteínas básicas (histonas) - marcadas aparecen en la progenie del virus y son las mismas e idénticas a las de la célula huésped; con lo que se mues--

tra claramente la similitud entre el genoma de SV40 y el genoma de organismos eucariotas, (94).

Ciclo Lítico de SV40

Adsorción del virus

El ciclo comienza desde que la célula se pone en contacto con el virus, y se realiza colocando sobre células de riñón de mono al menos 10 virus por célula, de tal manera que la mayor parte de las células sean infectadas.

El virus se adsorve primeramente a la membrana celular y se forma subsecuentemente una vesícula pinocítica, con la cual el virus penetra a la célula. Posteriormente y por causas aún no bien conocidas la célula huésped pasa de un estado Go a G1 hasta la síntesis de DNA celular (fase S1) observándose que lo más importante que ocurre a este nivel es la síntesis de una gran variedad de enzimas como son la DNA polimerasa (forma α), y la DNA ligasa, a tal grado que llegan a producirse de 4 a 10 veces más que en una célula no infectada.

Posteriormente (10 hrs después de la infección) los mRNA y los rRNA son sintetizados en gran cantidad hasta llegar a un 30% en proporción más que en las células no infectadas, dando lugar a la formación subsiguiente de proteínas cromosomales -- histónicas y no histónicas.

Hay que hacer notar que todas estas actividades ocurren antes que la síntesis del DNA viral comience.

Sin embargo 20 hrs después de la infección la síntesis de DNA viral comienza a una gran velocidad , y a su vez ocasiona también la síntesis de DNA celular. Esto se lleva a cabo sin afectarse la síntesis de histonas, ya que se ha observado que

ésta prosigue. La causa de estos efectos en la célula se han -
investigado y se ha encontrado que son estimuladas por el pro-
ducto codificado por el gen A del virus, y que además se sabe
que es el antígeno T, (94).

Esto se ha demostrado ya que inyectando antígeno T a célu--
las sin infectar, estas comienzan a sintetizar rápidamente su-
DNA. Se ha encontrado también que mutantes en el gen A (Dele
ciones) o bien el antígeno T desnaturalizado por calor no causan la
estimulación de la síntesis de DNA en las células.

La infección de una gran variedad de virus se ha dividido -
en dos etapas debido a las proteínas producidas y promotores -
usados en las diferentes horas de infección, las cuales son Fa
se Temprana y Fase Tardía.

Fase Temprana:

En la fase temprana, de 10 a 12 hrs después de la infección,
aparecen en el núcleo, RNAs pertenecientes al virus y que cons-
tituyen solamente de 10 a 100 moléculas de RNA por cada 300,000
moléculas de RNA celular; en otras palabras de 10^{-5} a 10^{-6} del
total del RNA citoplásmico es RNA viral.

Estos se han analizado e identificado extrayendo el RNA to-
tal celular y poniéndolo a hibridizar con fragmentos de DNA (ob-
tenidos del virus SV40 por medio de enzimas de restricción) en
filtros de nitrocelulosa o analizando los híbridos formados en-
líquido por medio de la nucleasa S_1 o por la unión específica -
de cadenas lineales de ácidos nucleicos a hidroxapatita.

En la fase temprana, por medio de gradientes de sacarosa , -
se ha detectado sólomente un RNA de un coeficiente de sedimen-
tación de 19S ó 20S y con un peso de 0.7×10^6 daltones.

Este RNA codifica para la síntesis de 2 polipéptidos, el antígeno T mayor y t pequeño (de 90,000 y 22,000 daltones -- respectivamente).

Observando el mapa genético de SV40 (Figura A) nos damos cuenta que el antígeno T mayor se codifica de una región de 0.67 hasta 0.17 teniendo un Splicing (ver Apéndice A) en la región de 0.59-0.54 , y el antígeno t pequeño teniendo el mismo aminoácido terminal al T mayor, se codifica desde 0.67- hasta 0.54, teniendo un pequeño Splicing desde 0.55 a 0.54.

Todos estos RNAs y sus cortes se han detectado por medio de análisis en geles de agarosa y gradientes de sacarosa, y la subsiguiente hibridización con fragmentos de DNA de SV40.

Por otro lado se ha detectado por medio de anticuerpos específicos y marcados con fluoresceína, que el antígeno T mayor se encuentra localizado en el núcleo y que debe estar involucrado de alguna manera en algunas etapas durante el crecimiento de SV40. Algunas de estas etapas y funciones del antígeno T son las siguientes:

- a) Se ha observado que es responsable de la inducción de Kinasas deoxipirimidina celulares, ya que mutantes Tsa (región del gene A que codifica al antígeno T mayor) no las inducen.
- b) El gran antígeno T regula su propia síntesis (94) y la de otras proteínas codificadas por el virus; reduciendo de alguna manera la velocidad de síntesis de la cadena E de RNA (cadena de DNA que se transcribe en la parte temprana del virus).
- c) Se requiere su presencia para la iniciación de cada ciclo de replicación.

Esto se ha demostrado ya que las mutantes tsA (temperatura sensibles) muestran que inician y completan su replicación , pero no vuelven a reiniciar.

d) El polipéptido T mayor se requiere al menos indirectamente para iniciar experimentalmente la transcripción tardía.

e) El gran antígeno T se requiere sobre ciertas condiciones para el establecimiento y mantenimiento de la transformación de células normales.

Replicación del DNA

Observando el mapa de restricción del genoma de SV40, el origen de replicación se localiza cerca de 0.67 unidades de mapa (en el fragmento C que es cortado por Hind II/HindIII) y la terminación en la región cercana a 0.17 unidades de mapa (en el fragmento G de Hind II y Hind III).

La replicación del DNA comienza al finalizar la fase temprana y define el comienzo de la fase tardía. Se caracteriza principalmente por la gran cantidad de antígeno T que se ha sintetizado y que interviene para que dicha replicación se lleve a cabo, así como también las enzimas envueltas en dicho proceso se encuentran inducidas en niveles del orden de 3 a 10 veces más que en células sin infectar.

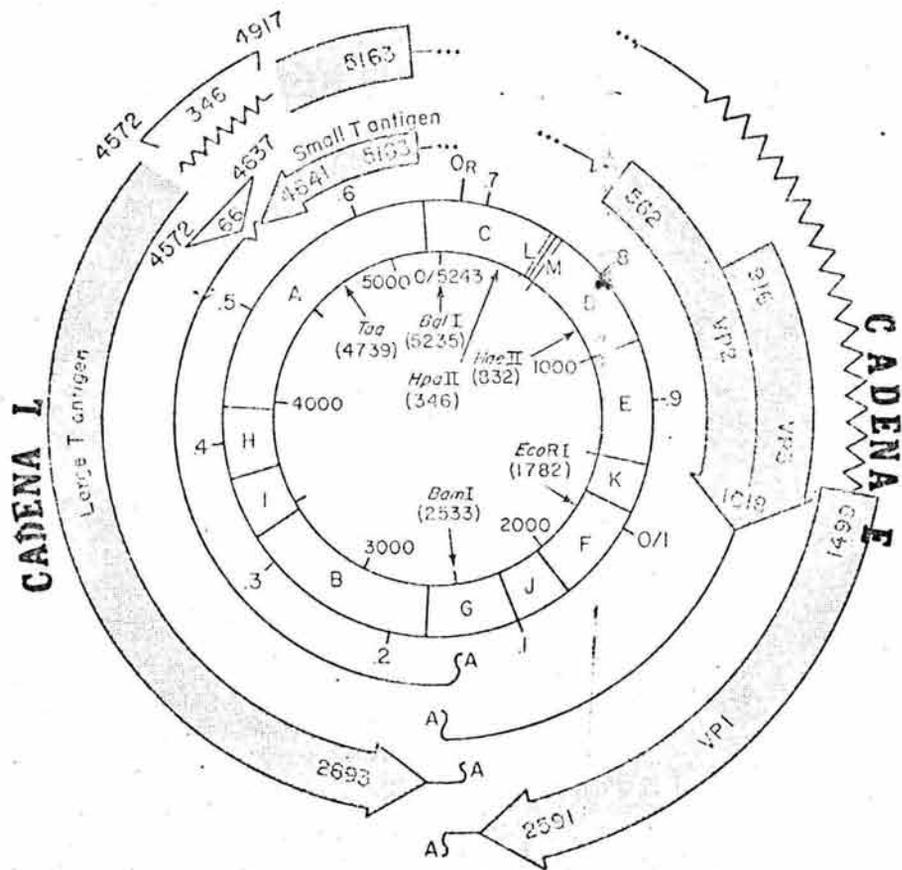
Fig A . MAPA GENETICO DE SV40. (A)

El genoma se representa como un circulo con el origen de replicación marcado como OR.

Los números fuera del circulo se refieren a las localizaciones en el genoma fraccionado, relativo a la longitud a un sitio de corte de Eco R₁ dentro de SV40.

Las flechas muestran la dirección de lectura de 5' → 3', en el mapa genético.

También se muestran los 5 genes, en donde empiezan y terminan las proteínas codificadas por estos, así como algunos sitios de restricción.



Tomado de Tooze, J. (1981). DNA Tumor Viruses. (94).

ESTRUCTURA DE MOLECULAS DE DNA EN REPLICACION

Las moléculas de DNA nuevas sintetizadas presentan una cadena nueva y una cadena derivada intacta de la molécula de DNA parental.

En otras palabras la replicación procede de una manera semiconservativa. Esta se lleva a cabo de 15 a 20 hrs postinfección y da lugar a que el DNA viral en este tiempo presente una sedimentación ligeramente más rápida (21S a 25S) que el DNA forma I (21S) en gradientes neutrales de sacarosa.

Esto puede apreciarse más detalladamente en fotografías de microscopía electrónica en donde los intermediarios replicativos (Fig 1) son más grandes que las moléculas de DNA parental, y más aún de que ésta - se lleva a cabo bidireccionalmente.

Lo primero que se lleva a cabo es la unión de la RNA polimerasa al-DNA y la síntesis de pequeños oligorribonucleótidos sobre el DNA (Primeros), los cuales servirán como base para que la DNA polimerasa I empiece a sintetizar la cadena complementaria de DNA.

La replicación ocurre en diferentes lugares del DNA formando fragmentos replicados de DNA llamados de Okasaki en la dirección '5—→3', posteriormente ocurre la polimerización de todos los fragmentos formados para formar una cadena continua de DNA. Terminada la iniciación y elongación de las cadenas, la replicación termina en el momento en que 2 "forks" (Ver apéndice A) de replicación creciendo lleguen a juntarse, y se ha demostrado de que no se requieren factores adicionales como proteínas para que la terminación ocurra., (94).

Es de hacerse notar que el mecanismo exacto de replicación no se conoce ya que éste se lleva a cabo estando el DNA en forma nucleosomal - (presentando el DNA las 4 histonas H_2A , H_2B , H_3 y H_4) y no se sabe-

- exactamente como el DNA se desnaturaliza y se va replicando, sin perder -
su estructura conformacional. Sin embargo lo más probable es que la desna-
turalización y la replicación del DNA se lleven a cabo muy rápidamente --
permitiendo que las proteínas histónicas se separen del DNA en el momento
que la DNA polimerasa I va sintetizando nuevo DNA y posteriormente éstas-
se unen rápidamente tanto al DNA parental como a las nuevas moléculas re-
plicadas. (94).

Fase tardía:

Este período comienza cuando la replicación del DNA viral empieza, y se caracteriza por la aparición de RNA sintetizado a partir de la cadena complementaria de DNA que se transcribe en la fase temprana.

La síntesis de mRNA tardío tiene como principal meta codificar las proteínas capsulares (VP_1 , VP_2 y VP_3) virales. Este se sintetiza de 100 a 500 veces más que el mRNA temprano, ya que se requieren una gran cantidad de proteínas para el encapsulamiento del DNA viral. Por otro lado se ha estimado que éste representa el 0.13% del RNA citoplásmico total (siendo de 5,000 a 10,000 moléculas de mRNA por célula), y que sufre ciertas modificaciones, después de que éste ha sido transcrito (Splicing), (94).

La transcripción de la cadena L se muestra en la figura A en donde pueden observarse el tamaño de los 3 RNAs que se producen, y a partir de donde se transcriben en el genoma de SV40.

Después de demostrar por experimentos de hibridación entre el DNA de SV40 y el RNAm tardío, de que este último era transcrito a partir de la cadena L , se trató de averiguar porque había diferentes tamaños de RNA viral (experimentos de mapeo hechos con la enzima nucleasa S_1) en el período tardío de infección, (94).

El conocimiento de los diferentes tamaños de mRNA (16S , 18S y 19S) - se obtuvo por experimentos de hibridación entre los mRNA aislados en períodos tardíos de infección y fragmentos de restricción de DNA de SV40, -- así como también por mapeo con S_1 , llegandose a encontrar (94) que el RNA de 16S codifica para la mayor proteína capsular VP_1 y que el RNA 19S codifica para las proteínas VP_2 y VP_3 , sufriendo este último un Splicing para que se genere un RNA de 16S el cual codificara para la proteína VP_3 (ver- figura A).

Lo más importante de estos experimentos y otros realizados mostró ---

que casi todo el RNA es transcrito a partir de las nuevas moléculas que se han formado y que casi no hay transcripción de las moléculas de DNA parentales.

Ensamblaje del virus:

Poco se sabe a cerca del ensamblaje del DNA viral (teniendo ya histonas de la célula huésped) y las proteínas capsulares virales para que se formen partículas virales maduras.

Se ha observado que al comenzarse a sintetizar las proteínas capsulares , éstas se ensamblan solas formando cápsides vacías y que solo hasta que entran en contacto con el DNA viral éstas se rearreglan para formar los viriones maduros, llegándose a medir que este encapsulamiento dura 8 hrs al menos.

Es de hacerse notar que estas observaciones se obtuvieron a partir de experimentos in vivo , ya que in vitro disgregando la cápsides y colocándolas en contacto con el DNA viral no se observa reconstitución de partículas virales enteras, únicamente algunas cápsides vacías.

Liberación del virus y muerte celular:

No se conoce un mecanismo específico por el cual el virus salga de la célula, lo único que se ha observado es la asociación de las partículas virales a la membrana nuclear, después de lo cual ésta se disgrega e inmediatamente o al mismo tiempo hay cambios en la permeabilidad de la membrana, con lo cual el virus sale al espacio extracelular.

Transformación por virus SV40 y virus Polyoma:

Este tema es de gran importancia para la investigación, pero no forma parte de esta tesis por lo cual no se detalla. Para información sobre este tema ver referencias (1, 4 , 8 , 11 , 13 , 20 , 26 , 38 , 59 , 74).

Fig 1. Complejos De Replicación DE SV40.

En la figura se muestran:

- a) Microfotografía electrónica de un intermediario replicativo de SV40.
- b) Representación de las moléculas replicándose mostrando dos puntas de replicación ó de ramificación.

L_1 y L_2 : ramificaciones de igual longitud.

L_3 : Fragmento superenrollado sin replicar.

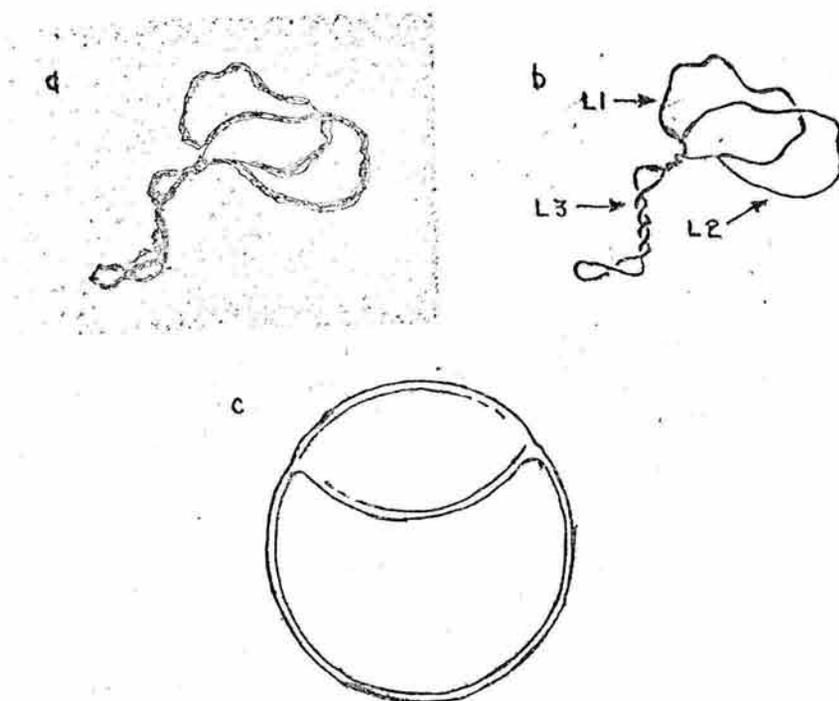
- c) Ambas cadenas parentales están unidas, y las cadenas hijas tienen extremos libres.

La cadena de crecimiento en la dirección $5' \longrightarrow 3'$ es sintetizada continuamente,

La cadena creciendo en la dirección $3' \longrightarrow 5'$ es sintetizada en pequeñas piezas las cuales son subsecuentemente unidas,

El diagrama simplificado muestra la naturaleza helicoidal de las cadenas complementarias. No se encuentran en esta fotografía la presencia de nucleosomas,

Fig 1. Complejos de Replicación de SV40.



Tomado de DNA Tumor Viruses (1981), (94).

Proteína 32: (Características Generales)

La Proteína 32 es una proteína desestabilizadora del DNA y parece tener un papel muy importante en los mecanismos de replicación y recombinación en células infectadas con el bacteriófago T₄.

Esta proteína es codificada por el gene 32 del bacteriofago T₄, fue purificada primeramente por Alberts, M.B. 1979 (3) y se ha usado bastante para el alargamiento y visualización de RNAs sintetizados in vitro e in vivo tanto de organismos Procariotas (E. coli), como de Eucariotas (ovocitos de anfibio) y algunos virus (ϕ T₄ y virus SV40).

Su función es de esencial importancia para que la replicación del DNA del fago T₄ se lleve a cabo, ya que esta es la principal proteína que desnatura liza al DNA, permitiendo así a la RNA polimerasa o DNA polimerasa I que se una fácilmente al ácido nucleico y éste se transcriba o se duplique.

Presenta otras características muy interesantes como son su autorregulación a nivel genético, llevándose a cabo primeramente por la unión a su mRNA que la codifica, trayendo consigo la disminución de mRNA, que se traducen; mecanismo que se presenta por lo general cuando la Proteína 32 se encuentra en gran cantidad (16).

Una de sus principales características intrínsecas es que presenta un efecto cooperativo, es decir, después que se ha unido una proteína al DNA, se lleva a cabo la unión de otras subsecuentes proteínas más rápidamente y al lado de ésta.

Esta propiedad ayuda en gran medida para que la inhibición de la traducción de su mRNA se lleve a cabo rápidamente.

Algunas características muy importantes y que justifican la realización de algunos experimentos de esta tesis, son las medidas de las constantes de asociación de la Proteína 32 con los ácidos nucleicos, y son las siguientes (--

(Jensen, E.D. et al. 1976).

| | | Constante de asociación |
|----------------------------|---|--------------------------------------------------|
| DNA doble cadena | - | $0.8 \times 10^{+4} \text{ M}^{-1}$ |
| DNA simple cadena | - | 10^6 M^{-1} a 10^{-3} M Na^+ |
| mRNA ϕ T ₄ | - | 6.3×10^{-2} |
| Otros RNAs | - | $1.2 \times 10^{+3}$ |

TRANSCRIPCIÓN:

Las diferencias fenotípicas de los tipos celulares de un organismo eucariota, resultan de la expresión de algún conjunto de genes. Conclusión que es apoyada ya que observaciones durante el desarrollo demuestran que no hay pérdida de genes en las células, ó amplificación de genes activos transcripcionalmente.

Además el concepto de expresión diferencial de genes en los tipos celulares se ha verificado, ya que, existen diferentes poblaciones de mRNA; y lo más importante es que proteínas que existen en abundancia en algunas células no existen en lo absoluto en las demás.

Estas observaciones llevaron a confirmar que la diferenciación celular da lugar de alguna manera a que ciertos genes se expresen en algunos tipos celulares y otros genes en otras.

La expresión de genes en una célula, o la formación de mRNA a partir de DNA se llama Transcripción. La enzima responsable de formar mRNA se llama RNA-polimerasa y su función aunque compleja a nivel molecular para regular de cierto modo la expresión de genes, se conoce de modo ya general.

Las células eucariotas tienen 3 clases de RNA polimerasa, responsables de sintetizar diferentes clases de RNA. Poco se conoce acerca de los mecanismos envueltos en la iniciación de síntesis de RNA, esto es, acerca de la selección de secuencias de DNA para la Transcripción, y menos de cómo se encuentran reguladas las regiones que se van a transcribir, y la función que desempeña la RNA polimerasa en estos procesos.

La Transcripción nuclear ocurre en dos regiones en el nucleoplasma. Aquellos genes que se encuentran en el nucleólo se transcriben en RNAs ribosomales (23S y 16S) y son transcritos por la RNA polimerasa I. Además hay que hacer notar aquí que la actividad de esta enzima representa más de la mitad de la actividad total transcripcional nuclear.

Una segunda enzima, la RNA polimerasa II es la responsable de la síntesis de RNA heterogéneo nuclear, y proporciona los precursores de mRNA, además presenta un 30% de la actividad transcripcional nuclear.

La 3a. enzima, llamada RNA polimerasa III se encarga de transcribir RNAs de pequeño tamaño, como RNA 5S (ribosomal) y t-RNAs, teniendo un 10% de la actividad total nuclear.

Algunas de las características y propiedades de estas tres enzimas se muestran en la siguiente tabla:

Tabla No. 1

| ENZIMA | RNA POLIMERASA I | RNA POLIMERASA II | RNA POLIMERASA III |
|----------------------------------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| LOCALIZACION | Nucleolar | Nucleoplasmica | Nucleoplasmica |
| PROPORCION DE | 50-70% | 20-40% | 10% |
| ACTIVIDAD ACTIVIDAD OPTIMA | 0,05M | 0,09M | 0,05-0,17M |
| EN $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | | | |
| INHIBICION DE 50% con α -A- MANITINA, | 400 μ g/ml | 0,025 μ g/ml | 20 μ g/ml |

(Tomado de Lewin, B. 1980, (73)).

El mecanismo para la formación de RNA se lleva a cabo primeramente por la unión de la RNA polimerasa al DNA, y la subsiguiente polimerización de trinucleótidos - fosfatados, trayendo consigo la catálisis y unión de ribonucleótidos trifosfatados

para formar cadenas de RNA.

Al menos para la RNA polimerasa II se ha demostrado que esta se encuentra unida al templado y que hay algunas señales para que esta empiece a transcribir a los genes que se encuentran en frente (39).

Estas señales pueden ser la separación de algunas proteínas que impidan que los genes puedan ser transcritos, o bien la modificación de éstas o de la RNA polimerasa misma, como son la fosforilación de algunas subunidades de la polimerasa o de otras proteínas.

Así como también puede ocurrir la pérdida o ganancia de algunos péptidos o proteínas que permitan de alguna manera que la polimerasa pase por ellos y los transcriba (73).

Algunas de estas hipótesis, en especial las últimas son fuertemente apoyadas, ya que experimentos realizados en el laboratorio muestran que algunas subunidades de la RNA polimerasa II están presentes en aquellos genes que se transcriben, mientras que en los que no se transcriben no se encuentran (Estos experimentos fueron hechos usando al sistema modelo de SV40 , comparando la Cromatina viral activa e inactiva transcripcionalmente, obtenida de gradientes de sacarosa, Fig 24).

Por otro lado hemos demostrado (en publicación) que las histonas de genes que transcriben activamente están más acetiladas que aquellos que se encuentran inactivos transcripcionalmente.

Estas evidencias confirman fuertemente que la regulación de la expresión de genes se encuentra principalmente a nivel transcripcional.

Sin embargo hay que hacer notar que la regulación también depende de los genes que vayan a ser transcritos y de los mensajeros producidos en la célula en algún período de su crecimiento, así como también de las condiciones en que se crezcan las células.

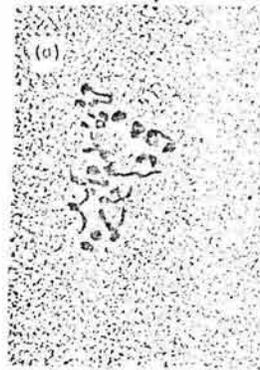
Ahora no solo se sabe que estos reguladores (Proteínas o modificaciones en las mismas) intervienen para que ciertos genes sean transcritos, sino que

experimentos in vitro hechos con extractos de algunas células, como Hela, o de células de tumor de ascites (46, 100) muestran que hay ciertos factores proteicos (Extracto S100: llamado al extracto obtenido de estas células) -- que promueven que solo ciertos genes sean transcritos específicamente, y no se transcriban al azar ciertos genes (hablando de genes potencialmente activos para que sean transcritos).

Todas estas observaciones sin embargo se abordarán más directamente hasta que haya algún sistema para poder comparar a las regiones activas e inactivas transcripcionalmente, sin embargo falta mucho por hacer.

Los detalles de la función de las secuencias de Poly A y Cap que se encuentran en los extremos 3' y 5' del mRNA no se dan con detalle en esta tesis, so lo cabe mencionar que funcionan para el transporte del mensajero del núcleo al citoplasma (extremo 3' , Poly A) , y que algunos mRNA como los del gen de β -globina lo requieren intacto (40 a 60 residuos de A) para que estos sean trasladados eficientemente.. se observa que su función regulatoria está más involucrada para la unión eficiente de mensajero con el ribosoma y probablemente para evitar su acción degradatoria. (94).

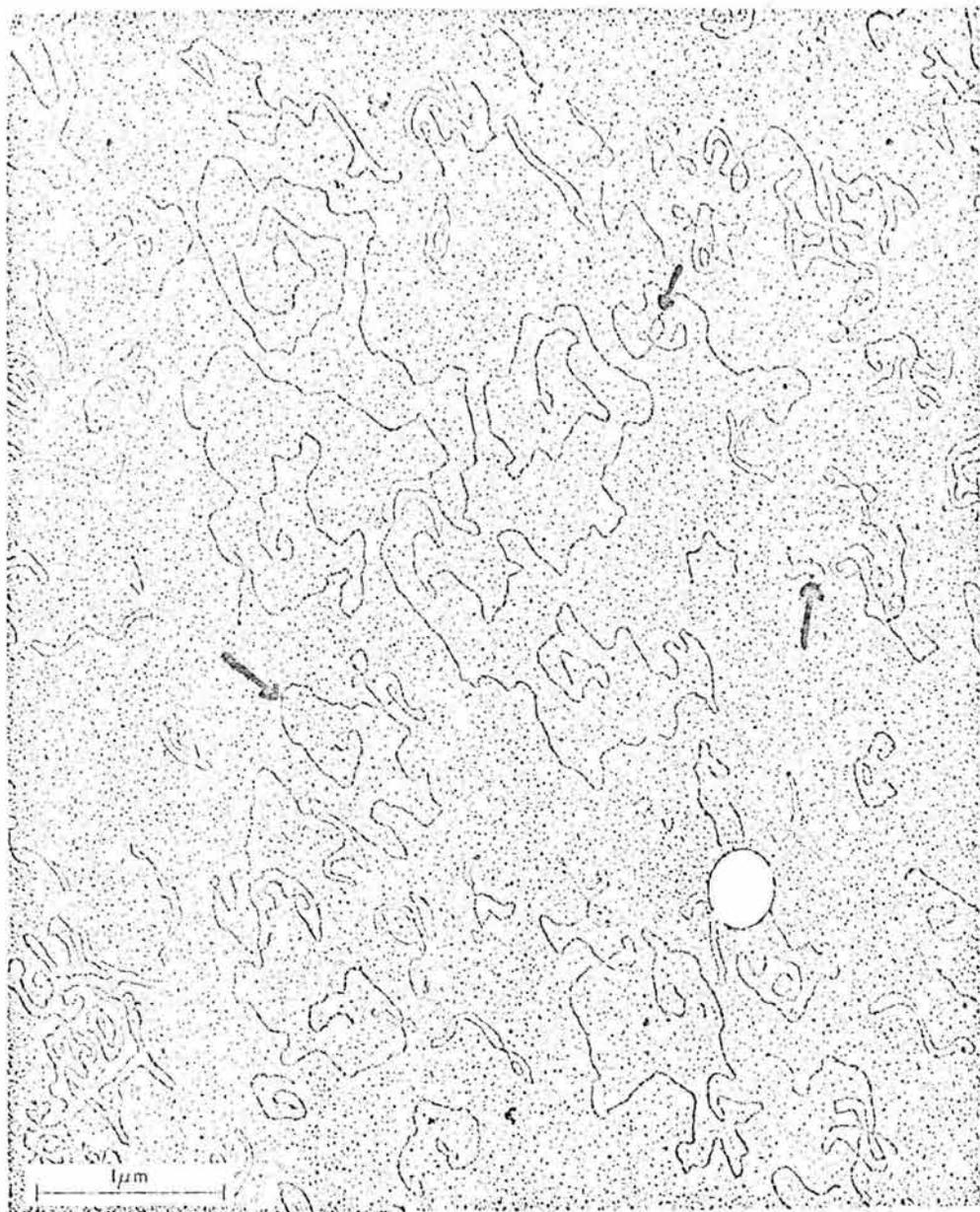
Complejo de Transcripción viral y Minicromosoma de SV40 , obtenidos de algunas preparaciones de purificación de complejos y tratados para microscopía electrónica (Delius, H. et al , 1973) . (26).



COMPLEJOS DE TRANSCRIPCIÓN DE DNA DE SV40 *

Se mezclaron 30 μg de DNA de SV40/ml con 150 μg de RNA polimerasa de E. coli , posteriormente, después de la síntesis de RNA por 15 min, a 37°C , los complejos fueron tratados con Proteína 32 (P_{32}) , y fijados con glutaraldehído para la observación en microscopía electrónica. Se muestran en la figura los tamaños de RNA sintetizados y algunas P_{32} fijadas a estas cadenas de RNA (flechas).

* Tomado de: Delius, H., et al. (1973). J. Mol. Biol. 74, 677-687.
Ref (26).



MAPA GENETICO DEL BACTERIOFAGO T₄.

Se muestran en el mapa circular la localización de los genes del Bacteriófago T₄.

Se dan los nombres de algunos genes que codifican para algunas partes estructurales del fago.

Las mutantes de fase temprana están numeradas como:

DO: No síntesis de DNA.

DA: Inhibición de síntesis de DNA.

DD: Disminución en la síntesis de DNA.

y algunas de fase tardía como:

MD: Maduración defectiva.

El gene que codifica para la Proteína 32 está numerado como 32 (DO). Una mutación provoca que la síntesis del DNA se vea afectada, trayendo consigo en ocasiones que no haya síntesis de DNA.

MATERIAL y METODOS:

1. Los disolventes empleados en la realización de este trabajo fueron proporcionados por el Laboratorio No. 24 a cargo del Dr. Patricio Gariglio V. del Departamento de Genética y Biología Molecular.
2. Los reactivos empleados fueron químicamente analíticos y proporcionados por las siguientes casas: Merck, Sigma, Packard, BDH, BRL y Backer.
3. Reactivos específicos y enzimas usados:
 - a) Polymina P.- B.R.L.
 - b) Comassie (R250).- Sigma.
 - c) Comassie (G250).- Sigma.
 - d) Proteasa tipo XI.- Sigma.
 - e) DNAasa I.- Sigma. 95% pureza.
 - f) PPO y POPOP.- Packard.
4. Los aparatos empleados para los experimentos fueron los siguientes:
 - a) Contador de centelleo. Packard Tri-CARB. Modelo 3385 (Espectrómetro de líquido de centelleo).
 - b) Ultracentrífuga Beckman. Modelo L8-55'
 - c) Fotómetro espectral Carl-Zeiss PMQII.
 - d) Sonicator Soniren MSF.
 - e) Centrífuga Sorvall RC-5
 - f) Potenciómetro Beckman , modelo 3500.

Medios empleados:Medio Luria

Tryptona - 10 g

Extracto de
levadura - 5 g

NaCl - 10 g

H₂O - 1000 ml

NaOH 2% - 4.8 ml

Medio MínimoKH₂PO₄ - 13.6 g(NH₄)₂SO₄ - 2 gMgSO₄.7H₂O - 0.2 gCaCl₂ - 0.01 gFeSO₄.7H₂O - 0.0005 g

Llevar pH: 7.4 con KOH

H₂O - 1000 ml

Se adiciona 20 g glucosa (2% final) y L-histidina al 2%.

MEDIOS:

Preparación Medio (M9).

Solución Stock (Sales 10X) 1 lt.

Na_2HPO_4 70g.

KH_2PO_4 30g.

NaCl 5g.

NH_4Cl 10g.

Preparacion 1 lt Medio M9.

Soluciones Stock:

| | | |
|-----------------------------------|---------|---------|
| Sales 10X | 100ml, | |
| Na_2HPO_4 | | 493 mM, |
| KH_2PO_4 | | 22,0mM, |
| NaCl | | 8,5mM, |
| NH_4Cl | | 18,6mM, |
| Casamino | 30ml, | 0,3% |
| ácidos (10%) | | |
| Glucosa 20% | 20ml | 0,4% |
| FeCl_3 10^{-3}M | 10ml | 0,01mM, |
| MgSO_4 1M | 1ml. | 1mM, |
| CaCl_2 0,1M | 1ml | 0,1mM, |
| H_2O Bidestilada | 838 ml, | |

Las soluciones se preparan por separado,

Las sales se filtran por Millipore y despues se esterilizan.

El medio se prepara mezclando las soluciones en condiciones estériles,

Los Casamino ácidos: Laboratorios DIFCO, Detroit. Michigan USA,

REACTIVOS ESPECIALES.

Muramil Dipéptido. Producción Instituto Pasteur.

Adyuvante de Freund Completo: DIFCO.

Aceite Mineral: Producción Instituto Pasteur.

CELULAS VIRUS Y CEPAS.

Celulas de riñón de mono de la linea CV₁ fueron crecidas en medio Dulbecco modificado, suplementado con 10% de suero fetal, en cajas de petri de 10 cm - diámetro.

El Stock de virus usado fue de SV40 de la linea 777,

Las cepas usadas de bacterias fueron las siguientes.

E. coli Uracilo⁻ ; teniendo el genotipo de: Ura⁻ , His⁻ , Sm^r.

E. coli. K₁₂

159 rnc 105

RNAasa II⁻

E. coli. CR63.

E. coli.B : Cepa deficiente en Lisozima. Producción: Instituto Pasteur.

El fago usado fue: ϕ T₄ AmBL₂₉₂; Simple mutante del gene 55, Producción del Instituto Pasteur.

MATERIAL Y METODOS

RESUMEN - TESIS.

La metodología que se encuentra descrita más adelante está ordenada cronológicamente, de cómo y cuáles fueron los diferentes materiales biológicos que se obtuvieron y se emplearon en esta tesis.

Hay que mencionar que parte de la metodología de este trabajo, -- no se encuentra en la literatura aún, ya que ésta se desarrolló en el laboratorio bajo la asesoría del Doctor Patricio Gariglio; y por lo tanto no doy referencia de las mismas. (vea el orden de cómo se encuentran en el Índice de Materias y de Resultados).

a) Las técnicas mencionadas en Material y Métodos, sólo fueron realizadas para obtener el material biológico necesario para realizar todos y cada uno de los experimentos que están enumerados en el Índice de Resultados.

b) La secuencia que se siguió para el montaje de la técnica para purificar genes transcripcionales es la siguiente:

La idea central era precipitar el complejo de transcripción de SV40 (1% de copias) y separarlo del resto de copias no activas -- transcripcionalmente (99%).

El experimento final fue tener al complejo de transcripción en el cual, el RNA de este complejo tenga unida a la proteína 32 , y a su vez esta proteína a los anticuerpos contra la misma, de tal forma que todo el complejo (Complejo de Transcripción- P₃₂ - Anti P₃₂ y Anti IgG), sea lo suficiente grande para que se pueda separar -- del resto de copias no activas.

Para lograrlo, primero se intentó precipitar DNA de simple cadena, formando complejos con la proteína 32 (ver características de la P₃₂ en la Introducción) y anticuerpos contra la misma, ya que -- como se sabe la P₃₂ tiene más afinidad por el DNA que por el RNA (-

ver constantes de asociación) . Además se usó primero DNA de células CV₁ , ya que es más grande y tiene muchos sitios para que la P₃₂ pueda unirsele. (Fig 15).

El paso siguiente era usar DNA de SV40 que es más pequeño que el DNA celular, y tratar de precipitarlo como en el experimento No.15.

En este experimento (Fig 16) se usó suero blanco (obtenido de conejos no inmunizados) para verificar que no hubiera precipitación inespecífica de DNA (simple cadena) con los anticuerpos.

Teniendo precipitados ambos DNAs (usando como acarreador a la Proteína A-Sepharosa para precipitar los complejos formados), se trató de precipitar a estos 2 DNAs (DNA de células CV₁ y DNA de SV40) de simple cadena y separarlos de DNA de doble cadena; pero usando en estos experimentos como acarreador , anticuerpos contra los anticuerpos de conejo (Para precipitar los complejos de DNA-P₃₂-Anti P₃₂).

La idea aquí era formar complejos de DNAsc-P₃₂ - Anti P₃₂ - Anti IgG ya que el doble anticuerpo es más pequeño que la proteína A-Sepharosa, los complejos formados son más pequeños , y de alguna manera se evita la precipitación inespecífica de DNAs , RNAs ó minicromosomas de SV40. (ver descripción de resultados), (Fig 17 y 18).

Teniendo estos resultados empecé a ensayar las precipitaciones de RNA de SV40 (cRNA), (ver Síntesis de cRNA), ya que este RNA es el que se obtendría unido al minicromosoma en los últimos experimentos al tratar de precipitar al complejo de transcripción.

Primero se ensayó su precipitación, solo , es decir formando complejos de cRNA- P₃₂ - Anti P₃₂ y precipitándolos posteriormente agregando Proteína A-Sepharosa (Fig 20).

Posteriormente se ensayó su precipitación diferencial mezclándolo con DNA de SV40 (doble cadena) y usando como acarreador al do-

ble anticuerpo (Fig 21).

Con esto se tenia prácticamente montado el sistema para precipitar al complejo de transcripción de SV40. Pero hacia falta un experimento; que es el siguiente;

Se ensayó la precipitación del cRNA mezclandolo con el Minicromosoma de SV40 (ver su Purificación en está sección) y (Fig 22).- de esta manera se tendría el RNA y el minicromosoma juntos, tal y como se tendría en el Complejo de Transcripción de SV40 al tratar de precipitarlo (ver Fig 23).

El último paso a realizar era la purificación del Complejo de Transcripción de SV40 y separarlo de los minicromisomas, tal y como se obtenían en las preparaciones (ver Purificación del Complejo de Transcripción y Fig 24).

Con esta serie de experimentos se llegó a ensayar varias veces la precipitación del Complejo de Transcripción de SV40 (ver resultados parte II).

Todos los experimentos descritos anteriormente son los que llevarán a tener una metodología para tratar de precipitar a genes activos transcripcionalmente.

Obtención de Fago T₄ (7)

La obtención de fago T₄ (ϕ T₄) se realiza de la siguiente manera:

Se crece un cultivo de 300 ml. de la bacteria E. coli CR63 en medio M9 por toda una noche.

Al día siguiente una fracción del inóculo se diluye en 6 litros de medio M9 hasta obtener una absorbancia de 0.01 a 590 nm.

Posteriormente la bacteria se crece a 37°C hasta obtener una lectura de 0.1 a 0.2 de absorbancia a 590 nm. Se le añade enseguida al medio 40mg/litro del aminoácido L-Triptofano. 10 minutos después, las bacterias se infectan con ϕ T₄, adicionando 1 fago por cada 10 bacterias (moi= 0.1).

El cultivo se incuba por 4 horas; luego se adicionan 2 ml de cloroformo y 35 μ g de DNAasa I por cada litro de cultivo.

Se incuba nuevamente por 30 minutos a 37°C y posteriormente se enfría a 4°C. Se centrifuga a 6000 rpm por 10 min, 4°C en rotor GSA, para quitar restos celulares (se toma alícuota de sobrenadante para título).

Al sobrenadante se le agrega NaCl (concentración final de 0.5M) y Polietilenglicol 6000 (PEG 6000) al 10% final; se mezcla por 2 hrs a 4°C y se deja reposar por toda la noche a 4°C, centrifugándose después a 6000rpm, 10 min, 4°C en rotor GSA (se toma nuevamente alícuota de sobrenadante para título).

La pastilla obtenida se resuspende en 125 ml de buffer Tris HCl 0.02 M pH:7.4, 0.1 M NaCl, y se mezcla suavemente por 1 ó 2 días.

Titulación de fago T₄ (7)

La titulación de sobrenadantes obtenidos en la preparación de fago T₄, se realiza de la siguiente manera:

1) Se realizan diluciones de la solución original del fago desde 10^{-2} hasta 10^{-11} en medio Luria:

| | Dilución* | | | | | | |
|---------------------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | -2 | -4 | -6 | -8 | -9 | -10 | -11 |
| ml de la sol. anterior | 0.1 ml | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| ml de medio Luria | 9.9 ml | 9.9 | 9.9 | 9.9 | 9.0 | 9.0 | 9.0 |

* Nota: Cambiar de pipeta en cada dilución.

2) Las diluciones del fago se agitan en un vortex y se titulan desde -8 en adelante.

Para esto se toman 0.1 ml de la dilución del fago y se colocan en tubos pequeños y por duplicado; después se adiciona a cada tubo 2 gotas de bacteria CR63 (crecida hasta 0.1 de absorbancia a 595 nm.).

Se añade a cada tubo 2.5 ml de agar blando y fundido a una temperatura de 42°C y se vierte en una caja de petri con agar sólido (Medio luria con agar al 1.5%); se deja solidificar durante 30-min a temperatura ambiente, en posición invertida para evitar goteo.

Las cajas se ponen después a incubar a 37°C y al día siguiente se observan y se cuentan las placas formadas.

Se determina el título (número de fago infectivo por ml de suspensión).

Se centrifuga a 5000 rpm por 10 min, 4°C en rotor GSA, para limpiar el fago de restos celulares.

El fago se almacena en refrigeración a 4°C.

Inyección de bacterias E. coli B con ϕ T₄ para la obtención de Proteína 32 (P₃₂). (7)

Se crece un inóculo de 300 ml de bacteria E. coli B en medio M9 a 32°C por toda la noche.

Al día siguiente una fracción del inóculo se diluye en 8 litros de medio para obtener una absorbancia de 0.1 a 590 nm.

El cultivo se crece a 32°C hasta una absorbancia de 1.0 a 590 nm (se tienen en esta lectura 4-5 x 10⁸ células por ml de cultivo). Aproximadamente de 3.5 a 4 hrs después de que se inició el cultivo se obtiene la lectura de 1.0 de absorbancia.

Enseguida se adiciona 40 mg del L-Triptofano por litro de cultivo y se incuba por 10 min (se toma aquí una alícuota de 1 ml para recuento de colonias).

Posteriormente se infectan las bacterias con fago T₄ Am 292, adicionando 5 fagos por bacteria (moi = 5); 5 minutos después se agrega más fago (moi: 5) (durante este tiempo, se toma una alícuota del cultivo). Se incuba el medio a 32°C por 1 hora 30 min; enseguida se enfría 4°C.

El cultivo se centrifuga a 8000 rpm por 5 min, 4°C en rotor GSA (Sorvall); se descarta el sobrenadante y la pastilla obtenida se pesa en papel aluminio y se congela en nitrógeno líquido. Posteriormente, la pastilla se almacena a -20°C.

Cuenta viable de Bacteria

Para verificar la infección de E. coli B con ϕT_4 , se cuenta el número de bacterias antes y después de la infección (ver infección de E. coli con ϕT_4).

A las alícuotas tomadas antes y después de la infección se les realiza cuenta viable de bacterias (Absorbancia 1.0 a 590 nm) que contiene aproximadamente 4.5×10^8 bacterias/ml, como se muestra.

| | 10^{-2} | 10^{-4} | 10^{-6} | 10^{-7} | 10^{-8} | 10^{-9} |
|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| bacteria (ml sol. anterior) | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Medio Luria (ml) | 9.9 | 9.9 | 9.9 | 9.0 | 9.0 | 9.0 |

Las diluciones se agitan en un vortex; enseguida se toman por duplicado 0.1 ml de la dilución correspondiente y se vierten sobre cajas con agar. Después se espatula y se incuban las cajas a 37°C por toda la noche y al día siguiente se cuenta el número de colonias formadas.

Datos sobre las columnas usadas en la Purificación de P₃₂

Las columnas de vidrio se lavan con 0.2 M NaOH a temperatura ambiente, y después con H₂O bidestilada estéril, posteriormente, éstas se esterilizan.

Las columnas LKB o de farmacia se tratan con 0.2 N NaOH por toda la noche y después se les pasa abundante agua bidestilada estéril.

Dimensiones columna DNA-Celulosa: 1.8 x 30 cm.

Volumen de lecho: 120 ml.

DNA-Celulosa: Aprox. 1.56 mg DNA/ml de Celulosa (45 g DNA-Celulosa seca).

Buffer lavado; Buffer B (Tris HCl 0.02 M pH: 8.1, 2.0 M NaCl, 5 mM EDTA).

Buffer Equilibrio: Buffer B₁ (Tris HCl 0.02 M pH: 8.1, 0.05 M NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM β-mercaptoetanol, 10% glicerol).

Columna DEAE-Celulosa

DE52 Whatman (15 g DEAE-Celulosa seca).

Dimensiones: 1.5 x 30 cm.

Volumen de lecho: 45 ml.

Lavado: Buffer C₂: (Tris HCL 0.02 M pH: 8.1, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA sin glicerol y β-mercaptoetanol).

Equilibrio: Buffer C₁: (Tris HCl 0.02 M pH: 8.1, 1 mM EDTA, 1 mM β-mercaptoetanol, 10% glicerol).

Columnas Fosfocelulosa: Whatman P-11 (3 g Fosfocelulosa seca).

Dimensiones: 0.9 x 15 cm.

Volumen de lecho: 70 ml.

Lavado: Buffer D₂: (Tris HCl 0.02 M pH: 8.1, 0.05 M NaCl,
1 mM EDTA, 1.0 mM β-mercaptoetanol, 10% glicerol.

Preparación Resina DNA-Celulosa (105)

Parte I. Preparación de la Celulosa.

1. Suspender 100 g de Celulosa (Cellex # 410 BIO-RAD) en 10 volúmenes - de H₂O estéril, en un cilindro de 45 cm de altura. (Se utilizó una probeta de 2 litros).
2. Decantar el sobrenadante (por aspiración) después de 60 min, para de sechar partículas finas.
3. Repetir el lavado (6 veces) con 50% de etanol.
4. Lavar 2 veces con etanol 100% mediante filtración en un embudo Buchner.
5. Lavar con H₂O bidestilada estéril 2 veces.
6. Lavar con NaOH 0.5 M.
7. Lavar con H₂O 2 veces
8. Lavar con HCl 0.5 M.
9. Lavar con H₂O bid. 4 veces.

Filtrar en
Buchner
con 2 hojas
Whatman 1 MM

En todo este tiempo permanece la Celulosa en el embudo Buchner.

10. Posteriormente se retira y se seca toda la noche con pistola de aire (sin calor) , cubriendo el recipiente con una gasa.
11. Liofilizar durante 30 hrs, o dejar 2 días en un desecador y liofilizar al menos 5 hrs.
12. Almacenar el polvo a -20°C.

Preparación de DNA-Celulosa

Parte II. Preparación del DNA.

1. El DNA (1 g) se resuspende en 0.01 M de Tris HCl pH: 8.1, 1mM EDTA- a una concentración de 2mg/ml. Para esto se agita suavemente a 4°C por -- 48hrs.

2. Extraer con fenol saturado con Tris HCl 0.01 M pH: 8.1, a temperatura ambiente.

Extracción

- 2.1 1 volumen de fenol saturado + 1 vol de muestra.
- 2.2 Agitar suavemente durante 2 a 3 min y centrifugar a 4000 x g, 10 min, 4°C (5000 rpm, rotor GSA).
- 2.3 Recuperar la fase acuosa (superior) la cual contiene el DNA. Repetir la extracción 3 veces.
3. Precipitar el DNA de la última fase acuosa con 2 volúmenes de etanol a -20°C, toda la noche.
4. El DNA se colecta por centrifugación, 30 min, a 6000 x g, 4°C (ó 6000 rpm rotor GSA).
5. Secar con aire toda la noche y liofilizar 40 hrs.

Preparación de DNA-Celulosa

Parte III. Unión DNA a Celulosa).

1. El DNA liofilizado se resuspende a una concentración de 2 mg/ml en 10^{-2} M K_2HPO_4 , EDTA 10^{-3} M, (para dar un pH: 8.5 por 48 hrs a temperatura ambiente.
2. Calentar en alícuotas de 10 ml a 100°C por 15 min.
3. Enfriar rápidamente y hacerla solución Tris HCl 20 mM pH: 7.4 final (2.5 ml de Tris HCl 0.1 M pH: 7.4/10 ml de muestra), en una alícuota a 260 nm medir absorbancia.
4. Mezclar 1 g de celulosa liofilizada por cada 3 ml de solución de DNA, lentamente y con agitación suave a temperatura ambiente. Generalmente se usan 100 g de celulosa.

5. Secar la amalgama con aire toda la noche y liofilizar por 40 hrs.
6. El polvo se macera ligeramente en un mortero y se resuspende en etanol al 100%. (12.5 g de polvo/100 ml etanol 100%).
7. La suspensión se expone a luz U.V. a $100,000 \text{ ergs/mm}^2$, 40 min y con agitación ligera, (en un refractario de 1000 cm^2).
8. La DNA-Celulosa se lava extensivamente con solución 10 mM Tris HCl, pH: 8.0, 1 mM EDTA (Buffer TE).
Se filtra en Büchner y se mide absorbancia a 260 nm al filtrado.
9. Secar con aire toda la noche, y liofilizar por 48 hrs.
10. Almacenar a -20°C .
11. Antes de usar la resina se resuspende en T.E.

(Nota: Por este método se une más del 90% del DNA a la celulosa).

Purificación de Proteína 32 (P₃₂) (7) . .

Se mezclan en una licuadora 100 g de bacterias E. coli B infectadas -- con el fago T₄ Am 292 con 300 ml de Buffer A₁ (Tris HCl 0.02 M pH: 8.1, - 1mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 1mM β- mercaptoetanol. Las bacterias - se suspenden por 5 min a baja velocidad en la licuadora a 4°C, (tomar a - lícua de 500^ul).

Despues se agregan 12 mg de DNAasa I comercial y las bacterias se rompen en un sonicador (MSE) en volúmenes de 200 ml dando 12 golpes de 20 seg- e intermedios de 40 seg a 24 micrones. Las bacterias rotas (sonicado) - se incuban por 1 hr a 10°C y despues se enfría a 4°C; en todas las etapas siguientes la temperatura se mantiene a 4°C.

Se centrifuga a 8000 rpm por 15 min en rotor GSA (Sorvall) , para quí- tar restos celulares (se toma alícuota).

El sobrenadante se ultracentrifuga a 100,000 x g por 90 min (se usó - un rotor tipo 60 ti) para bajar ribosomas, y se dializa contra 400 ml de buffer A₂/10 (Tris HCl 0.02 M pH: 8.1, 0.05M NaCl, 5mM EDTA, 1 mM β-mer- captoetanol) realizando 3 cambios de buffer durante 24 hr.

El dializado se centrifuga a 8000 rpm , 15 min en rotor GSA y se le a- grega glicerol 10% final; posteriormente se pasa por una columna de DNA - Celulosa equilibrada con buffer B₁ (Tris HCl 0.02 M pH; 8.1 , 0.05 M NaCl, 5 mM EDTA , 1 mM β-mercaptoetanol , 10% glicerol).

Nota: Trabajar hasta aquí lo más rápido posible para evitar la acción de- proteasas.

La elución de la columna se lleva a cabo por medio de un gradiente discontinuo de sal, usando 250 ml de los buffers B₁ a B₅, conteniendo respectivamente Tris HCl 0.02 M pH: 8.1, 5 mM EDTA, 1 mM β-mercaptoetanol, 10% glicerol y las concentraciones crecientes de sal de 0.05 M, 0.15 M, 0.4 M, 0.6 M, y 2.0 M NaCl.

Se colectan fracciones de 6 ml y se analizan por absorbancia a 280 nm.

Nota: La P₃₂ eluye en un pico a 0.6 M de NaCl.

Posteriormente, se juntan las fracciones que corresponden al pico de P₃₂ (90 ml aproximadamente) y se dializan contra 2 lt de buffer C₁ (Tris HCl 0.02 M pH: 8.1, 1 mM EDTA, 1 mM β-mercaptoetanol, 10% glicerol), realizando 2 cambios de buffer durante 24 hrs.

Este dializado se coloca en una columna de DEAE-Celulosa equilibrada con buffer C₁, y se eluye con un gradiente continuo de sal de 0.0 a 0.5 M de NaCl con 150 ml de los buffers C₁ y C₂ (Tris HCl 0.02 M pH: 8.1, 0.5 M NaCl, 1.0 mM EDTA, 1 mM β-mercaptoetanol, 10% glicerol).

Igual que anteriormente se colectan fracciones de 6.0 ml y se analizan por absorbancia a 280 nm.

Nota: La Proteína 32 eluye en un pico aproximadamente a 150 mM NaCl se juntan las fracciones del pico (65 ml aproximadamente) y se pasan por una columna de fosfo-celulosa equilibrada con buffer D₁ (Tris HCl 0.02 M pH: 8.1, 0.2 M NaCl, 1 mM β-mercaptoetanol, 10% glicerol). La elución se lleva a cabo también con buffer D₁ (bajo estas condiciones la P₃₂ no se une a la fosfo-celulosa).

Se colectan las fracciones igualmente que para las otras columnas y se mide absorbancia a 280 nm.

Las fracciones de P₃₂ eluidas de la Fosfocelulosa (65 ml) se dializan contra buffer E₁₀ (Tris HCl 0.02 M pH: 8.1, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, glicerol 10%) o buffer E₆₂ (igual al buffer E₁₀ pero conteniendo glicerol al 62%) a 4°C por toda la noche.

La Proteína 32 posteriormente se guarda a -20°C.

Cuantificación de Proteínas por el método de Bradford

Reactivos:

- 1) Etanol al 95% (50 ml).
- 2) H_3PO_4 al 85% (100 ml).
- 3) Disolver 100 mg de azul de Comassie G250 en 50 ml de etanol al 95%.
- 4) Agregar 100 ml de H_3PO_4 85%.
- 5) Diluir la solución hasta 1 lt con H_2O bidestilada.
- 6) Filtrar en Whatman 3MM.

Ensayo:

- a) Se ajusta la muestra de proteína con solución salina 0.15 M NaCl o buffer adecuado hasta 100 μ l.
- b) Agregar 5 ml de reactivo de Bradford.
- c) Medir a 595 nm inmediatamente.

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

| <u>Tubo</u> | <u>BSA (1 mg/ml)</u> | <u>NaCl 0.15 M</u> | <u>Bradford</u> |
|-------------|----------------------|--------------------|-----------------|
| 1 | 0 μ l | 100 μ l | 5 ml |
| 2 | 5 μ l | 95 μ l | " |
| 3 | 10 μ l | 90 μ l | " |
| 4 | 20 μ l | 80 μ l | " |
| 5 | 30 μ l | 70 μ l | " |
| 6 | 40 μ l | 60 μ l | " |

Tratamiento de bolsas de diálisis (105).

1. Hervir las bolsas en agua bidestilada estéril conteniendo NaHCO_3 al 10% y 10 mM de EDTA por 15 min.
2. Tirar la solución y lavar las bolsas varias veces con agua bidestilada estéril.
3. Repetir la operación 1 y 2.
4. Esterilizar las bolsas en 1 mM EDTA por 20 min.
5. Almacenar las bolsas agregándole 2 gotas de cloroformo, a 4°C.

Preparación de virus de Simio (SV40) (105).

1. Se siembran 50 cajas de petri (P100) con 3×10^6 células cada caja (24 hrs antes de usar); se incuban a 37°C en una cámara conteniendo CO_2 ; se retira el medio y se lavan las células con buffer PBS. Se infecta cada cultivo agregando 0.01 PFU (Unidades formadoras de placa) de virus por célula (en 0.5 ml de Medio Dulbecco sin suero). Las cajas se mueven deslizando el medio en direcciones perpendiculares) cada 20 min; se incuba por 1 1/2 hr a 37°C (para permitir la adhesión del virus); se adicionan 10 ml por caja de Medio Dulbecco al 2% de suero fetal de bovino.

Se incuba a 37°C (incubador con CO_2) por 10 días (El efecto citopático se observa entre 7-10 días).

Con un gendarme (hule) se separan las células y se mezclan dentro de la caja; la suspensión se coloca en un tubo de centrifuga - (frascos de 250 ml estériles); se centrifuga a 8000 rpm por 30 min. (4°C) en rotor SS34 (Sorvall).

El sobrenadante contiene la mayor parte del virus; la pastilla (conteniendo también virus) se suspende en buffer PBS. Posteriormente se sonica 3 veces por 15 seg a 50 watts (4°C). Se centrifuga 30 min, a 8000 rpm (4°C) en rotor SS34 y el sobrenadante se mezcla con el sobrenadante anterior.

El sobrenadante total se centrifuga a 25 000 rpm, 5 hrs (4°C) en rotor SW27; el virus queda en el paquete, el cual se resuspende en 1 ml por cada tubo de rotor (27 ml vol. de cada rotor) de PBS (o medio Dulbecco con 1% de suero fetal), y se deja por 18 hrs al menos a 4°C .

Titulación del virus SV40 por el método de PFU (Unidades formadoras de placa). (37).

1. Se siembran células de la línea CV1, teniéndose 1×10^6 células por caja (P60).

Al día siguiente se preparan las diluciones del virus en Medio Dulbecco (sin suero) o PBS (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , y 10^{-10}). Se elimina el Medio y se lavan las células 2 veces con 5 ml de buffer PBS (a 4°C).

Se infectan las células con 0.2 ml por caja de cada dilución. Las diluciones e infecciones se hacen por cuadruplicado.

Las cajas se mueven cada 20 min para permitir la absorción del virus; este proceso dura 90 min.

Por otra parte se prepara una mezcla de agar noble al 0.9% en Medio Dulbecco al 1.8%, a 45°C .

(debe de conservarse a esta temperatura hasta el momento de usarse). Al final del período de absorción se añade 1 ml de mezcla agar- Medio a 45°C por caja; luego de que solidifique se añaden 4 ml más.

Se incuban las cajas invertidas durante varios días a 37°C .

A partir del 14º día se empiezan a observar las placas (algunas veces se observan después de 16 a 18 días).

Para observar con mejor claridad las placas se tiñen con 4 ml de una solución al 0.01 % de rojo neutro estéril disuelto en Medio Dulbecco completo.

Se incuban por 18 hrs (con CO_2 a 37°C).

Al día siguiente se retira el colorante y se cuentan las placas.

La suspensión de virus se mezcla suavemente con una pipeta Pasteur (al final se ajusta con 1% de suero fetal de ternera (si se usó PBS para resuspender) y se centrifuga a 2000 rpm, 10 min, 4°C en SS34. El sobrenadante contiene el virus.

Se almacena 1 ml por tubo a -20°C.

Posteriormente, el virus se titula para determinar PFU/ml (Unidades formadoras de placa).

Puede determinarse también la dilución viral que aún produce una cantidad máxima de $[^3\text{H}]$ -DNA en extractos de Hirt (53). Este método ofrece la ventaja de ser más rápido que el plaqueo.

Obtención de DNA de SV40 por el Método de Hirt. (53).

- Células de la línea CV₁ infectadas con el virus SV40 y marcadas con timidina radioactiva entre 20 y 40 hrs después de la infección son empleadas para la obtención de DNA de SV40, y DNA celular marcado (ver células y virus).

Las células infectadas en cajas de 6 cm de diámetro) se colocan a 4°C (sobre hielo).

Se retira el medio y las células se lavan 2 veces con 5 ml de buffer PBS a 4°C. Después se agrega 1 ml de solución Hirt (Tris HCl 10⁻²M pH: 7.5, 10⁻²M EDTA, 0.6% SDS) (ó 2.5 ml si la caja es de 10 cm de diámetro), y se deja en contacto sobre las células entre 10 y 20 min a temperatura ambiente.

Las cajas se inclinan suavemente (2 veces); se despegan las células con la ayuda de un gendarme, colocándolas (sin usar pipeta, por inversión en la caja) después en un tubo Fálcon ó Eppendorf (revisar que el volumen obtenido por caja sea de aproximadamente 1.2 ml). Se adiciona NaCl (5 M) a una concentración final de 1.0 M; se tapa el tubo y se mezcla suavemente por inversión 3 veces, guardándolo después por lo menos 8 hrs a 4°C.

El tubo se centrifuga a 10,000 rpm, 60 min, a 4°C en rotor SS34; la fase superior conteniendo el DNA viral se extrae y la pastilla contiene el DNA celular.

Ambas fracciones de DNA se guardan a 4°C para su purificación posterior.

Purificación de DNA de Células CV₁ y de SV40, para ensayos de precipitación de ácidos nucleicos. (105).

El DNA obtenido por el Método de Hirt (El celular y el viral) se purifica de la siguiente manera:

A un volumen de solución de DNA, agregarle 1 volumen de fenol saturado con buffer TE (Tris HCl 10 mM pH: 7.9 , 1mM EDTA) La mezcla se agita lentamente por 2 a tres minutos a temperatura ambiente y después se centrifuga a 1500 rpm (4°C) en rotor SS34 (Sorvall); después se toma la fase acuosa superior que contiene el DNA y se la realiza una 2a. extracción fenólica (la fase fenólica inferior se descarta cada vez)

Posteriormente , a la fase acuosa se le realizan 2 extracciones -- con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) , adicionando 1 volumen de esta mezcla.

La mezcla se agita varias veces durante 1 min. en cada extracción, y la fase acuosa superior se trata luego con 2 volúmenes de etanol -- absoluto dejándolo por toda la noche a -20°C.

Nota: A esta mezcla no se le agrega NaCl, ya que viene del Hirt.

Al día siguiente la suspensión de DNA se centrifuga a 10,000 rpm, por 60 min, (4°C) en rotor SS34 (Sorvall) y la pastilla obtenida se suspende en el menor volumen posible de buffer TE.

Para quitar el exceso de SDS al DNA; se toma 1 ml de solución de DNA y se pasa por una columna de Sephadex G10 ó G50 de 20 ml de volumen de lecho previamente preparada y equilibrada con buffer TE.

El DNA se eluye con el mismo buffer TE, colectando fracciones de 500 μ l.

El pico de DNA eluido se detecta por absorbancia a 260 nm o por medio del Método de Burton (17).

Este DNA se guarda posteriormente a 4°C.

Nota Usando este tipo de Sephadex el DNA (tanto celular como viral) eluye en volumen vacío (volumen muerto) y el SDS queda incluido en la columna.

Determinación de DNA por el método de Burton (18).

Reactivos

Solución stock de DNA.

Se prepara una solución de DNA a una concentración de 0.4 mg/ml en 5 mM de NaOH, la cual se almacena a 4°C.

Las soluciones de DNA para la curva estándar se preparan mezclando 1 volumen de solución stock de DNA con un volumen de HClO₄ 1 M y calentando la mezcla por 15 min a 100°C.

Las soluciones estándar se preparan a las concentraciones de 10 µg/ml, 20 µg/ml, y 40 µg/ml, respectivamente.

Difenilamina.

La solución de Difenilamina se prepara mezclando 1.5 g de Difenilamina destilada con 100 ml de ácido acético concentrado y 1.5 ml de H₂SO₄ concentrado; la solución se almacena en la obscuridad.

Para usar se toman 20 ml de la solución de difenilamina y se adicionan 100 µl de acetaldehído en solución acuosa (16 mg/ml).

Ensayo para muestras en líquido

Se toman 200 µl de muestra a lo que se desea estimar la concentración de DNA; se adicionan 200 µl de 0.5 N HClO₄ y 800 µl de difenilamina (con acetaldehído).

Los tubos conteniendo las muestras se tapan con papel aluminio o se guardan en la obscuridad y se agitan suavemente por 20 hrs a temperatura ambiente, después de lo cual se lee absorbancia a 600 nm.

Ensayo para resinas

El ensayo se realiza tomando 100 μ l de resina y disolviéndola en 4.9 ml de 0.5 N HClO_4 ; la solución se agita para hacerla homogénea, y se toman 200 μ l de la suspensión, para ensayar la cantidad de DNA del mismo modo que el ensayo para muestras en líquido.

Corte y Desnaturalización de DNA de SV40. (105).

El DNA de SV40 obtenido por la técnica de Hirt y posteriormente purificado por medio de extracciones fenólicas, se corta con la enzima de restricción Eco. R1.

Se toma 1 μ g de DNA y se le adiciona 2 unidades de la enzima en una mezcla de reacción conteniendo 50 mM Tris HCl pH: 7.5 , 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl , 1 mM DTT , en un volumen final de 23 μ l.

Posteriormente la mezcla se incuba por 5 hrs a 37°C ; después la reacción se detiene calentando 5 min a 70°C . El corte del DNA se observa posteriormente por medio de geles de agarosa (ver Técnica geles de Agarosa).

Desnaturalización de DNA.

La desnaturalización del DNA se realiza calentando una solución de DNA (43.5 μ g/ml) por 15 min a 100°C y posteriormente enfriándolo rápidamente en hielo a 0°C.

De esta manera se prepara el DNA cadena simple.

Calendario de Inmunizaciones. (106).

Para la obtención de anticuerpos contra la Proteína 32 , 8 conejos jóvenes New Zeland de 2 meses de edad fueron inyectados y sangrados de acuerdo al siguiente esquema:

| <u>Número de Conejo:</u> | <u>Agente Inmunizante</u> |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 55 , 56 | P ₃₂ -Muramil Dipéptido (P ₃₂ -MDP). |
| 57 , 58 | P ₃₂ -Adyuvante de Freund completo. |
| 59 , 60 | P ₃₂ -RNA (Levadura) -Adyuvante de Freund Completo. |
| 61 , 62 | P ₃₂ -RNA (Levadura) -Muramil Dipéptido. |

Cada conejo recibe 4 inyecciones a los tiempos (0, 15, 30 y 60 días)

La primera inmunización de los conejos se realiza inyactándolos -- en los cojinetes de las patas traseras y en la parte dorsal.

Las siguientes 3 inmunizaciones se realizan simultaneamente por vía subcutánea en la parte dorsal y por vía intramuscular en las patas tra seras.

El sangrado de los conejos (5 ml) se realiza cada 15 días, des-- pues de la primera inmunización , para ir observando la respuesta -- del conejo y el título de anticuerpos.

El título se sigue por medio de Inmunodifusión (ver Preparación-- de Ouchterlony).

Preparación de Inyecciones para Conejos (106).

A. Preparación de Muramil Dipéptido (MDP) para 10 inyecciones.

Disolver 2 mg de MDP (ver Reactivos) en 500 μ l de H₂O bi-destilada estéril (1 ampolleta comercial).

Se toman 50 μ l de la solución de MDP (200 μ l de MDP); y se añaden 200 μ g de Proteína 32 más 250 μ l de Aceite mineral comercial (ver Reactivos). Posteriormente se mezcla con un homogenizador hasta que se forme una emulsión.

B. Inyección con Adyuvante de Freund Completo.

Tomar 200 μ g de Proteína 32 y agregar un volumen de Adyuvante de Freund completo.

Nota: Es conveniente que la proteína esté disuelta en un pequeño volumen de buffer.

Después, agregar solución salina (0.15 M NaCl), para llevar a un volumen final adecuado (800 μ l por ejemplo).

La mezcla se homogeniza como se indicó anteriormente hasta que se forme una emulsión.

Nota: Las inyecciones con el adyuvante Muramil Dipéptido se preparan al momento y las de Freund se pueden almacenar por 1 semana a 4°C.

OBTENCION Y PRESELVACION DEL SUERO (106).

Después de sangrado el conejo, se deja la sangre por 1 o 2 horas a temperatura ambiente, para que se forme el coágulo.

Posteriormente, separar cuidadosamente el coágulo de las paredes del tubo con una espátula de metal y se guarda en el refrigerador por 12 o 24 hrs para permitir la contracción del coágulo.

Al día siguiente el suero se decanta en tubos adecuados (Falcon) y se centrifuga a 1000 x g por 30 min, a 4°C (6 2500-3000 rpm, en un rotor de 14 cm de radio; en rotor SS34). Cuidadosamente el suero se remueve por decantación o con una pipeta pasteur con la punta justo debajo del menisco.

Si se requiere un suero muy claro, se repiten las centrifugaciones.

El suero después de centrifugado, se guarda a -20°C, o con merthiolate al 0.0001% o azida de sodio al 0.1% a 4°C.

Técnica Ouchterlony (105).

Las placas sobre las que se va hacer la inmunodifusión se lavan con RBS (detergente) o con SDS al 10% y después se lavan varias veces con agua bidestilada, hasta que corra uniformemente el H₂O sobre el cristal.

Las placas se colocan en un horno por 10 min. a 80°C.

Pretratamiento.

Colocar sobre la placa (con una pipeta pasteur) 2 gotas de agarosa (Sigma) al 2% disuelta en agua y rápidamente extenderla con el dedo para que quede una película trasparente y fina.

Nuevamente se colocan las placas en el horno a 80°C por 10 min.

Posteriormente, se adicionan 25 ml por placa o 5 ml por portaobjeto de agarosa Sigma (o agar noble) al 1% disuelta en buffer PBS (10^{-2} M PO_3^{-3} pH: 7.5, 150 mM NaCl, 10% glicerol).

Nota: Hay que calentar la agarosa al 1% y hacer una solución homogénea a 60°C.

Esperar a que la agarosa solidifique y se fije completamente.

Después con un molde formar las cubetas en la agarosa y sacarlas de la agarosa con una pipeta pasteur conectada al vacío.

Se llenan los pozos con las muestras, colocando 14 μl , primero del suero a titular y después de 1 hr colocar el Antígeno (varía de 3 a 14 μl) en el pozo correspondiente.

Guardar la placa formada en una caja de 102 x 140 mm, conteniendo en el fondo un papel filtro Watman 3 MM humedecido con PBS + 10% glicerol.

La caja se coloca por 8 hrs a 37°C y luego se observa la precipitación del complejo Antígeno - Anticuerpo.

Purificación de Anticuerpos (Globulinas Totales de suero: IgG)
libres de RNAasas (105).

A. Precipitación de Anticuerpos (IgG) del suero con sulfato de Amonio.

Todas las operaciones de la purificación se realizan a 4°C.

Se toma un volumen de suero de conejo (20 ml son convenientes y se adiciona 1 volumen de buffer boratos (0.1 M BO_3^{-3} , 25 mM tetraborato de sodio pH: 8.4, 150 mM NaCl) y se agita lentamente por 15 min.

Posteriormente se adiciona al suero diluido 1 volumen de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40 ml) concentrado (saturado a temperatura ambiente) gota a gota y muy lentamente con agitación constante.

Posteriormente se deja reposar por 6 hrs.

Se centrifuga a 3000 rpm por 30 min en rotor SS34; se descarta el sobrenadante (para observar título) y la pastilla obtenida se resuspende en un pequeño volumen de buffer boratos (8 a 10 ml de buffer son suficientes).

La solución se vuelve a precipitar con 1 volumen de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado y se deja reposar por 30 min.

Nuevamente se centrifuga (el sobrenadante se guarda para título); la pastilla obtenida se suspende en 5 ml de buffer PBS y se pone a dializar 200 ml de buffer PBS, realizando 3 cambios de buffer durante 72 hrs.

Después los anticuerpos se guardan a -20°C hasta su uso.

B. Fijación de Anticuerpos (IgG) a resinas de Proteína A-Sepharosa.

Se toman 3 ml del suero precipitado y dializado y se llevan a una concentración de 20 mg/ml; se agregan a un tubo que contiene 2 ml de Proteína A-Sepharosa (ver Reactivos), para su preparación).

El suero junto con la resina se incuban por inversión lenta por 1 hr a 37°C. Después, se deja decantar la resina y se toma el sobrenadante (fracción no retenida).

La resina se lava 2 veces con 5 ml de PBS cada vez, descartando el sobrenadante obtenido al sedimentarse la resina; se lava nuevamente con un gradiente discontinuo de sal en buffer PB (10^{-2} M PO_4^{-3} pH: 7.5) conteniendo 0.2 M NaCl, 0.4 M NaCl, 0.6 M NaCl, y 1 M NaCl respectivamente y realizando 2 lavados de 4 ml por cada buffer.

La resina conteniendo los anticuerpos fijos y lavados, se trata 2 veces con buffer PBS para equilibrarla y posteriormente se coloca en una columna previamente preparada (pipeta Pasteur estéril).

Los anticuerpos fijos a la Proteína A-Sepharosa son eluidos adicionando a la columna 10 ml de buffer citrato fosfato (Acido cítrico 52 mM, 25 mM Na_2HPO_4 pH: 3.0) y colectando fracciones de 1 ml.

Las fracciones en donde eluyen los anticuerpos se identifican y cuantifican por el método de Bradford; éstas rápidamente se juntan y neutralizan adicionando 600 $\mu\text{l/ml}$ de Anticuerpos de buffer Tris HCl 2 M pH: 7.9.

Se toma alícuota para título y el resto se dializa contra buffer PBS por 24 hrs a 4°C.

Después de la diálisis se ensaya título por Inmunodifusión y actividad de RNAasas (ver Ensayo RNAasas).

Los anticuerpos son guardados a -20°C.

Electroforesis de proteínas en geles de Poliacrilamida-SDS(Geles en Gradiente) (Modificación Laemmli, 67).

Los geles se preparan en gradiente continuo teniendo una concentración del 5% al 17% de acrilamida.

Se prepara una solución stock de acrilamida al 30% en peso y 0.8% de N,N' bis-metilen-acrilamida en peso, disuelta en H₂O. Posteriormente se preparan las soluciones de trabajo de acrilamida al 17% y 5% agregando buffer a una concentración final de buffer Tris HCl 0.375 M pH: 8.9, 0.1% SDS, 5% glicerol, las soluciones se mezclan suavemente y después se agrega tetrametil-etilenamina (TEMED) a una concentración de 4×10^{-3} % final y persulfato de amonio (recién preparado) al 0.02% final para que la acrilamida se polimerize.

El gradiente de gel se prepara mediante un formador de gradientes adicionando la acrilamida (25 ml de cada solución a placas de vidrio de 15 cm x 15 cm. Se coloca inmediatamente sobre el gel aún sin polimerizar isopropanol para que el gel quede uniforme en toda su anchura). Después de polimerizado el gel, se retira el isopropanol y se lava con H₂O destilada la parte superior del gel.

Sobre el gel formado, se adicionan 10 ml de acrilamida al 5% en buffer Tris HCl 0.125 M pH: 6.8, 0.1% SDS conteniendo TEMED y persulfato de amonio, a la misma concentración que en el gel separador.

Se coloca un peine el cual formará los carriles después de que el gel concentrador polimerize.

Las muestras que se colocan sobre el gel se preparan (por lo general) adicionando a 15 μ l de muestra (Proteína) 5 μ l de buffer de muestra obteniéndose una concentración final de buffer Tris HCl 0.0625 M pH: 6.8, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol, 10% glicerol, 0.5 μ l de colorante azul de bromofenol al 0.001% y 10% glicerol final, es decir, se adiciona 1/4 de volumen de solución conteniendo 0.25 M Tris HCl pH: 6.8, 8% SDS, 20% β -mercaptoetanol, 40% glicerol, y azul de bromofenol). Después la mezcla se calienta por 5 min a ebullición.

El buffer sobre el cual se coloca el gel (buffer de electrodo es Tris HCl 0.025 M pH: 8.3, 0.192 M glicina, 0.1% SDS.

Condiciones de corrida

Después de hecho el gel y colocado en una cámara con el buffer de corrida, éste se precorre por 2 hrs a 150 volts.

Se aplica posteriormente la muestra y se corre el gel primero 20 min a 200 volts, y luego a 150 volts hasta terminar la corrida.

Terminada la corrida el gel se tiñe por 1 hr a temperatura ambiente con una solución conteniendo azul de Comassie (R250) al 0.25%, 45.5% Metanol y 9.2% ácido acético.

Se retira el colorante y se destiñe con una solución (45% metanol, 7.5% ácido acético) por 1 hr, luego se lava el gel contra otra solución (5% Metanol, 7% ácido acético) dejándolo aquí por 12 hrs al menos, para observar bandas definidas de polipéptidos.

NOTA: Deben usarse marcadores de peso molecular conocido.

Geles de Agarosa (105).

Los geles de agarosa se emplearán para separar por electroforesis muestras conteniendo ácidos nucleicos (DNA y RNA). La agarosa se prepara disolviendo 1 g de agarosa Sigma tipo II en 100 ml de buffer E (Tris HCl 40 mM pH: 7.3, 10 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA), conteniendo glicerol 10% final.

Se calienta la agarosa a ebullición y se deja enfriar a 70°C, posteriormente, se agregan 120 ml de la solución de agarosa a una cámara de 21 cm x 14 cm y se coloca enseguida un peine que forma los carriles sobre el gel al solidificarse la agarosa.

La muestra se prepara adicionando a 50 μ l de la solución conteniendo el ácido nucleico, 5 μ l de sacarosa al 60% (p/v), conteniendo azul de bromofenol al 0.2% (p/v).

Después de solidificado el gel, se retira el peine y se colocan 40 μ l de muestra por cada carril. Se corre a 120 volts por 3 hrs a temperatura ambiente o a 4°C de preferencia.

Terminada la corrida el gel se coloca en un refractario conteniendo 100 ml de bromuro de etidio a una concentración de 1 g/ml disuelto en buffer E.

El gel se agita suavemente por 30 min para que se tiña el ácido nucleico; después el gel se destiñe por 30 min más en buffer E. Se emplea luz U.V. en cámara oscura para observar las bandas de DNA.

Purificación de RNA ribosomal (RNAr) (105).

Crece un precultivo de 5 ml de *E. coli* Uracilo⁻ (U⁻) en medio mínimo, conteniendo glucosa al 2% y 10 µg/ml de Uracilo a 37°C por toda la noche.

Al día siguiente, el cultivo se centrifuga a 6000 rpm por 10 min a 4°C en rotor SS34.

La pastilla de bacterias se lava 2 veces con 5 ml de medio sin Uracilo, centrifugando como se indicó anteriormente y las bacterias se suspenden en 50 ml de medio mínimo conteniendo como fuente de carbono glucosa al 2% y 1 µg/ml de uracilo. Se añade 5 µCi/ml de [³H] Uracilo y las bacterias se crecen por 5 generaciones (~5 hrs) a 37°C; después se lavan las células 2 veces con medio de cultivo sin uracilo y se incuban nuevamente en medio mínimo (2% glucosa) conteniendo 50 µg/ml de Uracilo frío (casa) por 30 min a temperatura ambiente (con el objeto de eliminar el [³H] m RNA de vida media corta).

Se centrifugan las células (en las condiciones anteriores) y se suspenden en 10 ml de EDTA 5 mM, agregando 100 µg/ml de lizosima; se incuba por 10 min a 20°C, y posteriormente se adiciona SDS 1% final, Proteinasa K* (200 µg/ml final) y buffer Tris HCl 10 mM pH: 7.5, 20 mM NaCl; se vuelve a incubar por 30 min a 37°C (con el objeto de digerir proteínas, en particular RNAsas).

Se adiciona 1/10 de volumen de Acetato de sodio 1 M, pH: 5.1.

La mezcla se calienta a 66°C; se agrega un volumen de fenol a 66°C que ha sido saturado previamente con agua bidestilada estéril, se mezcla por 2 a 3 min y se enfría rápidamente en hielo-NaCl (- 8°C) y se centrifuga a 1500 rpm, 10 min, a temperatura

ambiente.

Se extrae la fase acuosa y se repite la extracción fenólica; seguido de una extracción con 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1); la fase acuosa se transfiere a un tubo corex y se le agrega buffer acetato de sodio 100 mM final pH: 5.1 y 2 volúmenes de etanol al 100%; se deja precipitando toda la noche a -20°C .

Al día siguiente se centrifuga a 12,000 rpm, 60 min, 4°C en rotor SS34.

Se retira el sobrenadante; la pastilla de $[^3\text{H}]\text{RNA}_r$ se seca en (aire o vacío) y se suspende en 1 ml de buffer acetato de sodio 100 mM pH: 5.1 y se almacena a -20°C .

*La Proteinasa K se prepara disolviendo la enzima en agua bidestilada estéril e incubándola 30 min a 30°C ; después se almacena a -20°C .

Nota: Todas las operaciones deben ser efectuadas en las condiciones más estériles posibles, es decir, soluciones esterilizadas, material de vidrio calentado a 180°C por 3 hrs. etc.

Purificación de RNA polimerasa de *E. coli* RNAasa III⁻ (16)

A. Preparación del extracto celular crudo.

50 g de bacterias *E. coli* K12 RNAasa III⁻ crecidas hasta 3 cuartas partes de fase logarítmica (Abs: 0.7 a 590 nm), se congelan a -70°C hasta antes de usar (ver crecimiento de bacterias *E. coli* K12 RNAasa III⁻).

Al usar la pastilla se fragmenta y se coloca en 150 ml de buffer Grinding (Tris HCl 0.05 M pH: 7.9, .002 M EDTA, 0.1 mM DTT, 1 mM β-mercaptoetanol, 0.233 M NaCl, 0.02 M Fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF), 5% glicerol); se adiciona posteriormente lizosima (0.13 mg/ml final).

Las bacterias son centrifugadas 3 min a 5000 rpm (4°C) en rotor SS34 (aquí la temperatura aumenta de 2 hasta 5°C). A la mezcla de bacterias homogenadas se incuban a 4°C por 20 min.

Se agrega desoxicolato de sodio al 0.05% final y la mezcla se centrifuga a 500 rpm x 30 seg (4°C) en rotor SS34 y se incuba a 10°C por 20 min. Nuevamente la mezcla de lisado bacteriano se centrifuga a 500 rpm, 30 seg, 4°C, en rotor SS34 (Sorvall).

A la mezcla se le adiciona 200 ml de buffer TGED (Tris HCl 0.1 M pH: 7.9, 10⁻⁴ M EDTA, 10⁻⁴ M DTT, 5% glicerol) y se agrega 0.2 M NaCl (concentración final) y la mezcla se centrifuga a 8000 rpm por 30 seg (4°C) en rotor SS34. Hasta aquí se tienen 400 ml de extracto celular.

El extracto celular se centrifuga a 8000 rpm por 45 min (4°C) en rotor GS3 (Sorvall RC-2B); el sobrenadante claro ámbar y viscoso se colecta, obteniéndose aproximadamente 346 ml de extracto.

B. Fraccionamiento con Polymina P.

Al sobrenadante obtenido a baja velocidad se le adiciona lentamente una solución de Polymina P al 10%, pH: 7.9, hasta obtener una concentración final de aproximadamente 0.35%.

La mezcla se sigue agitando suavemente por 5 min (4°C) y después se centrifuga a 6000 rpm por 15 min (4°C) en rotor SS34; el sobrenadante se guarda y se le mide absorbancia a 280/260 nm.

La pastilla obtenida se suspende en 200 ml de buffer TGED + 0.5 M NaCl y se agita lentamente por 5 min, evitando la formación de espuma. Si hay partículas, éstas pueden ser suspendidas en un homogenizador Dounce de 100 ml. La solución se centrifuga a 6000 rpm, 15 min (4°C) en rotor GSA y nuevamente el sobrenadante (0.5 M NaCl) se descarta. La pastilla se suspende en 200 ml de buffer TGED + 1 M NaCl, agitando lentamente por 5 min (las partículas son resuspendidas en un homogenizador Dounce).

La mezcla se centrifuga a 6000 rpm x 30 min a 4°C en GSA, y el sobrenadante es colectado (197 ml aproximadamente conteniendo la polimerasa en 1.0 M NaCl). A éste se le adiciona $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido (35 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por 100 ml de sobrenadante) hasta dar un 50% de saturación final. La mezcla se agita suavemente por 20 min y se centrifuga 45 min a 8000 rpm (4°C) en GSA, descartando el sobrenadante.

La pastilla se disuelve en TGED hasta obtener una conductividad equivalente a la de buffer TGED + 0.15 M NaCl (se requieren aproximadamente de 100 a 150 ml de TGED).

C. Cromatografía de DNA - Celulosa

Previamente a la purificación de la RNA polimerasa se monta una columna de DNA- Celulosa de 100 ml de lecho, equilibrada con buffer TGED + 0.15 M NaCl.

La muestra disuelta y diluída en buffer TGED es puesta en una columna de DNA - Celulosa, con un flujo de 100 ml/hr.

Posteriormente, la columna se lava con 500 ml de buffer TGED + 0.15 M NaCl, luego la RNA polimerosa se eluye con un gradiente lineal de NaCl (Buffers TGED + 0.15 M NaCl y buffer TGED 1.0 M NaCl).

La actividad de la enzima (ver Ensayo de actividad de RNA polimerasa), eluye en una concentración de 0.3 a 0.45 M NaCl.

Se colectan las fracciones del pico y se dializan por 24 hrs contra 800 ml de buffer TGED + 50% glicerol; la enzima se guarda a -70°C (a -20°C si se requiere estar usando continuamente).

Ensayo de Actividad RNA polimerasa de *E. coli* (modificación Burgess, 16).

La actividad de la RNA polimerasa de *E. coli* se detecta de la siguiente manera:

Se toman 50 μ l de la solución donde se encuentra la enzima y se agregan 60 μ g de DNA de timo de ternera como templado; se incuban por 5 minutos a 37°C para permitir la unión de la enzima al DNA.

Después se agrega agua hasta un volumen de 90 μ l y 39 μ l de la mezcla de reacción que contiene Tris HCl 50 mM pH: 7.9, 100 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.25 mM DTT, 1 mM ATP, GTP, TTP, 2.25 mM de UTP y 0.27 μ M [³H] UTP (3 μ Ci por ensayo).

La mezcla (125 μ l) se incuba 5, 15, 30 y 60 min); después se para la reacción agregando, 20 mM EDTA, SDS al 1% final. Como control se usó una mezcla de reacción sin DNA y otra sin RNA polimerasa.

Las mezclas de reacción se precipitan en el tubo adicionando 2 volúmenes (250 μ l) de Acido Tricloro acético (TCA) al 10% (por 10 min a 4°C).

La mezcla se filtra en Whatman GF/C (y se enjuaga 2 veces el tubo con TCA al 5%, se lava 2 veces el filtro con 5% TCA y 2 veces con 98% de etanol.

El filtro se seca y se cuenta su radioactividad con líquido de centelleo (Tolueno, 5% PPO, 1.8% POPOP).

Síntesis de cRNA de SV40 (Modificación Burgess, 16).

El $[^3\text{H}]$ -cRNA se sintetiza incubando 12 μg de RNA polimerasa de *E. coli* (250 μl) con 9.6 μg de DNA de SV40 (125 μl) por 4 min a 37°C.

Posteriormente se adiciona 300 μl de la solución (Mezcla de Reacción) conteniendo 50 mM Tris HCl pH: 7.9, 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 0.25 mM DTT, 1.0 mM de cada uno de los nucleótidos ATP, GTP y TTP, 0.1 mM UTP y 1 mCi de $[^3\text{H}]$ UTP (Actividad 23 Ci/mMol), y 500 μl de H_2O bidestilada estéril y se incuba por 90 min a 37°C.

La reacción se detiene agregando 20 mM EDTA y 1% SDS a concentración final y 100 μg de tRNA de levadura y colocando el tubo a 4°C.

Se realiza inmediatamente una extracción fenólica a 66°C y se centrifuga a 1500 rpm, 15 min, 4°C en rotor SS34 (SORVALL); la fase acuosa superior se colecta y se le adiciona 2 volúmenes de etanol absoluto, dejando toda la noche a -20°C.

Al día siguiente el cRNA se empastilla centrifugando a 10,000 rpm, 90 min, 4°C en rotor SS34, descartando el etanol y secando el cRNA en un desecador al vacío por 2 hrs.

El $[^3\text{H}]$ -cRNA se suspende en 200 μl de buffer Acetatos 100 mM pH: 5.1, y se almacena, en alícuotas de 50 μl a -20°C.

Purificación de Complejo de Transcripción de SV40 (39).

A. Obtención de minicrosomas de SV40

Células de la línea CV₁ (10⁸ células/caja) son infectadas con virus SV40, a una multiplicidad de infección de (moi.10) (10 PFU/célula) (ver infección, células y virus).

En general las células se marcan ya sea con [³H] timidina ó [¹⁴C] timidina. Después de 40 hrs post-infección las células son sacadas de incubación y puestas a 4°C.

El medio se retira y se lavan 2 veces con 5 ml de buffer A (Tris HCl 2.5 mM pH: 7.9, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄). Se retira el buffer A, se añade 1 ml de buffer A y con la ayuda de un gendarme se colectan las células. Posteriormente, se centrifugan 5 min a 3000 rpm (4°C), en rotor SS34; el sobrenadante se descarta y las células son suspendidas en 0.5 ml/caja de buffer hipotónico B (Tris HCl 25 mM pH: 7.9, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF).

La suspensión de células es colocada en un gradiente discontinuo de Sacarosa (4 ml 0.8 M Sac, 2 ml 0.5 M Sac, 2 ml, 0.3 M Sac) disuelta en buffer C (20 mM Tris HCl pH: 7.9, 15 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF), centrifugada a 600 rpm, 15 min (4°C) en rotor SS34.

La sacarosa se descarta y los núcleos purificados se suspenden en 0.25 ml/caja de buffer de extracción (10 mM Tris HCl pH: 7.9, 0.2 mM PMSF, 1.0 mM DTT) adicionando (después de resuspender los núcleos) 0.4 M NaCl final.

Se incuba a 4°C por 30 min, agitando lentamente cada 5 min.

Se vuelve a centrifugar 15 min a 10,000 rpm (4°C) en rotor SS34.

El sobrenadante conteniendo la cromatina viral se mantiene por corto tiempo a 2°C antes de usarlo en reacciones de transcripción.

Después de la transcripción (ver parte B la reacción se detiene con EDTA 10 mM final, y tanto los minirosomas como los complejos de transcripción son puestos sobre un gradiente continuo de Sacarosa de 10 a 40% en 20 mM Tris HCl pH: 7.9, 0.4 M NaCl, 0.2 mM EDTA y centrifugados 90 min a 49,000 rpm (4°C) en rotor SW50.1.

El gradiente es colectado y detectada las fracciones donde se localizan el minirosoma (marcado generalmente con $[^{14}\text{C}]$ Timidina) y el complejo de Transcripción (generalmente marcado con $[^3\text{H}]$ -UTP), contando la radioactividad en los mismos (Ver resultados, Purificación de Minirosoma y Complejo de Transcripción de SV40).

B. Transcripción de Minirosomas extraídos de células CV₁.

180 μl de cromatina viral conteniendo de 6 a 8 μg de DNA fueron incubados con 70 μl de mezcla de reacción teniendo 88 mM Tris HCl (pH: 7.9), 150 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MnCl_2 , 1.7 mM DTT, 1 mM de cada uno de los nucleótidos UTP, ATP, GTP, 0.1 mM CTP y μM de $[^{32}\text{P}]$ CTP, por 70 min a 32°C.

La reacción fue detenida a 4°C adicionando EDTA a una concentración final de 10 mM.

Los complejos obtenidos son puestos en un gradiente de Sacarosa. (Ver parte A).

Columna Sepharosa 4B para Experimentos de Purificación de
Complejos de Transcripción de SV40 (105).

10 ml de Sepharosa 4B Sigma se lavan extensivamente de 10 a 15 veces con 80 mM de trietanolamina pH: 7.9 , 0.2 M NaCl , 1.2 $\mu\text{g/ml}$ de P_{32} .

Posteriormente se monta una columna de 5 ml de volumen de lecho y de 25-cm de altura , equilibrándola después con 3 volúmenes del buffer descrito anteriormente; esto se realiza antes de cada experimento.

El flujo de la columna se mantiene por 300 μl /hr y se trabaja siempre a 4°C.

Es muy importante no poner menos de 500 μl de muestra ni más de 900 , ya que la resolución de la columna no es muy satisfactoria.

RESULTADOS PARTE I

Resultados (a):

La descripción de los resultados (b) muestran el protocolo seguido para el montaje de purificación del complejo de transcripción de SV40.

El $[^3\text{H}]_r$ RNA purificado (Fig 13) se empleó básicamente para probar la presencia de RNAasas en todas nuestras muestras, buffers y material biológico empleado, como DNA, Anticuerpos y Proteína A-Sepharosa (ver Fig 9).

Se obtuvieron por cada preparación de $[^3\text{H}]_r$ RNA aproximadamente 1 mg, teniendo éste una actividad e 3000 CPM/ μg .

Los DNAs empleados fueron de células CV₁ y de timo de termera; en el caso del primero la cantidad que se obtuvo variaba de purificación en purificación, lo mismo que el cRNA sintetizado in vitro.

La cantidad de cada una de estas muestras y su actividad específica se muestra en la siguiente hoja.

Actividad Específica De Muestras Obtenidas En El Laboratorio.

- ^3H rRNA 2700 CPM/ μg .
- ^3H DNA- Células CV₁... 100 CPM/ μg .
- ^{14}C DNA-Células CV₁ ... 700 CPM/ μg .
- ^3H cRNA SV40 2,500000 CPM/ μg .

Cantidad De Muestras Obtenidas De Algunas Preparaciones.

De 20 ml. de suero total de conejo, se obtuvieron entre 30-35 mg de anticuerpos - puros y libres de RNAasas.

Se obtuvieron de 6 lts de cultivo de ϕ T₄ 120 ml. de fago con un título de 2×10^{11} fagos/ml.

Resultados (b):

Para el desarrollo del objetivo de este proyecto, lo primero que se realizó fue la purificación de la Proteína 32 (P_{32}). La cual se empleó básicamente para la precipitación diferencial de ácidos nucleicos de cadena simple y posteriormente el montaje de purificación del complejo de transcripción de SV40.

Se obtuvo a partir de 100 g de células 30 mg de P_{32} altamente pura (Fig 5) por electroforesis.

Después de probar que esta estuviera libre de RNAasas (Fig 4) y su purificación posterior, se montó el sistema para precipitar primeramente DNA simple cadena de células CV₁, empleando a la P_{32} y anticuerpos contra la misma (previamente obtenidos y purificados en el laboratorio) para formar complejos los cuales se precipitaron primeramente con Proteína A-Sepharosa (Fig 5) y después para evitar incluir a la Sepharosa en nuestros experimentos ya que ésta puede arrastrar inespecíficamente a algunos componentes como DNA se empezó a usar un segundo anticuerpo para precipitar a los complejos formados de Acido nucleico- P_{32} -Anti P_{32} (Fig 7).

Posteriormente al precipitar DNA simple cadena, se trató de precipitar diferencialmente a éste de una mezcla que llevara DNA doble y simple cadena, marcados con [¹⁴C] y [³H] respectivamente, esto con el fin de montar una metodología para cuando se tuviera una mezcla de ambos (como por ejemplo Minicromosomas de SV40 y RNA_m de SV40) (Fig 8) y Fig 6).

Después de montar este sistema se precipitó cRNA de SV40 (ver Material y Métodos) como en el caso del DNA de células CV₁

empleando Proteína A-Sepharosa y el doble anticuerpo como acarreador para precipitar los complejos. (Fig 20 y Fig 21).

No obstante la idea central es tratar de purificar el 1% de complejo de transcripción y separarlo del resto de minicromosomas (99%) que se encuentran en una célula infectada con SV40 en periodos tardíos de infección.

Para lo cual después de precipitar el cRNA en un buen porcentaje (~ 80%), se incluyó en una mezcla [^3H] cRNA y [^{14}C] Minicromosomas SV40, tratando de precipitar al cRNA diferencialmente (Fig 23). Aquí el porcentaje máximo de precipitación que se alcanzó fue del 20% para el cRNA; experimentos subsecuentes tratando de aumentar este porcentaje (experimentos no mostrados) solo se obtenía un 25% cuando máximo.

Figura 2. PERFIL DE ELUCION DE LA COLUMNA DE DNA-CELULOSA USADA PARA PURIFICAR PROTEINA 32.

La cromatografía se llevó a cabo como se describe en Material y Métodos, con un flujo de columna de 47 ml/hr. Fracciones de 6 ml fueron colectadas y a 1 ml de cada fracción le fue medida su absorbancia a 280 nm y multiplicada por el volumen de cada fracción.

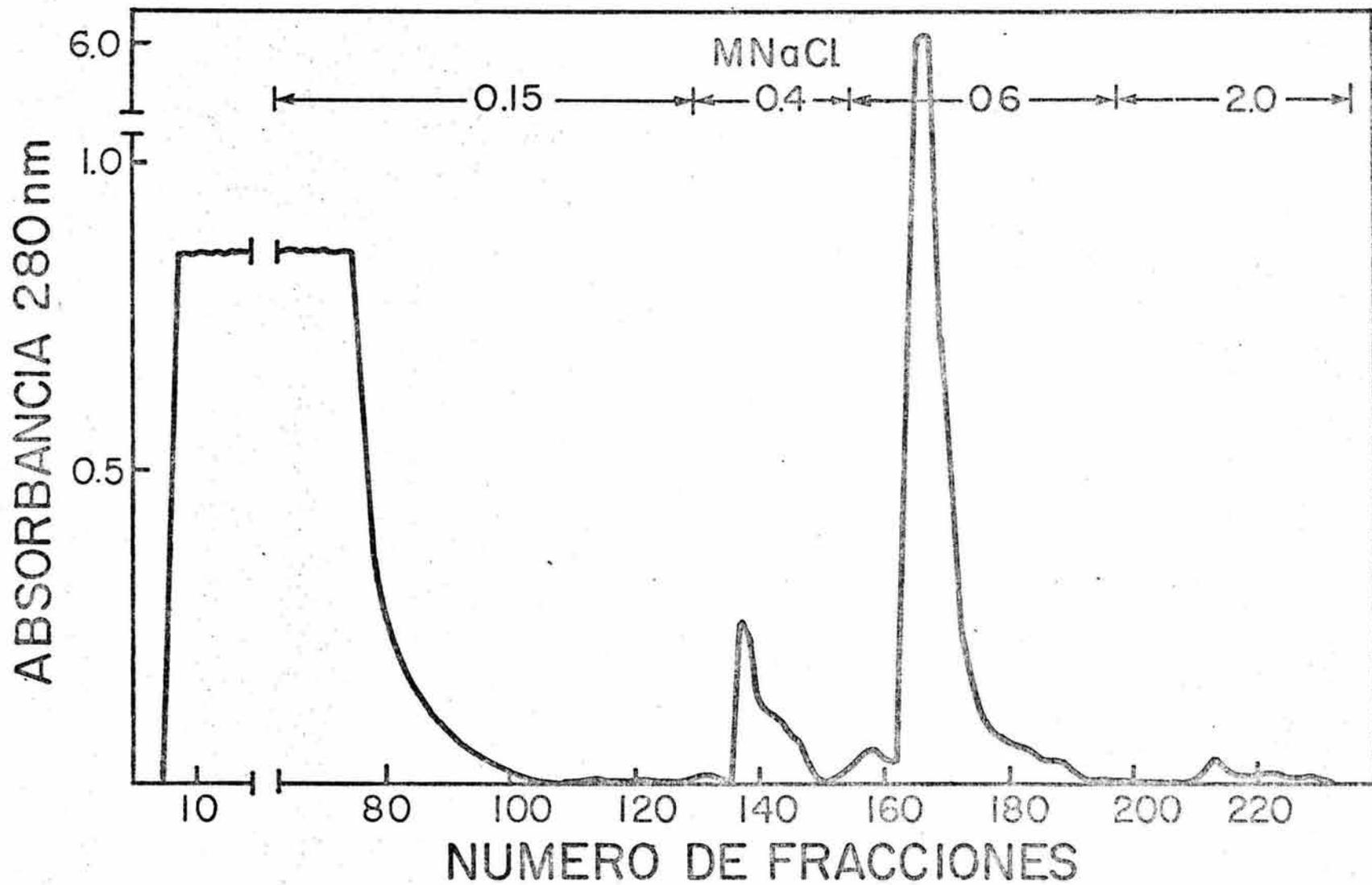


Figura 3 y 4. CROMATOGRAFIA DE COLUMNA DE DEAE-CELULOSA Y FOSFOCELULOSA.

Se llevó a cabo como se describe en Material y Métodos. Para la figura A, alícuotas de 6 ml fueron colectadas con un flujo de columna de 44 ml/hr y 34 ml/hr para la columna de fosfocelulosa.

Posteriormente a 1 ml de cada fracción le fue medida su absorbancia a 280 nm y cuantificada posteriormente proteína.

Se muestra la absorbancia total de cada fracción.

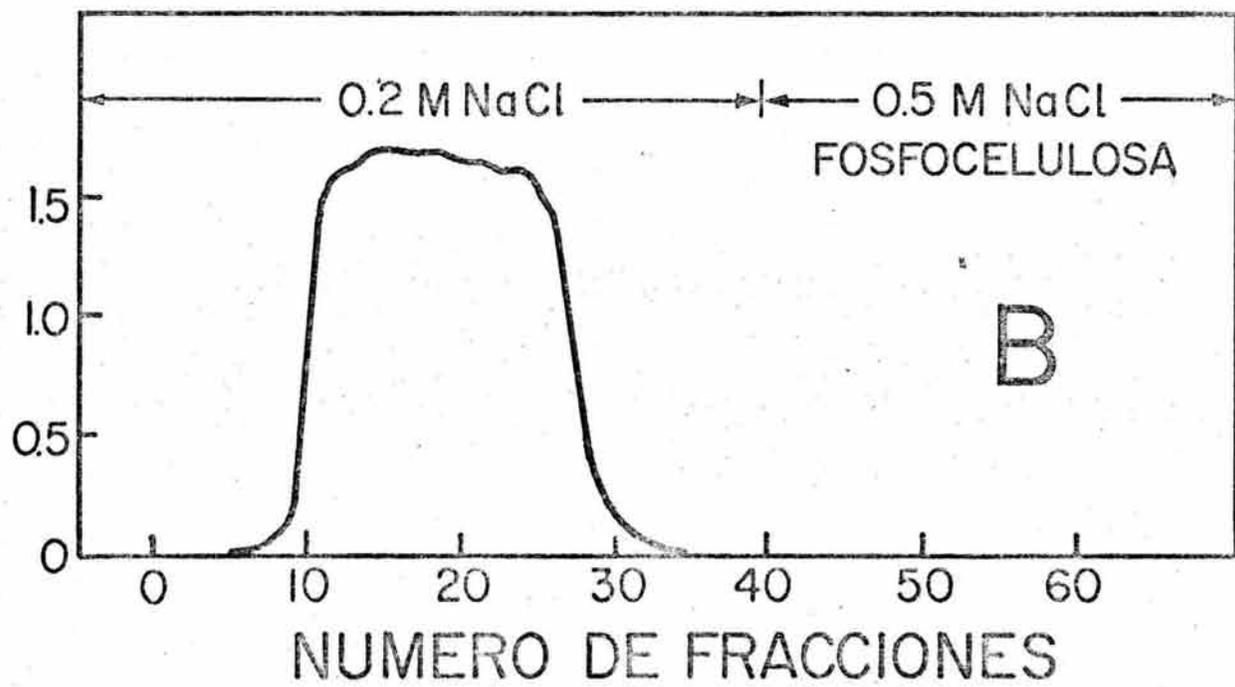
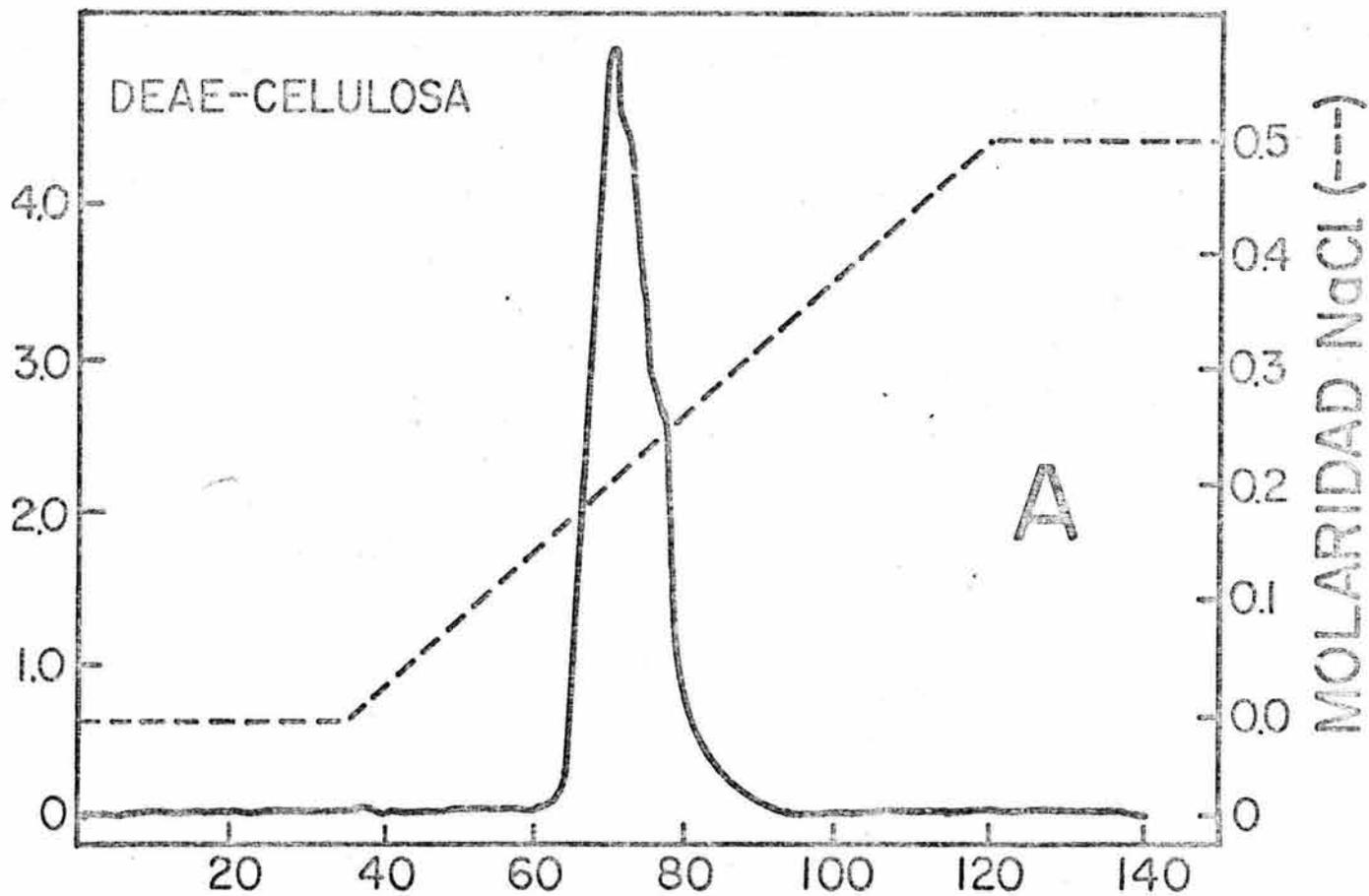


Figura 5. ETAPAS DE PURIFICACION DE PROTEINA 32 EN GEL EN GRADIENTE DE ACRILAMIDA 5%-17% (ver Material y Métodos)

En 1. Se muestra un lisado total de bacterias *E. coli* B_E, 2. lisado después de quitar restos celulares, 3. extracto después de remover ribosomas, 4. fracción eluida en columna de DNA-Celulosa en 0.6 M NaCl, 5. fracción columna DEAE-Celulosa eluida en 0.2 M NaCl, 6. fracción P₃₂ de Fosfo-Celulosa, 7. marcadores de polipéptidos de peso molecular, 94,000δ, 67,000δ Albúmina, 43,000δ ovoalbúmica, 30,000δ Pepsina, 20,000δ, β-lactoglobulina y 14,000δ lisozima.

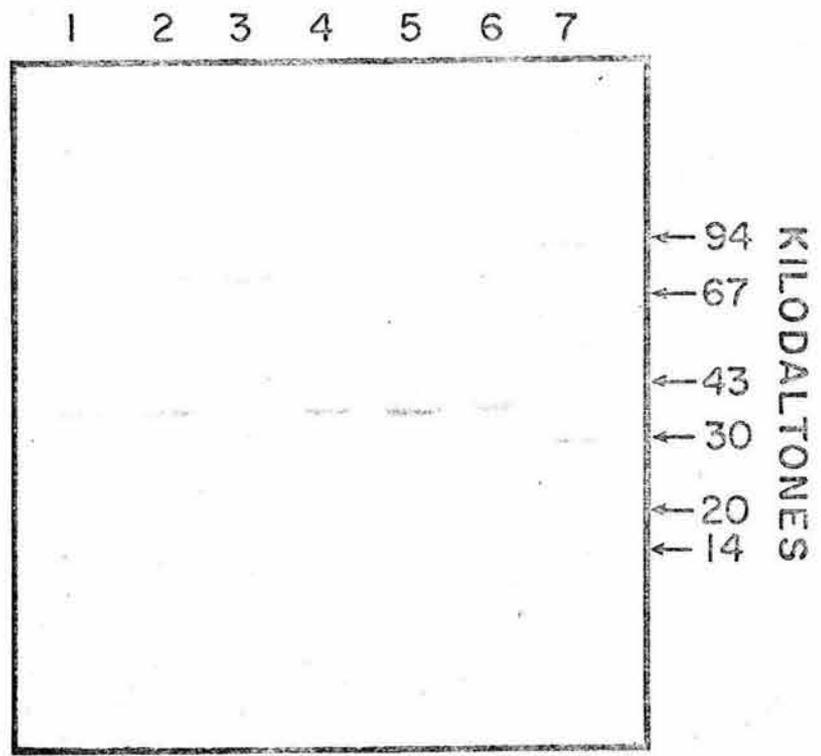


Figura 6. ENSAYO DE TITULO DE ANTICUERPOS POR INMUNODIFUSION
(VER TECNICA OUCHTERLONY).

A. 14 μ l de anticuerpos fueron colocados en los pozos periféricos en el siguiente orden. 1. Suero de conejo, 2. IgG-anti P_{32} precipitados con $(NH_4)_2SO_4$, 3. 2a. Precipitación de IgG-anti P_{32} con $(NH_4)_2SO_4$, 4. IgG-anti P_{32} eluidos de columna Proteína A-Sepharosa, 5. Anticuerpos dializados y liofilizados libres de RNAasas, 6. Suero blanco.

1 hr después se colocaron en el pozo central 760 ng de P_{32} (2 μ l) y se puso a incubar el gel a 37°C por 8 hrs.

B. Se muestran anticuerpos anti P_{32} después de purificados por columna de Proteína A-Sepharosa (la inmunodifusión se realizó al mismo tiempo que A).

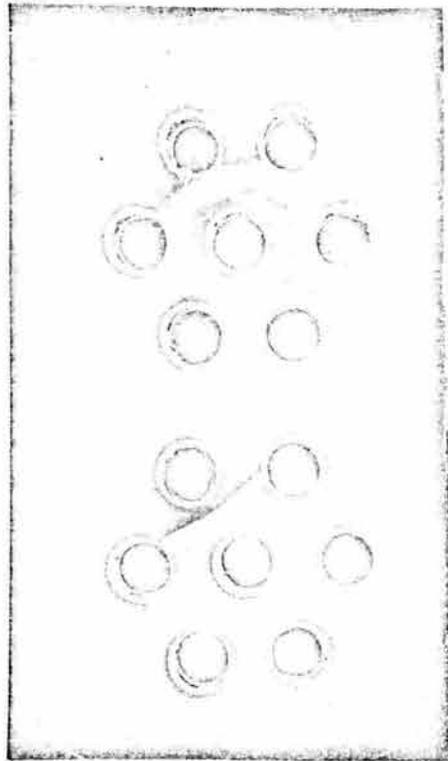


Figura 7. PURIFICACION DE ANTICUERPOS (ANTI-IgG de Conajo) POR
PROTEINA A-SEPHAROSA (ver Material y Métodos).

Anticuerpos fijos a la columna de 2 ml de lecho se eluyeron con
buffer citrato fosfato pH: 3.0 con un flujo de 2 ml/hr colectando-
fracciones de 1 ml.

Posteriormente 10 μ l de cada fracción se tomaron y se cuantificó
la proteína por medio de Bradford, cuya absorbancia es la mostrada-
(ver curva patrón de Bradford para cuantificación de proteína).

PURIFICACION DE ANTICUERPOS (ANTI-IgG de conejo) POR PROTEINA A-SEPHAROSA

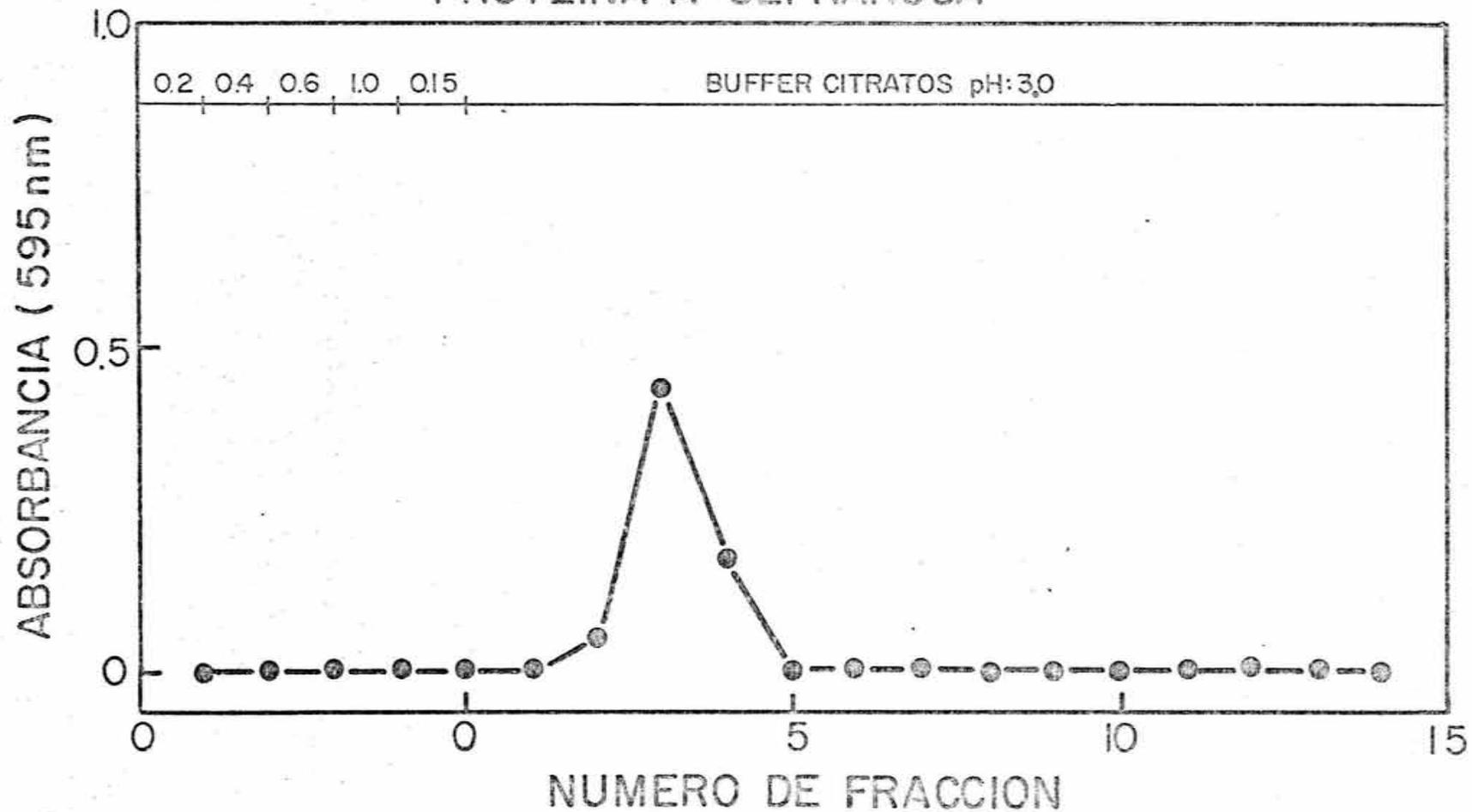


Figura 8. PURIFICACION DE ANTICUERPOS POR PROTEINA-A-SEPHAROSA

(ver Material y Métodos).

Anticuerpos de conejo (Anti-P₃₂) después de fijarlos a 2 ml de resina se lavarón y se eluyeron con un gradiente discontinuó de NaCl de 0.2, 0.4 , 0.6, y 1.0 M de NaCl en bufffer PBS, pH: 7.5.

Posteriormente la columna se equilibró con buffer PBS y se eluyeron los anticuerpos con buffer citrato-fosfato pH:3.0 con un flujo de 2 ml/hr co--lectando fracciones de 1 ml.

Después 10 µl de cada fracción se tomaron y se cuantificó la proteína - en las mismos por Bradford.

La absorbancia del ensayo de Proteína es la mostrada (ver curva patrón para cuantificación de proteína).

PURIFICACION DE ANTICUERPOS POR PROTEINA A-SEPHAROSA

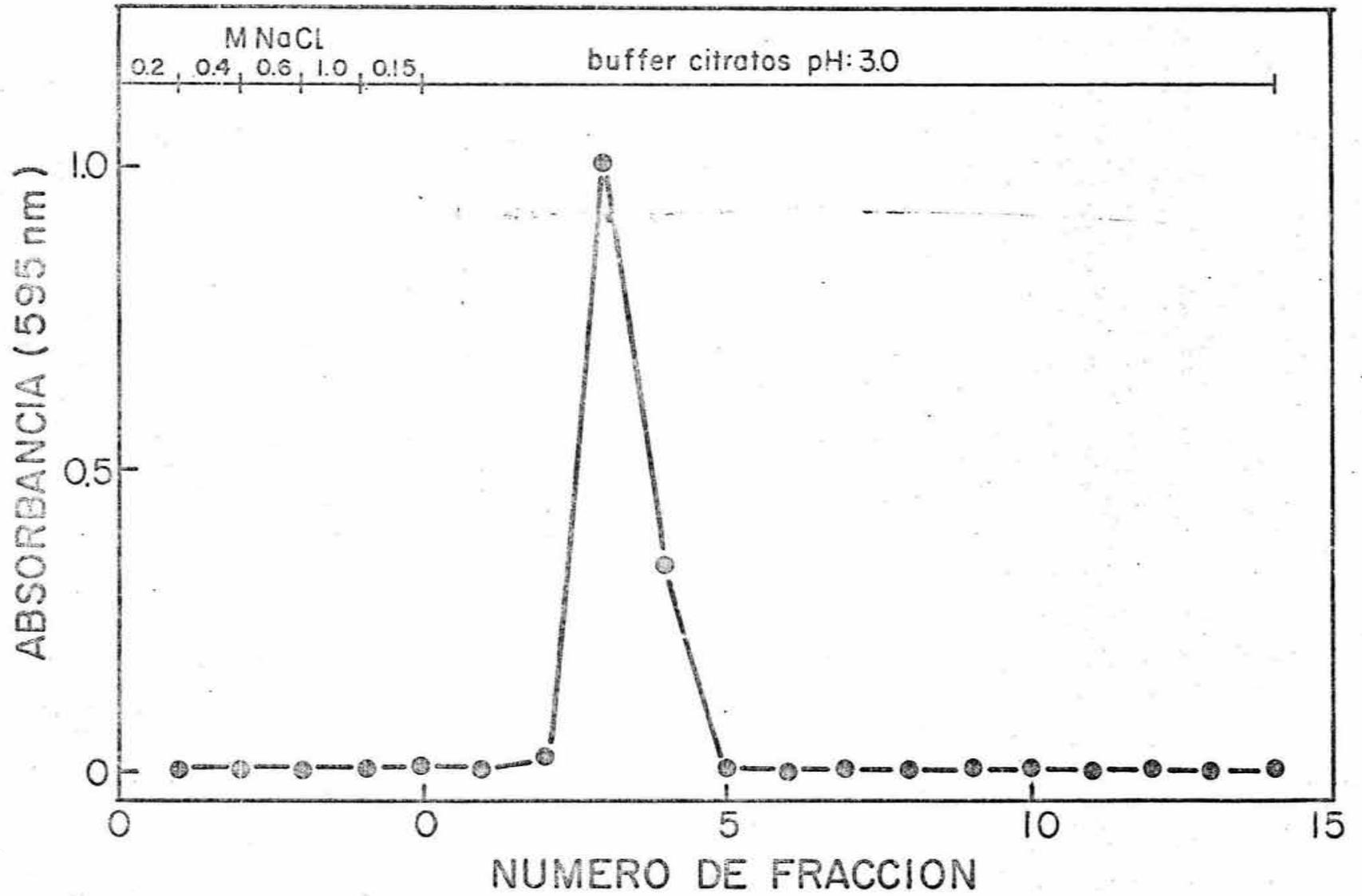


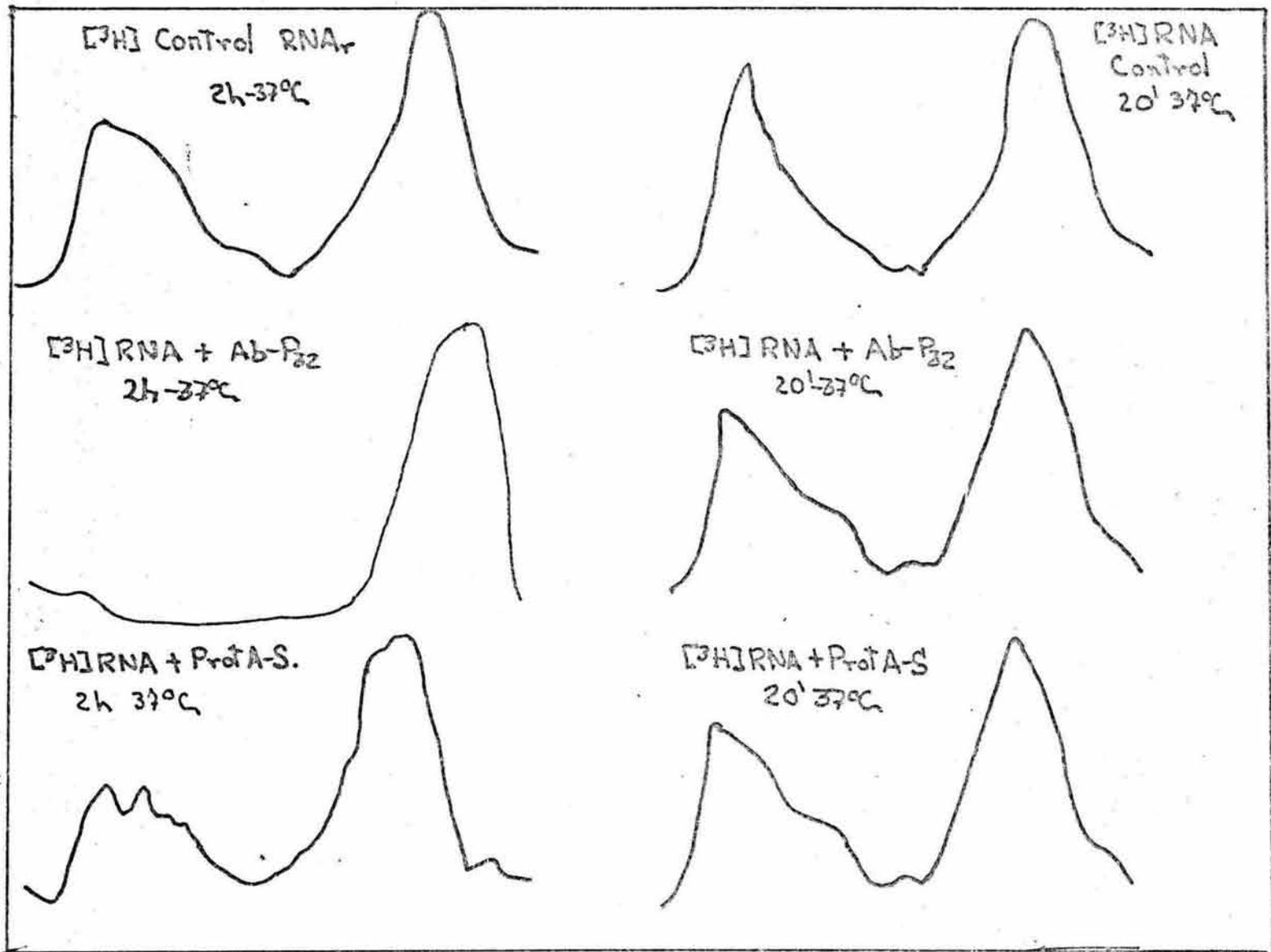
Figura 9.

Ensayo de Actividad de RNAasas en Anticuerpos contra P₃₂ y Proteína A-Sepharosa. (Perfiles de gradientes de Sacarosa).

3.6 µg de [³H]-rRNA (10,000 CPM) (16S, 23S) se incubaron por separado con 50 µg de Anti-P₃₂ y con 100 µl de Proteína A-Sepharosa por 20 min y 2 hrs a 37°C en un volumen de 150 µl ajustado con buffer Tris HCl 0.01 M pH: 8.1, 0.005 M EDTA, 0.05 M NaCl. Posteriormente las muestras con Proteína A-Sepharosa, se centrifugaron 1 min en eppendorf y el sobrenadante al igual que las muestras de incubación con Anti-P₃₂ se colocaron en un gradiente de sacarosa de 10% al 30% en buffer Tris HCl 10 mM pH: 7.5, 0.01% SDS, 5 x 10⁻³ M EDTA, 0.05 M NaCl y se centrifugó a 49,000 rpm, 3 hrs, 22°C, en rotor SW50.1.

Posteriormente fracciones de 125 µl fueron colectadas por el fondo del tubo y puestas en papel Whatman 3MM. Los filtros se secaron y se lavarón 5 veces con 5% TCA y 2 veces con 96% etanol; nuevamente se secaron y colocaron en viales conteniendo 5 ml de líquido de centelleo (Tolueno, 5% PPO, 1.8% POPOP) para determinar radioactividad en los mismos.

^{3}H RNA CPM $\times 10^{-2}$ / FRACCION



NUMERO DE FRACCION (125, μl)

10. ESPECTRO DE ABSORCION DE DNA DE TIMO DE TERNERA

El DNA previamente purificado (ver Material y Métodos) y desnaturalizado por calor para estimar su pureza se le realizó un espectro de absorción.

1 ml de solución de DNA teniendo 40.5 μg en buffer TE se olocó en una cubeta de cuarzo de 1 ml y se le midió la absorción en las longitudes de onda indicadas en la figura.

ESPECTRO DE ABSORCION DE DNA DE TIMO DE TERNERA

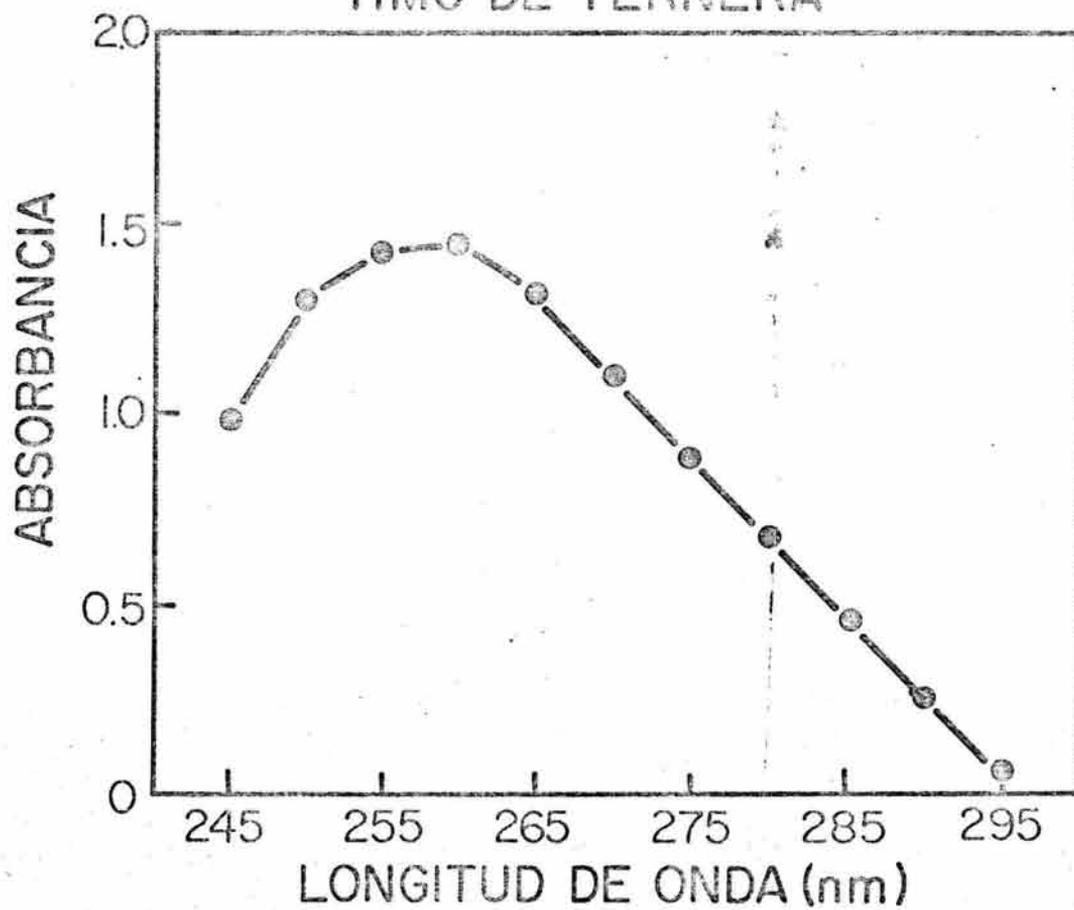


Figura 11. ESPECTRO DE ABSORCION DE t-RNA DE LEVADURA.

El RNA de Levadura Calbiochem (ver Reactivos y Aparatos), y (Material y Métodos) , previamente purificado (por medio de 2 extracciones fenólicas) se le estimó su pureza por medio de un espectro de absorción.

1 ml de solución de t-RNA conteniendo 44 μg disuelto en H_2O bidestilada esteril se colicó en una cubeta de cuarzo de 1 ml. y se le midió la absorbancia a las longitudes de onda indicadas en la figura.

ESPECTRO DE ABSORCION DE t-RNA DE LEVADURA

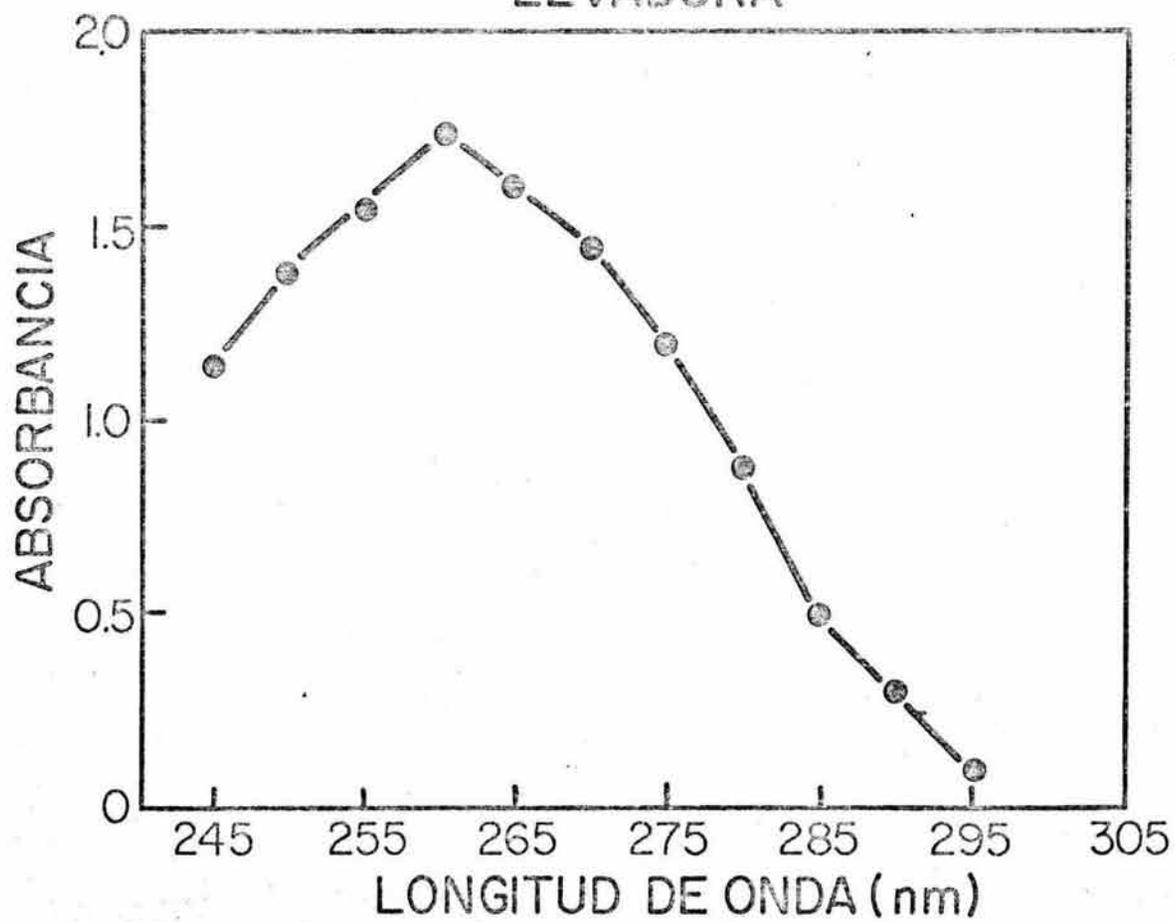


Figura 12. CURVA PATRON PARA CUANTIFICACION DE PROTEINA.

Concentraciones crecientes de Albúmina de suero de bovino se tomaron y se ajustaron a un volumen de 100 μ l con solución 0.15 M NaCl, posteriormente se le adicionó 5 ml de reactivo de Bradford y la solución se mezcló.

Después se midió cada uno de los tubos a 595 nm, utilizando como blanco 100 μ l de 0.15 M NaCl + 5 ml de reactivo Bradford y se calculó la recta de regresión correspondiente.

CURVA PATRON PARA CUANTIFICACION DE PROTEINA

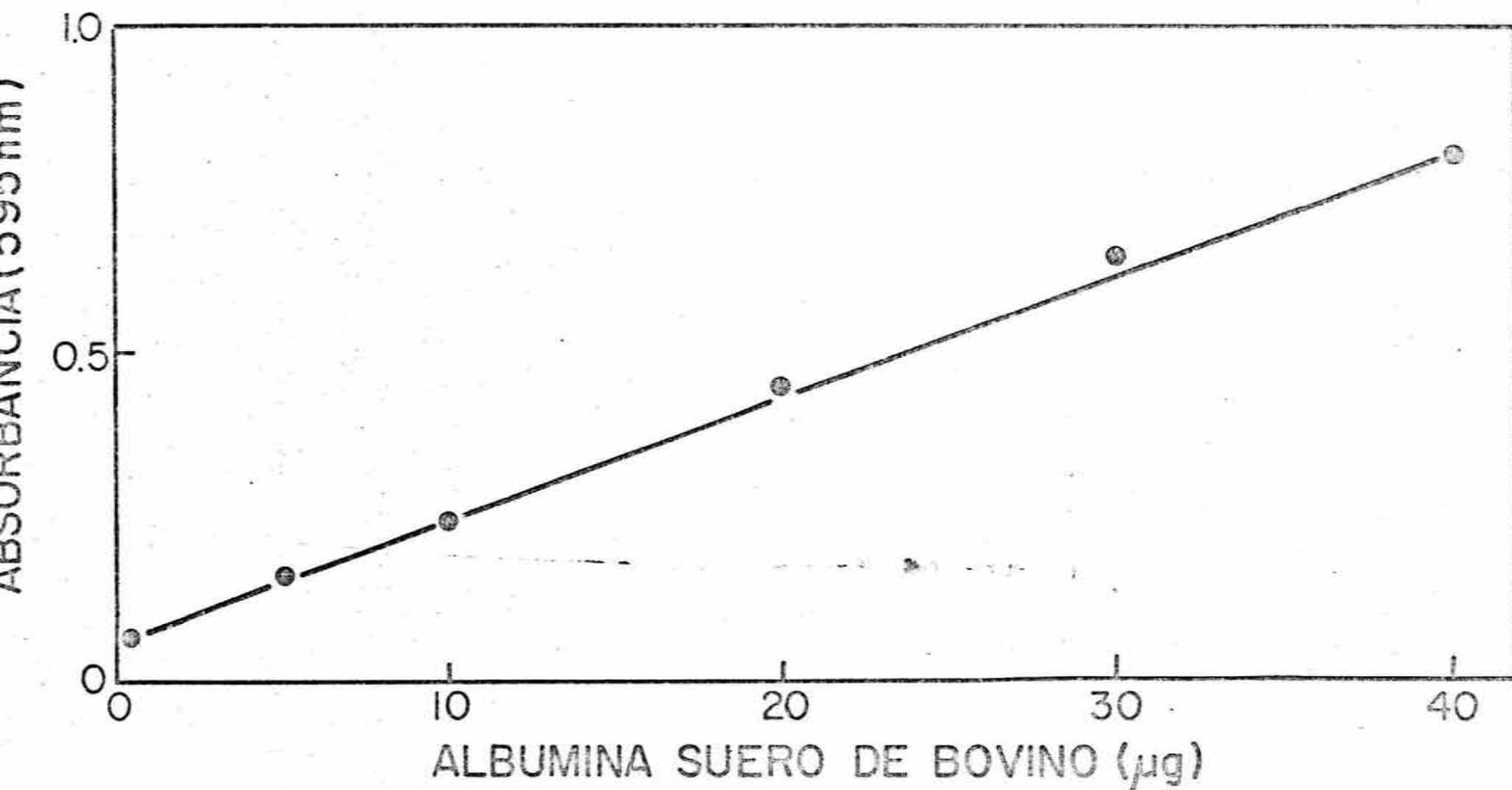
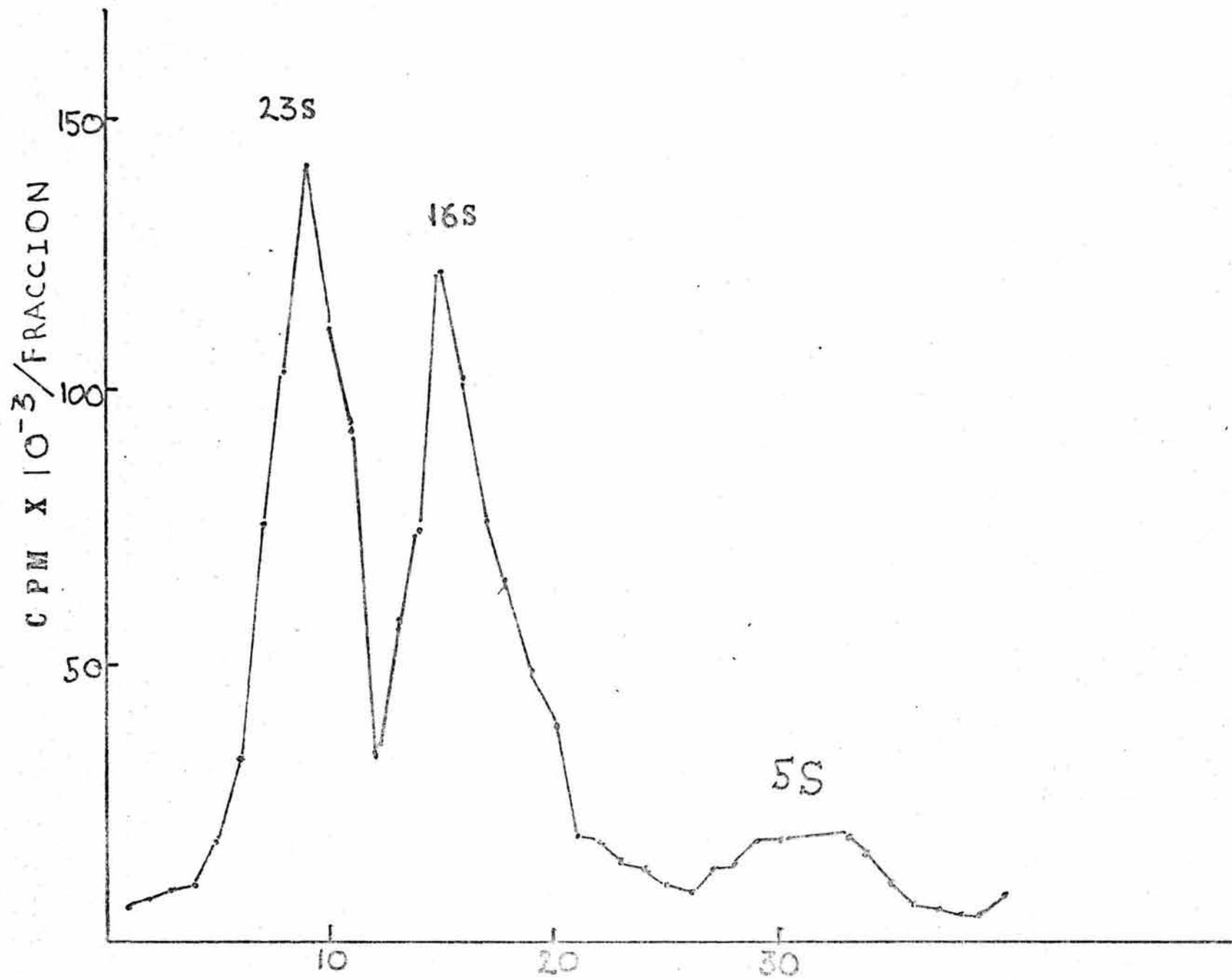


Figura 3. PATRON DE SEDIMENTACION DE [^3H] rRNA.

[^3H] rRNA extraído como se describió en Material y Métodos se sedimentó a través de un gradiente de sacarosa del 10% al 30% en buffer Tris HCl 5 mM pH: 7.5, 5 mM EDTA, 0.1% SDS, 50 mM NaCl, con colchón de sacarosa al 60%. Centrifugando en tubos de 5 ml a 49,000 rpm, 4.5 hrs, 22°C, en rotor SW50.1.

Fracciones de 125 μl se colectaron por el fondo del tubo en papel Whatman 3MM, los papeles se secaron y se lavaron 5 veces con 5% TCA, y 2 veces con 96% de etanol por 5 min cada lavado. Posteriormente los papeles se secaron y colocaron en viales conteniendo 5 ml de líquido de centelleo (Tolueno, 5% PPO, 1.8% POPOP) para contar la radioactividad en los mismos.



4. Ensayo de Actividad de RNAasas contaminantes en P₃₂ antes y después de pasar por Sephadex G-50 (Perfil del gradiente de Sacarosa)

10.5 µg de [³H]-r-RNA (31,000 CPM) (5s, 16s y 23s) se incubaron con 50 µg de P₃₂ por 75 min a temperatura ambiente en un volumen de 150 µl ajustado con buffer Tris HCl 0.01 M, pH: 8.1, EDTA, 0.005 M, 0.05 M NaCl. Posteriormente la mezcla se colocó en un gradiente de Sacarosa de 10% al 30% en buffer Tris HCl, 10 mM, pH: 7.5, 0.01% SDS, EDTA 5×10^{-3} M, 0.05 M NaCl y se centrifugó a 49,000 rpm, 4.5 hrs, 22°C en rotor SW 50.1.

Posteriormente fracciones de 125 µl fueron colectadas por el fondo del tubo y colectadas en papel Whatman 3MM. Los filtros fueron secados y colocados en viales conteniendo 5 ml de líquido de centelleo para determinar la radioactividad.

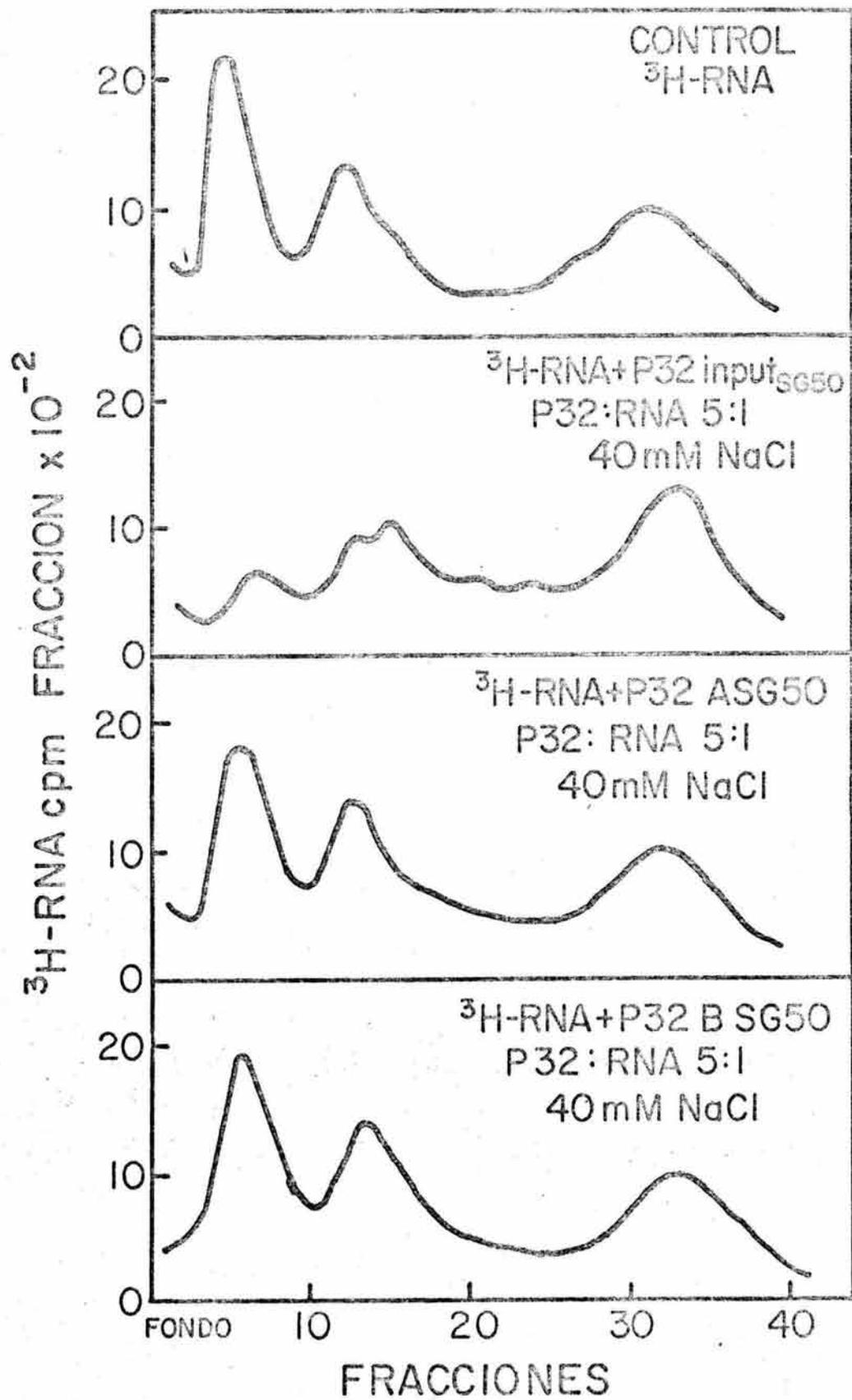


Figura 15. PRECIPITACION DNA DE CELULAS CV₁ CON P₃₂, ANTI-P₃₂ Y PROTEINA A-SEPHAROSA.

3 µg de [³H] DNA-CV₁ (3000 CPM) de doble cadena a simple cadena fueron incubados por separado con concentraciones crecientes de P₃₂ por 5 min a temperatura ambiente, adicionando después 150 µg de anti P₃₂ por µg de P₃₂ e incubando por 15 min a 37°C.

Se adicionó después 5 µl de Proteína A-Sepharosa y se ajustó el volumen a 500 µl con buffer PBS, incubando nuevamente por 30 min a 37°C.

Posteriormente cada tubo se centrifugó 1 min en eppendorf y la pastilla y sobrenadante se colocó por separado en papel Whatman 3MM, secándolos y colocándolos después en viales conteniendo 5 ml de líquido de centelleo (Tolueno, 5% PPO, 1.8% POPOP).

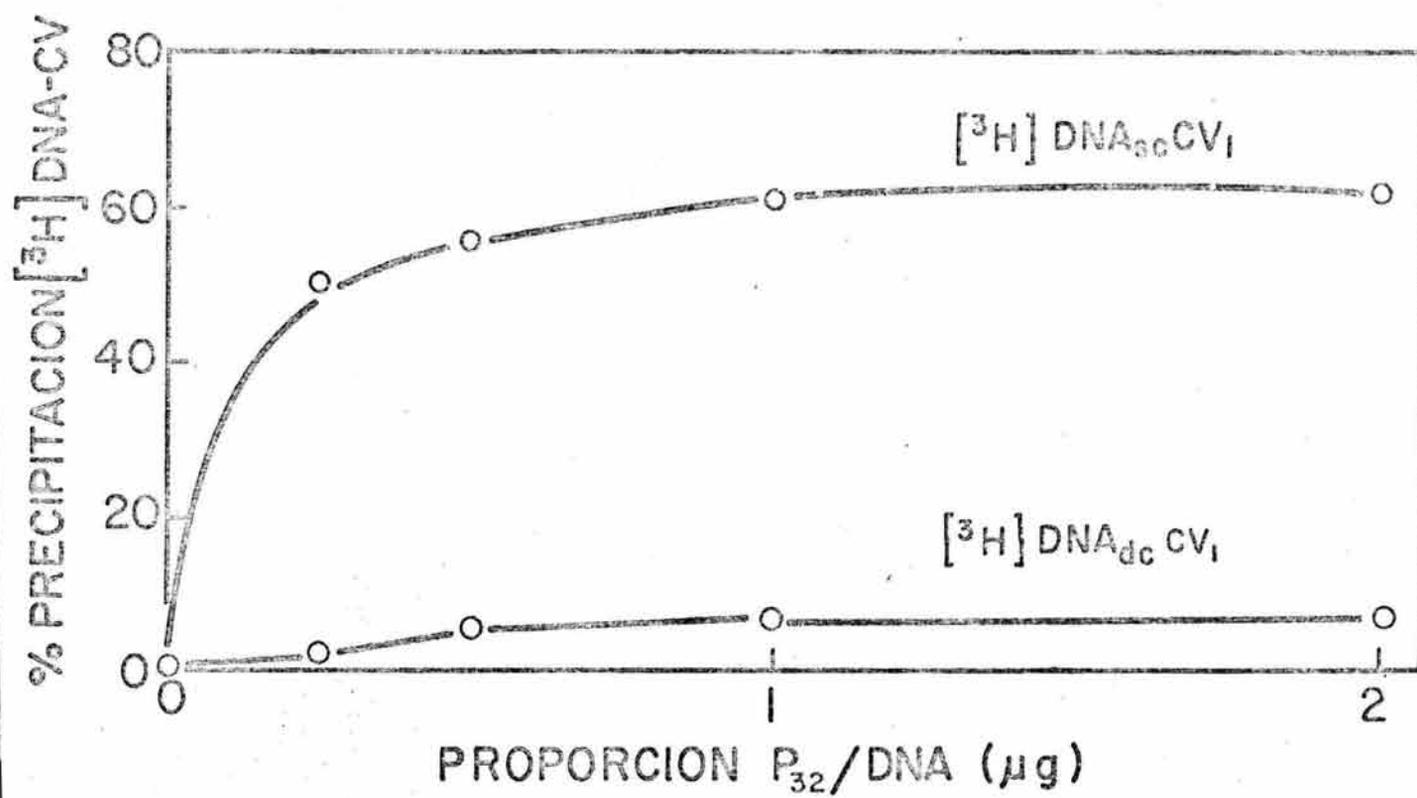


Figura 16. PRECIPITACION DE DNA DE SV40 DE DOBLE Y SIMPLE CADENA

CON SUERO BLANCO CONTROL.

3 μg de ^{14}C DNA simple cadena; 3 μg ^3H DNA y 3 μg ^{14}C DNA doble cadena fuerón incubados en tubos por separado con concentraciones crecientes de P_{32} , e incubados por 5 min a temperatura ambiente, adicionando después 150 μg de anti- P_{32} por μg de P_{32} e incubando por 15 min a 37°C ó 150 μg de γ -globulinas de conejos no inmunizados contra la P_{32} (Suero control) para el ^{14}C DNA_{sc}.

Los complejos formados se precipitaron adicionando 1.2 μl de Proteína A-Sepharosa por 30.0 μg de IgG, ajustando el volumen a 200 μl con buffer PBS- e incubando nuevamente por 30 min a 37°C .

Los tubos se centrifugaron posteriormente 1 min en centrífuga eppendorf- y el sobrenadante y la pastilla se colocaron por separado en papel Whatman 3MM, secándolos inmediatamente; y la radioactividad en los mismos se contó colocando el papel en viales que contenían 5 ml de líquido de centelleo (- Tolueno, 5% PFO, 1.8% POPOP).

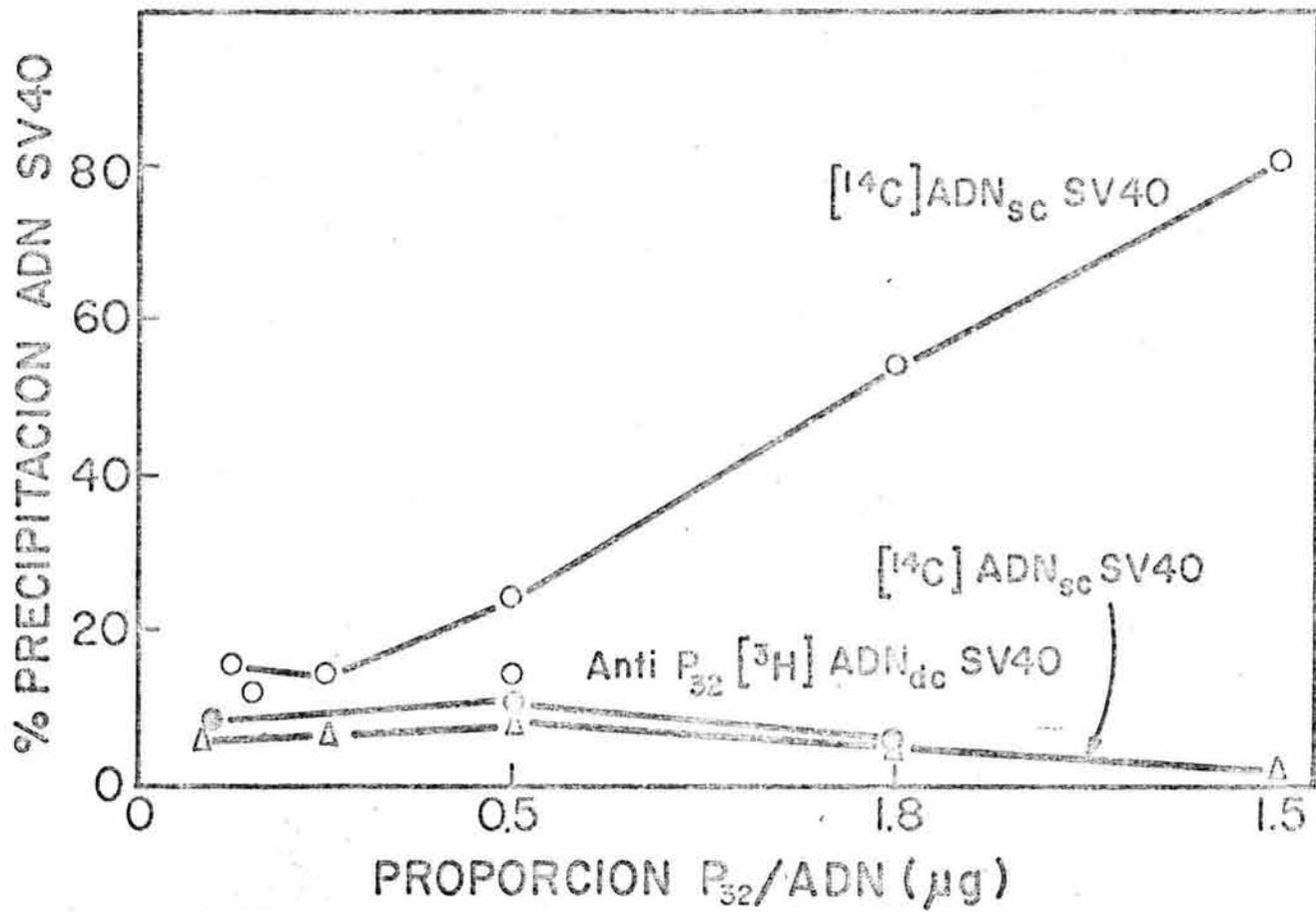


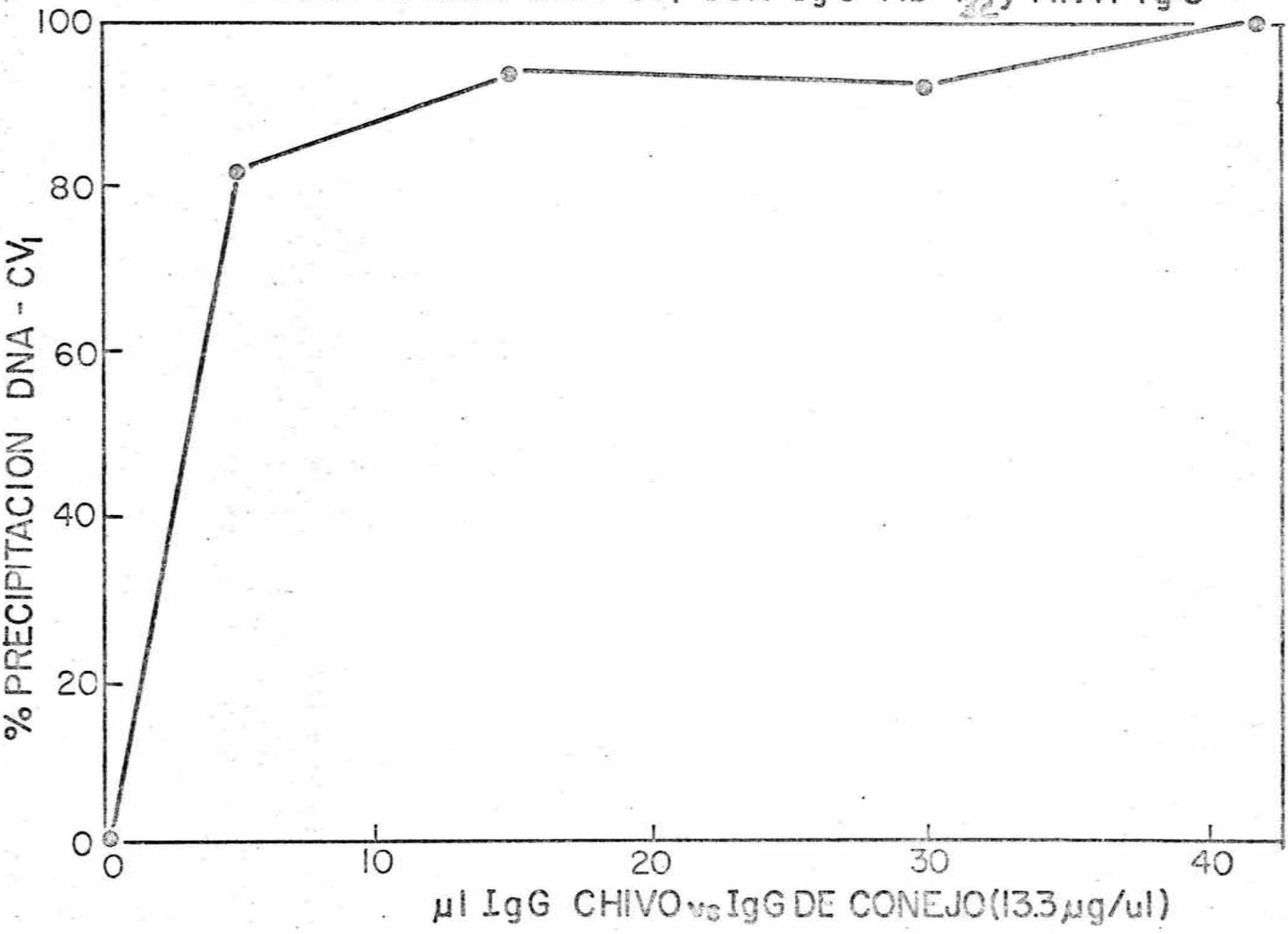
Figura 17. PRECIPITACION DNA-CV₁ CON P₃₂, IgG ANTI P₃₂ Y ANTI-IgG.

0.5 μ g de [³H] DNA-CV₁ (3000 CPM) se incubaron con 3 μ g de P₃₂ por 5 min a temperatura ambiente posteriormente se adicionaron 600 μ g de Anti-P₃₂/ μ g de P₃₂ y se incubó por 15 min a 37°C.

Inmediatamente se adicionaron concentraciones crecientes de anticuerpos de chivo contra conejo (Anti-IgG) y se ajustó el volumen a 150 μ l con buffer PBS e incubando por 1 hr a 4°C.

Los complejos formados se precipitaron centrifugando por 1 min en eppendorf, y el sobrenadante y precipitado obtenido se colocó por separado en papel Whatman 3MM y se contó la radioactividad en los mismos colocándolos en viales que contienen 5 ml de líquido de centelleo (Tolueno, 5% PPO, 1.8% POPOP).

PRECIPITACION DNA-CV_I CON IgG-Ab-³²P y ANTI-IgG



18. Precipitación Diferencial de ADN de SV40 de doble y simple cadena
con P_{32} y Anti- P_{32}

3 μg de $[^3\text{H}]$ ADN (3000 CPM) simple cadena y 3 μg de $[^{14}\text{C}]$ DNA (2000 CPM) doble cadena fueron incubados con concentraciones crecientes de P_{32} por 5 min a temperatura ambiente. Adicionando después 150 μg de Anticuerpos contra la P_{32} por μg de P_{32} e incubando nuevamente por 15 min a 37°C. Posteriormente los complejos formados se precipitaron adicionando 1.2 μl de Proteína A-Sepharosa al 100% por cada 30 μg de Anti- P_{32} más buffer PBS hasta completar un volumen de 200 μl e incubando 30 min a 37°C.

Después los tubos se centrifugaron 1 min en eppendorf a temperatura ambiente, y colocando por separado el sobrenadante y la pastilla en Whatman 3MM.

Posteriormente los papeles se secaron y se contaron en viales que tienen líquido de centelleo (Tolueno, 5% PPO, 1.8% POPOP) los cuales se ponen en un contador de centelleo para medir la radioactividad en los mismos.

PRECIPITACION DIFERENCIAL DE ADN SV40 DE DOBLE Y SIMPLE CADENA CON P_{32} Y Anti P_{32}

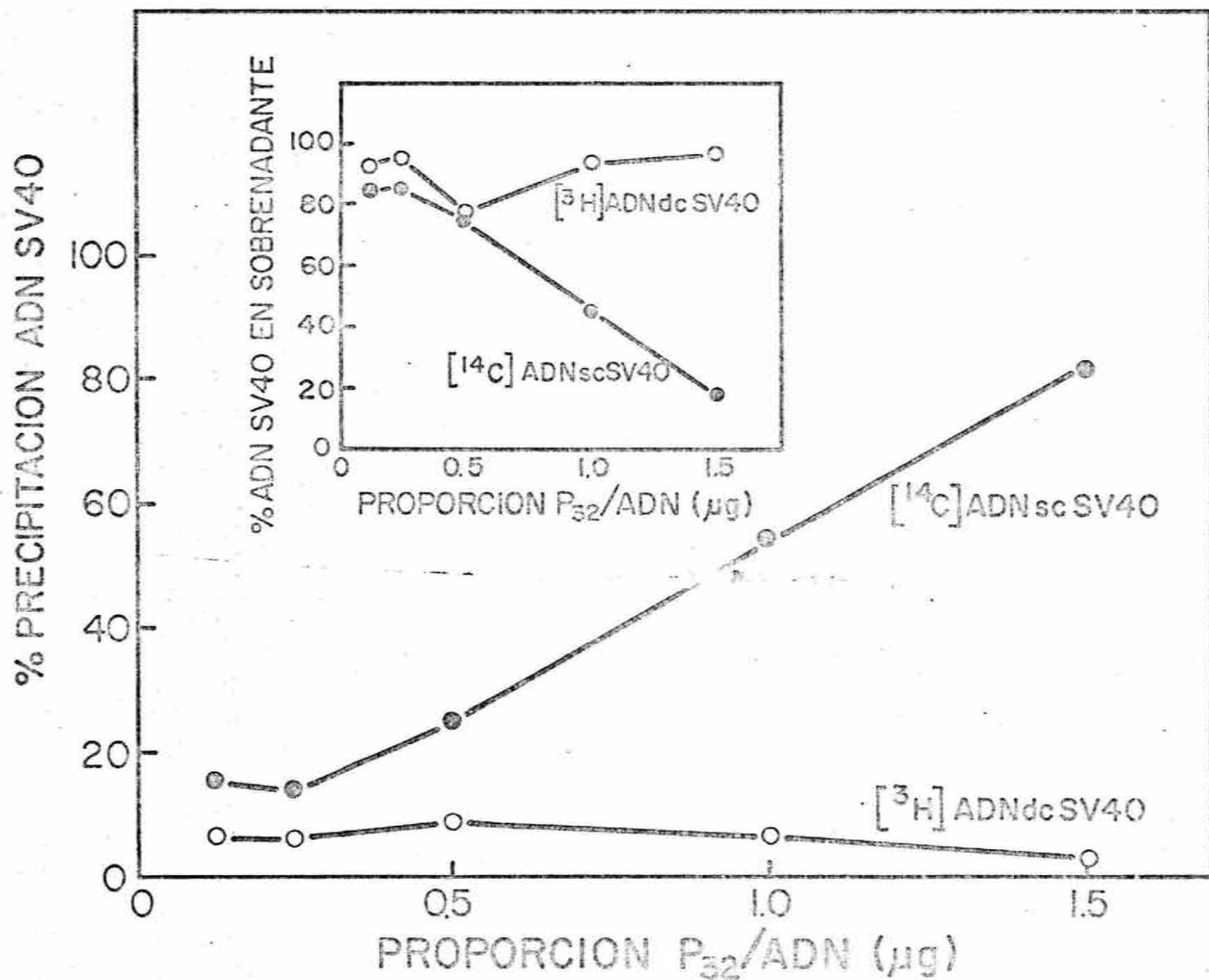


Figura 19. PATRON DE SEDIMENTACION DE cRNA DE SV40 (VER MATERIAL Y METODOS).

El $[^3\text{H}]$ -cRNA de SV40 previamente sintetizado se colocó en un gradiente de sacarosa para estimar su tamaño.

200 μl de $[^3\text{H}]$ -cRNA sintetizado por 30 min y 90 min se colocaron por separado en un gradiente de sacarosa del 10% al 20%, con colchón de sacarosa al 60% (700 μl), centrifugando 35,000 rpm, 5 hrs, 4°C, en rotor SW40.

Fracciones de 400 μl fueron colectadas por el fondo del tubo y alícuotas de 20 μl se tomaron y colocaron en papel Whatman 3MM y la radioactividad en los mismos se determinó colocándolas en viales conteniendo 5 ml de líquido de centello (Tolueno, 5% PPO, 1,8% POPOP).

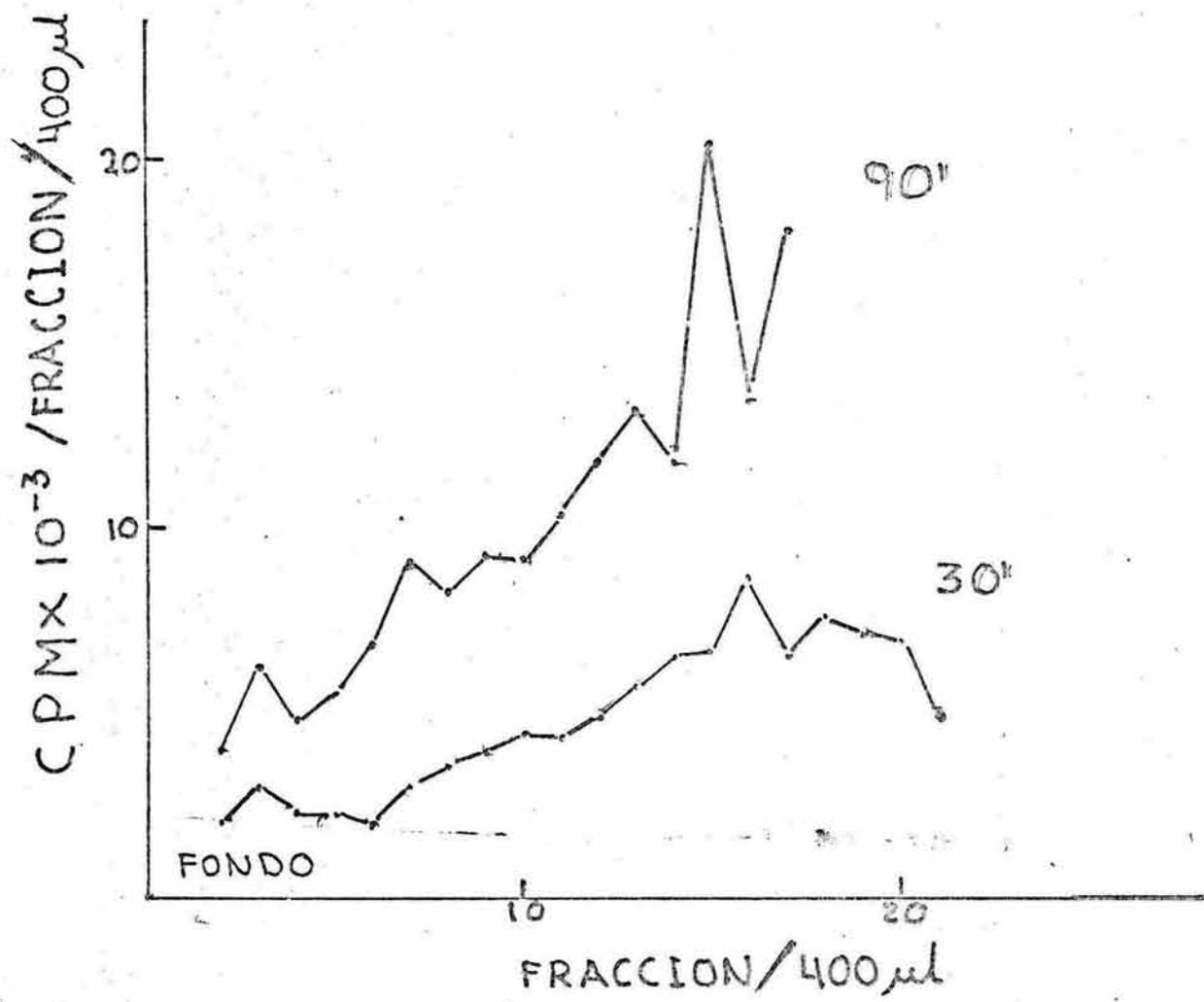


Figura 20. PRECIPITACION DE $[^3\text{H}]$ -cRNA SV40 CON P_{32} , ANTI P_{32}
(CONEJO) Y PROTEINA A-SEPHAROSA.

2 ng de $[^3\text{H}]$ -cRNA (3000 CPM) se incubaron con concentraciones crecientes de Proteína 32 por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 600 μg de Anti- P_{32} por cada concentración de P_{32} ensayada e incubada por 15 min a 37°C. Después se adicionó 60 μl de Proteína A-Sepharosa al 100% y se ajustó el volumen final a 150 μl con PBS, incubando nuevamente por 30 min a 37°C.

Los complejos formados (o cRNA precipitado) se precipitó totalmente y centrifugando 1 min en eppendorf a temperatura ambiente.

El sobrenadante y la pastilla se colectó y se puso por separado en Whatman 3MM y la radioactividad en los mismos se contó colocándolas en viales conteniendo 5 ml de líquido de centelleo (Tolueno, 5% PPO, 1.8% POPOP).

PRECIPITACION DE $[^3\text{H}]$ -cRNA SV40 CON P_{32}
ANTI P_{32} (conejo) y PROT A. SEPHAROSA

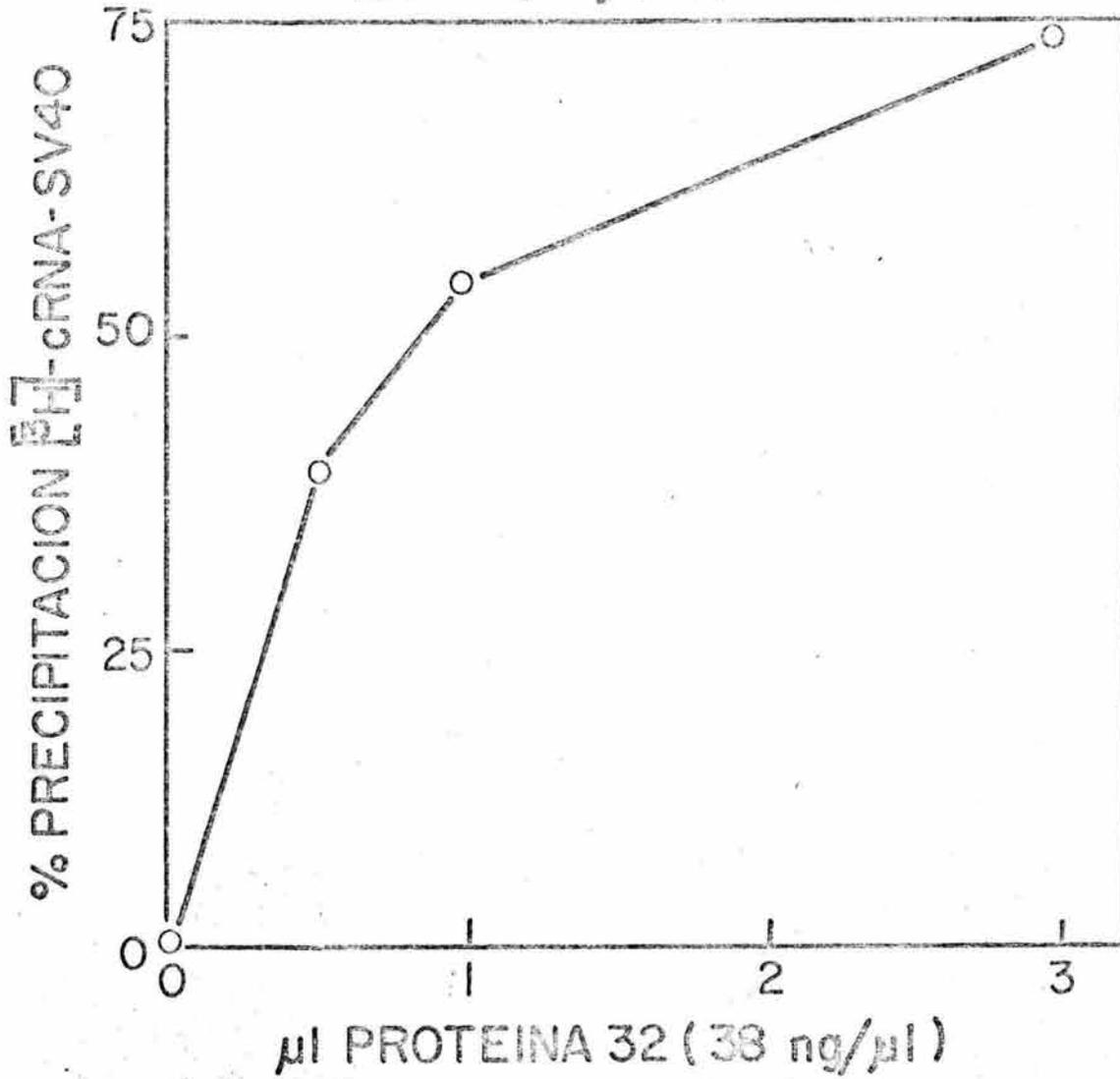


Figura 21.

2 μg de $[^3\text{H}]$ -cRNA (3000 CPM) junto con 3 μg de $[^{14}\text{C}]$ -DNA de SV40 (2000 CPM) se incubaron con concentraciones crecientes de P_{32} como se muestra en la figura por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 600 μg de Anti- P_{32} por μg de P_{32} y se incubó por 15 min a 37°C . Después se adicionó 400 μg de Anti-IgG y se ajustó el volumen a 150 μl con buffer PBS incubándose nuevamente por 1 hr a 4°C .

Los complejos formados (o cRNA precipitado) se precipitó totalmente centrifugando 1 min en eppendorf a temperatura ambiente.

El sobrenadante y la pastilla se colectó por separado y se colocó en papel Whatman 3MM.

Los papeles se secaron y se lavaron 5 veces con 5% TCA y 2 veces con 96% etanol.

Nuevamente se secaron y se colocaron en viales conteniendo 5 ml de líquido de centelleo (Tolueno, 5% PPO, 1.8 POPOP) para contar la radioactividad en los mismos.

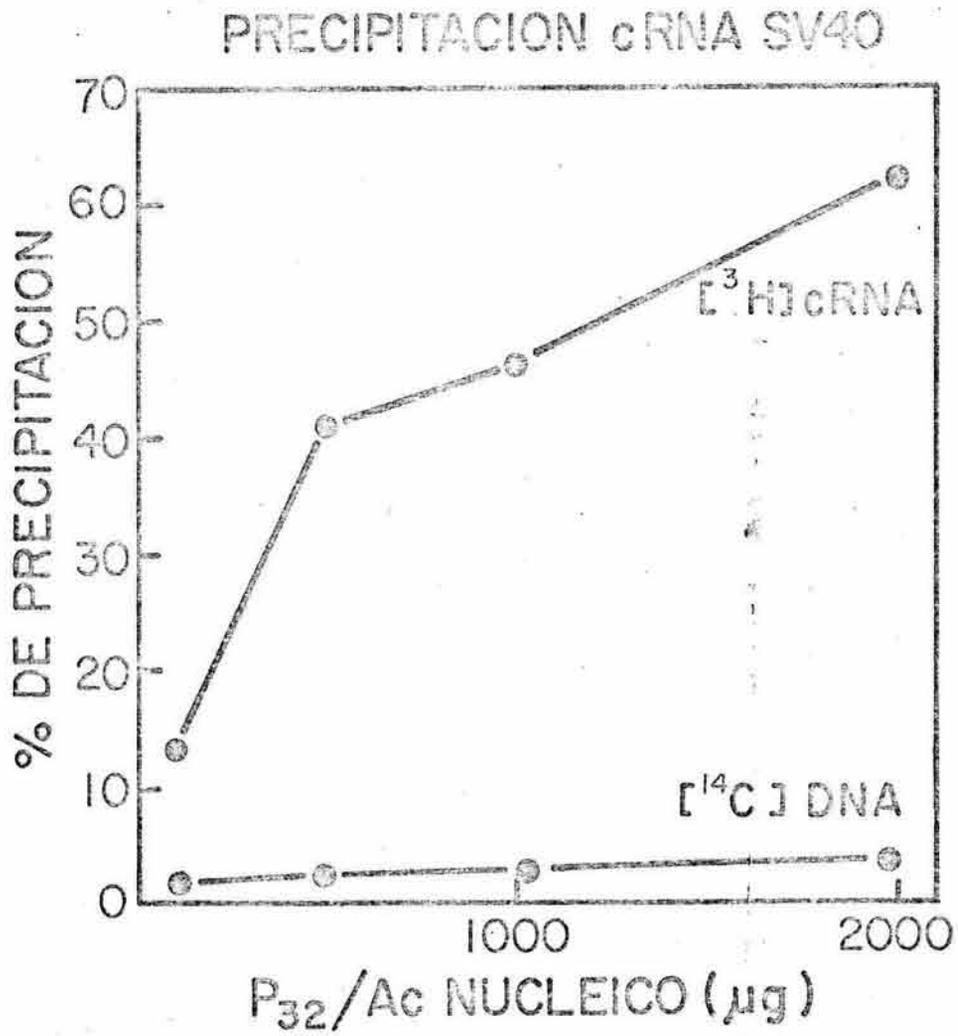


Figura 22. PATRON DE SEDIMENTACION DE CROMATINA VIRAL.

(VER MATERIAL Y METODOS).

150 μ l (130,000 CPM) de solución de minicromosomas $[^{14}\text{C}]$ se colocaron en un gradiente continuo de sacarosa de 10 a 40% en buffer Tris HCl 20 mM pH: 7.9, 0.4 M NaCl, 0.2 mM EDTA, con colchón de sacarosa al 60% y centrifugados 9 min a 49,000 rpm (4°C) en rotor SW50.1.

Fracciones de 200 μ l se colectaron por el fondo del tubo y alícuotas de 20 μ l se tomaron de cada una de ellas y colocaron en papel Whatman 3MM. Los papeles se secaron y se lavaron 5 veces con 5% TCA, y 2 veces con 96% etanol. Se secaron nuevamente y se colocaron en viales conteniendo 5 ml de líquido de centelleo (Tolueno, 5% PPO, 1.8% POPOP) para determinar la radioactividad en los mismos.

PATRON DE SEDIMENTACION DE CROMATINA VIRAL

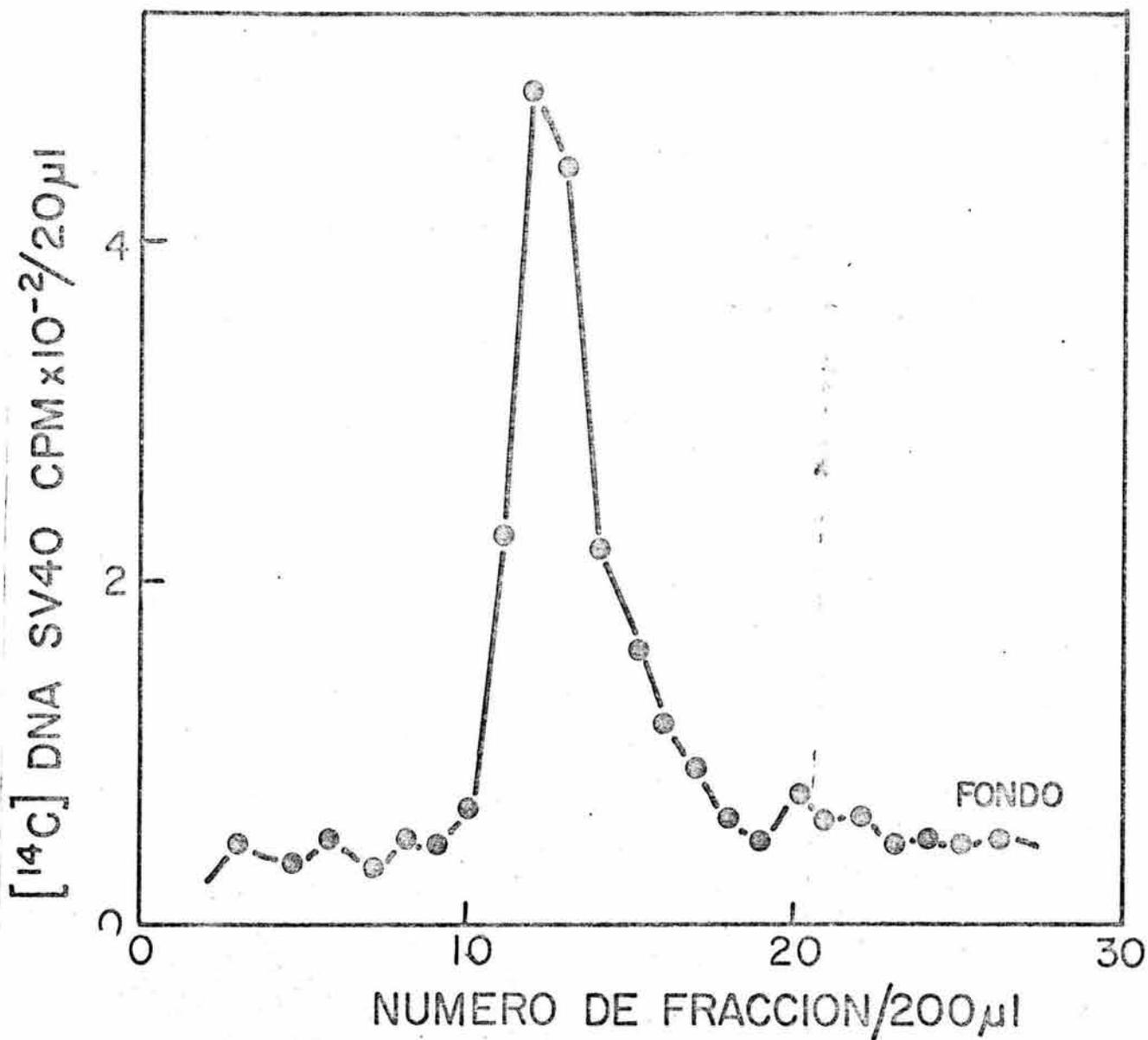


Figura 3. PRECIPITACION DE UNA MEZCLA DE $[^3\text{H}]$ -cRNA Y MINICROMOSOMA CON P_{32} -ANTI P_{32} (CONEJO) Y ANTI IgG (CHIVO).

2 ng de $[^3\text{H}]$ -cRNA (5000 CPM) y aproximadamente 350 ng de Minicromosoma de SV40 (1000 CPM) se incubaron junto con concentraciones crecientes de Proteínas 32 por 5 min a temperatura ambiente.

Se adicionó después 600 μg de Anti- P_{32} y se volvió a incubar por 15 min a 37°C . Posteriormente se agregó 400 μg de Anti-IgG, se ajustó el volumen a 400 μl con buffer PBS y se incubó por 1 hr a 4°C .

Los complejos formados se precipitaron centrifugando 1 min en eppendorf. El sobrenadante y precipitado se colocó por separado en papel Whatman 3MM y la radioactividad contenida en los mismos se contó como en los ensayos anteriores.

PRECIPITACION DE UNA MEZCLA DE $[^3\text{H}]$ -cRNA Y MINICROMOSOMA
CON P_{32} ANTI P_{32} (conejo) Y ANTI IgG (chivo)

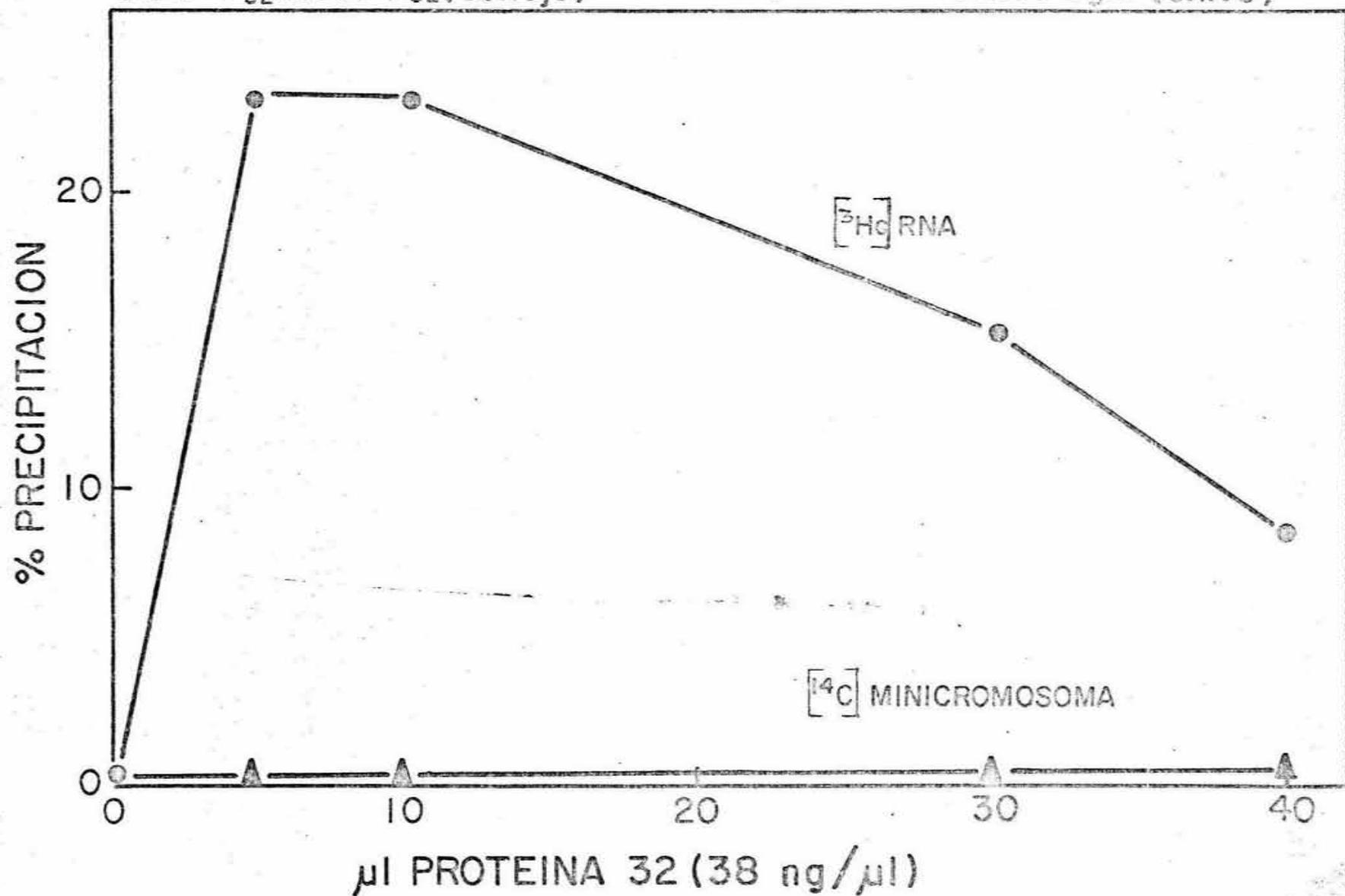


Figura 24. PATRON DE SEDIMENTACION DE $[^3\text{H}]$.
 MINICROMOSOMAS Y $[^{32}\text{P}]$ COMPLEJO DE TRANSCRIPCIÓN DE
 SV40. (VER MATERIAL Y METODOS).

250 μl de la mezcla de transcripción se colocaron en un gra-
 diente igual empleado para la sedimentación de cromatina viral y
 se centrifugó de la misma manera que los minicromosomas solos.

Fracciones de 250 μl se colectaron por el fondo del tubo y
 alícuotas de 20 μl se tomaron y colocaron en papel Whatman 3MM,
 se secaron y se lavaron 5 veces con 5% TCA conteniendo 5% de pi-
 rofosfato, y 2 veces con 96% de etanol.

Los papeles se secaron y se les determinó su radioactividad.

Se muestra en la figura la radioactividad por alícuota toma-
 da. Δ $[^3\text{H}]$ DNA SV40; \circ $[^{32}\text{P}]$ CMP incorporado.

NOTA: Los corchetes muestran las fracciones que se juntaban para
 la realización de la precipitación del Complejo de Trans-
 cripción viral (ver Resultados Parte II).

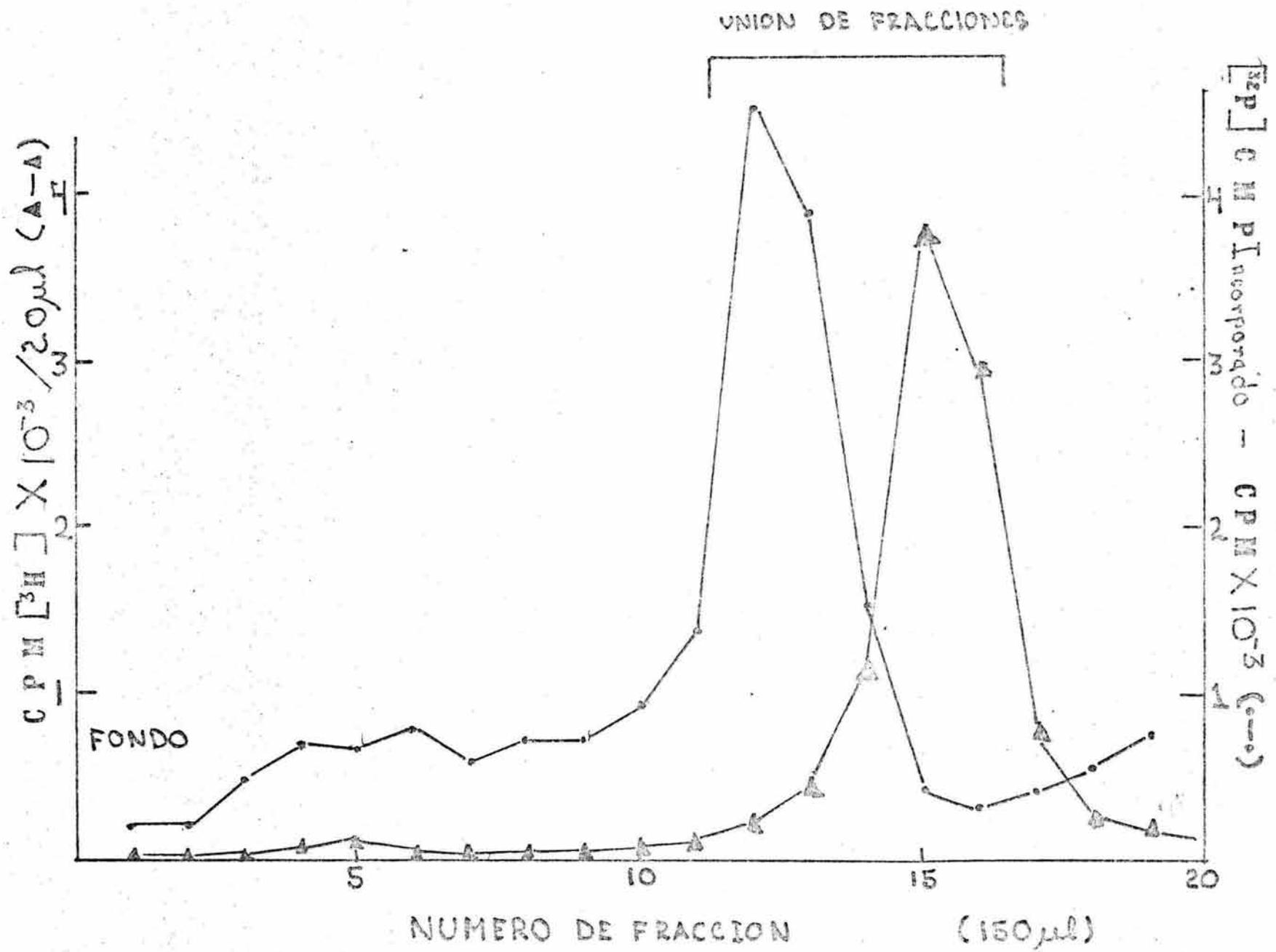
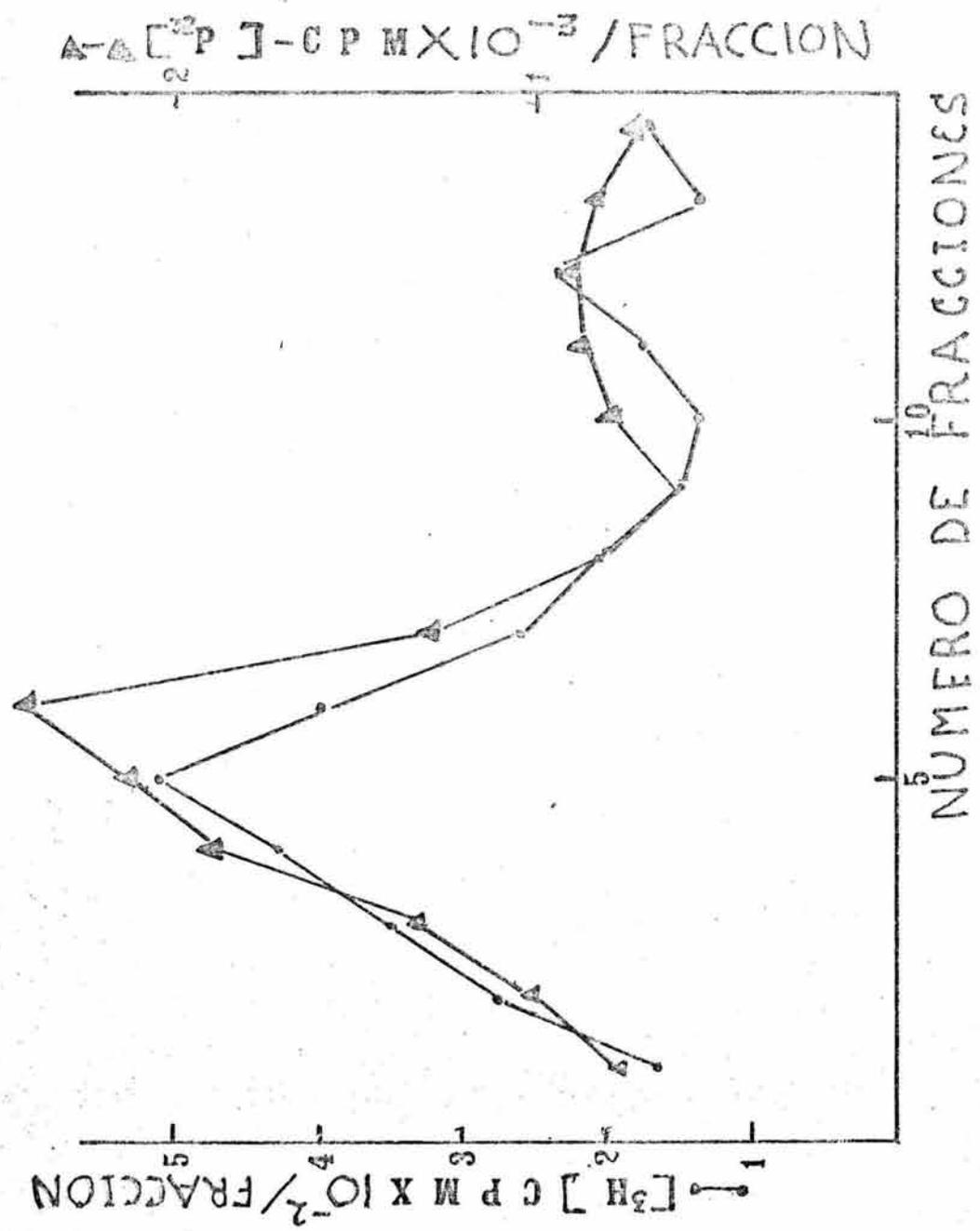


Figura 25.

De las fracciones de esta columna , se tomaron 20 μ l y se contaron por -
cerenkov.

En la figura se muestran las cuentas totales para cada fracción,

El pico donde se encuentra la marca radioactiva $[^{32}\text{P}]$ (Complejo de -
Transcripción, o mejor dicho colas de mRNA nacientes) se observa que comigra
con la marca de $[^3\text{H}]$ que corresponde al minicromosoma; indicio que las colas
de RNA nacientes se encontraban en estas condiciones pegadas al minicromosoma.



RESULTADOS PARTE II

RESULTADOS (PARTE II)

Intentos de Purificación de Complejo de Transcripción Viral de SV40.

1. El complejo de transcripción junto con el minicromosoma (ver Figura 24) se tomaron realizando la unión de fracciones de la 11 a la 16 y después mezclandolas 3 veces en un tubo Falcon con una micropipeta de 1 ml.

Posteriormente se tomó una alícuota de 20 l y se contó la radioactividad para estimar la cantidad de CPM de $[^3\text{H}]$ y $[^{32}\text{P}]$.

Alícuotas de 200 μ l de esta unión de fracciones (700 CPM de $[^3\text{H}]$ y 4800-CPM de $[^{32}\text{P}]$) * se incubaron con 190 ng de P_{32} por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 100 μ g y 300 μ g de Anti- P_{32} en tubos por separado e incubando por 15 min a 37 $^{\circ}$ C , despues se adicionó 400 μ y 800 μ g de Anti-IgG de chivo en los tubos donde se agregó 150 y 300 μ g de Anti- P_{32} respectivamente, ajustando el volumen posteriormente a 400 μ l con buffer PBS e incubando nuevamente por 1 hora a 4 $^{\circ}$ C. Los complejos formados se precipitaron -- centrifugando 15 seg en una centrífuga eppendorf.

El precipitado y el sobrenadante se tomaron por esparado y se colocaron en papel Whatman 3MM para contar la radioactividad en los mismos:

(Nota: En estos experimentos y en los subsecuentes las CPM fueron no TCA -- precipitables).

* CPM contadas por Cerenkow (ver apéndice A).

Se usó de control un tubo sin agregar P_{32} ; además se incluyó un tubo conteniendo el doble de P_{32} (380 ng) y de anticuerpos.

El resultado obtenido en este experimento y los 2 subsiguientes se muestran en la tabla No.1

Experimento 2.

El Complejo de transcripción fue aislado de la misma manera que en el experimento anterior (Figura 24), y con el fin de alargar las cadenas de mRNA nacientes de estos complejos, se realizó lo siguiente:

Se tomaron 250 μ l de complejo de transcripción viral y se pusieron a dializar contra 80 mM de Trietanolamina pH: 7.9 por 30 min a 4°C. Posteriormente se agregaron 100 μ g de P_{32} y se incubó por 5 min a 37°C e inmediatamente se colocaron en una columna de Sepharosa 4B (ver Material y Métodos) equilibrada con 80 mM de Trietanolamina pH: 7.9, 1.2 g/ml de P_{32} , 0.2 M NaCl manteniendo un flujo de 300 l/hr (La columna debe de estar a 4°C) , y se colectaron fracciones de 250 μ l (ver figura 25).

Se juntaron las fracciones de la 4 a la 7 y se mezclaron suavemente.

Una vez más se tomaron alícuotas de 225 μ l de esta unión de fracciones y se les agregó Anti- P_{32} y Anti-IgG , como en el experimento anterior, ajustándose el volumen a 450 μ l, con buffer PBS.

Los complejos formados se precipitaron centrifugando por 15 seg en una centrífuga eppendorf; y ambos, el sobrenadante y el precipitado se les determinó su radioactividad como en el experimento anterior.

El resultado de este experimento se muestra en la tabla No.1.

Experimento 3.

El tercer intento de purificación del complejo de Transcripción de SV40 , se realizó de la misma manera que el experimento No.2; con la diferencia de-

que las fracciones eluidas en la columna (Figura 25) , se juntaron y se tomaron alícuotas de 225 μ l, agregándoles Anti-P₃₂, Anti-IgG, y además 2 ng de cRNA exógeno, ajustando el volumen a 450 μ l con buffer PBS (0.2 M NaCl).

Las incubaciones con los anticuerpos fueron idénticas como en los experimentos anteriores.

El resultado de este experimento se muestra en la tabla No. 2.

Hay que hacer notar que el cRNA exógeno agregado se esperaba que precipitara, ya que, este al menos se había logrado precipitar en experimentos anteriores.

Tabla No. 1

PRECIPITACION DE COMPLEJO DE TRANSCRIPCION VIRAL DE SV40,

% Precipitación.

Experimento 1.

 ^3H ^{32}P

Sobrenadante

Precipitado.

Sobrenadante

Precipitado

| | | | | |
|---|------|----|-------|-------|
| 1 | 100% | 0% | 100% | 0% |
| 2 | 100% | 0% | 0% | 0% |
| 3 | 100% | 0% | 0% | 0% |
| 4 | 100% | 0% | 30,0% | 19,0% |

Experimento 2.

 ^3H ^{32}P

Sobrenadante

Precipitado

Sobrenadante

Precipitado

| | | | | |
|---|----|----|-------|------|
| 1 | 0% | 0% | 0% | 0% |
| 2 | 0% | 0% | 8,46% | 0% |
| 3 | 0% | 0% | 0% | 7% |
| 4 | 0% | 0% | 0% | 5,8% |

Hay que hacer notar que en ambos experimentos (1 y 2) no se observó que precipitara absolutamente nada de $[^{32}\text{P}]$ además de que el porcentaje de cuentas disminuía considerablemente y se perdían; probablemente se quedaba algo de material pegado a los tubos de reacción.

Se necesita usar acarreador como t-RNA para tratar de evitar la pérdida de material en los tubos, así como también modificar algunos detalles en el protocolo del experimento (Ver Discusión y Conclusiones).

Del tercer experimento podemos observar, Tabla No.2 que tampoco precipitó el complejo de transcripción marcado con $[^{32}\text{P}]$ y que el $[^3\text{H}]$ cRNA agregado exógenamente tampoco precipitó; además de que se perdió más del 90% de cRNA en este experimento.

Se requiere al igual que en los otros experimentos anteriores modificar el protocolo y usar cantidades más grandes del material biológico usado (ver Discusión y Conclusiones).

Experimento 3.

Tabla No. 2

PRECIPITACION DE COMPLEJO DE TRANSCRIPCION VIRAL DE SV40.

% Precipitación.

| ^{14}C | | ^{32}P | |
|-----------------|-------------|-----------------|-------------|
| Sobrenadante | Precipitado | Sobrenadante | Precipitado |
| 1 100% | 0% | 100% | 0% |
| 2 100% | 0% | 0% | 0% |
| 3 100% | 0% | 0% | 0% |
| 4 100% | 0% | 36% | 0% |

| ^3H | |
|--------------|-------------|
| Sobrenadante | Precipitado |
| 1 0% | 0% |
| 2 0% | 0% |
| 3 0% | 0% |
| 4 7,5% | 0% |

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Discusión y Conclusiones:

1.- Se logró precipitar de manera diferencial primeramente DNA simple cadena de células CV₁ de DNA doble cadena. Esto nos dió la pauta de que era factible separar de una mezcla, ácidos nucleicos de cadena simple (al menos DNA hasta este punto) ensayando en líquido (Fig 15).

Con estos resultados y por las referencias que se tenían empezamos a montar la metodología para precipitar DNA de SV40, ya que como se sabe es más pequeño y tiene menos sitios de unión a la P₃₂, además de que éste sería el DNA que se tendría en la mezcla al tratar de purificar al Complejo de Transcripción viral de SV40.

2.- Por otro lado en los siguientes experimentos empezamos a usar anticuerpos de chivo contra IgG de conejo, ya que la Proteína A-Sepharosa es muy grande y por ensayos hechos en paralelo observamos que precipitaba inespecíficamente al minicromosoma de SV40 (resultados no mostrados).

3.- El porcentaje de precipitación que se tenía en los primeros experimentos era un poco bajo; esto es del 60 al 80% (Fig 15 y Fig 16) , pero después al empezar a usar el 2o. anticuerpo , el rendimiento aumento hasta un 100%, para el caso de DNA de células CV₁ (Fig 17).

4.- La precipitación diferencial de [³H] DNA simple cadena y [¹⁴C] DNA doble cadena (Fig 18) , nos dió el resultado para empezar a tratar de precipitar el cRNA de SV40 , ya que el porcentaje de precipitación para este experimento fue casi el 80%.

5.- El [³H]-cRNA sintetizado in vitro se usó para precipitarlo solo y con DNA doble cadena de SV40, haciendo notar en este punto que este RNA es de diferentes tamaños (Fig 19) , consecuencia por la cual no todo (100%) iba a precipitar, así como también, ya que se tiene el conocimiento que la P₃₂ tiene menos afinidad por éste, no era lógico esperar un 100% de precipitación (Fig 20 y 21) en estos experimentos.

Cabe mencionar aquí que dada la baja afinidad de la P_{32} por el crNA, era necesario mantener una concentración mínima de P_{32} alrededor del ácido nucleico, para que ésta no se despegara o bien de que hubiera un recambio rápido de P_{32} del ácido nucleico al dominio de P_{32} que se encontraba en las cercanías de éste, esto con el fin de que siempre hubiera algo de P_{32} pegada al RNA.

En este par de experimentos usando Proteína A-Sepharosa en un caso, y en otro precipitando diferencialmente el crNA de una mezcla junto con DNA doble cadena y utilizando además el doble anticuerpo para precipitar los complejos formados, se logró precipitar del 75% en el primer caso (Fig 20) y el 62% en el segundo caso (Fig 21).

Es de observarse claramente que en el 2o. experimento precipita un 15% -- menos RNA que en el primer experimento, consecuencia que atribuimos a la concentración de dominios de ácidos nucleicos con respecto a la P_{32} alrededor del crNA. Esto siempre es de esperarse ya que al incrementar la concentración de ácido nucleico, la proporción relativa P_{32} / ácido nucleico disminuya, a pesar de que la P_{32} no se pegue al DNA de doble cadena y por lo tanto la concentración del dominio de P_{32} alrededor del RNA disminuye.

6.- Se realizaron diferentes purificaciones de minicromosoma de SV40 y se mezclaron con crNA de SV40 para precipitar diferencialmente a este último y tener las condiciones más cercanas en las que se trataría de purificar al complejo de transcripción viral.

Para este experimento (Fig 23) solo se logró precipitar un 20% de crNA y a pesar de que se incrementó la concentración de P_{32} no aumentó el porcentaje de precipitación (haciendo hincapié en este punto que la máxima concentración de P_{32} usada en este ensayo no es un exceso para la cantidad de anticuerpos usada para precipitarla).

No sabemos exactamente a que se debe esto y si el dominio de P_{32} alrededor del cRNA está extremadamente reducido; o si hay algún factor inhibitorio en el extracto donde se encuentra el minicromosoma de SV40 que impida la precipitación del cRNA.

Con estos resultados se probó después que los anticuerpos no se unen al minicromosoma, y lo más probable que esté ocurriendo, es que debido al tamaño tan grande que tiene el minicromosoma estorbe de alguna manera para que no se pegue la P_{32} al RNA ó no permita la formación de los complejos RNA-Anti- P_{32} -Anti-IgG, y que estos se precipiten.

Esta última hipótesis podría tal vez descartarse si se hiciera un experimento en el cual se agregara un exceso de P_{32} y de cada uno de los anticuerpos, manteniendo exactamente la relación que se usó en todos los experimentos anteriores, con el fin de que haya siempre bastante P_{32} alrededor del RNA y que todo este precipite al agregar los dos anticuerpos.

7.- En base a estos resultados y pensando siempre en la purificación del complejo de transcripción de SV40 (ver Resultados Parte II), se tomó el minicromosoma de SV40 y se incubó con $[^3\text{H}]$ -cRNA y posteriormente con P_{32} , agregando esta mezcla a una columna de Sepharosa 4B (ver Material y Métodos).

El resultado de este experimento no se muestra, pero después de sacar el cRNA con el minicromosoma de la columna e incubarlos con anticuerpos (Anti- P_{32} y Anti-IgG), se observó que no precipitó absolutamente el cRNA, hecho que no pudimos explicar totalmente ya que como se dijo anteriormente en una mezcla de $[^3\text{H}]$ -cRNA y $[^{14}\text{C}]$ -Minicromosoma, el primero precipita al menos un 20%. Este resultado puede explicarse porque después de salir de la columna el cRNA se encuentra en menor cantidad, al igual que el minicromosoma, y y , la relación P_{32} /ácido nucleico aumente. Ocasionalmente tal vez la pérdida de algunos tamaños de RNA que si precipitaban antes; sin embargo esta explicación no es muy lógica pero no encontramos otra hasta el momento.

8.- Con lo que respecta a la parte II de Resultados, podemos decir que se necesitan incrementar las concentraciones de P_{32} y de anticuerpos, para poder precipitar al complejo de transcripción viral.

Menciono esto, ya que los Anti- P_{32} debido al bajo título (1:4) que presentan nos son un factor limitante para poder incrementar la P_{32} en gran cantidad.

En estos experimentos (Tabla 1 y Tabla 2) no era de esperarse absolutamente que precipitara el CTV , pero se intentó realizar varias veces, ya que en los demás experimentos se estuvo trabajando con cRNA . En el CTV se encuentra al menos en su gran mayoría un tamaño homogéneo de colas de RNA.

Se está trabajando actualmente para probar diferentes tamaños de colas de RNAm en el CTV , para descartar la posibilidad de que este sea un factor limitante, así como también estamos analizando el posible efecto inhibitor de la mezcla del gradiente donde obtenemos el CTV y el tamaño de CTV como posible impedimento estérico para la formación de complejos estables entre el RNA- P_{32} y los anticuerpos usados.

APENDICE A . ABBREVIATURAS.

Cerenkov - Son las cuentas por minuto contadas sin líquido de centelleo; el contaje es directo en el aparato.

CPM - Cuentas por minuto.

C.T.V. - Complejo de transcripción viral.

DTT. - Ditionitrosol.

EDTA. - Etilen diamino tetraacético .

Forks - Son los sitios en donde se va replicando el DNA.

His⁻ . Cepa mutante deficiente en producir histidina.

Linker. - Pequeña porción de DNA de pocos pares de bases (solo 200 pares de bases aproximadamente).

Luz U.V. luz ultravioleta.

Moi. - Multiplicidad de infección.

ng. = nanogramos = 10^{-9} g.

PEG. - Polietilen glicol,

PMSF. - Phenil-metil , sulfonil fluoruro ,

SDS. - Dodecil sulfato de sodio.

Sm^r . - Cepa mutante resistente a estreptomicina.

Splicing. - Maduración de RNAs. Son los cortes que tiene un RNAm que es precursor de otros RNAs más pequeños.

Ura⁻ . - Cepa mutante deficiente en producir uracilo.

p.b . - Pares de bases.

Bibliografía General

1. Aaronson, S.A. 1970. Susceptibility of human cell strains to transformation by simian virus 40 deoxyribonucleic acid. J. Virol. 6: 470.
2. Adam, A., et al. (1981). Molecular and Cellular Biochemistry 41, 27-47.
3. Alberts, M.B. (1970). Nature 227, 1313-1318.
4. Allison, F.C., F.C. Chesternan, and S. Baron. 1967. Induction of tumors in adult hamsters with simian virus 40. J. Natl. Cancer Inst. 38: 567.
5. Andrea, D.R., Harvey, R. and Wells, E.R. (1981). Nucleic Acids Research 9, 3119-3128.
6. Bellard, M., Gannon, F. and Chambon, P. (1977). Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol. 42, 779-791.
7. Bittner, M., Burke, L.R. and Alberts, M.B. (1979). J. Biol. Chem. 254, 9565-9572.
8. Black, P.H. and W.P. Rowe. 1963. SV40 induced proliferation of tissue culture cells of rabbit, mouse, and porcine origin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 114: 721.
9. Bloom, S.K. and Anderson, N.J. (1978). Cell 15, 141-150.
10. Bolivar, Z.F. (1980). Ciencia 31, 155-163.
11. Bonner et al. (1968). Methods in Enzymology, vol 12 B, pag 3.
12. Botchan, M., W.C. Topp, and J. Sambrook. 1976. The arrangement of simian virus 40 sequences in the DNA of transformed cells. Cell 9: 269.
13. Bruschi, S. and Wells, E.R.J. (1981). Nucleic Acids Research 9, 1591-1597.
14. Burch, E.B.J. and Martinson, G.H. (1981). Nucleic Acids Research 9, 4367-4385.
15. Burger, M.M. 1970. Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth. Nature 227: 170.

16. Burgess, R.R and Jendrisak, J.J. (1975). Biochemistry 14: 4634.
17. Burton, E.L., Blackburn, D. and Moore, S. (1980). Int. J. Peptide Protein Res. 16, 359-364.
18. Burton, K. (1956). Biochem. J. 62, 315-322.
19. Clark, J.C., Krieg, A.P. and Wells, E.R.J. (1981). Nucleic Acids Research 9, 1583-1590.
20. Christiansen, G. and Griffith, D.J. (1977). Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol. 42, 215-226.
21. Christmann, L.J. and Dahmus, E.M. (1981). J. Biol. Chem. 256 , 7, 3326-3331.
22. Dahmus, E.M. (1981). J. Biol. Chem. 256 , 7, 3319-3325.
23. Dahmus, E.M. (1981). J. Biol. Chem. 256 , 7, 3332-3339.
24. Davie, J. and Candido, M.P.E. (1978). Proc. Natl Acad. Sci. USA. 75, 3574-3577.
25. Delance, J.R. and Smith, L.E. (1971). Copyright 279-312
(All rights reserved).
26. Delius, H., Westphal, H. and Axelrod, N. (1973). J. Mol. Biol. 74, 677-687.
27. Diez-Caballero, T., Aviles, X.F. and Albert, A. (1981). Nucleic Acids Research 9, 1383-1393.
28. Elgin R.C.S., Serunian, A.L. and Silver, M.L. (1976). Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol. 42, 839-850.
29. Elliot, G.S. and McLaughlin, S.C. (1979). Molec. gen. Genet. 169, 237-243.
30. Finch, J.T. and Klug, A. (1977). X-ray and Electron Microscope Analyses of Crystals of Nucleosome Cores.
Symposia on Quantitative Biology, vol XLII.
31. Fishbein, E., et al. (1979). Clin. exp. Immunol. 36, 145-150.
32. Flores, O.G., Fernández, T.C. and Gariglio, V.P. (1982). Virology 116, 619-628.

33. Foe, E.V. and Wilkinson, E.L. (1976). Comparative Organization of Active Transcription Units in Oncopeltus fasciatus. Cell 9: 131-146.
34. Franke, W.W., Scheer, U., Spring, H., Freundenburg, F.M. and Krohne, G. (1976). Morphology of Transcriptional Units of rDNA Exp. Cell Res. 100: 233-244.
35. Franklin, G.S. (1977). Nature 266, 273-275.
36. Gariglio, P. and Mouset, G. (1975). Isolation and Partial Characterization of a nuclear RNA polymerase-SV40 DNA Complex. FEBS Letters 56 (1): 149-153.
37. Gariglio, P. (1976). Effect of Sarkosyl on Chromatin and Viral RNA Synthesis (The Isolation of SV40 Transcription Complex). Differentiation 5: 179-183.
38. Gariglio, P. and Mousset, G. (1977). Characterization of a Soluble Simian-Virus-40 Transcription Complex. Cur. J. Biochem. 76: 583-590.
39. Gariglio, P., Llopis, R., Oudet, P. and Chambon, P. (1979). The Template of the Isolated Native Simian Virus 40 Transcriptional Complexes is a Minichromosome. J. Mol. Biol. 131: 75-105.
40. Gariglio, P., Bellard, M. and Chambon, P. (1981). Nucleic Acids Research. 9, 2589-2597.
41. Giardi, A.J., F.C. Jensen, and H. Koprowski. (1965). SV40- Induced transformation of human diploid cells: Crisis and recovery. J. Cell Comp. Physiol. 165: 69.
42. Cocks, E., et al (1978). Nucleic Acids Research 5, 3993-4006.
43. Gold, L., O'Farrell, Z.P. and Russell, M. (1976). J. Biol. Chem. 251, 7251-7262.
44. Gottesfeld, M.J. and Butler, J.P. (1977). Nucleic Acids Research 4, 3155-3173.
45. Griffith, D.I. (1975). Chromatin structure: Deduced from a Minichromosome. Science 187: 1202-1203.
46. Grumet, I. (1981). Proc. Natl Acad. Sci. 78, 727-731.
47. Hentschel, C.C. and Birnstiel, L.M. (1981). Cell 25, 301-313.

48. Hewlett, R.D. and Burgoyne, A.L. (1973). Biochem. Biophys. Res Commun. 52, 2, 504-510.
49. Hewlett, J.M. (1977). Biochemistry 16, 2763-2767.
50. Hibner, U. and Albert, M.B. (1980). Nature 285, 300-305.
51. Higashinakagawa, T., et al. (1977). Develop. Biol. 55, 375-386.
52. Hinsch, B. and Kula, R.M. (1981). Nucleic Acids Research 9, 3159-3174.
53. Hirt, B. (1967). J. Mol. Biol. 26, 365-369.
54. Isackson, J.P. and Reeck, R.G. (1981). Nucleic Acids Research 9, 3779-3791.
55. Isenberg, I. (1979). Ann Rev. Biochem. 48, 159-191.
56. Jensen, E.D. and Von Hippel, H.P. (1976). J. Biol. Chem. 251, 7198-7214.
57. Jensen, E.D., Kelly, C.R. and Von Hippel, H.P. (1976). J. Biol. Chem. 251, 7215-7228.
58. Johnson, M.E., et al. (1978). Proc. Natl Acad Sci. USA. 75, 1116-1120.
59. Kelly, C.R. and Von Hippel, H.P. (1976). J. Biol. Chem. 251, 7229-7239.
60. Kelly, C.R., Jensen, E.D. and Von Hippel, H.P. (1976). J. Biol. Chem. 251, 7240-7250.
61. Kit, S. 1966. Induction of enzymes of DNA metabolism by simian virus 40. Int 1st International Symposium on Tumor Virus, Nagoya, Jpan.
62. Kleinschmidt, M.A. and Martinson, G.H. (1981). Nucleic Acids Research 9, 2423-2431.
63. Kornberg, D.R. (1972). Science 184, 868-871.
64. Kornberg, D.R. (1977). Annu. Rev. Biochem. 40, 931-956.
65. Kornberg, D.R. and Thomas, J.O. (1974). Chromatin Structure: Oligomers of the histones. Science 184: 865.

66. Lacy, J. and Axel, R. (1975). Proc Natl Acad Sci. 72: 3978-3982.
67. Laemmli, L. K. (1970). Nature (London) 227, 680-685.
68. Lamers, C.M. (1982). Laboratory Investigation 46, 4, 393-399.
69. Lavi, S. and E. Winocour. 1972. Acquisition of sequences homologous to host deoxyribonucleic acid by closed circular simian virus 40 deoxyribonucleic acid. J. Virol. 9:309.
70. Lehninger, L.A. (1975). Biochemistry. Worth Publishers, Inc. Second Edition.
71. Lewin, B. (1975). Cell 4, 11-20.
72. Llopis, R., Perrin, F., Bellard, F. and Cariglio, P. (1981). Quantitation of Transcribing Native Simian Virus 40 Minichromosomes Extracted from CV₁ Cells Late in Infection. J. Virol. 38 (1) 82-90.
73. Lewin, B. (1980). Gene Expression 2. A Wiley-Interscience Publication. Second Edition.
74. Lutter, C.L. (1981). DNAase II Digestion of the Nucleosome Core: Precise Locations and Relative Exposures of Sites. Nucleic Acids Research, vol 9: 17.
75. Mcknight, L.S. and Miller, L. Jr. (1976). Ultrastructural Patterns of RNA Synthesis during Early Embryogenesis of *Drosophila Melanogaster*. Cell 8: 305-319.
76. Manor, H., M. Fogel, and L. Sachs. 1973. Integration of viral into chromosomal deoxyribonucleic acid in an inducible line of polyoma-transformed cells. Virology 63: 174.
77. Munns, W.T., et al. (1982). Biochemistry 21, 2922-2928.
78. Munns, W.T., et al. (1982). Biochemistry 21, 2929-2936.
79. Nicolini, A.C. (1979). Chromatin Structure and Function. Plenum Press, New York.
80. Noll, M. (1974). Nature 251, 249-251.
81. Okasaki, T., et al. (1979). Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol. Vol. XIII, 203-219.
82. Oudet, P., Gross-Bellard, M. and Chambon, P. (1975). Cell 4: 281-300.

83. Oxman, M. and P. H. Black. (1976). Inhibition of SV40 T-antigen formation by interferon. Proc. Natl. Acad. Sci. 55: 1133.
84. Prunell, A. and Kornberg, D.R. (1977). Relation of nucleosomes to DNA Sequences. Symposia on Quantitative Biol. vol. XLII.
85. Reeves, R. (1978). Nucleosome Structure of *Xenopus* Oocyte Amplified Ribosomal Genes. Biochemistry 21: 4908-4916.
86. Ris, H. (1975). Ciba Found. Symp. 28: 7.
87. Rosset, B.M., Florentin, I. and Mathé, G. (1981). Molecular and Cellular Biochemistry 41, 113-118.
88. Russel, M., Gold, L., Morrissett, H. and O'Farrel, Z. P. (1976). J. Biol. Chem. 251, 7263-7270.
89. Saneyoshi, M. (1981). Nucleic Acids Research 9, 3129-3138.
90. Saver, G. and E.C. Hahn. 1970. Interaction of SV40 with SV40-transformed and non-transformed monkey kidney cells. Z. Krebsforsch. 74: 40.
91. Scheer, U., Trendelenburg, F.M., et al. (1977). Lengths and Patterns of Transcriptional Units in the Amplified Nucleoli of Oocytes of *Xenopus laevis*. Chromosoma (Berl.) 60: 147-167.
92. Scheer, U. (1978). Change of Nucleosome Frequency in Nucleolar and Non-Nucleolar Chromatin as a Function of Transcription: As Electron Microscopic Study. Cell 13: 535-549.
93. Seale, L.R. (1981). Nucleic Acids Research 9, 3151-3158.
94. Tooze, J. (1981). DNA Tumor Viruses. Cold Spring Harbor Laboratory, Second Edition. (Part 2).
95. Trendelenburg, F.M. and Gurdon, B.J. (1978). Transcription of Cloned *Xenopus* Ribosomal Genes Visualized after Injection into oocyte nuclei. Nature 276z; 292-294.
96. Tsuda, M. and Susuki, Y. (1981). Cell 27, 175-182.
97. Wasylyk, B., Thevenin, G., Oudet, P. and Chambon, P. (1979). J. Mol. Biol. 128, 409-438.

98. Watson, D. J. (1977). Molecular Biology of the Gene. W.A. BENJAMIN, INC. 3rd. Edition.
99. Weintraub, H. and Groudine, M. Science 193: 848-856.
100. Weil, P.A., Segall, J., Harris, B., Ng, S. Roeder, R.G. (1979). Cell 18, 469-484.
101. Wilson, L.B. and Dixon, H.G. (1979). Proc. Natl Acad. Sci. 76, 1682-1686.
102. Winkle, A.S. and Krugh, R.T. (1981). Nucleic Acids Research. 9, 3175-3186.
103. Yaniv, M., Croissant, O. and Cuzin, Francois. (1974). Biochem Biophys. Res. Commun. 57, 1074-1079.
104. Zabel, P., Dorssers, L., K. and Kammen, U.A. (1981). Nucleic Acids Research 9, 2433-2444.
105. Comunicación personal. Patricio gariglio.
106. Comunicación personal. Dr. Jesus Calderón, Departamento de Biología Celular. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.