

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL  
DEL ADN DE NEUROSPORA CRASSA.

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
JAVIER BARRIOS GONZALEZ

419

1976



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.

CLAS Tesis  
ADE \_\_\_\_\_  
FECHA 1976  
PROC U-53



QUIMICA

Jurado asignado originalmente según el tema:

PRESIDENTE:	DRA. ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ
VOCAL:	MenC. GRACIELA MEZA RUIZ
SECRETARIO:	DR. RAFAEL PALACIOS DE LA LAMA
1ER. SUPLENTE:	DRA. BEATRIZ MEDINA JIMENEZ
2DO. SUPLENTE:	MenC. ROCIO SALCEDA SACANELLES

Sitio donde se desarrolla el tema:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM

Sustentante:

JAVIER BARRIOS GONZALEZ

Asesor del tema:

DR. RAFAEL PALACIOS DE LA LAMA.

A MIS PADRES

A MIS AMIGOS

# I N D I C E

	Pag.
I. <u>INTRODUCCION.</u>	1
II. <u>GENERALIDADES.</u>	4
1. <u>RENATURALIZACION E HIBRIDIZACION DE ACIDOS NUCLEICOS.</u>	4
a) Condiciones de la reasociación.	6
b) Medición de la reasociación.	7
c) Cinética de la reasociación.	10
d) Secuencias repetitivas.	12
2. <u>PURIFICACION DEL ADN DE NEUROSPORA CRASSA.</u>	18
a) Acción de las sustancias.	19
b) Pureza del ADN extraído.	20
c) Limitaciones del método.	20
d) Aparición de una fracción nueva en el ADN de Neurospora crassa.	20
3. <u>ESTUDIOS CON ADN DE NEUROSPORA CRASSA.</u>	23
III. <u>MATERIAL Y METODOS.</u>	29
1. Condiciones de crecimiento.	32
2. Curva de crecimiento.	33
3. Purificación del ADN (marcado con isótopos radioactivos).	33
4. Rompimiento del ADN.	37
5. Determinación de las características espectrofotométricas y curvas de fusión.	37
6. Medición de la concentración y cálculo de la actividad específica.	39
7. Fraccionamiento de las secuencias únicas y repetitivas.	39
IV. <u>RESULTADOS.</u>	44
1. Curva de crecimiento.	44
2. Purificación del ADN.	45
a) Rendimiento del cultivo.	45
b) Rendimiento del ADN.	45
c) Capacidad de la hidroxapatita.	45
d) Pruebas de pureza.	45
3. Fraccionamiento por cromatografía de hidroxapatita.	47
V. <u>DISCUSION.</u>	48
VI. <u>CONCLUSIONES.</u>	60
VII. <u>BIBLIOGRAFIA.</u>	61

## INTRODUCCION

*Neurospora crassa* es un hongo de la clase Ascomycetos. Aunque su complejidad genética y metabolismo son poco complicados en relación a células de organismos superiores, posee membrana nuclear, organelos bien definidos y mas de un cromosoma. Estas características hacen que esté considerado como un eucariote. Además, existen en *N. crassa* un proceso de reproducción asexual y otro de reproducción sexual a través de la participación de dos cepas de diferente tipo sexual (a y A), de manera que se pueden efectuar cruizas entre cepas con diferentes características genéticas. Debido a las propiedades anteriormente descritas, *N. crassa* es en la actualidad el eucariote mejor estudiado desde el punto de vista genético y bioquímico.

El descubrimiento y perfeccionamiento de una serie de métodos que permiten estudiar los eventos moleculares de la célula, ha ocasionado que los estudios a este nivel estén avanzando muy rápidamente. Entre las técnicas mas importantes, está la de renaturalización e hibridización de ácidos nucleicos (1,2,3).

Con *Neurospora crassa* como modelo de eucariote y la gran variedad de recursos que nos proporcionan las técnicas antes mencionadas, se tienen buenas posibilidades de llegar a una mejor comprensión de los mecanismos que hacen posible la regulación genética y diferenciación celular.

El ADN de *N. crassa* presenta una serie de dificultades especiales para su purificación y manipulación (6), con respecto al de otros organismos (4,5). Para obtener un ADN de *Neurospora crassa* de pureza e integridad aceptables, es conveniente utilizar el método de purificación desarrollado por Britten (6) o ligeras variaciones (7). Este método se basa en la separación del ADN de los demás componentes celulares al pasar un lisado celular a través de una columna de hidroxiapatita.

En este trabajo se presenta una modificación de este método. En esta modificación, la columna de hidroxapatita se ha cambiado por su modalidad en "lote". Esto se hizo, principalmente, pensando en las ventajas que esta modalidad puede traer consigo en este caso y que son: rapidez y facilidad en el montaje del método, poder utilizar grandes volúmenes de hidroxapatita, además de poder procesar varias muestras a un mismo tiempo.

Para complementar lo anterior se da una descripción detallada de como, basándose en el método de Dutta (8), se llevó a cabo la técnica para separar las secuencias de ADN repetitivas de las únicas. Tanto la purificación como el fraccionamiento del ADN son procesos básicos para efectuar trabajos relacionados con este campo.

Además de la parte experimental, se incluye una parte bibliográfica, en la cual se hace una revisión sobre renaturalización e hibridización de ácidos nucleicos y sobre secuencias



repetitivas de ADN. También se dan algunos antecedentes sobre purificación del ADN de *N. crassa* y se comentan los trabajos mas relevantes en el campo de investigación sobre ADN de *Neurospora crassa* relacionados con secuencias repetitivas, hibridización y renaturalización de ácidos nucleicos.

## GENERALIDADES

### RENATURALIZACION E HIBRIDIZACION DE ACIDOS NUCLEICOS

Las cadenas complementarias del ADN se separan al exponerlas al calor, álcali o agentes químicos desnaturizantes. Cuando el ADN es calentado en solución, ocurre un marcado aumento en su coeficiente de extinción a 260  $m\mu$  al llegar a la temperatura a la cual se lleva a cabo la transición del ADN - de doble hélice a hélices sencillas.

La temperatura correspondiente a la mitad del incremento de absorbancia, llamada temperatura media de fusión o  $T_m$ , está relacionada linealmente a la composición básica promedio de e se ADN (9). Un contenido mayor de G - C ( guanina - citosina) confiere al ADN una mayor estabilidad térmica.

Debido a la reproducibilidad de los resultados, el perfil de transición térmica o curva de fusión se utiliza para determinar la composición del ADN en moles % de G - C. Otras propiedades, como la heterogeneidad de un ADN con respecto a su composición básica, así como la presencia de regiones desnaturizadas, también pueden ser detectadas y cuantificadas.

La estructura complementaria del ADN, hace posible que sus cadenas separadas se reasocien, bajo condiciones adecuadas, recuperando sus propiedades físicas y actividad biológica. Este fenómeno ha aportado una herramienta muy útil para explorar la naturaleza de los eventos moleculares de la célula y otros problemas biológicos como la cercanía o lejanía de las especies - en la escala filogenética.

Al estudiar la cinética de reasociación del ADN de un organismo, se obtienen datos de gran importancia. Entre otros se puede evaluar su complejidad genética, es decir, calcular el número de pares de bases que forman el ADN no repetitivo por célula o virus. También se puede saber si ese ADN está formado exclusivamente por secuencias únicas, o hay secuencias que se repiten. Se puede averiguar también si la población de secuencias repetitivas es homogénea o heterogénea, o sea ver si el ADN repetitivo está constituido por especies del mismo grado de repetición o por especies con grados de repetición muy diferentes.

En cuanto a la hibridización de ADNs de especies biológicas diferentes, ésta nos proporciona datos sobre su cercanía o lejanía en la escala filogenética (7,10). Una tercera posibilidad es hibridizar ADN con ARN, ofreciéndonos esto un método muy versátil, cuyas aplicaciones van desde la estimación de la transcripción (8) hasta aislamiento y cuantificación de ciertos genes (11).

Los experimentos de renaturalización o hibridización de ácidos nucleicos pueden efectuarse en solución o midiendo la unión de fragmentos de ADN de hélice sencilla (marcado con radioisótopos) a largas cadenas de ADN inmovilizadas en una sustancia soporte, la cual puede ser: agar, celulosa, o filtros de nitrocelulosa (13). Al efectuarse el experimento de ésta última manera, la velocidad de la reacción disminuye notablemente en relación a su velocidad en solución.

### Condiciones para la reasociación.

Las condiciones que se deben controlar para tener una reasociación adecuada, son las siguientes:

- 1) La concentración de cationes afecta grandemente la velocidad de reasociación (14,15).

Se ha encontrado que la velocidad de renaturalización está en función de la concentración de sales en el medio. Esta dependencia sólo es válida en un rango que va de 0.01 M de Na a 0.4 M de Na, por debajo del cual se bloquea la reacción y por arriba del cual, la velocidad se vuelve casi independiente de la concentración de sales (1,2). Este efecto refleja los cambios en las interacciones electrostáticas entre las dos cadenas de ADN.

- 2) La temperatura debe ser suficientemente elevada para evitar la formación de estructura secundaria en la misma cadena o apareamiento con una cadena que no sea la complementaria. Se ha encontrado que la temperatura óptima de renaturalización es de 25° a 30° C abajo de su  $T_m$  (temperatura media de fusión) (1,14).

- 3) El tiempo y la concentración del ADN. La reasociación de un par de secuencias complementarias es el resultado de su colisión y por lo tanto, la velocidad depende de la concentración de ADN. El producto de la concentración del ADN por el tiempo de incubación es el parámetro que mide el número de choques entre las cadenas o el

grado de avance que tiene la reacción en un momento dado. A este parámetro se le ha llamado "Cot", el cual es expresado en moles de nucleótidos por litro por segundo (ver sección de cinética de reasociación).

$$\text{Cot} = \frac{\text{moles de nucleótidos}}{\text{litro}} \times \text{tiempo (segundos)}$$

El ADN de cada organismo puede ser caracterizado por el valor del Cot, en el cual la mitad de la reasociación se ha llevado a cabo (Cot 1/2). También, el Cot 1/2 es proporcional a la complejidad genética de un organismo.

- 4) El tamaño de los fragmentos de ADN también afecta la velocidad de reasociación (16). Esto concuerda con la hipótesis de la nucleación (ver Cinética de Reasociación), pues es lógico que para ADNs de pesos moleculares mayores, se necesitan menos sitios de nucleación para renaturalizar una cierta cantidad de ADN.

#### Medición de la reasociación.

Existen muchas maneras de medir la reasociación, todas ellas basadas en diferencias físicas, biológicas y químicas, entre el ADN de doble hélice y el de hélice sencilla (16), - que puedan detectarse fácilmente.

- 1) Entre las diferencias físicas más utilizadas se encuentran las siguientes:
  - a) El ADN disociado absorbe más luz ultravioleta que el ADN de doble hélice.

- b) El ADN reasociado tiene un mayor grado de actividad óptica que el disociado.
  - c) En el método de reasociación en el que se utiliza ADN inmovilizado, se detecta la renaturalización midiendo la unión de fragmentos radioactivos de ADN de hélice sencilla a largas hebras de ADN inmovilizado, esta técnica, aunque no se basa en una diferencia física propiamente dicha, se menciona aquí por conveniencia.
  - d) Una técnica que es particularmente útil se basa en el hecho de que el ADN de doble hélice puede ser separado del ADN de hélice sencilla en una columna de fosfato de calcio (hidroxiapatita). Debido a su diferente afinidad por la hidroxiapatita. Las reacciones de reasociación pueden seguirse pasando muestras por hidroxiapatita y determinando la cantidad de ADN reasociado que se pegó a la columna. La importancia que tiene este método, reside en que el ADN puede ser fraccionado, en una escala preparativa, en base a su habilidad para reasociar a un Cot determinado (ver significado de Cot en Sección Condiciones para la Reasociación).
- 2) A continuación se describen las diferencias biológicas que se han utilizado para medir la reasociación, siendo en la actualidad el tratamiento con enzimas la más importante.

- a) Tratamiento con enzimas. Aunque los métodos físicos son altamente deseables en algunos casos, sufren de una desventaja general y es que secuencias de hélice sencilla unidas covalentemente a regiones apareadas de ADN siempre aparecerán o se tomarán en cuenta la fracción reasociada.

Existen enzimas como la fosfodiesterasa de *E. coli* (exonucleasa) que hidrolisan el ADN desnaturalizado, respetando el ADN de hélice doble. Este fenómeno provee un método para eliminar todo el ADN de hélice sencilla y cuantificar únicamente el ADN de doble hélice. La desventaja de esta nucleasa y en general de las exonucleasas, es que deja gazas (lazos) o colas 5' o 3' unidas al ADN reasociado.

Enzimas sin esta desventaja han sido extraídas de cerebros de ternera, riñón de oveja, levaduras, conidias de *Neurospora crassa* y la nucleasa  $S_1$  de *Aspergillus oryzae*. En contraste con las demás, cuya preparación es relativamente difícil, la nucleasa  $S_1$  puede prepararse fácilmente a partir de polvo de Takadiastasa o Amilasa de Sigma (22).

En técnicas de hibridización de ADN con ARN, es usual quitar secuencias no apareadas con ribonucleasa específica para ARN de hélice sencilla (25) o utilizar ribonucleasas que liberen las secuencias de ADN digiriendo la cadena de ARN (19).

- b) Transformación bacteriana. Se ha utilizado la capacidad del ADN de doble hélice para llevar a cabo transformación en bacterias (24).

c) Método inmunológico. Se ha aprovechado también la mayor efectividad del ADN de hélice sencilla para reaccionar en la fijación de complemento con anticuerpos anti-ADN (25).

3) Los métodos químicos más utilizados son las reacciones del ADN con naranja de acridina o con formaldehído, - los cuales dan coloraciones diferentes con ADN de doble hélice y ADN de hélice sencilla (26).

### Cinética de reasociación.

La velocidad de una reacción es directamente proporcional a la concentración de los reactantes.

1.  $A \longrightarrow P$  donde V es proporcional a  $C_a$
  
2.  $2A \longrightarrow P$  " V " " " a  $C_a^2$   
 $A+B \longrightarrow P$  " V " " " a  $C_a C_b$
  
3.  $A+2B \longrightarrow P$  " V " " " a  $C_a C_b^2$   
 $2A+B \longrightarrow P$  " V " " " a  $C_a^2 C_b$

Donde V es la velocidad de la reacción;

$C_a$  la concentración de A;

$C_b$  la concentración de B; y

P el producto de la reacción.

Las proporcionalidades anteriores indican que se tienen diferentes tipos de dependencia de la velocidad de la concentra-



ción para diferentes tipos de reacciones. Para distinguir entre estos tipos se utilizó el término: "orden de reacción".

Orden de reacción. Es la suma de todos los exponentes a los que las concentraciones de los reactantes son elevados, en la ecuación de equilibrio de la reacción.

$$\text{(Ecuación de equilibrio)} \quad \frac{-dC}{dt} = K C_1^{n_1} C_2^{n_2} \dots$$

$$\text{(Orden de reacción)} \quad n = n_1 + n_2 + \dots$$

Cinética de reasociación del ADN. La renaturalización de dos secuencias complementarias se lleva a cabo en los siguientes pasos:

- 1) Colisión de las secuencias.
- 2) Si las secuencias son complementarias sucede una nucleación, es decir, la formación de uno o unos apareamientos correctos de bases en algún punto (punto de nucleación) a lo largo de las dos cadenas.
- 3) El subsiguiente apareamiento del resto de las bases, en una reacción llamada de "zipper", dando por resultado la formación de la doble hélice.

Bajo las condiciones en las que se acostumbra llevar a cabo, la renaturalización del ADN sigue una cinética de segundo orden. Esto indica que el evento limitante de la velocidad es una nucleación y que la subsiguiente reacción de zipper debe ser rápida, de otra manera la velocidad total de formación de pares de bases sería de primer orden (2).

Análisis de la gráfica.- Las velocidades de reasociación de los diferentes ADNs abarcan un rango más de ocho órdenes de magnitud. Debido a ésto, fue necesario utilizar un método logarítmico para la presentación de medidas de reasociación. La gráfica que se presenta en la figura 1, muestra el curso de una reacción ideal de segundo orden en función del producto de la concentración de ADN por el tiempo de reacción, (Cot) en una escala logarítmica.

Los dos tercios centrales de la curva siguen una línea recta, cuya pendiente puede ser evaluada dividiendo los valores de Cot de sus extremos. El valor de esta relación es de 100 para una reacción ideal, si es mucho mayor, la reacción es seguramente heterogénea. (Ver significado de reacción heterogénea en Pag. 5).

En una gráfica de este tipo, se pueden comparar reacciones llevadas a cabo a diferentes concentraciones y combinar los datos para dar un panorama completo del curso de la reacción.

### Secuencias repetitivas.

Cuando se inició el estudio de las cinéticas de reasociación de organismos superiores, surgió la hipótesis de que ciertas secuencias nucleotídicas estaban repetidas en el ADN de algunos vertebrados. Esta suposición estaba basada en la observación de que 10% del ADN de ratón reasociaba extremadamente rápido en relación al resto del ADN y ADNs de otros organismos como bacterias y virus. Después se demostró que esta fracción,

identificada como ADN satélite de ratón, consistía en un millón de copias de una pequeña secuencia (28).

Trabajos posteriores llegaron a la conclusión de que todos los eucariotes contienen ADN repetitivo, mientras que los procariotes no (1). El hecho de que todos los eucariotes tienen secuencias repetitivas, aunado a la complejidad creciente de estas secuencias en organismos superiores, indican que debe jugar un papel importante en la evolución.

#### Precisión de la reasociación.

Cuando se reasocian cadenas de ADN que no son perfectamente complementarias, los pares resultantes tienen una estabilidad térmica reducida. Este efecto provee un buen método para medir el grado de diferencia entre las dos cadenas. La medición de la estabilidad térmica se acostumbra hacer llevando a cabo una curva de fusión ( $T_m$ ) o un fraccionamiento térmico con hidroxapatita (1). Esta técnica está basada en la absorción del ADN renaturalizado en una columna de hidroxapatita. Después se va aumentando la temperatura de la columna gradualmente, de tal manera que el ADN se va desnaturalizando y eluyendo de la columna.

Se ha calculado que una temperatura media de fusión ( $T_m$ ) disminuida en un grado centígrado indica 1% de las bases apareadas incorrectamente (27). También, un rango amplio de transición térmica indica un apareamiento impreciso.

Los datos obtenidos por las mediciones de la estabilidad térmica pueden ser complementados con la medición de la hiper-

cromicidad a la luz ultravioleta (Ver curva de fusión en Pag. 4), la cual nos da una medida de la fracción de la longitud total que está apareada formando una doble hélice.

Utilizando las técnicas anteriormente descritas, se ha visto que el ADN de bacteria tiene una renaturalización precisa. La fracción única del ADN de organismos superiores tiene una hipercromicidad de aproximadamente 75% de la del ADN nativo y una transición térmica homogénea. Sin embargo, las secuencias repetitivas muestran un apareamiento impreciso, detectado por una reducción en el  $T_m$ , así como por un amplio rango de transición térmica. Además una parte importante de los nucleótidos no están apareados, pudiéndose ejemplificar ésto con el ADN repetitivo de salmón, donde se encontró que las regiones apareadas incluían sólo la mitad de los nucleótidos de los fragmentos (1).

#### Función de las secuencias repetitivas.

Se dice que el potencial de información del ADN repetitivo es mayor de lo que podía parecer, argumentándose los siguientes puntos:

1. Las secuencias de nucleótidos miembros de una "familia" típica son similares, pero no idénticas (1).
2. Las secuencias repetitivas o fragmentos de ellas, han sido traslocadas a varias partes del genoma (27), lo cual reviste gran importancia, pues tanto su localización como su relación con secuencias vecinas puede estar relacionada con su función.

La función del ADN repetitivo ha sido objeto de gran interés recientemente (1,17). El hecho de que todos los genomas de eucariotes tienen ADN repetitivo y la complejidad creciente de estas secuencias en organismos superiores, indican que estas secuencias desempeñan un papel importante en la evolución. El papel de los genes redundantes en la diferenciación celular, ha sido tema de particular importancia últimamente (18). Se ha demostrado que, al menos parte del ADN repetitivo se transcribe y que diferentes familias se expresan en diferentes fases de la diferenciación celular (42).

Es ahora un asunto de gran importancia investigar cómo están arreglados los genes redundantes en el cromosoma (37) y si controlan la regulación genética como han sugerido fuertemente las investigaciones de Lodish y colaboradores en el eucariote *Dictyostelium discoideum* (19).

Además de las funciones regulatorias arriba mencionadas, - las cuales tienen un razonable apoyo experimental, se han sugerido las siguientes funciones:

1. Muchas copias casi iguales de un gene, harían posible una mayor velocidad de síntesis. Esto sería consistente en el caso de los genes que codifican para ARN ribosomal, de los cuales hay cientos o miles en el ADN repetitivo (20,11).
2. Una gran cantidad de copias parecidas, proveerían una clase de cadenas protéicas similares, como parece ocurrir en la producción de anticuerpos (21). De cual -

quier manera, su función no podría estar limitada al sistema inmunológico, pues las secuencias repetitivas existen en plantas y organismos en los que no se han observado anticuerpos.

3. F. Crick ha propuesto que los segmentos repetitivos de ADN llevan a cabo su papel estructuralmente, a través de su interacción con las proteínas del cromosoma.
4. Otra posibilidad sería que la existencia de los genes redundantes eleve hasta un nivel útil la posibilidad de que suceda un evento raro, quizás algo como la traslocación de ciertos fragmentos de secuencias de ADN (1).

#### Origen de las secuencias repetitivas.

Parece probable que las familias de secuencias repetitivas se hayan originado en ciertos momentos de la evolución, por duplicación en gran escala de determinadas secuencias. Las divergencias se deberían a subsiguientes mutaciones y finalmente se trasladarían segmentos de algunas secuencias miembros de la familia.

Por la evidencia que se tiene, se piensa que el fenómeno - descrito arriba (formación de secuencias repetitivas) es un evento repentino al que se le ha llamado "Replicación Saltatoria" (Saltatory Replication) (1). Una pregunta que surge aquí es: ¿Cuales son las condiciones que seleccionan a la secuencia y desencadenan el evento?

Para finalizar con las secuencias repetitivas, en la tabla No. 1 se dan las características de reasociación de los ADNs único y repetitivo.

NO REPETITIVO	REPETITIVO
<u>Fuente</u>	
Bacterias Virus	Vertebrados Invertebrados Plantas superiores Euglena Dinoflagelados
<u>Velocidad de reasociación.</u>	
Una velocidad inversamente proporcional al contenido de ADN por célula o partícula.	Muchas diferentes velocidades. La más lenta, inversamente proporcional al contenido de ADN por célula - haploide y la más rápida hasta un millón de veces mayor.
<u>Extensión de la reasociación.</u>	
Excelente, hasta un 90% de doble hélice reformada. (No hay un efecto acentuado debido al tamaño de los fragmentos.	Bueno, si el ADN se corta en fragmentos pequeños. Pobre si el ADN tiene un alto peso molecular.
<u>Estabilidad térmica del ADN reasociado.</u>	
Temperatura a la cual las cadenas se separan ( $T_m$ ), casi igual a la del ADN nativo.	Algunos con un $T_m$ cercano al del ADN nativo y muchos con más bajos grados de estabilidad.
<u>Tamaño de partícula del ADN reasociado.</u>	
Varias veces el tamaño del fragmento, debido al apareamiento de extremos de hélice sencillas libres (concatenación).	Enorme, si los fragmentos son grandes, debido a múltiples conexiones (formación de redes).

Tabla # 1. Características de reasociación del ADN (Tomada del artículo de Britten y Kohne (1) ).

### PURIFICACION DEL ADN DE NEUROSPORA CRASSA.

Métodos convencionales para purificación del ADN, no funcionaban bien en *Neurospora crassa*. En 1966 se publicó un método que parecía dar buenos resultados (29,10). En este método, se incubaba a 60°C el polvo de micelio liofilizado en una solución que contiene S.D.S. y E.D.T.A. Esto se hace con objeto de romper las membranas celular y nuclear, así como para separar las proteínas del ADN con el detergente. La acción de las nucleasas es inhibida por el E.D.T.A. Después se desproteiniza por una extracción con fenol, se precipita con etanol y se trata con ribonucleasa. Finalmente, se precipita en isopropanol y se enrolla en una varilla de vidrio; se solubiliza y se le quita la enzima por medio de otra extracción con fenol.

En 1970, Britten y colaboradores (6) encontraron que al pasar un lisado celular a través de una columna de hidroxipatita, en presencia de 8 M urea y 0.24 M buffer de fosfatos, el ADN permanece adsorbido mientras que los otros constituyentes celulares pasan a través de la columna. El ADN se recupera eluyéndolo de la columna con buffer de fosfatos 0.4 M. La tabla No. 2 muestra el procedimiento que se sigue en este método.



Lisis	Suspender el tejido en 8 M urea, 0.24 M P.B., 1% S.D.S, y 0.01 M E.D.T.A.
Rompimiento	Con una mezcladora o licuadora a 10-20 000 r.p.m. En un recipiente sellado y lleno de buffer para evitar la producción de burbujas.
Adsorción	Pasar por la columna de hidroxapatita.
Lavado	Varios volúmenes de: 8 M urea y 0.24 M P.B.
Lavado	Varios volúmenes de: 0.014 M P.B.
Elución	Utilizando 0.4 M P.B.

Tabla # 2. Procedimiento para purificación de ADN, según el método desarrollado por Britten y colaboradores (6).

Acción de las sustancias.

Urea: Reduce la afinidad del ARN por la hidroxapatita, aumenta la del ADN y desnaturaliza las proteínas, reduciendo así el peligro de actividad enzimática.

Puede también ayudar a romper las células y la cromatina.

S.D.S.: Rompe las membranas celular y nuclear, además de separar las proteínas unidas al ADN.

E.D.T.A.: Actúa quelando iones divalentes, inhibiendo así la acción de las nucleasas.

### Pureza del ADN extraído.

Se encontró que una pequeña cantidad de proteína y otras macromoléculas se adsorbían también a la hidroxiapatita, pero no eran eluidas en las condiciones del método.

Utilizando células "L" de ratón, marcadas con  $^{14}\text{C}$ -valina, se encontró que menos de 1/1000 de la proteína celular estaba presente en la fracción del ADN. Al llevar a cabo las curvas de fusión, se obtuvieron hipercromicidades de 25-28% de la densidad óptica original. Para obtener ADNs de pureza comparable, por métodos convencionales, se requerirían etapas sucesivas de tratamientos enzimáticos, desproteínización y precipitación.

### Limitaciones del método.

1. La hidroxiapatita tiene una capacidad que varía con la marca y el lote, pero un promedio sería 1.67 D.O./ml. de hidroxiapatita empacada.
2. En las condiciones del método, cadenas muy largas de ADN no pueden ser eluidas eficientemente de la columna, por lo que uno de los pasos de la técnica es el rompimiento del ADN.

### Aparición de una fracción nueva en el ADN de neurospora crassa.

El desarrollo del nuevo método, fué importante por la novedad de su fundamento y por su rapidez en relación a otras técnicas. Sin embargo, su trascendencia fué mayor en el campo de la investigación con ADN de *N. crassa*.

Los autores pensaron que al tener un método que no dependía de la precipitación, podrían recuperar nuevas fracciones menores de ADN, las cuales difirieran en peso molecular o en estado, de la parte principal del ADN. Al efectuar investigaciones a este respecto, los autores encontraron que un componente mayor del ADN de *Neurospora crassa* había sido discriminado. La Fig. 2 muestra la curva de fusión del ADN de *N. crassa* extraído por este método, (6). La fracción de bajo punto de fusión corresponde a un 25% del total. Esta fracción está ausente en los ADNs extraídos por los métodos anteriores. Tampoco aparece como componente de baja densidad en ninguno de los gradientes de cloruro de cesio, publicados para ADN de *Neurospora*.

En este punto es importante hacer notar que si la fracción de bajo G-C se encontrara en forma de pequeñas secuencias repartidas en el genoma, podría ser que esta fracción no se esté perdiendo al purificar por otros métodos, sino que la fracción se pone de manifiesto en la curva de fusión, debido al menor tamaño de los fragmentos de ADN purificado por el método de Britten.

Para desechar esta posibilidad se buscó información sobre los rendimientos obtenidos por ambos métodos (el método anterior y el de Britten). Un 25% de ADN que no se pierde debe, lógicamente, aumentar el rendimiento de ADN.

Existe poca información sobre esto en la literatura, sin embargo, sí hay un aumento en el rendimiento (10,7), aunque no lo dicen exactamente, ni de un modo directo.

Otro factor que habla a favor de que efectivamente se estaba perdiendo esta fracción, es el hecho de que el porcentaje de G-C del ADN purificado por otros métodos es de 52% (56) (calculado por su densidad boyante), el cual es igual al de la fracción de alto G-C del ADN purificado por el método de Britten.

Aunque todo lo anterior indica que se trata efectivamente de una nueva fracción, la posibilidad planteada inicialmente queda abierta, debido a que no se habla de esto en la literatura y es difícil encontrar datos que lo aclaren sin lugar a dudas.

### ESTUDIOS CON ADN DE NEUROSPORA CRASSA.

Estimaciones sobre la transcripción de la información genética en eucariotes es necesaria para una mejor comprensión del control y la diferenciación de los tejidos, en condiciones normales y anormales. En 1973, Dutta y colaboradores calcularon el porcentaje del ADN no repetitivo que se transcribía en fase logarítmica, por medio de la hibridización de ADN único con ARN total (8).

Por la importancia de este trabajo y por su relación con los trabajos siguientes, se describen a continuación algunos detalles de su metodología.

La razón por la cual se utilizó únicamente ADN no repetitivo es la siguiente: Si un miembro de una familia de varios miles de genes similares, pero no idénticos, es expresado, el ARN resultante reaccionaría con ADN de otros miembros de la familia. Esto implica que un examen de la transcripción de secuencias repetitivas, podrían no definir adecuadamente el patrón de transcripción.

Para purificar las secuencias repetitivas, el ADN marcado, roto y desnaturalizado se incubó hasta un Cot de dos. En este Cot (se sabe por medio de las curvas de renaturalización de ADN total) todas las secuencias repetitivas han renaturalizado, mientras que las secuencias únicas se encuentran como hélices sencillas. En este momento, se pasó la solución a través de una columna de hidroxapatita, quedando las secuencias repetitivas adsorbidas a ella.

Para cuantificar la transcripción, se incubaron las secuencias únicas de ADN ( $^{32}\text{P}$ ) con una concentración muy alta de ARN total, de manera que ocurriera la mínima reasociación posible de ADN - ADN. Después de la incubación, la solución se pasó por hidroxapatita y se eluyó el material que había permanecido adsorbido, es decir híbridos ADN - ARN y quizás un poco de ADN - ADN. Para cuantificar únicamente el ADN unido a ARN, esta mezcla se trató con ribonucleasa y fue pasada por hidroxapatita, quedando adsorbido el ADN - ADN y saliendo el ADN ( $^{32}\text{P}$ ), que había hibridizado con el ARN, ahora en forma de hélice sencilla.

Se encontró que el 35% del ADN único había hibridizado con el ARN total, es decir, era transcrito en esa fase de crecimiento (logarítmica). Por medio de curvas de saturación, se comprobó que la reacción estaba completa en las condiciones en que se llevó a cabo la hibridización. Esta información se complementó con el hecho de que el ADN que no reaccionó, tampoco lo hizo al volver a incubarse con el ADN total hasta el mismo Cot.

Para comprobar que el ADN que no reaccionó no estaba dañado, se le puso a renaturalizar con ADN frío, lográndose casi un 100% de renaturalización. Por último, la elevada estabilidad térmica de los híbridos ADN - ARN indicó un alto grado de complementariedad.

Estimaciones de la transcripción de la información genética con ADN no repetitivo de otros eucariotes han sido llevados a cabo por Gelderman y colaboradores (30). Ellos muestran que 6%

de las secuencias únicas del ADN están representadas como ARN en el ratón recién nacido. Hahn y Laird (31) reportaron estimaciones de la transcripción del ADN único en diferentes tejidos de ratón, obteniendo los siguientes resultados: cerebro 10.8-12.4%, hígado 3-5.2% y riñón 2.7-4.8% en células procarióticas, Mc. Carthy y Bolton (32) reportaron 50% de hibridización ADN - ARN utilizando un método de ADN - agar. El 35% de *N. crassa*, representa uno de los mayores niveles de transcripción encontrado en un organismo eucariote. Las fases de desarrollo de *N. crassa*, proveen una oportunidad muy buena para estudiar el control de la transcripción y la expresión diferencial de los genes.

En 1975 Dutta y Chaudhuri (33), utilizando la metodología descrita al principio de este tema (medición de la hibridización ADN - ARN, utilizando cromatografía de hidroxapatita), midieron el porcentaje de transcripción de secuencias únicas de ADN provenientes de cuatro tipos celulares, representantes de cuatro estadios de desarrollo de *Neurospora crassa*. La transcripción del ADN fue del 34% (68% del genoma) en la fase de micelio ramificado y 15% en la fase de conidia, la cual es considerada como una fase inerte o de latencia. Las fases de conidia germinada y micelio no ramificado mostraron un marcado incremento en la transcripción, siendo 25 y 27%, respectivamente. Esto quiere decir que, como era de esperarse, la diversidad transcripcional del genoma va aumentando para llenar los requerimientos de crecimiento y diferenciación celular. Siendo

una opinión general que algunos tipos de moléculas de ARN se sintetizan siempre, mientras que otros solamente en ciertas fases de desarrollo, los autores calculan que aproximadamente un 30% del genoma de *N. crassa* (5000 a 8000 genes) se ven envueltos en la producción de nuevas moléculas de ARN en diferentes etapas de desarrollo.

#### ADN repetitivo en *N. crassa*.

Como se vió en un capítulo anterior, el ADN de *N. crassa* está formado por una fracción de bajo contenido de G-C (32 moles %) y otra de alto contenido de G-C (52 moles %), correspondiendo la primera a un 25%, aproximadamente, del ADN total. Se ha encontrado que la fracción de alto G-C está constituida principalmente por secuencias únicas y parte de la de bajo G-C por secuencias repetitivas (34). Algunos datos interesantes sobre esta fracción de bajo G-C son su marcada variación (en cuanto a cantidad) obtenida en diferentes cepas y especies (Chakra Bartty y Dutta, no publicado). Se ha visto también, que la mutante "slime" de *N. crassa* contiene un 44% de esta fracción (Ojha y Colaboradores, en preparación).

En cuanto a las secuencias repetitivas, experimentos de reasociación han mostrado que representan 10-12% del ADN total (8). En este 10-12% están incluidas las secuencias mitocondriales (34) y las secuencias que codifican para ARN ribosomal y de transferencia (11), (35). Recientemente se encontró que el ADN repetitivo de *N. crassa* mostraba una cinética de reasociación típica de segundo orden, lo cual indica una naturaleza homogénea de estas secuencias (36).



La información sobre transcripción de ADN repetitivo es escasa en relación a la de ADN único. Hough y Davidson (17) reportaron 6-8% de transcripción del ADN repetitivo en oocitos de *Xenopus*. Sugieren que por lo menos 2-5% del ARN de oocito puede proceder de secuencias repetitivas no ribosomales y que la mayor parte de estos ARNs está presente en poblaciones de pequeños ARN heterogéneos. En *Dictyostelium* se ha encontrado que 90% del ARN mensajero proviene de secuencias únicas y sin embargo 25% del ARN nuclear que contiene poli-A ha sido transcrito de ADN repetitivo (19). En 1975 se cuantificó el porcentaje de transcripción del ADN repetitivo en *N. crassa* (36). Esto se llevó a cabo en la forma acostumbrada (hibridización ADN - ARN y cromatografía de hidroxipatita), obteniéndose los resultados mostrados en la tabla.

ADN repetitivo	ARN total	7.3% de hibridización
ADN repetitivo	ARN ribosomal	4.4% de hibridización
ADN repetitivo	ARN de transferencia	0.1% de hibridización

Tabla No. 3 Resultados de la hibridización de ADN repetitivo con ARN total, con ARN ribosomal y con ARN de transferencia.

De 10 a 12% del ADN de *N. crassa* son secuencias repetiti-

vas y se encontró que 7.3% se transcribe en fase logarítmica. Parte de los ARNs transcritos de ADN repetitivo son de origen nuclear y se sugiere que parte pueden ser de ADN mitocondrial. La mayor parte del ADN repetitivo nuclear, sin embargo, codifica para ARN ribosomal y ARN de transferencia.

MATERIAL Y METODOS

Citrato de Sodio ( 5 H <sub>2</sub> O )	Baker analyzed
Fosfato de Potasio mono básico	Baker analyzed
Nitrato de Amonio	Merck
Sulfato de Magnesio ( 7 H <sub>2</sub> O )	Baker analyzed
Cloruro de Calcio ( 2 H <sub>2</sub> O )	Mallinckrodt
Biotina	Sigma
Acido Cítrico ( H <sub>2</sub> O )	Baker analyzed
Sulfato de Zinc ( 7 H <sub>2</sub> O )	Baker analyzed
Sulfato Ferroso Amoniacal	Baker analyzed
Sulfato de Cobre ( 5 H <sub>2</sub> O )	Baker analyzed
Sulfato de Magnesio ( H <sub>2</sub> O )	Baker analyzed
Acido Bórico	Baker analyzed
Molibdato de Sodio ( 2 H <sub>2</sub> O )	Mallinckrodt
Cloroformo	Baker analyzed
Adenina HCl	Sigma
Sacarosa	Baker analyzed
Agar (Bacto Agar)	Difco
Acetona	Baker analyzed
Hidroxiapatita	Bio-Rad H.T.P. (9404)
Na <sub>2</sub> HP <sup>32</sup> O <sub>4</sub>	New England Nuclear
Adenina-8-C <sup>14</sup>	New England Nuclear
Urea	Merck
Glicerol	Merck

Fosfato de Sodio Dibásico	Baker analyzed
Fosfato de Sodio Monobásico	Baker analyzed
Dodecil Sulfato de Sodio (S.D.S.)	Baker analyzed
Acido Etilendiamino Tetracético (Sal disódica) (E.D.T.A.)	Baker analyzed
a) Pronasa 50 g/ml. (autodigerida)	Sigma
Se disuelve en una solución amortiguadora de 0.01 M Tris a un p.H. de 6.8 y se incuba una hora a 37 C.	
b) Solución de Fenol-Cloroformo	Baker analyzed(Fenol)
Para preparar este reactivo es <u>ne</u> cesario utilizar fenol <u>previamente</u> destilado. Después se funde - en un baño de agua hirviendo y se mide el volumen deseado. Se le <u>a</u> grega un volumen igual de cloro - formo.	

NOTA: Esta solución debe prepararse antes de usarse.

- c) Solución de Cloroformo-Alcohol  
Isoamílico. Merck (Alcohol Isoam.)
- Se mezcla veinticuatro partes de  
cloroformo por una de alcohol iso  
amílico.

d) Líquido de Centelleo Bray:

Naftaleno	60.0 g.	Merck
P.P.O.	4.0 g.	Packard
Etilenglicol	20 ml.	Baker analyzed
Metanol	100 ml.	Baker analyzed
Dioxano	c.b.p. 1000 ml.	Baker analyzed

Cepas.

Neurospora crassa: 74-A (Cepa silvestre)

Neurospora crassa: Ad-8-a (Auxótrofo de adenina)

Ambas cepas fueron obtenidas del Fungal Genetics Stock Center en Darmouth College, Hanover, N.H., U. S. A.

Medios:

Para la obtención de micelio, se creció *N. crassa* en el medio mínimo de Vogel (38) al 2%, suplementado de 1.5% de sa carosa y con las variaciones especificadas para el crecimen to de cada una de las cepas.

Medio de Vogel con bajos fosfatos. Para el crecimiento de la cepa 74-A, el medio de cultivo se preparó usando medio mínimo de Vogel de bajos fosfatos, el cual tiene la misma com posición que el medio mínimo de Vogel, con la diferencia de - que se le ponen únicamente 25 g. de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  por litro. De es- ta manera, al preparar el medio quedará una concentración fi- nal de fosfatos equivalente a 0.05 g.%. Esta es la mínima - concentración de fosfatos en la que puede crecer *Neurospora cra* ssa (39). Gracias a ésto, el fosfato frío no cometirá con el mar

cado para su incorporación al ADN. Medio adicionado de adenina. Para el crecimiento en medio líquido de la cepa Ad-8-a, se adicionó el medio de cultivo con adenina para dar una concentración final de 2.5 mg.%. Esta es la concentración mínima de adenina en la que puede crecer esta mutante (40). De esta manera, la adenina fría no competirá con la marcada para su incorporación al ADN.

#### Condiciones de crecimiento.

Las esporas utilizadas como inóculo para el crecimiento en medio líquido fueron recogidas de matraces erlenmeyer (250 ml.) con 50 ml. de medio mínimo de Vogel al 2% con sacarosa al 1.5% y agar al 1.5% para la cepa 74-A y adicionado de 20 mg.% de adenina para la cepa Ad-8a. Estos matraces fueron inoculados con esporas. Posteriormente se incubaron 3 días - en la oscuridad a 29°centígrados y dos días con iluminación - de 25°centígrados. Se les agregó medio esteril (15-25ml.) con objeto de suspender las esporas y la suspensión fue filtrada en un tubo de vidrio (15 x 1.5 cm.) con lana de vidrio. Este filtrado se utilizó como inóculo para el medio líquido (obtención de micelio).

Para el crecimiento en medio líquido, se usaron 4 litros de medio contenidos en un matraz de florencia de 6 litros, al que se le colocaron 4 tubos de vidrio para burbujear aire. Estos tubos se sostienen con el tapón de algodón del matraz.

Los matraces fueron inoculados con una suspensión de espospo

ras para obtener una densidad óptica de 0.06 a 540 m $\mu$  en un clorímetro Bausch & Lomb.

Los matraces se incubaron en un baño de agua a 25°C y a través de los tubos de vidrio se introdujo una corriente de aire hidratado, que airea y agita.

#### Curva de crecimiento.

Se hicieron creciendo cultivos de la cepa 74-A y de la Ad-8-a en los medios y condiciones descritos anteriormente.

Se sacaron alícuotas (de 100 ml. al principio y de 50 - ml. después) a diferentes tiempos. Estas alícuotas se filtraron, se lavaron con agua destilada y se les agregaron varios volúmenes de acetona con el fin de deshidratar el micelio. Posteriormente las muestras fueron secadas con aire y pesadas.

#### Purificación del ADN (marcado con isótopos radioactivos)

La purificación del ADN fue hecha por una modificación del método de Britten de la Urea-Fosfato (6). Como se menciona en la introducción, la modificación más importante consistió en utilizar la modalidad de "lote" en lugar de la coluna de hidroxapatita.

##### a) Obtención del micelio liofilizado.

La cepa 74-A se creció en medio de Vogel con bajos fosfatos, en las condiciones ya descritas, adicionando de 2 mCi. de  $\text{Na}_2 \text{H}^{32}\text{P} \text{O}_4$  por litro de medio. El micelio fue cosechado a las 15-16 horas de incubación.

La cepa Ad-8-a se creció en medio mínimo de Vogel adicio\_nado de adenina, en las condiciones descritas, EN CONDICIONES DE CRECIMIENTO, suplementado con 20  $\mu$ Ci./lt. de adenina-8-C<sup>14</sup> y se incubó durante 19-20 horas. El micelio filtrado y lavado con agua destilada fue liofilizado.

b) Lisis.

Un gramo de micelio liofilizado se pulverizó en un mortero con la ayuda de hielo seco. Este polvo se suspendió en 50-60 ml. de una solución de:

8 M Urea

0.24 M P.B.

1% S.D.S.

0.01 M E.D.T.A.

NOTA: P.B. significa buffer de fosfatos mono y disódico a un p.H. = 6.8.

El lisado fue pasado por una jeringa desechable sin aguja con objeto de homogeneizar bien la suspensión y a continuación se filtró con una gasa doble (esto es con objeto de evitar que se tape la aguja utilizada en el paso siguiente).

c) Rompimiento del ADN.

Para que el ADN pueda ser eficientemente recuperado de la hidroxapatita, hace falta reducir el tamaño de sus pedazos, de manera que la solución fue pasada a través de una aguja del 26.

d) Adsorción.

Se repartió el lisado en dos tubos de centrifuga cónicos de 50 ml., los cuales contenían 10 ml. de -



hidroxiapatita (empacada) cada uno. La hidroxiapatita había sido equilibrada previamente y a temperatura ambiente con la siguiente solución:

0.24 M P.B.

8 M Urea

Una vez hecho ésto se resuspendió la hidroxiapatita agitando suavemente y se mantuvo en suspensión durante 30 minutos. NOTA: Como presenta cierta dificultad el desempacar o resuspender la hidroxiapatita con pura agitación se utilizaron pipetas pasteur rotas de la punta y con un bulbito de hule en el otro extremo. Después se taparon los tubos con "parafilm" y se mantenía en suspensión agitándolo suavemente cada vez que fuera necesario.

Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó la suspensión en una centrífuga clínica (M.S.E.) con una velocidad y un tiempo suficientes para bajar toda la hidroxiapatita.

e) Lavados.

Un lavado significa suspender la hidroxiapatita en aproximadamente 35 ml. de buffer y mantenerla en suspensión por 10 minutos aproximadamente y centrifugar.

1. Cinco lavados con volúmenes de 35 ml. cada uno de una solución de:

8 M Urea

0.24 M P.B.

NOTA: Se deben tomar alícuotas de cada lavado (alrededor de 20  $\lambda$ ) y medírseles la radioactividad, de modo que se cambiará al siguiente buffer únicamente cuando ya no salgan cuentas de la hidroxiapatita.

2. Cuatro lavados con: 0.014 M P.B.

f) Elución.

Se efectuó el mismo proceso que en los lavados. Es to se hizo 3 veces con: 0.48 M P.B.

En este caso el volumen empleado puede ser menor.

En las primeras 2 eluciones se encuentran, gene - ralmente, más del 90% de las cuentas totales.

g) Tratamiento con pronasa.

Las soluciones de ADN, después de ser eluidas en 0.48 M P.B., fueron ajustadas a 0.2 mM E.D.T.A. y 0.4% S.D.S. y tratado con pronasa autodigerida (ver preparación en la página 1) a una concentra - ción de 50  $\mu$ g. por ml. durante una hora a 37°C.

La pronasa se quita desproteinizando por medio de una ex - tracción con fenol y cloroformo.

h).Desproteización por extracciones.

Se efectuaron dos extracciones con fenol-clorofor mo y una con cloroformo-alcohol isoamílico (ver prepa ración en la página 21).

El proceso de extracción es el siguiente: Se pone la solu - ción de ADN en un recipiente con tapa y se le agrega un volumen igual de solución de fenol-cloroformo o cloroformo-alcohol iso - amílico y se agita durante 5 minutos.- Después se centrifuga 10

minutos a 10,000 r.p.m. y se recupera la fase acuosa (fase superior).

i) Centrifugación.

Finalmente la solución de ADN se centrifugó a 105,000 x g. durante 20 horas (Beckman L 5-75) y el ADN en forma de pellet se disuelve en 0.01 M P.B. (Es necesario centrifugar a una temperatura superior a 15°C para evitar que precipite el S.D.S.).

Rompimiento del ADN

El ADN se llevó a una concentración de 0.14 M de fosfatos y se rompió por sonicación durante 5 minutos, con pulsos de 15 segundos y descanso de 1 minuto aproximadamente para evitar el sobrecalentamiento de la solución. Todo esto se hace manteniendo el tubo rodeado de hielo picado.

Determinación de las características espectrofotométricas y curvas de fusión del ADN.

Los criterios de pureza del ADN que se utilizaron, se basan en sus características espectrofotométricas y curvas de fusión. Estas determinaciones se efectuaron en un espectrofotómetro UNICAM SP 1800 acoplado a un graficador AR-25, a un programador de cambio automático de celdas UNICAM SP 1805 (éste último solamente cuando se medía el Tm de varias muestras al mismo tiempo) y un programador de control de temperatura SP 876, bajo las siguientes condiciones:

- a) Espectrofotómetro UNICAM SP 1800.  
Longitud de onda fija a 260 nm.; un portaceldas especial para el espectrofotómetro, con regulación de temperatura y un termómetro dentro de una celda UNICAM SP 877, en glicerina al 20%; un carrilo del portador de celdas para cambiar la posición de las mismas.
- b) Programador de control de temperatura UNICAM SP 876.  
Aumento de temperatura de 1°C/minuto; temperatura inicial de 25°C; temperatura máxima de 110°C.
- c) Programador de cambio automático de celdas UNICAM SP 1805.  
Cambio y lectura de las celdas cada minuto.
- d) Graficador UNICAM AR-25.  
Velocidad del papel de 5 minutos por centímetro para una intensidad de 10 mV.
- e) Celdas UNICAM SP 877.  
Se utilizaron celdas de cuarzo de un cm. de paso de luz con tapón de teflón. Las muestras de ADN utilizadas para la determinación del  $T_m$ , fueron ajustadas a 0.12 M de P.B. Las concentraciones de ADN empleadas, fueron entre 10 y 70 g./ml.

NOTA: Al comparar las temperaturas registradas en el termómetro del aparato con las de un termómetro colocado en una de las celdas por medio de un tapón de corcho, se vió que no coincidían exactamente, por lo que hubo necesidad de hacer una tabla de equivalencia de temperaturas.

### Medición de la concentración y cálculo de la actividad específica.

De las lecturas de absorbancia determinadas a 260 nm (espectrofotómetro Zeiss M 4 Q III) en celdas de cuarzo de un centímetro de paso, se calculó la concentración de los ADN en las soluciones, sabiendo que una unidad de densidad óptica corresponde a una concentración de 50  $\mu$ g. de ADN/ml.

Para determinar las actividades específicas se tomaron alícuotas de las soluciones de ADN de concentración conocida, se les agregaron mezcla de centelleo Bray y se les midió la radioactividad en un contador de centelleo líquido Nuclear - Chicago. A partir de estos datos se sacaron las actividades específicas, utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{cuentas/minuteo}}{\text{unidades de D.O.}}$$

### Fraccionamiento de las secuencias únicas y repetitivas

(con ADN ( $^{14}\text{C}$ ) y con ADN ( $^{32}\text{P}$ )).

Esta técnica está basada en lo siguiente: Se desnaturaliza el ADN marcado y roto y se deja renaturalizar hasta un  $C_{ot}$  suficiente para que las secuencias repetitivas se encuentren apareadas pero no las secuencias únicas (8). Después se separan ambos tipos de secuencias por cromatografía con hidroxipatita.

#### a) Desnaturalización.

El ADN marcado y roto se desnaturalizó en un medio con la composición siguiente:

0.14 M P.B.

0.4% S.D.S.

$10^{-4}$  M E.D.T.A.

La desnaturalización se llevó a cabo poniendo la solución de ADN en un baño de aceite a 100 °C y contando 3 minutos a partir del momento en que la solución alcanzó la temperatura de 100°C. Esto quiere decir que anteriormente hay que medir un tiempo cero con un buffer de igual composición (exceptuando el ADN) y un termómetro dentro.

b) Incubación o renaturalización.

Después de la desnaturalización la solución se enfrío rápidamente a 60°C (en esta parte también hay que medir antes el tiempo que tarda la solución en enfriarse, son ayuda de hielo picado, de 100°C a 60°C y en ese momento empezar a tomar el tiempo de incubación) y se incubó a la misma temperatura por un tiempo suficiente para obtener un valor de Cot de dos. En ese momento se pasó la muestra a través de una columna de hidroxapatita equilibrada a 60°C con un buffer de la siguiente composición:

0.14 M P.B.

0.4% S.D.S.

y se empezó a lavar con el mismo buffer.

c) Lavados y elución.

Se fueron colectando fracciones de 1 ml. aproximadamente, tomándose alícuotas y midiéndole la radioac-

tividad. Cuando ya no salieron más cuentas de la columna (es decir, todo el ADN de hélice sencilla había sido eluido), se lavó ésta con varios volúmenes de 0.14 M P.B. para quitar el S.D.S. que pudo haber quedado en la columna.

Finalmente, se eluyó con 0.48 M P.B., el ADN que había permanecido en la columna y que representa el ADN repetitivo. Se comprobó el final de la elución midiendo la radioactividad de las fracciones.

d) Cálculos para la renaturalización.

El tiempo de incubación necesario para llegar a un Cot de dos, se calculó con la forma siguiente (1):

$$\text{Cot} = \text{moles de nucleótidos/lt.} \times \text{segundo} \times 1.3288.$$

La última cifra de esta fórmula es el factor de corrección (tomado de la tabla 4) utilizado para tomar en cuenta el aumento de velocidad que sufre la reacción al llevarse a cabo en una concentración mayor de fosfatos (se ha acordado que el factor es 1 cuando la concentración de fosfatos es de 0.12 M ó 0.18 M de cloruro de sodio).

En cuanto a la concentración de nucleótidos ésta se convirtió a moles/lt., tomando 327 g. como el peso molecular promedio de un nucleótido.

Molaridad de catión Monovalente	Velocidad relativa de reasociación	Molaridad P.B.	Molaridad de catión Monovalente	Velocidad relativa de reasociación	Molaridad de P.B.
0.115	0.0000	0.01	0.465	3.8841	0.31
0.030	0.0016	0.02	0.480	4.0085	0.32
0.045	0.0133	0.03	0.495	4.1300	0.33
0.060	0.0453	0.04	0.510	4.2487	0.34
0.075	0.1021	0.05	0.525	4.3646	0.35
0.090	0.1831	0.06	0.540	4.4778	0.36
0.105	0.2858	0.07	0.555	4.5884	0.37
0.120	0.4063	0.08	0.570	4.6964	0.38
0.135	0.5410	0.09	0.585	4.8019	0.39
0.150	0.6867	0.10	0.600	4.9049	0.40
0.165	0.8404	0.11	0.615	5.0056	0.41
0.180	1.0000	0.12	0.630	5.1040	0.42
0.195	1.1633	0.13	0.645	5.2001	0.43
0.210	1.3288	0.14	0.660	5.2941	0.44
0.225	1.4954	0.15	0.675	5.3860	0.45
0.240	1.6619	0.16	0.690	5.4758	0.46
0.255	1.8277	0.17	0.705	5.5636	0.47
0.270	1.9920	0.18	0.720	5.6495	0.48
0.285	2.1544	0.19	0.735	5.7335	0.49
0.300	2.3146	0.20	0.750	5.8157	0.50
0.315	2.4722	0.21	0.825	6.2009	0.55
0.330	2.6271	0.22	0.900	6.5478	0.60
0.345	2.7791	0.23	0.975	6.8613	0.65
0.360	2.9280	0.24	1.050	7.1457	0.70
0.375	3.0739	0.25	1.125	7.4047	0.75
0.390	3.2167	0.26	1.200	7.6413	0.80
0.405	3.3563	0.27	1.275	7.8582	0.85
0.420	3.4929	0.28	1.350	8.0575	0.90
0.435	3.6263	0.29	1.425	8.2412	0.95
0.450	3.7567	0.30	1.500	8.4110	1.00

Tabla No. 4. Velocidad de reasociación del ADN, en función de la concentración de sales. Tomada del artículo de - Britten (43).



e) La columna de hidroxiapatita.

La mejor manera que se encontró para tener la columna de hidroxiapatita en las condiciones antes descritas, fue la siguiente: a una columna de vidrio con camisa (12 x 1.5 cm.) se le hizo circular agua a 60°C con ayuda de un termomix adaptado a la camisa. La columna se conectó a una bomba peristáltica (Buchler, Polistaltic Pump) y ésta a un colector de fracciones. La bomba Peristáltica se usó a una velocidad de 3 en "low", de manera que el flujo era relativamente rápido, (13 gotas por minuto), pero sin que se empacara o rajara la columna. El colector de fracciones se ajustó a un cambio cada 17 gotas (1 ml.).

El baño de agua del termo-mix, se usó también para incubar el ADN.

## RESULTADOS

### Curvas de crecimiento.

Se hicieron curvas de crecimiento de la cepa 74-A en medio de Vogel con bajos fosfatos y de la cepa Ad-S-a en medio de Vogel adicionado de adenina, con el propósito de determinar el período adecuado de crecimiento para la extracción del ADN.

En la curva correspondiente a la cepa 74-A (figura 3), se observa que el crecimiento del microorganismo tiene un período lag de unas dos horas, después del cual empieza un crecimiento logarítmico con una velocidad de duplicación de 3.5 horas hasta que a las 16.5-17 horas, el crecimiento entra en su fase estacionaria.

En la curva correspondiente a la cepa Ad-8-a (figura 3), se puede ver que el crecimiento del microorganismo tiene una fase lag mucho más larga (alrededor de 11 horas), después de la cual pasa a un período de crecimiento logarítmico con una velocidad de duplicación de 2.5 horas. Finalmente, el cultivo empieza a entrar en su fase estacionaria a las 20 horas de incubación.

Debido a las observaciones anteriores, se fijaron los tiempos de incubación en: 15-16 horas para la 74-A.

19-20 horas para la Ad-8-a

Los anteriores períodos de incubación se fijaron usando el criterio de cosechar el micelio en la fase de crecimiento logarítmica tardía, pues está reportado (40) que en este período de

crecimiento el ADN tiene su máxima actividad específica y es después de este momento cuando el rendimiento de ADN por gramo de micelio empieza a bajar, con el consecuente aumento en proteína.

#### Purificación del ADN.

##### Rendimiento del cultivo.

Se obtuvieron unos rendimientos de 0.8 g. de micelio liofilizado por litro de medio de cultivo para la cepa Ad-8-a y 1.3 g. de micelio liofilizado por litro para la 74-A.

##### Rendimiento del ADN.

Las gráficas de las figuras 4 y 5, representan la purificación del ADN ( $^{14}\text{C}$ ) y del ADN ( $^{32}\text{P}$ ). El rendimiento que se obtuvo siempre, fue un poco mayor de 30 unidades de densidad óptica por gramo de micelio liofilizado.

Esta cantidad es mayor a la que reportan Dutta y Ojha (7), quienes obtienen 20-24 D.O./g. de micelio liofilizado.

##### Capacidad de la hidroxiapatita.

La hidroxiapatita que se utilizó tiene una capacidad de 1.65 D.O./ml. de hidroxiapatita empacada. Esta cantidad está dentro del promedio reportado, aunque se ha escrito sobre hidroxiapatitas que adsorben 20 D.O./ml. (6).

##### Pruebas de pureza.

A todas las muestras de ADN purificadas, se les midió la absorbancia a 260, 280 y 230 nm. y se calcularon las relaciones  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$ . Debiendo obtenerse los siguientes valores para tener una pureza aceptable:

$$\frac{\text{D.O. 260 nm.}}{\text{D.O. 280 nm.}} = 1.9 \pm 0.1$$

$$\frac{\text{D.O. 260 nm.}}{\text{D.O. 230 nm.}} = 2.2 \pm 0.2$$

Una vez que las muestras de ADN habían pasado la prueba anterior, se les hizo una curva de fusión ( $T_m$ ). Como todas ellas fueron muy similares, solamente se muestra una en la figura (6). En esta gráfica se ve que la muestra reúne las dos características más importantes desde el punto de vista de pureza e integridad, que son las siguientes:

1. Hiper Cromicidad de por lo menos 25%.
2. No elevación de la absorbancia antes de llegar a 78°C.

Otras características importantes que se observan en esta curva son:

1.  $T_m$  (temperatura media de fusión) de 91°C (medio grado arriba de la temperatura reportada en la literatura).
  2. Curva bifásica con aproximadamente 25% del ADN como fracción de bajo contenido de G+C. Esto quiere decir que se está conservando, en la purificación, esta fracción tan importante, sobre todo, para experimentos con ADN repetitivo.
  3. La transición térmica fue aproximadamente 80°C a 98°C.
- f) Actividades específicas.

1. Actividad específica del ADN ( $^{14}\text{C}$ ) = 10,000 c.p.m./D.O.  
La actividad obtenida es muy buena, pues es más de 3 veces superior a la que reportan Dutta y colaboradores (40) de un micelio de 48 horas de crecimiento. Sin embargo ellos aclaran que ADNs con actividades específicas de va-

rios cientos de c.p.m. por microgramo han sido obtenidos utilizando este método de marcaje.

2. Actividad específica del ADN ( $^{32}\text{P}$ ) = 100,000 c.p.m./D.O. Esta actividad específica es la mitad de lo que obtienen Richman y Dutta (39) con el mismo método de marcaje.

#### Fraccionamiento por cromatografía de hidroxapatita.

(utilizando los ADNs marcados)

El ADN marcado y roto, se desnaturaliza y se incuba hasta un Cot con valor de dos. En ese momento todas las secuencias repetitivas del ADN *Neurospora crassa* se encuentran reasociadas, mientras que las secuencias únicas no (8). Las figuras 7 y 8 representan el perfil de elución del ADN (ADN ( $^{32}\text{P}$ ) y ADN ( $^{14}\text{C}$ ), al pasarlo por la columna de hidroxapatita en las condiciones descritas en material y métodos. El pico A. de ambas gráficas, representa el ADN que permaneció como hélice sencilla al llegar a un Cot de dos y el cual salió de la columna inmediatamente. El pico B representa la elución del ADN que se encontraba reasociado al llegar a este Cot y que quedó adsorbido a la columna.

En el fraccionamiento del ADN ( $^{32}\text{P}$ ) (figura 7), el ADN que se encontraba reasociado equivale a un 12.9 del total. En el ADN ( $^{14}\text{C}$ ) (fig. 8), el ADN que renaturalizó a ese Cot representa un 12.5 % del total.

## DISCUSION.

### Curvas de crecimiento.

Con ayuda de las curvas de crecimiento, se encontraron los tiempos de incubación adecuados para obtener, en las condiciones utilizadas para el cultivo, un micelio en una etapa óptima para la purificación del ADN ( $^{14}\text{C}$ ) y ADN ( $^{32}\text{P}$ ). Con etapa óptima, me refiero a que se obtenga una buena cantidad de micelio, y que el ADN marcado que se purifique de él, tenga las siguientes características:

- a) La mayor actividad específica posible.
- b) Un alto rendimiento de ADN por gramo de micelio liofilizado.
- c) Una cantidad relativamente baja de proteína que facilite la purificación.

Todas estas características se reúnen si se cosecha el micelio en fase logarítmica tardía (40).

### Pureza del ADN.

En cuanto a la calidad del ADN purificado, esta es bastante buena según los criterios de pureza expuestos en la sección correspondiente de resultados, es decir:

- a) Relaciones de absorbancia  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$ .
- b) En relación a la curva de fusión, las características más importantes desde el punto de vista de pureza e integridad son:

1. Hiperchromicidad de por lo menos 25%.
2. No elevación de la absorbancia antes de llegar a una temperatura de 78°C.

Además de lo anterior, las curvas presentaron las siguientes características, las cuales son clásicas para ADN de *N. crassa*:

1.  $T_m$  (temperatura media de fusión).
2. Curva bifásica en la cual se ve claramente que un 25% del ADN representa la fracción de bajo contenido de G+C.

El segundo punto indica que en la purificación se está conservando íntegra esta fracción en la cual se encuentran gran parte de las secuencias repetitivas (34).

#### Actividades específicas.

El método de marcación utilizado para los ADNs fue satisfactorio, sobre todo para el  $^{14}\text{C}$  como ya se comentó en la sección correspondiente de resultados.

#### Fraccionamiento por cromatografía de hidroxapatita.

Al observar las gráficas de las figuras 7 y 8 se puede ver que aproximadamente 12.5% del ADN ( $^{14}\text{C}$ ) y 12.9% de ADN ( $^{32}\text{P}$ ) había renaturalizado en el momento en que se pasó la mezcla de incubación por la columna de hidroxapatita (es decir, cuando se llegó a un valor de  $Cot$  igual a dos). Estos valores son ligeramente mayores que el que reporta Dutta (8) y que es el

que en general se reconoce como el porcentaje de ADN repetitivo que contiene el ADN total de *Neurospora crassa* (que es 10-12%).

Para estudiar la regulación genética y diferenciación celular a un nivel muy fino, se podría aislar un determinado gene, de preferencia el de una enzima clave en la regulación de una vía metabólica (de esta manera, se tendría el panorama de la regulación a varios niveles), y obtener los patrones de transcripción de ese gene bajo diferentes condiciones.

La purificación del gene se haría aislando primero su ARN mensajero específico. Después, se podrían seguir dos caminos: 1) Sintetizar el gene "in vitro", utilizando una transcriptasa reversa (19), ó, 2) Hibridizar el ARN mensajero con ADN total y pasar por hidroxapatita. Posteriormente, eluir, tratar con ribonucleasa y volver a pasar por la columna de hidroxapatita (9). Los fragmentos de ADN de hélice sencilla que salgan de la columna, serán los genes que codifican para ARN. Para la cuantificación de la transcripción, se utilizaría el método descrito en la Sección titulada: "Estudios con ADN de *Neurospora crassa*".

El paso limitante de este procedimiento, es la purificación del ARN mensajero (m-ARN) que se desea. Para obtener m-ARNs específicos existen, básicamente, dos tipos de técnicas: 1) físicoquímicas, de entre las cuales destaca el empleo de gradientes de sacarosa (44) y, 2) Inmunológicas, las cuales se basan en la especificidad de un anticuerpo dirigido contra la cadena polipeptídica naciente en los polisomas (41).



Hay algunos m-ARNs que se han aislado, con relativa facilidad, por métodos fisicoquímicos (44,45,46,47,48,49), y otros por métodos inmunológicos (50, 51, 41, 52, 53, 54, 55). Sin embargo hay muchos m-ARNs que presentan todavía serias dificultades para su aislamiento. Los métodos inmunológicos son, en mi opinión, los que presentan mayor versatilidad. Además se siguen perfeccionando, prometiendo convertirse, en un futuro cercano, en un método general con el que se pueda purificar cualquier m-ARN específico que se desee.

Al revisar los trabajos que se han hecho sobre transcripción del ADN repetitivo en *N. Crassa*, es notoria la gran importancia que tendría investigar si existen en este hongo ARN mensajero y ARN nuclear (no ribosomal ni de transferencia), que provengan de secuencias repetitivas. Si los hay, sería interesante estudiar su metabolismo de la manera llevada a cabo por Lodish en otro organismo (19), y así obtener datos sobre la función de las secuencias repetitivas. Otro aspecto interesante, y del cual no se tienen datos en *N. crassa* (ni en ningún hongo), es el análisis de intercalamiento de zonas repetitivas, el cual se podría llevar a cabo utilizando la metodología de Davidson y colaboradores (37).

Algo que resultaría muy interesante y de gran trascendencia sería hacer estos estudios sobre genes individuales, para lo cual sería necesario, también, el aislamiento de genes específicos.

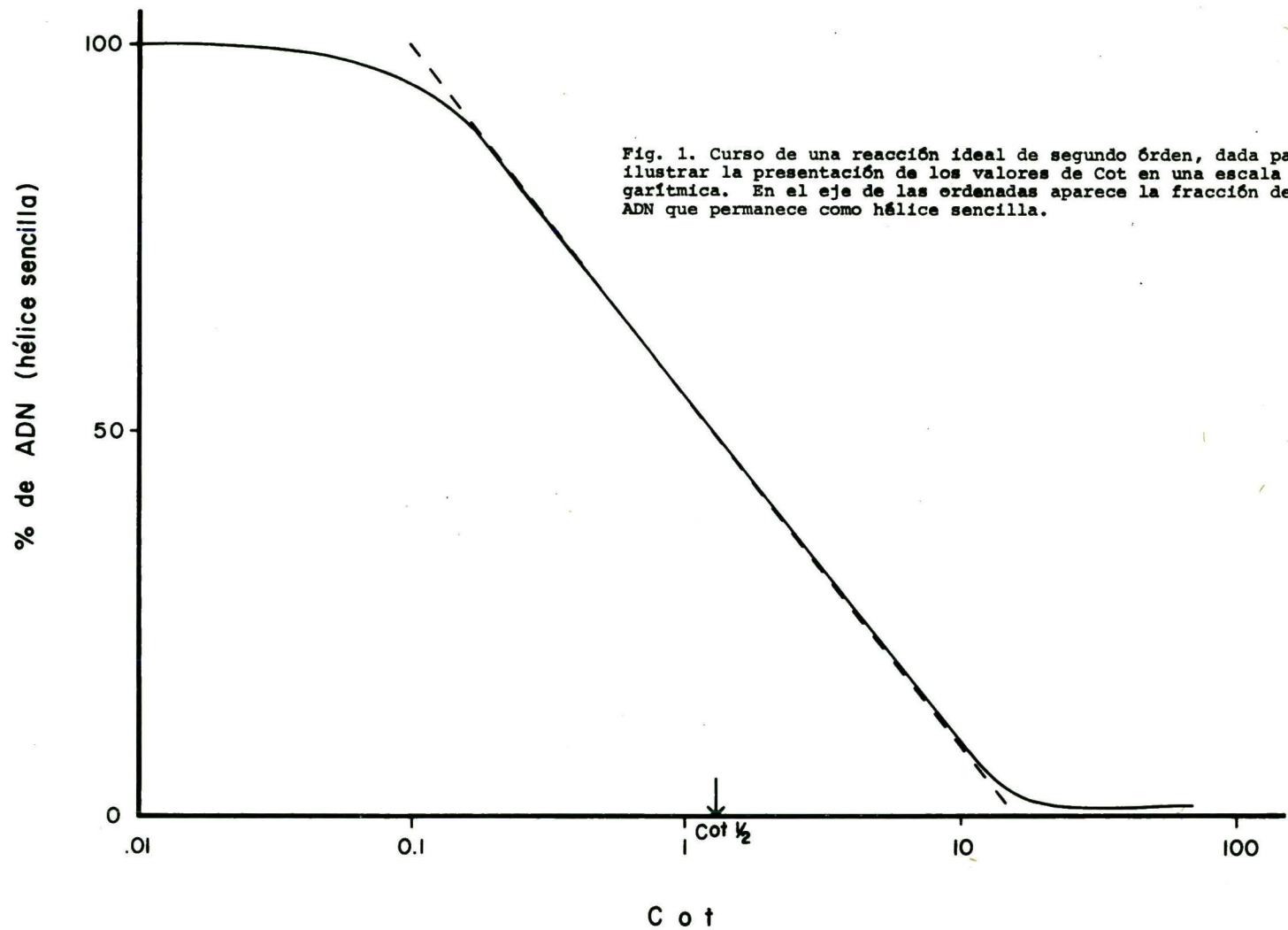


Fig. 2. Curva de fusión del ADN de *Neurospora crassa* purificado por Dutta (1), utilizando el método de Britten.

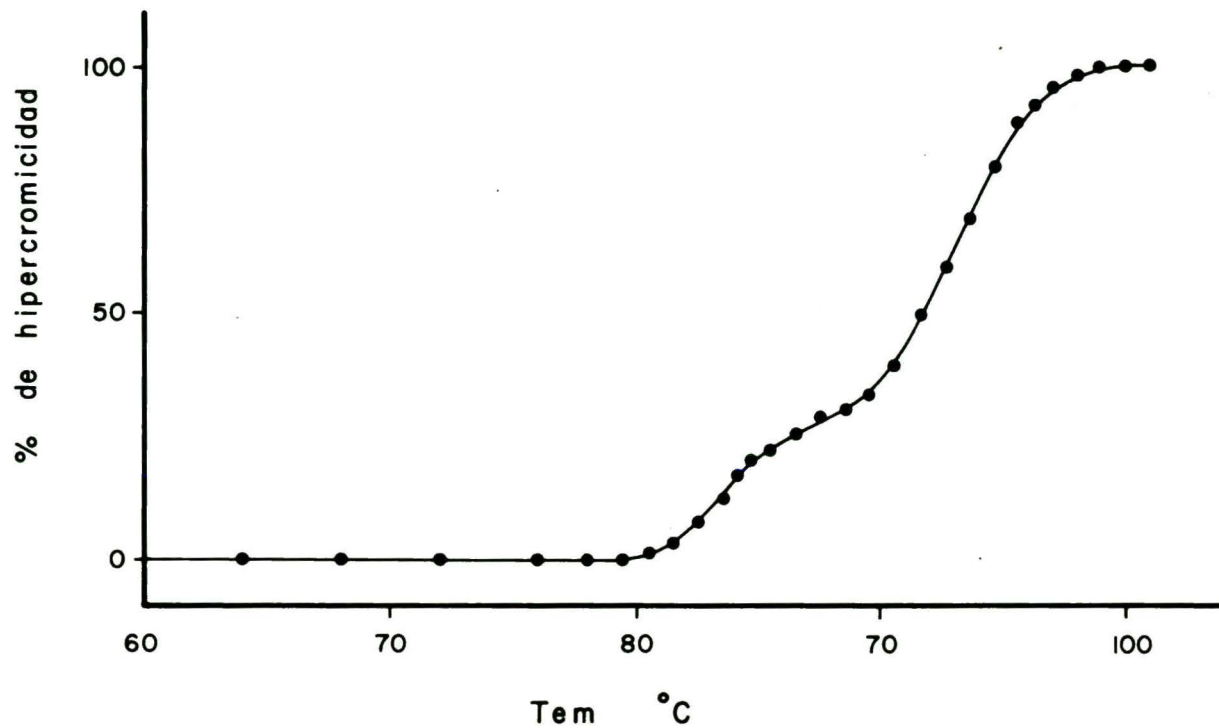
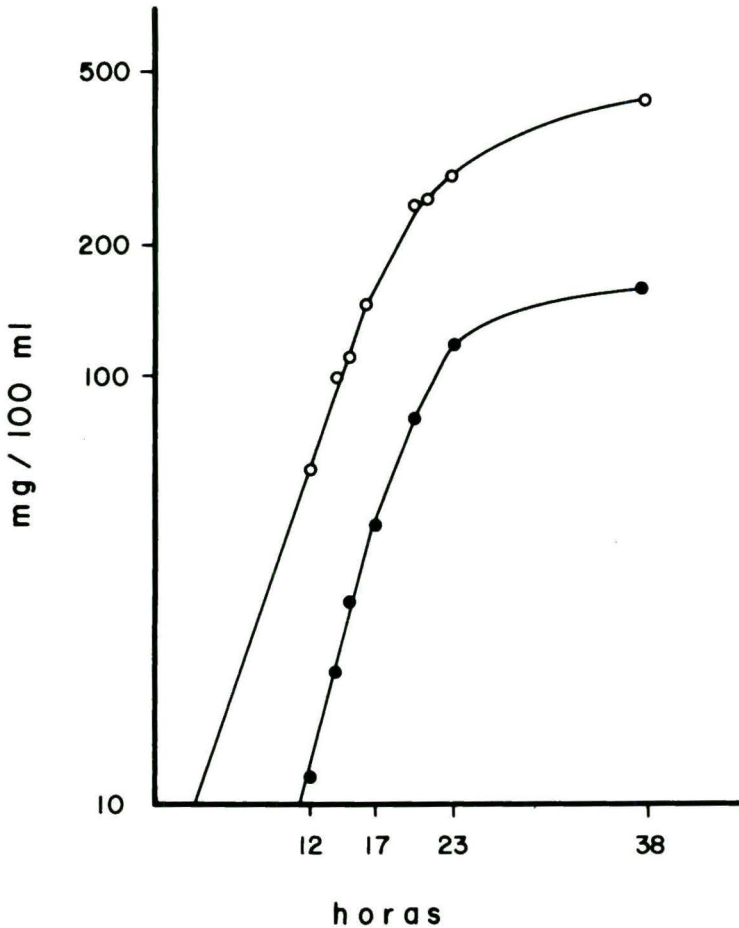


Fig. 3. Curva de crecimiento de la cepa 74-A (○) crecida en medio mínimo de Vogel (de bajos fosfatos) al 2% y sacarosa al 1.5%. Se grafica peso seco (en 100 ml. de medio) contra tiempo de incubación. Se presenta también, la curva de crecimiento de la cepa Ad-8-a crecida en medio mínimo de Vogel al 2%, sacarosa al 1.5% y adenina al 2.5% (●).



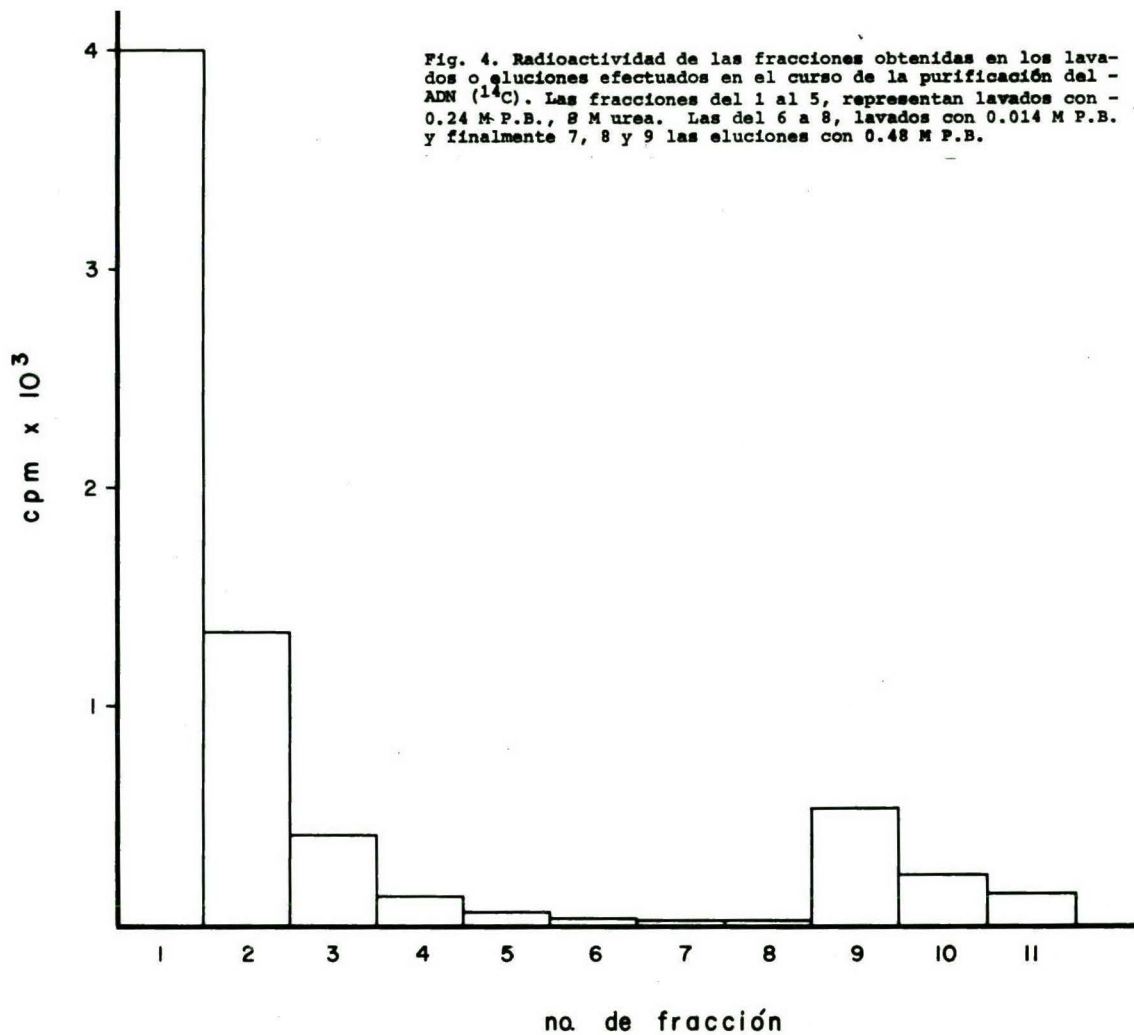


Fig. 4. Radioactividad de las fracciones obtenidas en los lavados o eluciones efectuados en el curso de la purificación del ADN (<sup>14</sup>C). Las fracciones del 1 al 5, representan lavados con 0.24 M P.B., 8 M urea. Las del 6 a 8, lavados con 0.014 M P.B. y finalmente 7, 8 y 9 las eluciones con 0.48 M P.B.

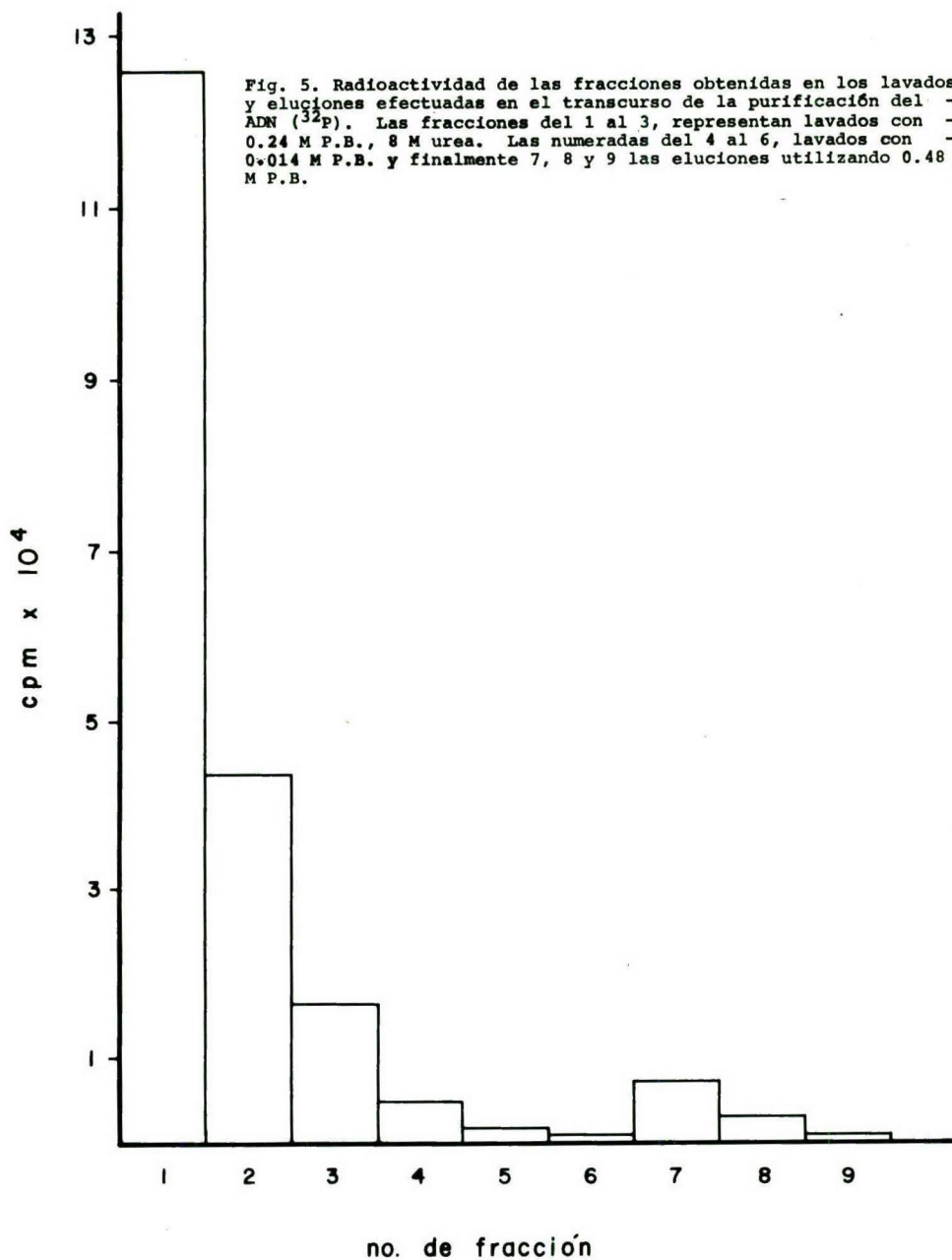
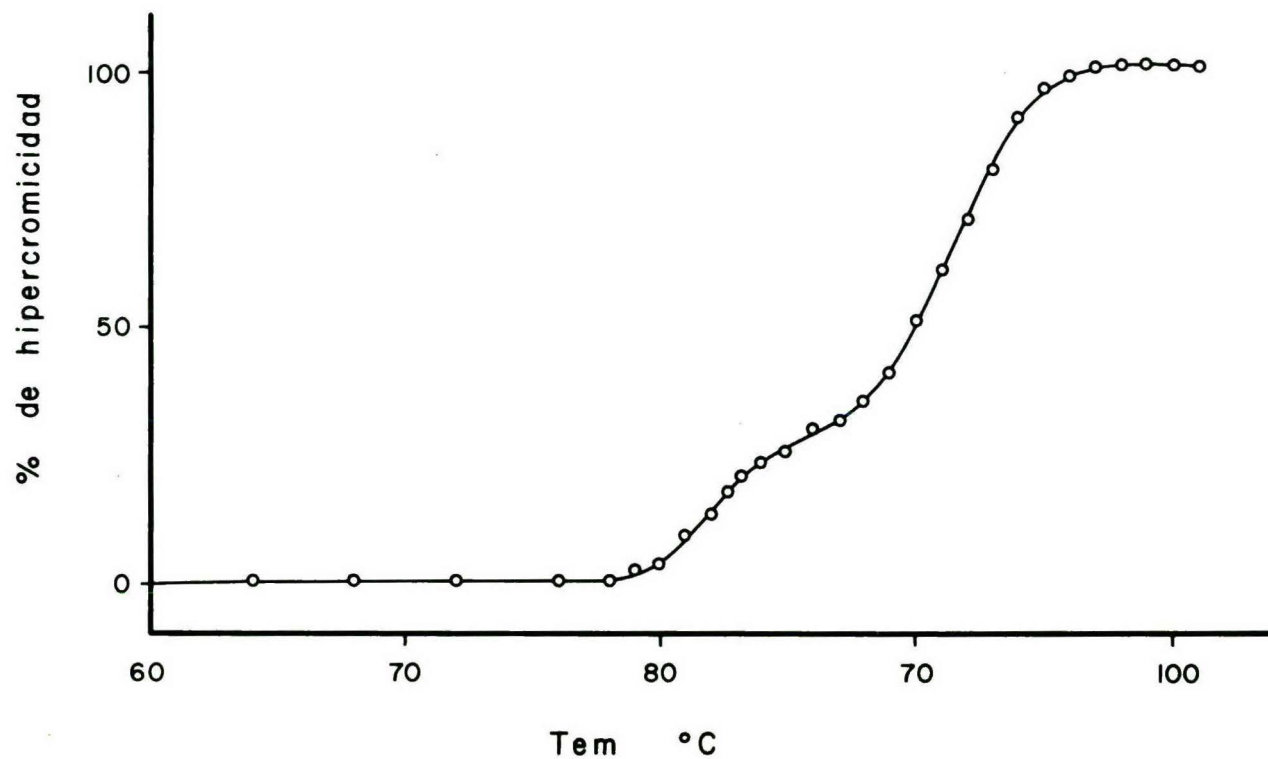


Fig. 6. A todos los ADN's purificados, se les determinó la temperatura media de fusión en un espectrofotómetro UNICAM SP 1800 en las condiciones descritas en la parte correspondiente del capítulo de Material y Métodos. Como todas ellas fueron muy similares, solamente se presenta una.



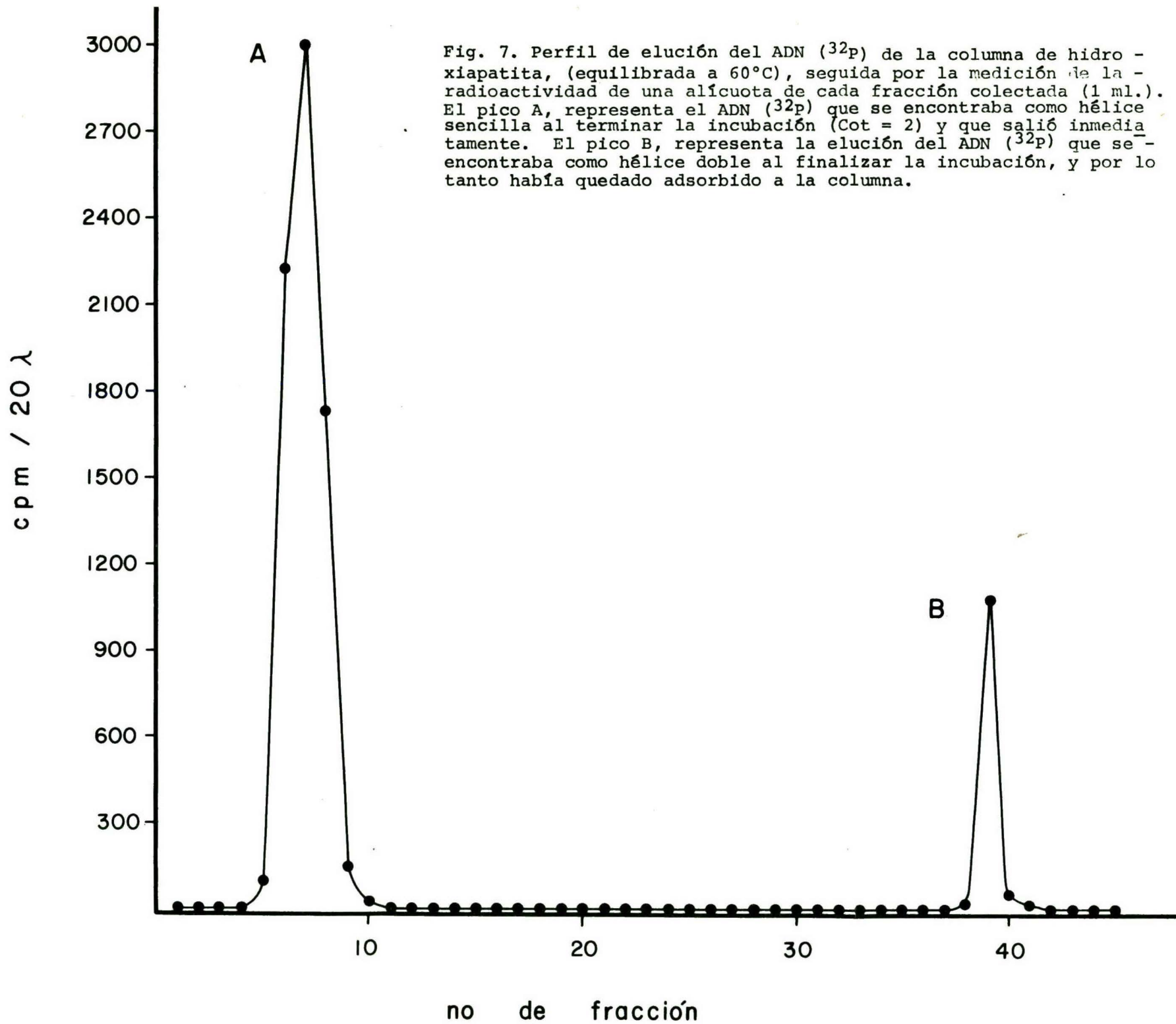


Fig. 7. Perfil de elución del ADN ( $^{32}\text{P}$ ) de la columna de hidroxiapatita, (equilibrada a  $60^\circ\text{C}$ ), seguida por la medición de la radioactividad de una alícuota de cada fracción colectada (1 ml.). El pico A, representa el ADN ( $^{32}\text{P}$ ) que se encontraba como hélice sencilla al terminar la incubación ( $Cot = 2$ ) y que salió inmediatamente. El pico B, representa la elución del ADN ( $^{32}\text{P}$ ) que se encontraba como hélice doble al finalizar la incubación, y por lo tanto había quedado adsorbido a la columna.



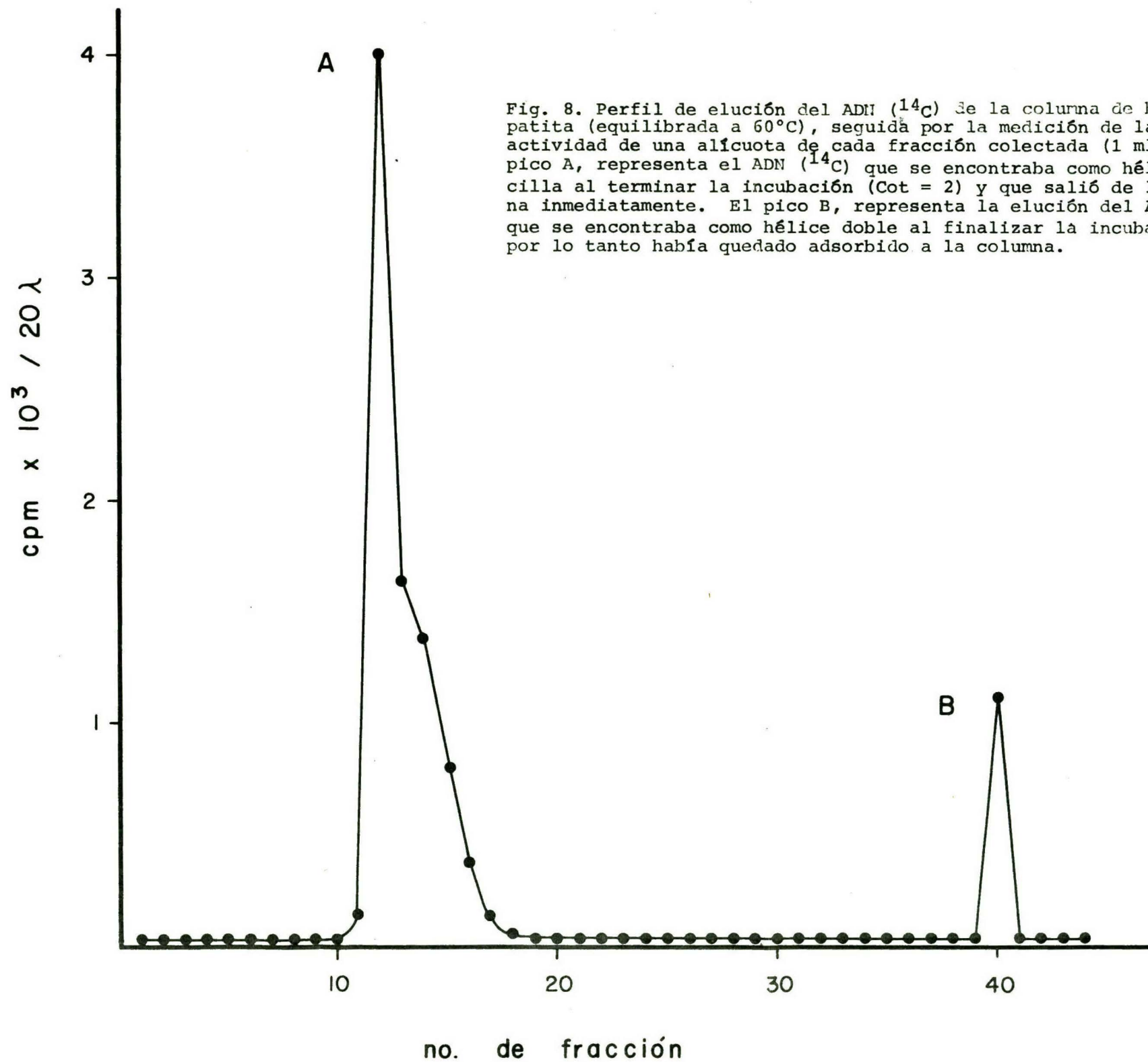


Fig. 8. Perfil de elución del ADN (<sup>14</sup>C) de la columna de hidroxapatita (equilibrada a 60°C), seguida por la medición de la radioactividad de una alícuota de cada fracción colectada (1 ml.). El pico A, representa el ADN (<sup>14</sup>C) que se encontraba como hélice sencilla al terminar la incubación (Cot = 2) y que salió de la columna inmediatamente. El pico B, representa la elución del ADN (<sup>14</sup>C) que se encontraba como hélice doble al finalizar la incubación, y por lo tanto había quedado adsorbido a la columna.

CONCLUSIONES.

1. Para las condiciones de crecimiento y marcación que se utilizaron, el mejor momento para cosechar un micelio adecuado, es el siguiente:

<u>Cepa</u>	<u>Isótopo</u>	<u>Tiempo de incubación</u>
74-A	$^{32}\text{P}$	15.5-16 horas
Ad-8-a	$^{14}\text{C}$	19 - 20 horas

2. Se puede concluir también que el método de cultivo y el de marcación son adecuados.
3. La adaptación del método de purificación de Britten - presentado aquí, fue satisfactoria. Aunada a su facilidad de montaje y manipulación (ver ventajas en in-troducción), se obtuvieron buenos rendimientos de ADN cuya pureza y calidad fueron encontradas satisfacto-rias.
4. Al llevar a cabo la técnica para separar secuencias únicas y repetitivas se obtuvieron unos porcentajes de ADN renaturalizado muy parecidos al que se reporta como ADN repetitivo en *Neurospora crassa*. Por ésto, se sugiere, hubo separación de las secuencias únicas y -repetitivas del ADN.

BIBLIOGRAFIA

1. Britten, R.J., Kohne, D.E., *Science* 161, 529 (1968).
2. Wetmur, J.G., Davidson, N., *J. Molec. Biol.* 31, 349 (1968).
3. Throver, K.J., Peacocke, A.R., *Biochem. J.* 109, 543 (1968).
4. Marmur, J., *J. Mol. Biol.* 3, 208 (1961).
5. Sullivan, D., Palacios, R., Stavnezer, J., Taylor, J.M., Faras, A.J., Kiely, M.L., Summers, N.M., Bishop, J.M., Schimke, R.T., *J. Biol. Chem.* 248, 7530 (1973).
6. Britten, R., Pavitch, M., Smith, J., *Carnegie Instn. Yearbook* 68, 400 (1970).
7. Dutta, S.K., Ojha, M., *Molec. Gen. Genet.* 114, 232 (1972).
8. Dutta, S.K., *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)* 324, 482 (1973).
9. Marmur, J., Doty P., *J. Mol. Biol.* 5, 109 (1962).
10. Dutta, S.K., Richman, N., Woodward, V.W., Mandel, M., *Genetics* 57, 719 (1967).
11. Chattopadhyay, S.K., Kohne, D.E., Dutta, S.K., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 3256 (1972).
12. Mc Carthy, B.J., *Bacteriol. Rev.* 31, 215 (1967).
13. Denhardt, D.T., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 23, 641 (1966).
14. Marmur, J., Round, R., Schildkraut C.L., *Prog. Nucleic Acid Res.* 1, 231 (1963).
15. Marmur, J., Lane D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 46, 453 (1960).
16. Marmur, J., Doty, P., *J. Mol. Biol.* 3, 585 (1961).
17. Hough, B.R., Davidson, E.H., *J. Mol. Biol.* 70, 491 (1972).
18. Brown, R.D., Teochino-Valentini, G.P., *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* 69, 1746 (1972).

19. Lodish, H.F., Firtel, R.A., Jacobson, A., Cold Spr. Harb. Symp. Quant Biol. 8, 899 (1973).
20. Attardi, G.P., Huang, P.C., Kabat, S., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 53, 1490 (1965).
21. Gray, W., Dreyer, W., Hood, L., Science 155, 465 (1967).
22. Sutton, W.D., Biochim. Biophys. Acta, 240, 522 (1971).
23. Gillespie, D., Spiegelman, S., J. Mol. Biol. 12, 829 (1965).
24. Zamenhof, S.A., Alexander, H.E., Leidy, C., J. Expl. Med. 98, 373 (1953).
25. Levine, L., Murakami, W.T., Van Vunakis, H., Brossman, L., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 46, 1038 (1960).
26. Berns, K.I., Thomas, C.A., J. Mol. Biol. 3, 289 (1961).
27. Britten, R.J., Waring, M., Carnegic Inst. Wash. Year Book 64, 316 (1965).
28. Waring, M., Britten, R.J., Science 154, 791 (1966).
29. Dutta, S.K., Richman, N., Neurospora Newsletter 10, 26 (1966).
30. Gelderman, A.H., Rake, A.V., Britten, R.J., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68, 172 (1971).
31. Hahn, W.E., Laird, C.D., Science 173, 158 (1971).
32. Mc Carthy, B.J., Bolton, E.T., J. Mol. Biol. 8, 184 (1964).
33. Dutta, S.K., Chadhuri, R.K., Developmental. Biology 43, 35 (1975).
34. Dutta, S.K., Kohne, D.E., Proc. Intl. Bot. Congress, Sesttle Washington, 50, (1969).
35. Ray, R., Dutta, S.K., Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 1458 (1972).
36. Dutta, S.K., Chaudhuri R.K., Molec. Gen. Genet. 136, 227 (1975).
37. Davidson, E.H., Hough, B.R., Britten, J. Mol. Biol. 77, 1 (1973).

38. Vogel, H. A., *Microbiol. Genet. Bull.*, 13, 42 (1956).
39. Richman, N., Dutta, S.K., *Neurospora Newsletter* 10, 4 (1966).
40. Dutta, S.K., Mc Worther V.W., Woodward, V.W., *Newrospora Newsletter*, 7, 9 (1965).
41. Palacios, R., Sullivan, D., Summers, N.M., Kiely, M.L., Schimke, R.T., *J. Biol. Chem.* 248, 590 (1973).
42. Church, R.B, Mc.Carthy, B.J., *J. Mol. Biol.* 23, 459 (1967)'
43. Britten, R.J. y colaboradores, *Carnegie Inst. Wash. Yearbook* (1968).
44. Chantrenne, H., Burry, A., Marbaix, G. *Prog. Nucleic Ac. Mol. Biol.*, 7, 173 (1967).
45. Stavnezer, J, Huang, R.C., *Hature New Biol.* 230, 172 (1971).
46. Heywood, S.M., Nwagu, M, *Biochemistry* 8, 3839 (1969).
47. Susuki, Y., Brown, D., *J. Mol. Biol.*, 63, 409 (1972).
48. Borun, T.W., Scharff, M.D., Robbins, E., *Proc. Natl. Acad. Sc.*, 58, 1977 (1967).
49. Berns, A.J., Strous, G.J, Bloemendal, H., *Nature New Biology*, 236, 7 (1972).
50. Palacios R., Palmiter, R.D., Schimke, R.T., *J. Biol. Chem.* 247, 2316 (1972).
51. Palmiter, R.D., Palacios, R., Schimke, R.T., *J. Biol. Chem.* 247, 3296 (1972).
52. Palacios, R., Schimke, R.T., *J. Biol. Chem.* 248, 1424 (1973).
53. Schechter, I, *Biochemistry* 13, 1875 (1974).
54. Schapiro, D.J., Taylor, J.M., Palacios, R., González C., Mc. Hight, G.S., Kiely, M.L. Schimke, R.T., *J. Biol, Chem*, 249, 3665 (1974).
55. González, C., Palacios, R., Schimke, R.T., *Biochem, Biophys, Acta*, 366, 424 (1974).
56. Storck, R., *J. Bacteriol* 91, 227 (1966).