

10.

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



## OBTENCION DE UNA SONDA MOLECULAR HOMOLOGA PARA EL GEN DE LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA (PEPC) EXPRESADO EN FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A  
ALFREDO FRANCISCO YALES OCHOA

MEXICO, D. F.

1995

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE**  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron el pasante(s)

Alfredo Eco Ayala Ochoa

con número de cuenta 8508622-7 con el Título:

Obtención de una sonda molecular homóloga para el gen de la Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) expresado en frijol (Phaseolus vulgaris L).

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Biologo

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
	Dra. Herminia Loza Tavera		<i>Herminia Loza T.</i>
Director de Tesis	Dra. Alejandra Mainero del Paso		<i>Alejandra Mainero</i>
	Biol. Miguel Angel Meneses Perez		<i>Miguel Meneses</i>
	Q.F.B. Rosa Elena Sarmiento Silva		<i>Rosa Elena</i>
Suplente	M. en C. Martín Pedro Vargas Suárez		<i>Martín Vargas</i>
Suplente			

CON TODO MI CARIÑO

A MIS PADRES, OFELIA OCHOA Y ARTURO AYALA

A MI JESSICA

A QUIENES DEDICO ESTE TRABAJO

---

**•AGRADECIMIENTOS.**

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado de la Fac. de Química bajo la dirección de la Dra. Herminia Loza Tavera, a quien agradezco y debo gran parte de mi actual formación y el interés en la investigación. Gracias.

Al Dr. Roberto Coria Ortega a quien deseo expresar mi agradecimiento por su asesoría especializada y su invaluable ayuda técnica en este trabajo. Gracias.

A la Dra. Alejandra Mainero del Paso, al Biol. Miguel Angel Meneses Perez, a la Q.F.B. Rosa Elena Sarmiento Silva y al M. en C. Martín Pedro Vargas Suárez por la revisión y puntos de vista críticos de este trabajo.

A mis compañeros y amigos, Enrique, Javier, Leonel, Claudia y Gabriela. Y a todas aquellas personas que de alguna manera ayudaron a la realización de esta tesis.

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México.

\*Este trabajo fue posible gracias al apoyo recibido por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico dentro del proyecto DGAPA IN-203592: "Fosfoenolpiruvato carboxilasa de frijol: regulación y expresión genética".

---

---

**Obtención de una sonda molecular homóloga para el gen de la Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) expresado en frijol (*Phaseolus vulgaris* L).**

---

---

## ABREVIATURAS.

ADN	Acido desoxirribonucleico.
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario.
ATP	Trifosfato de adenosina.
BSA	Albumina de suero bovino.
C3	Plantas cuyo primer compuesto estable después de la fijación del CO <sub>2</sub> es un compuesto de tres carbonos (Gliceraldehido 3-fosfato).
C4	Plantas cuyo primer compuesto estable después de la fijación del CO <sub>2</sub> es un compuesto de cuatro carbonos (ácidos malico o aspártico).
CAM	Plantas con el metabolismo ácido de las crasuláceas.
CIP	Enzima fosfatasa alcalina.
cpm	Cuentas por minuto.
CTAB	Bromuro de cetil-trimetilamonio.
dNTP	Deoxirribonucleótidos trifosfato.
EDTA	Etilendiamino tetra acetato.
IPTG	Isopropil tio β-D-galactósido.
Kb	Kilopares de bases.
LB	Medio Luria-Bertoni.
M	Molaridad.
mg	Miligramos.
ng	Nanogramos.
nm	Nanometros.
NZY	Medio con N-caza aminoácidos.
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PDB	Amortiguador de dilución para fagos.
PEP	Fosfoenolpiruvato.
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa.
PEG	Poliethylenglicol.
PNK	Enzima polinucleótido cinasa.
PVP	Polivinilpirrolidona.
SSC	Solución de sales Sodio-Citrato.
TE	Solución Tris-EDTA.
µg	Microgramos.
µl	Microlitros.
ufp	Unidades formadoras de placas.
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-galactosido.
( <sup>32</sup> P)	Isótopo radiactivo de fósforo

---

## CONTENIDO

---

<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
ESTRUCTURA MOLECULAR, REACCION Y REGULACION.	
II.1. Estructura de la proteína.	4
II.2. Isoformas.	7
II.3. Mecanismo de reacción.	8
II.4. Regulación de la actividad enzimática.	8
II.5. Fosfoenolpiruvato carboxilasa en frutos verdes.	10
ESTRUCTURA Y EXPRESION DE LOS GENES QUE CODIFICAN LA PEPC.	
II.6. Estructura del gen.	11
II.7. Expresión diferencial.	13
MANIPULACIÓN GENÉTICA DE PEPC.	
II.8. Clonación y expresión transgénica.	14
II.9. Mutagénesis dirigida.	15
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>IV. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>17</b>
PREPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN	
IV.1. Material biológico.	17
IV.2. Extracción y purificación de ADN genómico con CTAB.	17
IV.3. Cuantificación de ADN.	18
IV.4. Electroforesis de ADN.	19
IV.5. Purificación de ADN por GeneClean II (BIO 101 Inc.).	20
IV.6. Obtención de ADN de una biblioteca de ADNc de vaina de frijol clonada en λZipLox.	21
AMPLIFICACIÓN DE ADN POR PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)	
IV.7. Principio del método.	24
IV.8. Selección y diseño de los oligonucleótidos iniciadores.	26
IV.9. Reacción de amplificación por PCR.	27
CONSTRUCCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MOLECULAS DE ADN RECOMBINANTE.	
IV.10. Clonación molecular.	29
IV.11. Transformación de células competentes.	31
IV.12. Minipreparación ADN plasmídico.	32
IV.13. Extracción de ADN plasmídico.	33
INMOBILIZACIÓN DE ADN Y ANÁLISIS DE HIBRIDACIÓN	
IV.14. Transferencia por capilaridad de ADN a membranas de nylon.	34
IV.15. Marcaje y preparación de la sonda.	35
IV.16. Hibridación por Southern blot.	37

SECUENCIACIÓN DE ADN	
IV.17. Reacción de secuenciación por el método Sanger.	39
IV.18. Electroforesis de gel de secuenciación.	41
<b>V.RESULTADOS</b>	<b>44</b>
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	<b>55</b>
VI.1. PCR, sensibilidad y validación del método.	55
VI.2. Obtención de una sonda molecular homóloga para PEPC	57
VI.3. Relaciones filogenéticas con otras PEPCasas.	58
VI.4. Determinación del posible número de genes. que codifican a PEPC en frijol.	60
<b>VII. REFERENCIAS</b>	<b>61</b>

---

---

## I. INTRODUCCION.

---

El frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.) es una planta dicotiledónea de la familia Leguminosae considerada de gran importancia alimenticia ya que su semilla, que presenta un alto contenido de proteínas, es consumida a gran escala en nuestro país ocupando junto con el maíz el primer lugar de producción en México.

Se ha sugerido que la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), enzima presente en todas las plantas, pudiera estar correlacionada con la síntesis de proteínas (Andreo et al., 1987). Esta enzima cataliza la  $\beta$ carboxilación del fosfoenolpiruvato (PEP) con  $\text{HCO}_3^-$  para formar oxaloacetato (OAA) y fósforo inorgánico. La función metabólica que desempeña el OAA dependerá del tejido y del tipo de planta que sea considerado. En plantas superiores con fotosíntesis de tipo C3, como es el caso del frijol, la PEPC juega un papel muy importante como proveedora de compuestos de cuatro carbonos que se introducen al ciclo de Krebs (función anaplerótica) y que pasan a formar parte de los aminoácidos (Andreo et al., 1987; O'Leary, 1983). Por otro lado, se ha demostrado que la enzima PEPC presenta una alta actividad en vaina de frijol, correlacionada con las condiciones que operan dentro de ésta: altos niveles de  $\text{CO}_2$ , niveles relativamente bajos de clorofila y una penetración restringida de la luz a través del pericarpio. Sin embargo, la ruta por la cual se lleva a cabo la reasimilación del  $\text{CO}_2$  en la vaina aún no es clara.

El presente trabajo está comprendido dentro de un proyecto general más amplio denominado "Fosfoenolpiruvato carboxilasa de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): caracterización y regulación de su expresión genética" en donde además de caracterizar cinética y bioquímicamente a esta enzima se

---

---

#### INTRODUCCION

pretende aislar el gen o genes que la codifican, esperando conocer los mecanismos de expresión y regulación de éstos. Esto permitiría, combinando la elevada capacidad de la biología molecular así como de la biotecnología, su manipulación genética con miras a controlar los mecanismos de aprovechamiento y distribución de carbono en la planta de frijol.

El objetivo general de este trabajo, a propósito de lo anterior, es generar una sonda homóloga del gen de la fosfoenolpiruvato carboxilasa de frijol como una primera aproximación al problema. La síntesis y caracterización de esta sonda daría la posibilidad de aplicaciones técnicas, metodológicas y experimentales potencialmente alternativas y las perspectivas que de esto pueda derivarse son muchas.

---

## II. ANTECEDENTES.

---

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC; E.C. 4.1.1.31) es una enzima citoplasmática que se encuentra ampliamente distribuida en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos de plantas superiores, algas y bacterias (Andreo *et al.*, 1987). La enzima es responsable de la carboxilación primaria en plantas C4 y CAM (O'Leary, 1982). En plantas C3 y bacterias la PEPC tiene un papel anaplerótico en la fijación de carbono (para el aprovisionamiento de ácidos orgánicos) y otras funciones auxiliares tales como: recaptura de CO<sub>2</sub>, respirado, asimilación de nitrógeno, síntesis de aminoácidos, producción de NADPH, mantenimiento de pH y electroneutralidad (Latzko y Kelly, 1983).

La mayoría de los estudios en plantas están enfocados al análisis del papel de PEPC en especies C4 y CAM. Numerosos trabajos han documentado las propiedades cinéticas y bioquímicas de esta enzima (O'Leary, 1982; Latzko y Kelly 1983; Andreo *et al.*, 1987; Deroche y Carrayol, 1988; González y Andreo, 1989; Jiao y Chollet, 1991). Recientemente se han podido aislar clonas genómicas y de ADN complementario que codifican a la enzima de especies C4, C3 y CAM así como de formas procarióticas (Tabla 1). En la presente revisión se resume la información en cuanto a biología molecular, genética y manipulación genética de PEPC se refiere, haciendo énfasis en la forma de la enzima presente en plantas C3.

ANTECEDENTES

Tabla 1. Especies en las cuales se han caracterizado clones genómicos o de cDNA de PEPC, formas de PEPC y tejido en los que se encontró.

•Especies de plantas	•Formas de PEPC/ Tejido analizado	•Clon Genómico/cDNA	•Referencia
• <i>Glycine max</i>	C3 (semilla)	gmppc 16	Sugimoto <i>et al.</i> (1992)
• <i>Medicago sativa</i>	C3 (nódulo de raíz)	pPEPC-61	Pathirana <i>et al.</i> (1992)
• <i>Nicotiana tabacum</i>	Cultivo celular	pT301	Koizumi <i>et al.</i> (1991)
• <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	C3 (hoja)	λMC4C	Cushman <i>et al.</i> (1989)
• <i>Flaveria pringlei</i>	C3 (hoja)	pcFppc	Hermans y Westhoff (1992)
• <i>Saccharum</i> híbrido var. H 32-8560	C3 (hoja)	scpepcD1	Albert <i>et al.</i> (1992)
• <i>Sorghum vulgare</i>	C3 (hoja)	CP28	Crétin <i>et al.</i> (1991)
• <i>Zea mays</i>	C3 (hoja)	pepcZm-2A	Lepiniec <i>et al.</i> (1993)
			Izui <i>et al.</i> (1992)
			Schaffner y Sheen (1992)
	C3 (raíz)	pepcZm-3	Kawamura <i>et al.</i> (1990)
			Schaffner y Sheen (1992)
• <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	CAM (hoja)	λMC4C	Cushman <i>et al.</i> (1989)
• <i>Zea mays</i>	C4 (hoja)	pepcZm-1	Izui <i>et al.</i> (1986)
			Hudspeth y Gula (1989)
			Yanagisawa y Izui (1989)
• <i>Sorghum bicolor</i>	C4 (hoja)	CP46	Crétin <i>et al.</i> (1990)
			Lepiniec <i>et al.</i> (1992)
• <i>Flaveria trinervia</i>	C4 (hoja)	pcFtppc1-1	Poetsch <i>et al.</i> (1991)
• <i>Anacystis nidulans</i>	Procariótica	—	Ishijima <i>et al.</i> (1992)
			Katagiri <i>et al.</i> (1985)
• <i>Anabaena variabilis</i>	Procariótica	—	Luinburg y Coleman (1992)
• <i>Escherichia coli</i>	Procariótica	pLC20-10	Fujita <i>et al.</i> (1984)
• <i>Corynebacterium glutamicum</i>	Procariótica	pUC-pp2	Eikmanns <i>et al.</i> (1989)

•ESTRUCTURA MOLECULAR, REACCION Y REGULACION.

II.1. Estructura de la proteína.

Las secuencias deducidas de aminoácidos de PEPC de plantas superiores y formas procarióticas están disponibles en los bancos de datos (Genbank, Swissprot, etc.) y en las referencias bibliográficas citadas. La PEPC-C3 esta compuesta de 967 aminoácidos en *G. max* (Sugimoto *et al.*, 1992), 966 en *M. sativa* (Pathirana *et al.*, 1992), 964 en *N.tabacum* (Koizumi *et al.*, 1991), 956 en *Solanum* (Merkelbach *et al.*, 1993), 967 en *Flaveria* (Poetsch *et al.*, 1991), 966 en *Mesembryanthemum* (Cushman *et al.*, 1989), 960 en *Sorghum* (Crétin *et al.*, 1991) y 970 en *Z. mays* (Kawamura *et al.*, 1992). En la Tabla 2 se muestra una comparación de secuencias de aminoácidos de diferentes PEPCs.

Tabla 2. Comparación de secuencias de aminoácidos de diferentes PEPCs. Los valores indican el porcentaje de identidad determinado por el alineamiento más favorable individualmente en cada caso por el programa GENETYX. *Glicine Max* (Gm), *Nicotiana tabacum* (Nt), *Mesembryanthemum crystallinum* (Mc), *Sorghum vulgare* (Sv) y *Zea mays* (Zm). Isoforma C3 (C3), Isoforma C4 (C4). (Tabla tomada de Sugimoto *et al.*, 1992.)

Especies	•Gm C3	•Nt C3	•Mc C3	•Sv C3	•Mc CAM	•SvL2C4	•Zm C4
•SvL1 C4	71.6	71.8	72.6	72.8	70.3	74.6	86.6
•Zm C4	78.8	77.4	78.9	78.5	75.7	70.0	
•SvL2 C4	83.7	82.4	83.6	84.5	80.3		
•Mc CAM	81.8	81.4	82.6	84.0			
•Sv C3	87.1	86.7	86.2				
•Mc C3	86.9	88.3					
•Nt C3	87.6						

Modificaciones químicas de la enzima en maíz muestran que los siguientes residuos pueden estar cercanamente relacionados al sitio activo de la enzima: 2 argininas, 4 lisinas, 2 histidinas y de 5-7 cisteínas (Iglesias *et al.*, 1983; Chardot y Wedding, 1992).

La localización de algunos de estos aminoácidos y su función en PEPC están descritos en la Tabla

3. Además de otros aminoácidos que son muy conservados: 6 a 7 cisteínas, 3 lisinas, 17 argininas y 4 residuos de histidina (Izui *et al.*, 1986; Poetsch *et al.*, 1991). Sólo 2 aminoácidos, valina<sup>731</sup> y serina<sup>780</sup> de la enzima en *Zea mays* (valina<sup>725</sup> y serina<sup>773</sup> en caso de *Flaveria trinervia*) son específicos para mono y dicotiledóneas C4, éstos no se encuentran en formas C3 y CAM (Poetsch *et al.*, 1991). En las secuencias de PEPCs de formas eucarióticas y procarióticas hasta el momento analizadas, se han encontrado regiones altamente conservadas que están involucradas en la unión a PEP y en la actividad catalítica (Jiao *et al.*, 1991; Poetsch *et al.*, 1991), estos análisis de homología apoyan los datos de los experimentos de modificación química.

**Tabla 3. Localización de aminoácidos esenciales y su posible función en PEPC. \*Secuencias altamente conservadas en varias especies en procariontes y eucariontes.**

•Aminoácido	•Localización/Secuencia	•Posible función	•Ocurrencia
• Serina N-terminal	EKHIIS <sup>15</sup> IDAQLR	Regulación de la fosforilación	Homólogo en plantas superiores pro y eucariontes
• Histidina	LVLTAAH <sup>177</sup> PTQS	Formación de OAA	-la misma-
• Lisina	*GYSDSGK <sup>606</sup> DAG	Sitio activo	-la misma-
• Histidina II	*FH <sup>639</sup> GRGGTVGRGGGP	Unión a PEP	-la misma-
• Cisteína	196, 308, 335, 419, 424, 426, 687	Interacción entre las subunidades	-la misma-
• Valina	EYRSV <sup>731</sup> VVK	Desconocida	C4-específico
• Serina C-terminal	PWIFS <sup>780</sup> WTQ	Desconocida	C4-específico

Arboles filogenéticos, construidos a partir de secuencias de aminoácidos de 26 formas diferentes de PEPC, muestran que la enzima de la planta dicotiledónea C4 *F. trinervia* está más cercanamente relacionada a las isoformas C3 (*N. tabacum* y *G. max*) y C3/CAM de *M. crystallinum* que a las formas C4 de PEPC de monocotiledóneas (Koizumi *et al.*, 1991; Poetsch *et al.*, 1991; Kawamura *et al.*, 1992; Sugimoto *et al.*, 1992; Lepiniec *et al.*, 1993). Esta observación apoya la idea de que los

grupos de plantas C4 mono y dicotiledóneas evolucionaron independientemente uno de otro (Raghavendra, 1980).

### **II.2. Isoformas.**

Hasta el momento son conocidas tres isoformas de PEPC en plantas superiores: la forma fotosintética C4 que cataliza la fijación del CO<sub>2</sub> en la primera reacción de la llamada ruta C4. La existencia de esta vía metabólica reduce la pérdida de energía originada por la fotorespiración (la cual ocurre en plantas C3) y explica los altos rendimientos obtenidos en plantas C4 cuando son cultivadas en climas con altas temperaturas e intensa iluminación; la isoforma CAM con una función también de tipo fotosintético. En estas plantas de clima desértico la fijación del CO<sub>2</sub> ocurre solamente durante la noche, el malato producido a expensas del oxaloacetato producto de la actividad de PEPC, es utilizado como un donador de carbono durante la fotosíntesis que ocurre durante el subsecuente período luminoso y por último la forma de PEPC no autotrófica de tipo anaplerótico teniendo un papel muy importante en el abastecimiento de compuestos de cuatro carbonos al ciclo de Krebs, que pasan a formar parte de aminoácidos (O'Leary, 1982; Andreo *et al.*, 1987). Estas isoformas pueden ser distinguibles por sus propiedades cromatográficas, inmunológicas y cinéticas.

En hojas de sorgo se presentan dos isoformas de PEPC, una forma que ocurre en hojas etioladas que presenta características C3 mientras que la forma presente en hojas verdes muestra propiedades cinéticas y regulatorias tipo C4. No existe interconversión entre estas, lo que indica que estas dos formas son codificadas por genes diferentes. Tres diferentes isoformas han sido detectadas en hojas verdes, hojas etioladas y en raíz de *Zea mays* (Hudspeth and Grula, 1989; Schaffner y Sheen, 1992). Estas isoformas están codificadas por diferentes genes (Hudspeth y Grula, 1989; Hermans y Westhoff, 1990). La presencia de múltiples formas de PEPC sugiere que uno de los eventos más importantes durante la evolución de las plantas C4 fue el desarrollo de un mecanismo regulatorio para una expresión diferencial específica de los genes de PEPC.

### II.3. Mecanismo de reacción.

La PEPC cataliza la  $\beta$ -carboxilación de PEP para producir OAA y fosfato inorgánico (O'Leary, 1983; Andreo *et al.*, 1987). La reacción es esencialmente irreversible. La enzima requiere  $\text{HCO}_3^-$  para su activación y es dependiente de cationes bivalentes *in vivo*, preferentemente  $\text{Mg}^{2+}$ , pero puede utilizarse  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Co}^{2+}$  *in vitro* (O'Leary, 1983).

Una serie de trabajos recientes proveen la demostración del mecanismo de reacción (Janc *et al.*, 1992). El orden requerido de adición de los reactantes es  $\text{Mg}^{2+}$ , PEP y  $\text{HCO}_3^-$ . Se ha propuesto que los altos niveles de sinergismo en la unión de sustratos está en función de que el complejo PEP-Mg sirve como sustrato a PEPC. Después de la unión secuencial de  $\text{Mg}^{2+}$ , PEP y  $\text{HCO}_3^-$  a la enzima, la reacción de carboxilación parece proceder en dos etapas principales: 1) formación del carboxifosfato y el enolado de piruvato; descomposición del carboxifosfato y liberación de  $\text{CO}_2$  y fosfato inorgánico a partir de éste; y 2) carboxilación del enolado por el  $\text{CO}_2$  para la formación de OAA. (Andreo *et al.*, 1987)

### II.4. Regulación de la actividad enzimática.

Varios factores/fenómenos tienen influencia en la regulación de PEPC. El grado en que la actividad puede verse afectada puede diferir dependiendo del origen de la enzima y la presencia de otros factores interactuantes. Los principales mecanismos de regulación postraduccionales se deben a cambios en el estado de fosforilación de la enzima y a la forma oligomérica de la proteína (esto sólo está documentado *in vitro*). Además de que otros factores tales como hormonales, nutricionales o luminosos modulan la expresión del gen, la actividad enzimática es directamente dependiente de los niveles iónicos y del pH.

Se ha demostrado que algunos compuestos pueden inhibir (-) algunas de las reacciones que son mostradas en la figura 1. El conocimiento y la información que se tienen hasta el momento es inadecuado e insuficiente para detallar las posibles interrelaciones que se presentan entre los estados fosforilación/desfosforilación y oligomerización de la enzima *in vivo*.

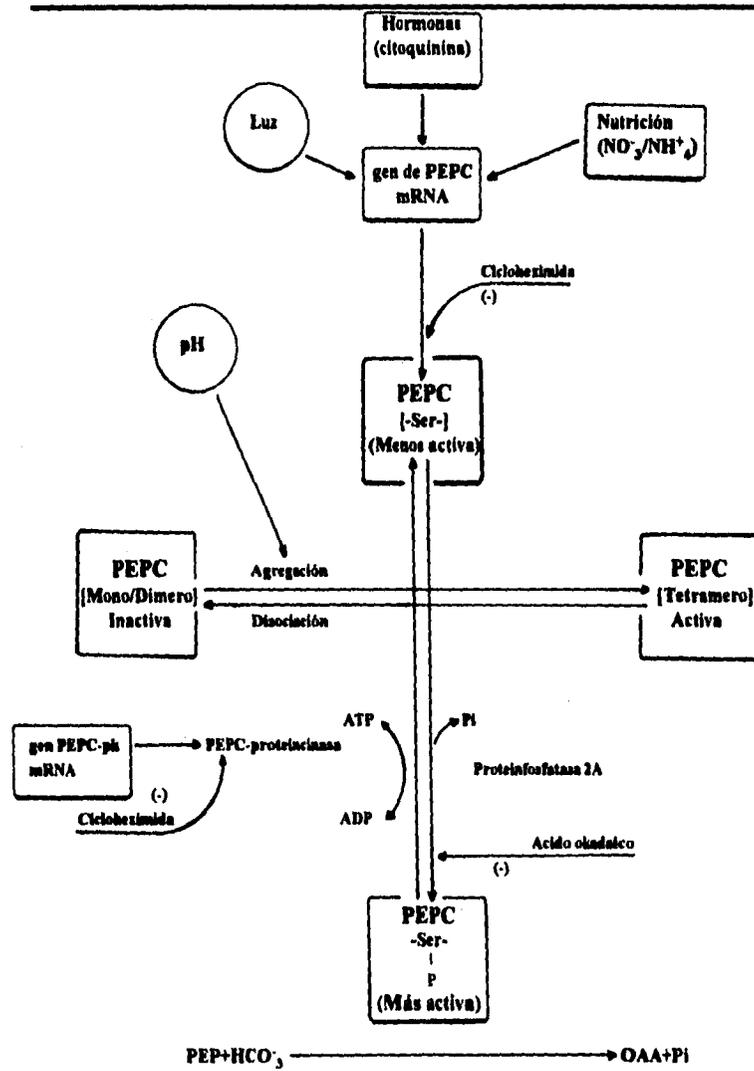


Figura 1. Representación simplificada de la regulación de PEPC por varios factores/fenómenos.

### 11.5 Fosfoenolpiruvato carboxilasa en frutos verdes.

Estudiando el significado de intercambio fotosintético y respiratorio en la economía del carbono en frutos de chicharo durante el desarrollo se ha observado que la vaina contribuye con aproximadamente un 10% de carbono de la semilla a través de la fotosíntesis del CO<sub>2</sub> respirado, lo cual es una cantidad nada despreciable considerando la producción global (Flinn et al., 1977).

Se ha observado que durante el desarrollo del fruto éste es capaz de refijar principalmente el CO<sub>2</sub> liberado de la respiración mitocondrial de la semilla. El análisis de las enzimas fijadoras de CO<sub>2</sub> atmosférico en los frutos muestra que muy poco de éste es fijado por medio de la Rubisco (enzima del ciclo de reducción fotosintética del carbono) en relación a lo que fijan las hojas. La actividad de estas enzimas en las paredes de la vaina de chicharo es de 10 a 100 veces menor que la actividad de las hojas (Hedley et al., 1975). En el pericarpio verde del grano de trigo, se ha detectado una preponderancia de productos de PEPC marcados tales como aspartato, citrato, malato y glutamato después de un minuto de exposición a <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> en la luz (Aoyagi y Bassham, 1984). Además, considerando la actividad de PEPC en base a la proteína, se han descrito relaciones PEPC:Rubisco de 1.7 a 1.4 para el fruto de tomate mientras que para hoja los valores son alrededor de 0.1 (Laval-Martin et al., 1977).

Por otro lado las características cinéticas de la PEPC de fruto difieren de la PEPC de otros modelos. Esto ha llevado a proponer que en los frutos está ocurriendo un tipo de fotosíntesis característico de ese órgano al cual denominaron "fotosíntesis de fruto". (Blanke y Lenz, 1989). Sin embargo, hasta la fecha no se ha definido si realmente la PEPC de fruto está funcionando fotosintéticamente. El hecho de que esta enzima tenga un papel anaplerótico importante en algunos tejidos hace suponer que ésta podría ser su principal función en fruto.

En un trabajo realizado por Delgado (1992) en frijol, se observó que la PEPC se localizaba en mayor cantidad en tejido interno de la vaina. Ello concuerda con la hipótesis de que esta enzima juega un papel importante en la reasimilación del CO<sub>2</sub> respirado por la semilla, que se acumula en

la cavidad de la vaina. Por otro lado, al proporcionar a la vaina  $^{14}\text{CO}_2$  desde su cavidad interna observó que aparecían marcados los compuestos sacarosa, glicina, serina, almidón, aspartato, glutamato y glutamina. Esto indica que el  $\text{CO}_2$  se está fijando en el tejido interno de la vaina y que los esqueletos carbomados están siendo utilizados para la síntesis de almidón y aminoácidos.

•ESTRUCTURA Y EXPRESION DE LOS GENES QUE CODIFICAN LA PEPC.

La naturaleza del gen de PEPC ha sido ampliamente estudiada principalmente en tres especies C4 principalmente *Zea mays*, *Sorghum* y *Flaveria trinervia*. La expresión y regulación diferencial del gen de PEPC en plantas C4 son ya un ejemplo clásico en la biología molecular de plantas (Sheen, 1991; Schaffner y Sheen, 1992), en contraste con la investigación de especies C3 (*Glycine max*, *Nicotiana tabacum*, *Flaveria pringlei*, *Medicago sativa*); CAM (*Mesembryanthemum crystallinum*) y formas procariontes (*Escherichia coli*, *Anacystis nidulans* y *Anabaena variabilis*) de las que se conoce muy poco. Aunque las plantas de tipo C3 poseen una PEPC estructuralmente muy similar a la enzima C4 (Matsuoka y Hata, 1987), la expresión genética en estas especies es muy diferente (Schaffner y Sheen, 1992).

II.6. Estructura del gen.

Una familia de genes nucleares con tres o cuatro miembros codifican las diferentes formas de PEPC las cuales son características para cada tejido / órgano. En maíz por ejemplo existen la forma fotosintética específica C4 de hoja y las formas no fotosintéticas C3 de raíz, tallo y hoja etiolada (Hudspeth *et al.*, 1986; Hudspeth y Grula, 1989, Crétin *et al.*, 1990; Hermans y Westhoff, 1990; Poetsch *et al.*, 1991; Schaffner y Sheen, 1992; Lepiniec *et al.*, 1993). Existen múltiples clonas genómicas que han sido caracterizadas y designadas diferencialmente en *Sorghum*, *Zea mays* y *F. trinervia* (Tabla I).

En maíz, los genes para diferentes isoformas de PEPC se encuentran separados en cromosomas diferentes; por ejemplo la forma C4 en el cromosoma 9, la forma C3 en el 7 y la forma de raíz en el

cromosoma 4 ó 5 (Izui *et al.*, 1992). La isoforma C4 específica de hoja está codificada por un sólo gen en sorgo (Crétin *et al.*, 1991, Lepiniec *et al.*, 1991) y maíz (Hudspeth y Grula, 1989), mientras que en *F. trinervia* la forma específica de hoja está codificada por múltiples genes (Hermans y Westhoff, 1990; Poetsch *et al.*, 1991). La multiplicidad de genes de la forma C4 específica de hoja en *F. trinervia* (dicotiledónea C4), a diferencia del gen único en maíz y sorgo (monocotiledóneas C4), parece ser una propiedad excepcional de dicotiledóneas (Hermans y Westhoff, 1990). Análisis mas completos de los genes de PEPC en otras dicotiledóneas C4 podrían revelar su significancia evolutiva.

Todos los miembros de la familia de genes C4 de PEPC poseen los componentes típicos de los genes: exones/intrones, marcos de lectura abiertos, regiones 5' no traducibles, secuencias 3' poliadeniladas, secuencias 5' regulatorias y factores de iniciación/terminación de la transcripción. Por ejemplo, el gen *ppc* en maíz es de 5.3 Kb, consistiendo de 10 exones y 9 intrones (Hudspeth y Grula, 1989). Este gen no contiene motivos o cajas regulatorias L, I o G, que se encuentran usualmente en genes que codifican enzimas fotosintéticas como Rubisco (Nelson y Langdale, 1992). Por otro lado contiene motivos RS1-3 en la región 5', los cuales interactúan con factores nucleares (Yanagisawa y Izui, 1990, 1992).

El gen de *ppc* en *F. trinervia* contiene un marco de lectura abierto de 2898 pb, 50 nucleótidos de secuencia 5' no traducible, una región de 222 pb 3' no codificadora y una señal de poliadenilación de 9 nucleótidos (Poetsch *et al.*, 1991). El codón de iniciación (ATG) está localizado en una secuencia consenso del sitio de iniciación de la traducción en plantas (Matsuoka y Minami, 1989). Secuencias cortas y repetitivas 5' son características de genes regulados por luz como es el caso de la subunidad pequeña de Rubisco (*rbcS*). El gen *ppc* en maíz contiene varias de estas secuencias (Hudspeth *et al.*, 1986; Hudspeth y Grula, 1989). Ahora bien las típicas cajas TATA o CATT, comunes en genes eucarióticos, no se encuentran en la región 5' de la secuencia de sorgo y maíz (Hudspeth y Grula, 1989; Matsuoka y Minami, 1989; Crétin *et al.*, 1991). En lugar de esto, se

encuentran secuencias ligeramente modificadas TATTT así como elementos CCAAT, no sabiéndose si éstos son funcionales.

Análisis de las clonas de ADNc de PEPC que han sido aisladas hasta el momento indican que la mayoría de las secuencias conservadas se encuentran en la región C-terminal, sugiriendo que esta zona comprende parte del sitio catalítico. Las regiones N-terminal que son conservadas pueden estar involucradas en la regulación alostérica de la enzima (Matsuoka y Minami, 1989).

#### **II.7. Expresión diferencial.**

Un estudio detallado de la familia de genes en sorgo y una evaluación con respecto a sus relaciones filogenéticas con otras plantas indica que una característica distintiva de la forma C4 de PEPC es que posee un nivel de expresión genética importante en cuanto a estructura primaria se refiere (Lepiniec *et al.*, 1993). La expresión de PEPC no depende solo del órgano, estado de desarrollo o iluminación, sino que se ha propuesto que la expresión diferencial del gen puede deberse a factores nucleares especializados, metilación de ADN o a la existencia de distintos promotores (Kano-Murakami y Matsuoka, 1992; Nelson y Langdale 1992; Schaffner y Sheen, 1992).

La fotosíntesis C4 es resultado de actividades metabólicas integradas de dos diferentes tipos de células: las células del mesófilo y las células de la vaina del haz vascular (Hatch, 1987). La especialización de estas células se lleva a cabo por una expresión celular selectiva de los genes que codifican a las enzimas de la vía metabólica C4 a través de regulación transcripcional y/o traduccional. (Nelson y Langdale, 1992). Un modo de expresión tejido-específico es a través de regulación transcripcional por factores nucleares que interactúan con regiones promotoras; esto ocurre por ejemplo en maíz regulando la expresión del gen *ppc* (Yanagisawa y Izui, 1990, 1992).

Otro modo de expresión selectiva es la metilación de ADN en mesófilo, esta modificación del ADN impide la unión de proteínas activadoras nucleares, restringiendo así la expresión del gen. La metilación de *ppc* ocurre particularmente en las células de la vaina del haz vascular especialmente en los estadios finales de diferenciación tisular (Yanagisawa y Izui, 1990).

---

ANTECEDENTES

Schaffner y Sheen (1992) sugieren que durante la evolución de la fotosíntesis C4, el gen de *ppc* es resultado de patrones de expresión específicos por adquisición de secuencias regulatorias y de promotores únicos, probablemente por un rearrreglo genómico. Estudios de expresión muestran que la región 5' del gen *ppc* en plantas C4 puede modular la expresión celular específica.

•MANIPULACIÓN GENÉTICA DE PEPC.

Una vez conocida la secuencia del ADN complementario que codifica la PEPC de tipo C4, el gen (*ppc*) fue clonado y expresado en bacterias y plantas C3. La clonación exitosa del gen *ppc* fue la base para los estudios de mutagénesis dirigida, que ayudaron a elucidar la importancia de ciertos residuos de aminoácidos en las propiedades catalíticas y regulatorias de la enzima.

**II.8. Clonación y expresión transgénica.**

Mutantes de *E. coli* deficientes en PEPC han sido complementados con el gen *ppc* de la isoforma C4 de *Sorghum* (Crétin *et al.*, 1991); determinando por actividad, ensayos inmunoquímicos y SDS-PAGE que las bacterias transformadas producen, una enzima funcional y de tamaño normal, la cual puede ser fosforilada *in vitro* por la PEPC-cinasa de sorgo. Este sistema representa una herramienta interesante para preparar grandes cantidades de proteína pura para estudios bioquímicos.

Plantas transgénicas de tabaco, con el gen *ppc* de maíz (Hudspeth *et al.*, 1992) y sorgo (Tagu *et al.*, 1991) han sido producidas, estudiando la expresión y propiedades de PEPC en estas plantas. El tamaño del transcrito de *ppc* en plantas transgénicas de tabaco corresponde al mRNA en maíz (Hudspeth *et al.*, 1992). Pero en el caso de sorgo el tamaño del transcrito es aparentemente el mismo que en tabaco (planta C3) (Tagu *et al.*, 1991). La variación del tamaño del transcrito en las plantas transgénicas puede deberse a un inadecuado inicio de la transcripción (Hudspeth *et al.*, 1992). Si bien la actividad de PEPC en plantas transgénicas de tabaco es tres veces superior a las plantas control, estos niveles son relativamente bajos comparados con las plantas C4 (Hudspeth *et*

*al.*, 1992). Dos diferentes isoformas de PEPC fueron identificadas en plantas transgénicas de tabaco (Hudspeth *et al.*, 1992) Una forma que correspondería a la enzima original de tabaco con una baja  $K_{M(PEP)}$  y una segunda forma que correspondería a la enzima C4 con una alta  $K_{M(PEP)}$ . En las plantas transgénicas el contenido de malato fue mayor que en las plantas control, lo que muestra el aumento en la actividad de PEPC y la ineficiencia de estas plantas para descarboxilar malato.

#### II.9. Mutagénesis dirigida.

El residuo de serina fosforilable ( $ser^8$ ) en PEPC de sorgo fue cambiado por mutagénesis dirigida a cisteína (S8C) y ácido aspártico (S8D) (Wang *et al.*, 1992). Los resultados comparando la enzima normal con las mutantes indican que la  $ser^8$  es una determinante importante en la regulación de la actividad de PEPC en sorgo por el metabolito efector negativo (L-malato), pero no por el positivo (glucosa 6-P). La fosforilación del residuo de serina de PEPC en sorgo pudo ser simulada con ácido aspártico (Wang *et al.*, 1992).

La mutación de histidina<sup>138</sup> a asparagina (H138N) en PEPC de *E. coli* da como resultado una enzima que no muestra actividad general de carboxilasa, pero puede catalizar la desfosforilación bicarbonato-dependiente de PEP (Terada y Izui, 1991). Además la  $his^{138}$  es de alguna manera esencial para la etapa de carboxilación del enolado de piruvato por  $CO_2$  (a partir del carboxifosfato) durante la reacción de PEPC. Por otro lado la mutación de la  $his^{579}$  a asparagina (H579N) producida en la enzima de *E. coli* muestra un 69% de actividad carboxilasa con respecto a la enzima normal, pero su afinidad por PEP decrementó 24 veces (Terada *et al.*, 1991). El grupo imidazol de la  $his^{579}$  no es por lo tanto, determinante para la catálisis de la enzima pero juega un papel muy importante en funciones regulatorias. Un último estudio de mutagénesis indica que la arginina<sup>587</sup> puede estar involucrada en la unión de  $HCO_3^-$  a PEPC en *E. coli*.

Todos estos estudios de mutagénesis con la enzima en *E. coli* proveen una base molecular para las observaciones de modificaciones químicas en los residuos esenciales para la actividad enzimática de PEPC (Iglesias y Andreo, 1983).

---

### **III. OBJETIVOS.**

---

El objetivo general de este trabajo es generar una sonda homóloga del gen de la fosfoenolpiruvato carboxilasa de frijol. La síntesis y caracterización de esta sonda dará la oportunidad de aislar el cDNA de este gen, así como de realizar diferentes análisis de expresión y regulación del mismo.

Los objetivos particulares son los siguientes: 1) Amplificación selectiva de un segmento específico de ADN conteniendo la secuencia exacta del gen de la fosfoenolpiruvato carboxilasa expresada en frijol utilizando la técnica de PCR 2) Clonación y secuenciación del fragmento amplificado con el propósito de obtener una sonda homóloga para el gen de PEPC. La secuenciación de este fragmento y su comparación con secuencias ya conocidas dará la posibilidad de conocer, como primera aproximación, el tipo de isoforma que se expresa en vaina de frijol. 3) Determinar el número de genes que codifican a la enzima PEPC en frijol.

---

#### **IV. MATERIALES Y METODOS.**

---

##### **•PREPARACION Y PURIFICACION DE ADN.**

###### **IV.1. Material biológico.**

Hojas jóvenes de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. var. Black Valentine) fueron empleadas para la extracción de ADN genómico. Las plantas fueron cultivadas en macetas con tierra de hoja y en condiciones de invernadero. Las hojas fueron colectadas, lavadas con agua destilada y congeladas con nitrógeno líquido para posteriormente ser almacenadas a -70 °C hasta su uso.

###### **IV.2. Extracción y purificación de ADN genómico con CTAB.**

La purificación de ADN genómico en plantas se lleva a cabo preferentemente por el tratamiento por CTAB (Bromuro de cetil-trimetilamonio). Este detergente posee cargas positivas las cuales interactúan con la carga negativa del ADN en altas concentraciones de sales formando un complejo soluble. En etapas subsiguientes un decremento en la concentración de sales causa la precipitación de ADN separándolo de otros componentes, especialmente polisacáridos en solución. (Brown, 1991). Es importante que el ADN esté completamente libre de impurezas ya que esto puede inhibir reacciones enzimáticas posteriores.

1. Pesar 2.5 g de tejido y triturar en mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.
2. Transferir el tejido pulverizado a un tubo corex y agregar 10 ml de amortiguador CTAB a 65 °C (2% p/v CTAB, Tris HCl 0.1 M [pH 8.0], EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, 1% PVP). Incubar por 15 min a 56 °C mezclando suavemente para disolver los ácidos nucleicos.
3. Agregar 10 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) cerrando perfectamente la tapa del tubo,

---

MATERIALES Y METODOS.

invertir varias veces hasta formar una emulsión.

4. Centrifugar a 12,000 xg en un rotor JA-20 por 10 min a 20 °C. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo corex.
5. Agregar 0.2 volúmenes de una solución de CTAB al 5% p/v, mezclar y repetir la extracción con cloroformo-álcohol isoamílico.
6. Medir el volumen de la fase acuosa transferirlo a un tubo nuevo y agregar un volumen igual de amortiguador de precipitación (CTAB 1% p/v, Tris HCl 50 mM [pH 8.0], EDTA 10 mM). Mezclar por inversión suavemente e incubar a 4 °C por 15 min.
7. Centrifugar a 5000 xg por 15 min a 20 °C y descartar el sobrenadante.
8. Adicionar 2 ml de TE pH 8.0 conteniendo NaCl 1 M para redissolver la muestra, para esto puede calentarse a 56 °C por 10 min.
9. Colocar la muestra en hielo y adicionar 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Mezclar suavemente por inversión.
10. Centrifugar a 12 000 xg por 10 min a 4 °C en rotor JA-20 y descartar el sobrenadante.
11. Lavar la pastilla suavemente con etanol frío al 70 % centrifugar nuevamente y secar la pastilla en vacío.
12. Disolver el ADN en 0.2 ml de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM [pH 7.5]) a 4°C.
13. Agregar 5 µl de RNasa H 10 mg/ml (Boehringer) e incubar 30 min a 37 °C.
14. Precipitar y recuperar el ADN repitiendo las etapas 9-12. Disolver en TE pH 7.5 o bien en H<sub>2</sub>O estéril.

#### **IV.3. Cuantificación de ADN.**

Existen dos tipos de métodos comúnmente utilizados para medir la cantidad de ácidos nucleicos en una preparación. Cuando la muestra es lo suficientemente pura, es decir sin cantidades significativas de contaminantes como proteínas, fenol, agarosa u otro ácido nucleico, la medición espectrofotométrica de la cantidad de radiación ultravioleta absorbida por las bases es lo más

adecuado. Las lecturas deben tomarse a una longitud de onda de 260 y 280 nm. La lectura a 260 nm permite el cálculo de la concentración de ácido nucleico en la muestra. Una D.O. de 1.0 corresponde aproximadamente a 50 µg/ml para ADN de doble cadena. Preparaciones puras de ADN poseen valores de 1.8 a 2.0 del coeficiente  $D_{260}/D_{280}$ . Si existe contaminación por otras sustancias que pueden absorber radiación ultravioleta como proteínas o fenol la relación puede bajar significativamente y su adecuada cuantificación no es posible.

Si la cantidad de ADN en la muestra es muy pequeña o contiene cantidades significativas de impurezas, la cantidad de ácido nucleico puede ser estimada por la intensidad de fluorescencia emitida con bromuro de etidio, éste se intercala en las moléculas de ADN por lo que la cantidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN y de ésta manera puede visualmente ser estimada (Sambrook, 1989).

#### IV.4. Electroforesis de ADN.

La electroforesis en geles de agarosa es el método comúnmente utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. La técnica es simple, rápida de interpretar y capaz de resolver DNA que puede ser adecuadamente recuperado por otros procedimientos y ser utilizado en experimentos posteriores.

1. Preparar un gel al 1.0-1.2% deritiendo completamente la cantidad correcta de agarosa en amortiguador TBE 1X (10 g de Tris base, 5.5 g de ácido bórico y 4 ml de EDTA 0.5 M [pH 8.0] por litro) en un horno de microondas, el volumen no debe ocupar más del 50% del volumen del recipiente utilizado. La concentración va a depender del tamaño de las moléculas de ADN y el grado de separación que se desee.

2. Agregar bromuro de etidio (solución stock de 10 mg/ml en agua) a una concentración final de 0.5 µg/ml y mezclar perfectamente.

3. Vaciar la solución en el molde teniendo cuidado de que no se formen burbujas en el gel o entre la dentación del peine. El gel debe tener un grosor de 3-5 mm.

---

MATERIALES Y METODOS

4. Una vez que el gel está completamente polimerizado (30-45 min a temperatura ambiente) quitar cuidadosamente el peine. Colocar el gel en un aparato de electroforesis (HE33 Horizontal Submarine Unit Hoefer Sci. Inc.). Utilizar TBE 1X como solución de corrida (alrededor de 200 ml) cubriendo el gel con aproximadamente 1 mm de amortiguador.
5. Agregar a las muestras de ADN amortiguador de carga 1X (azul de bromofenol 0.25%, xilen cianol 0.25% y sacarosa al 40% en agua) y mezclar. Cuidadosamente cargar las muestras en los pozos del gel sumergido con una micropipeta automática.
6. Conectar los electrodos con un poder constante de 80-100 volts. Correr el gel hasta que el azul de bromofenol llegue a una distancia de 1 a 2 cm del borde del gel.
7. Examinar el gel en transiluminador de luz ultravioleta (UVC).

**IV.5. Purificación de ADN por GeneClean II (Bio 101 Inc.).**

El procedimiento GeneClean es un método rápido y eficiente de recuperación y purificación de ADN de casi cualquier tipo y grado de agarosa. Esta técnica se fundamenta especialmente en el uso de una matriz de sílice (Glassmilk) a la que se une al ADN de cadena sencilla y doble separándolo de otro tipo de contaminantes (Brown, 1991) y se realiza de la siguiente manera:

1. Observar el gel en el transiluminador, cortar la banda deseada de ADN y colocarla en un tubo de microcentrífuga previamente pesado. Medir el volumen considerando que 1 g equivale aproximadamente a 1 ml de agarosa y agregar 3 volúmenes de NaI 6M. En el caso de que se haya utilizado amortiguador TBE en el gel agregar 0.5 volúmenes de modificador TBE y 4.5 volúmenes de NaI por peso de agarosa.
2. Calentar el tubo de 45 a 55°C hasta que la agarosa esté totalmente disuelta. Esto es en aproximadamente 5 min.
3. Agregar 5 µl de Glassmilk para una solución que contenga menos de 5 µg de ADN e incubar en hielo por 5 min mezclando cada 1 ó 2 min, tratando de que el Glassmilk se mantenga homogéneamente en solución.

En caso de una mayor cantidad de ADN, adicionar 1  $\mu$ l de Glassmilk por cada 0.5  $\mu$ g de ADN adicional.

4. Dar un pulso de centrifugación de 5 seg en microfuga y descartar el NaI.
5. Lavar la pastilla de Glassmilk con 200-700  $\mu$ l de New Wash frío (solución concentrada de NaCl, Tris, EDTA y etanol). Dar un pulso de centrifugación de 5 seg y descartar el sobrenadante. Repetir 2 veces más el lavado con New Wash.
6. Una vez terminados los lavados la pastilla de Glassmilk resultante es resuspendida en el menor volumen posible de amortiguador TE o bien en agua estéril incubando de 45 a 55 °C por 2-3 min.
7. Centrifugar por 30 seg recuperando la elución que contiene el ADN. En este paso la recuperación es casi completa. Si es necesario se puede hacer una segunda elución para aumentar la recuperación.
8. Tomar una alícuota de la elución final y estimar la cantidad y eficiencia de recuperación por electroforesis de la muestra en gel de agarosa al 1%.
9. El ADN obtenido a partir de la purificación por Genclean es utilizado directamente para cualquier reacción enzimática.

**IV.6. Obtención de ADN de una biblioteca de ADNc de valna de frijol clonada en  $\lambda$ ZipLox.**

$\lambda$ ZipLox es un vector de expresión derivado del bacteriofago  $\lambda$  el cual combina la capacidad de clonación de ADN complementario con la conveniente y fácil manipulación de plásmidos. En este sistema el ADN puede ser recuperado sin necesidad de subclonar efectuando la escisión *in vivo* para generar la replicación autónoma del plásmido pZL1 empleando la cepa DH10B (ZIP) de *E. coli* (Fig. 2). El proceso de escisión *in vivo* esta basado en la existencia, en el bacteriofago P1, de un sistema de recombinación sitio-especifico compuesto de dos elementos: un locus que actúa en *cis* (*loxP*) y una proteína (*Cre*) la cual cataliza el entrecruzamiento de secuencias de los dos sitios *loxP* que se encuentran flanqueando a pZL1. Una vez liberado y circularizado pZL1 por medio de la

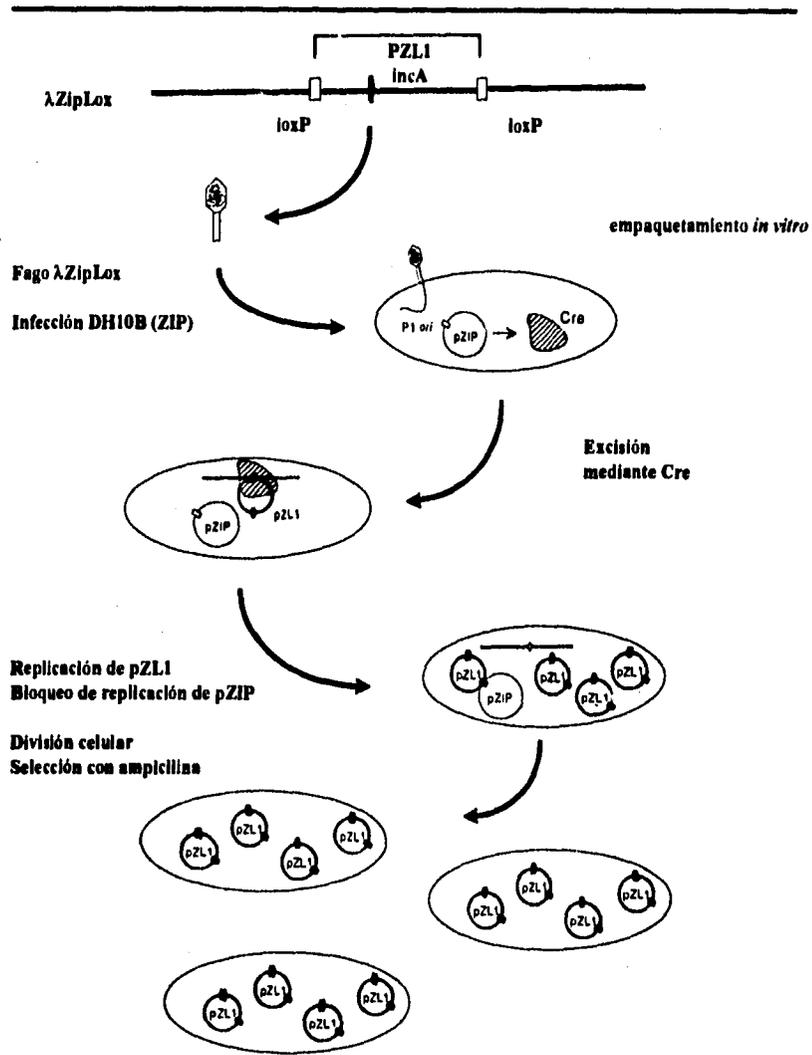


Figura 2. Mecanismo de excisión *in vivo* de pZL1 de  $\lambda$ ZipLox.

---

MATERIALES Y METODOS.

acción de Cre, el locus *incA* de este plásmido bloquea físicamente el origen de replicación de pZIP, plásmido propio de la cepa DH10B, el cual codifica a la proteína Cre. De esta manera se favorece la réplica de pZL1 y se inhibe la de pZIP (D'Alessio, 1992).

Para conseguir ADN complementario de la biblioteca clonada en  $\lambda$ ZipLox se siguió el siguiente protocolo:

1. Activar las bacterias *E. coli* cepa Y1090 con 200  $\mu$ l de medio S.O.C. (20 gr de peptona, 5 gr de extracto de levadura, 0.5 gr de NaCl, KCl 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y glucosa 20 mM por litro) e incubar por 10 min a 37 °C.
2. Plaquear las bacterias en medio LB (10 g triptona, 5 g extracto de levadura, 10 g de NaCl y 15 g de agarosa por litro) conteniendo 10  $\mu$ g/ml de kanamicina y 0.2% de maltosa e incubar a 37 °C durante toda la noche.
3. Tomar una sola colonia e inocular 10 ml de medio LB con 10  $\mu$ g/ml de kanamicina y 0.2% de maltosa e incubar a 37 °C durante toda la noche con agitación a 200 rpm.
4. Infectar 100  $\mu$ l de cultivo de DH10B (ZIP) con  $1 \times 10^5$  ufp de fagos recombinantes  $\lambda$ ZipLox de la biblioteca de ADN complementario. Incubar a 37 °C por 30-45 min.
5. Si finalizar la incubación agregar 3-6 ml de top-agarosa (10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 0.94 g de MgCl<sub>2</sub> y 7.5 g de agarosa por litro) a 50 °C. Mezclar rápidamente por inversión y vaciar el contenido inmediatamente en cajas con medio NZY (10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 0.94 g de MgCl<sub>2</sub> y 15 g de agar por litro).
6. Esperar a que solidifique el top-agarosa e incubar a 37 °C de 8-12 hrs con las cajas de Petri invertidas.
7. Una vez que las placas de lisis se han desarrollado al tamaño deseado, enfriar las cajas a 4 °C por un tiempo mínimo de 2 hrs.
8. Colocar el filtro de nylon (Gene Screen <sup>TM</sup>) sobre la placa por algunos segundos, asegurándose de que no quede aire entre la membrana y el top-agar.

9. Levantar cuidadosamente el filtro con pinzas teniendo la precaución de no rasgar la capa de top-agarosa. Colocar el filtro en una caja estéril de Petri conteniendo 3 ml de amortiguador de dilución PDB (NaCl 0.1 M, MgSO<sub>4</sub> 0.01 M, Tris HCl [pH 7.5], gelatina 0.1%) y lavar varias veces las partículas de los fagos. Finalmente levantar el filtro permitiendo caer la solución totalmente.

10. El fago eluido puede ser utilizado para la reacción de síntesis amplificadora por PCR.

11. ADN plasmídico de doble cadena fue empleado para las reacciones de síntesis amplificadora por PCR, para su preparación se parte de la infección de *E. coli* DH10B (ZIP) con el fago λZipLox, esto se inocula a 25 ml de medio NZY con 100µg/ml de ampicilina incubando a 37 °C durante toda la noche con agitación a 200 rpm y se continúa con la extracción de ADN plasmídico.

#### •AMPLIFICACION DE ADN POR PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION).

##### IV.7. Principio del método.

La técnica relativamente reciente de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una idea original de Kary Mullis en 1986 recibiendo por esto el premio Nobel, posteriormente fue desarrollada significativamente por Henry Erlich, Norman Arnheim y Randy Saiki (Saiki *et al.* 1988). Nuevas metodologías y aplicaciones basadas en esta técnica se están descubriendo por lo que PCR se ha convertido en una herramienta muy poderosa utilizada en biología molecular, la cual ha cambiado mucho la manera en la cual eran realizados una amplia variedad de experimentos.

La técnica de PCR es un método enzimático de síntesis de múltiples copias de un segmento específico de ADN preseleccionado que se encuentra entre regiones de secuencia conocida (Figura 3). Una amplificación de esta magnitud facilita enormemente procedimientos subsecuentes como la obtención de sondas específicas, clonación de ADN genómico y ADNc, así como su secuenciación directa. La reacción de amplificación se lleva a cabo empleando dos oligonucleótidos que son utilizados como iniciadores para una serie de reacciones sintéticas que son catalizadas por una ADN polimerasa termoestable. Estos oligonucleótidos son diferentes secuencias que son

complementarias a secuencias que 1) se sitúan en cadenas opuestas del ADN utilizado como molde y 2) flanquean el segmento de ADN que va a ser amplificado.

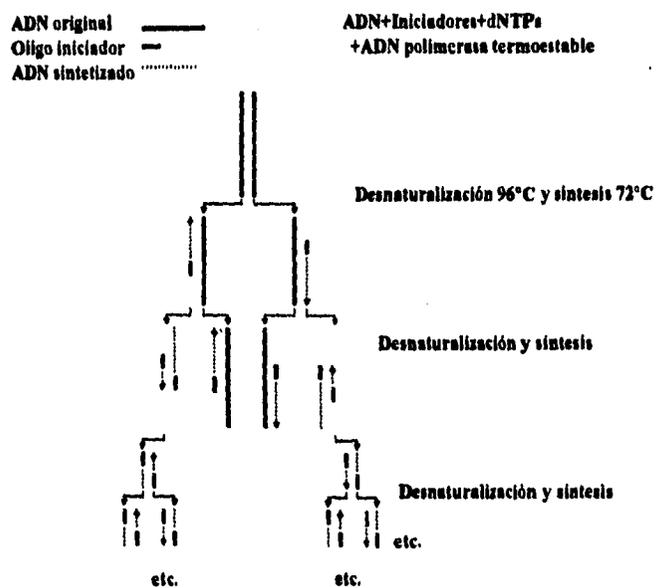


Figura 3. Amplificación de ADN por PCR. El ADN para ser amplificado es desnaturalizado en presencia de una ADN polimerasa termoestable, un exceso de desoxinucleótidos trifosfatos y oligonucleótidos que se unen específicamente a una secuencia conocida iniciando la síntesis. El producto es acumulado en forma exponencial en cada ciclo de amplificación.

El ADN utilizado como molde es primeramente desnaturalizado en presencia de concentraciones excesivas de cada uno de los oligonucleótidos y los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos A, C, G y T. Posteriormente la reacción es llevada a una temperatura en la que los oligonucleótidos iniciadores se unen a su correspondiente cadena complementaria. Los iniciadores son orientados con terminaciones 3' de tal manera que la síntesis por la ADN polimerasa se extienda a través de la

región del ADN molde entre los iniciadores. El principal producto de esta reacción exponencial es un segmento de doble cadena de ADN en donde la terminación de la síntesis esta definida por los extremos 5' de los iniciadores y su tamaño está en función de la distancia entre estos. El hecho de que cada iniciador es complementario a una de las nuevas cadenas sintetizadas permite que cada nueva cadena pueda participar como molde en ciclos subsecuentes de extensión iniciadora y de amplificación del segmento. De este modo cada ciclo de desnaturalización, iniciación de la complementación y extensión enzimática duplica la cantidad de ADN del ciclo previo.

#### **IV.8. Selección y diseño de los oligonucleótidos iniciadores.**

Uno de los factores más importantes para la realización de la técnica PCR es la selección de iniciadores. Se deben observar diversas condiciones, dependiendo de la información disponible de secuencias de ADN para estar en posibilidad de encontrar un par de iniciadores "ideales". El principal criterio que debe ser considerado es la capacidad del iniciador para la formación de un duplex híbrido estable en un sitio específico de ADN. La estabilidad de los iniciadores está en función de la selección de aminoácidos que se haga. Lo mejor es seleccionar secuencias altamente conservadas, con mínimas degeneraciones y tomando en cuenta el probable uso de codones. Su tamaño recomendable es de 20-28 nucleótidos con un 50-60% de composición G+C además de que el tamaño de ADN a amplificar entre los iniciadores también debe ser considerado.

Los oligonucleótidos iniciadores utilizados en el presente trabajo fueron los siguientes:

#### **Oligo Forward**

**5' GGC(TGA)AAG(A)CAA(G)G(C)AA(G)GTC(GTA)ATGA(G)TT(ACG)GGC(ATG)TA 3'**

#### **Oligo Reverse**

**3' CTC(T)TACATG(A)TTA(G)C(G)TC(T)ACCGGA(TGC)AAG(A)AA 5'**

Los paréntesis indican las degeneraciones en el código genético tomando en cuenta el probable uso de codones. La síntesis de estos oligonucleótidos fue realizada en un sintetizador de ADN (Applied Biosystems) en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Estos oligonucleótidos se encuentran flanqueando una zona del ADN bastante conservada que codifica para las secuencias deducidas de aminoácidos de PEPCs hasta ahora conocidas (Figura 4). En esta región están comprendidas secuencias muy conservadas que contienen residuos de aminoácidos los cuales se ha propuesto son esenciales o están involucrados en: el sitio activo de la enzima (GYSDSGKDAG) y el sitio de unión al sustrato (FHGRGGTVGRGGGP) (Cushman *et al.*, 1989; Jiao *et al.*, 1990; Créatin *et al.*, 1991; Poetsch *et al.*, 1991). Además de un residuo de cisteína (cis<sup>687</sup>) de las 5 a 7 que pueden estar involucradas en las interacciones entre las subunidades para mantener la estructura tetramérica de la enzima (Andreo *et al.*, 1987) o en la regulación redox (Chardot y Wedding, 1992).

Ahora bien como estos experimentos tenían como objeto obtener una sonda específica fue necesario descartar la posibilidad de que estas secuencias también se encontraran conservadas en otras enzimas que utilizan a PEP como sustrato como la fosfoenolpiruvato cinasa y la fosfoenolpiruvato carboxicinasa. El resultado de la búsqueda de similitud de secuencias en el Genbank mostró que estas secuencias son exclusivas para PEPC.

#### IV.9. Reacción de amplificación por PCR.

1. En un tubo eppendorf estéril de 0.5 ml agregar en el orden siguiente: 34  $\mu$ l de agua estéril, 5  $\mu$ l de amortiguador de amplificación 10X (Tris-HCl [pH 8.4] 200 mM y KCl 500 mM), 4  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1  $\mu$ l de una mezcla 10 mM de desoxinucleótidos trifosfato, 200 ng (en 2  $\mu$ l de agua) de oligo iniciador forward y 200 ng (en 2  $\mu$ l de agua) de oligo iniciador reverse, 100 ng de ADN molde en 1-5  $\mu$ l y por último 1 unidad de Taq DNA polimerasa (Gibco BRL). Es conveniente para múltiples reacciones, preparar una mezcla maestra para minimizar la pérdida de reactivos y disminuir en lo posible el pipeteo.
2. Mezclar perfectamente y agregar 40  $\mu$ l de aceite mineral (Sigma M-3516) para prevenir la evaporación de la muestra durante repetidos ciclos de calentamiento y enfriamiento.
3. Incubar la muestra en un ciclador térmico (Gibco BRL) a 94° C por 10 min para desnaturalizar

•Oligo Forward ☺									
• <i>Glycine max</i>	mringkqev	miGYSDSGKD	AGrfsaawql	ykaqeelinv	akqygvklm	FHGRGGTVGR	GGGPhlail	sppetihs	663
• <i>Medicago sativa</i>	inridgkqev	miGYSDSGKD	AGrfsaawql	ykaqedlikv	akqfgvklm	FHGRGGTVGR	GGGPhlail	sppetihs	
• <i>Nicotiana tabacum</i>	mringkqev	miGYSDSGKD	AGrfsaawql	ykaqeelikv	akehgvklm	FHGRGGTVGR	GGGPhlail	sppdtihs	
• <i>Sorghum vulgare C3</i>	knringkqev	miGYSDSGKD	AGrfsaawql	ykaqeelvqv	akeygvklm	FHGRGGTVGR	GGGPhlail	sppetvhs	
• <i>Flaveria pringlei</i>	nrirdgkqev	miGYSDSGKD	AGrfsaawql	yktqeqivki	akefgvklvi	FHGRGGTVGR	GGGPhlail	sppdtihs	
• <i>Zea mays C3</i>	qrfrngkqev	miGYSDSGKD	AGrfsaawql	ykaqeelikv	akdfgvklm	FHGRGGTVGR	GGGPhlail	sppdtihs	
• <i>Solanum tuberosum</i>	mringkqev	miGYSDSGKD	AGrfsaawql	ykaqeeliqv	akcfdvklm	FHGRGGTVGR	GGGPhlail	sppetihs	
• <i>Zea mays C4</i>	mdrikqkqv	mvGYSDSGKD	AGrfsaawql	yraqeemaqv	akrygvklm	FHGRGGTVGR	GGGPhlail	sppetvhs	
• <i>Sorghum vulgare C4</i>	mringkqev	miGYSDSGKD	AGrfsaawqm	ykaqeelikv	akhygvklm	FHGRGGTVGR	GGGPhlail	sppdtihs	
• <i>Flaveria trinervia</i>	nrirdgkqev	miGYSDSGKD	AGrfsaawql	yktqeqivki	akefgvklvi	FHGRGGTVGR	GGGPhlail	sppdtihs	
• <i>Saccharum hibrido</i>	mringkqev	miGYSDSGKD	AGrfsaawql	ykaqeelinv	aklygvklm	FHGRGGTVGR	GGGPhlail	sppetihs	
			•Sitio Activo				•Unión a PEP		
☻ Oligo Reverse									
• <i>Glycine max</i>	lrvtqgevi	eqsfgehlc	ftrlqrftaa	_____ =>	gaafkhvi..	.ckdvrmihv	lqemynewpff	819	
• <i>Medicago sativa</i>	lrvtqgevi	eqsfgehlc	ftrlqrftaa	_____ =>	gaafgvv..	.qkdvknllm	lqemynewpff		
• <i>Nicotiana tabacum</i>	lrvtqgevi	eqsfgehlc	ftrlqrftaa	_____ =>	gaafkyai..	.dkdiknlrm	lqemynewpff		
• <i>Sorghum vulgare C3</i>	lrvtqgevi	eqsfgehlc	ftrlqrftaa	_____ =>	gaafgyai..	.qkdvknlsv	lqemynewpff		
• <i>Flaveria pringlei</i>	lrvtqgevi	eqsfgehlc	ftrlqrftaa	_____ =>	gaafkhai..	.kkdsknlqm	lqemynewpff		
• <i>Zea mays C3</i>	lrvtqgevi	eqsfgehlc	ftrlqrftaa	_____ =>	gaafkvi..	.qkdirmllm	lqemynewpff		
• <i>Solanum tuberosum</i>	lrvtqgevi	eqsfgehlc	ftrlqrftaa	_____ =>	gaafkyai..	.ekdiknlrm	lqemynewpff		
• <i>Zea mays C4</i>	lrvtqgevi	eqsfgehlc	ftrlqrftaa	_____ =>	gaafkai..	.dkdvrmfvq	lqemynewpff		
• <i>Sorghum vulgare C4</i>	lrvtqgevi	eqsfgehlc	ftrlqrftaa	_____ =>	gaafkai..	.qkdirmihv	lqemynewpff		
• <i>Flaveria trinervia</i>	lrvtqgevi	eqsfgehlc	ftrlqrftaa	_____ =>	gaafkhai..	.gkdsknlqm	lqemynewpff		
• <i>Saccharum hibrido</i>	lrvtqgevi	eqsfgehlc	ftrlqrftaa	_____ =>	gaafkhvi..	.dkdirmllm	lqemynewpff		

Figura 4. Dos oligonucleótidos fueron sintetizados flanqueando una región altamente conservada de PEPC, incluyendo secuencias involucradas en el sitio activo (GYSDSGKDAG) y la unión al sustrato (FHGRGGTVGEGGPF). Los primers 5'GGCAAGCAAGAAGTCATGATTGGCTA3', 3'CTCTACATGTTACTCACCGGAAGAAS' fueron utilizados para la síntesis amplificadora por PCR. Comparación de secuencias de aminoácidos determinadas por el programa de alineamiento GCG.

completamente el ADN.

4. Ciclar la temperatura de la reacción de amplificación de la forma siguiente: a) desnaturalización a 94 °C por 1 min b) complementación de los iniciadores a 55 °C por 1 min y c) extensión a 72 °C por 2 min. El número de ciclos debe repetirse 30-50 veces.
5. Incubar la reacción a 72° C por 10 min.
6. Analizar los productos de amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando los marcadores de peso molecular apropiados.

•CONSTRUCCION E IDENTIFICACION DE MOLECULAS DE ADN RECOMBINANTE.

La primera etapa experimental real de la clonación molecular es la construcción de moléculas recombinantes por la inserción de fragmentos de ADN dentro de un vector (Fig. 5). En este sentido, uno de los procedimientos mas característicos en biología molecular es la utilización de enzimas con actividades específicas para llevar a cabo manipulaciones controladas de moléculas de ADN.

**IV.10. Clonación molecular.**

—Preparación del vector plasmídico para la clonación molecular (Brown, 1991).—

1. Digerir 10-20 µg de plásmido circularizado pTZ18R (Pharmacia) con un exceso de 2-3 veces de la enzima de restricción deseada por 2-4 hrs a la temperatura de restricción indicada. Tomar una alícuota y por electroforesis en un gel de agarosa al 1% observar si la digestión es completa comparando con un plásmido no linealizado. De no ser así, agregar más enzima y continuar con la incubación.
2. Cuando la digestión se ha completado, extraer la muestra con fenol:cloroformo y precipitar el ADN con 1/10 de volumen de NaOAc 3M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol frío. Recuperar el ADN por centrifugación a 12,000 xg en microfuga y disolver en 18 µl de agua estéril.
3. Agregar 2 µl de amortiguador de CIP 10X (ZnCl<sub>2</sub> 0.1 M, MgCl<sub>2</sub> 0.1 M y Tris-HCl 0.5 M [pH 8.3]) y 1 µl de fosfatasa alcalina CIP (1 unidad) e incubar a 37 °C por 1 hr. Esta

MATERIALES Y METODOS

enzima cataliza la desfosforilación 5' del ADN.

4. Terminada la reacción correr la muestra en electroforesis en gel de agarosa al 1% y purificar el ADN por el método GeneClean.

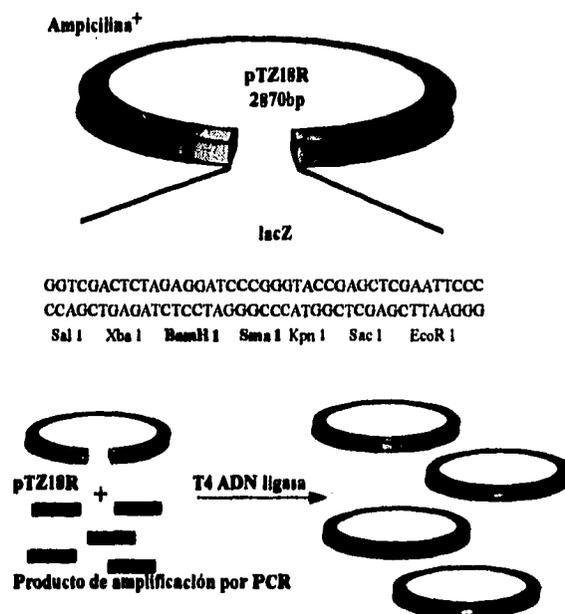


Figura 5. Clonación de productos de amplificación por PCR en el vector pTZ19R. La T4 ADN ligasa cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre fosfato 5'-hidroxilo 3' en ADN de doble cadena.

—Fosforilación de ADN (Brown, 1991).—

5. Purificar el ADN producto de la amplificación por PCR por electroforesis de la reacción completa y recuperación por GeneClean.
6. Digerir el ADN con la enzima de restricción correspondiente por el tiempo y temperatura adecuada.

7. Agregar 1/10 de volumen de amortiguador PNK 10X (Tris-HCl 0.5 M [pH 7.6], MgCl<sub>2</sub> 0.1 M, ditioneitol 50 mM, espermidina 1 mM, EDTA 1 mM [pH 8.0]), ATP 1 mM y 1 µl de T4 polinucleótido cinasa (1 unidad) e incubar 30 min a 37 °C. Esta enzima cataliza la transferencia de  $\gamma$ -fosfato del ATP a las terminaciones 5' del ADN.

8. Una vez que la reacción ha terminado proceder con la purificación por GeneClean.

—Ligado del inserto de ADN al vector (Brown, 1991).—

9. Preparar la reacción de ligado mezclando lo siguiente: 0.1 µg de ADN plasmídico linealizado y desfosforilado más 0.3 µg de ADN fosforilado. Es importante la selección de concentraciones apropiadas vector-ADN que van a utilizarse, dependiendo del experimento y tipo de unión. En este caso la proporción es 1:3 en un ligado de extremos cohesivos.

10. Agregar 1 µl de amortiguador de ligado 10X (Tris-HCl 0.5 M [pH 7.6], MgCl<sub>2</sub> 100 mM, ditioneitol 50 mM, 500 µg/ml de BSA) y 1 µl de T4 ADN ligasa (0.5 unidades).

11. Incubar la reacción a 16° C por 16-18 hrs. Una ligación completa y correcta puede analizarse con la transformación de células competentes.

#### IV.11. Transformación de células competentes.

La etapa principal del experimento de clonación es la generación e identificación de clonas recombinantes por la introducción de las moléculas de ADN sintetizadas dentro de células huésped. Para la transformación fueron utilizadas células competentes *E. coli* cepa *Epicurian coli* NM522. La identificación se fundamenta en la  $\alpha$ -complementación (Sambrook, 1989). El vector de clonación como la mayoría de los que son comúnmente utilizados, posee una secuencia que codifica la  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*). En esta región codificadora se encuentra un sitio de policlonación que no interrumpe el marco de lectura dando como resultado la intercalación de un pequeño número de aminoácidos dentro del fragmento N-terminal del gen (Fig. 5). Vectores de este tipo son utilizados en células huésped que codifican para la porción C-terminal de  $\beta$ -galactosidasa. Si bien ninguno de los dos fragmentos es por sí mismo activo, estos pueden asociarse para formar una proteína

enzimáticamente activa (Sambrook, 1989).

Este tipo de complementación en el cual la delección del segmento operador-proximal del gen *lacZ* es complementado por mutantes  $\beta$ -galactosidasa-negativos que tienen la región operadora-proximal intacta es llamada  $\alpha$ -complementación. Las bacterias  $Lac^+$  que son resultado de la  $\alpha$ -complementación son reconocibles porque las colonias son de color azul en presencia del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosa (X-gal). Ahora bien, la inserción de un fragmento de ADN dentro del sitio de policonación del plásmido da como resultado la producción de un fragmento N-terminal que no es capaz de realizar la  $\alpha$ -complementación. La bacteria que contenga plásmidos recombinantes por esta razón formará colonias blancas  $Lac^-$ .

1. Agregar a la reacción de ligación 90  $\mu$ l de células competentes e incubar en hielo 30 min.
2. Transferir los tubos a 42 °C por 2 min.
3. Agregar 300  $\mu$ l de medio LB después del choque térmico e incubar por 1 hr a 37 °C.
4. Centrifugar 20 seg y resuspender en 100  $\mu$ l de agua, 10  $\mu$ l IPTG (isopropil tio  $\beta$ -D-galactosido) y 50  $\mu$ l de X-gal al 2% en dimetilformamida.
5. Plaquear en cajas de medio LB con ampicilina (60  $\mu$ g/ml). Incubar 12-18 hrs a 37 °C.
7. Seleccionar las colonias blancas y transferirlas a una nueva caja con LB con antibiótico. Incubar 12-18 hrs a 37 °C.

#### **IV.12. Minipreparación ADN plasmídico.**

La estructura de plásmidos recombinantes puede ser verificada rápidamente por análisis de restricción de minipreparaciones de ADN plasmídico.

1. Cultivar la clona deseada en medio líquido LB con el antibiótico requerido a 37 °C durante toda la noche con agitación a 200 rpm.
2. Tomar 1.5 ml de medio en un tubo y centrifugar por 10 seg en microfuga a 12,000 xg.
3. Descartar el sobrenadante y resuspender perfectamente la pastilla en 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O estéril.

---

MATERIALES Y METODOS.

4. Agregar 300  $\mu$ l de buffer TENS (Sol. TE [pH 8.0] conteniendo SDS al 0.5 % y NaOH 0.2 M). Mezclar en vortex de 2-5 seg.
5. Adicionar 150  $\mu$ l de NaOAc 3M pH 5.2. Mezclar en vortex de 2-5 seg.
6. Centrifugar por 2 minutos y pasar el sobrenadante a un tubo nuevo.
7. Agregar 900  $\mu$ l de etanol absoluto frío, mezclar perfectamente y centrifugar por 2 min.
8. Lavar la pastilla 2 veces con etanol al 70% centrifugando 2 min en cada uno de los lavados.
9. Resuspender la pastilla agregando 40-100  $\mu$ l de agua estéril.

**IV.13. Extracción de ADN plasmídico.**

Es indispensable que el ADN que vaya a ser secuenciado esté completamente puro; su calidad es un factor crítico en este tipo de metodologías. Las preparaciones de ADN plasmídico están comúnmente contaminadas con oligodeoxiribonucleótidos y ribonucleótidos, los cuales pueden servir como iniciadores al azar o pueden tener contaminantes que puedan inhibir reacciones enzimáticas posteriores. El ADN plasmídico puede ser purificado con el siguiente método con buenos resultados en cuanto a rendimiento y pureza. (Brown, 1991)

1. Cultivar la clona deseada en 25 ml de medio LB con el antibiótico requerido a 37 °C durante toda la noche.
2. Centrifugar las células a 5 000 xg en rotor JA-20 por 10 minutos.
3. Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 5 ml de NaCl 10 mM, repetir la centrifugación.
4. Resuspender la pastilla en 0.6 ml de amortiguador de lisis (Tris HCl 25 mM [pH 8.0], EDTA 10 mM, Sacarosa al 15% y Lisozima 2 mg/ml), incubar 20 min en hielo.
5. Agregar 1.2 ml de una solución conteniendo 0.2 M NaOH, 1% SDS. Mezclar suavemente e incubar 10 min en hielo.
6. Agregar 0.75 ml de Acetato de sodio 3M pH 5.2. Mezclar cuidadosamente e incubar 20 min en hielo. Centrifugar 15 min a 6500 xg en el rotor JA-20.

---

MATERIALES Y METODOS.

7. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo. Agregar 5  $\mu$ l de RNasa 10 mg/ml e incubar 30 min a 37°C.
8. Extraer 2 veces con un volumen igual de fenol:cloroformo.
9. Precipitar con 2 volúmenes de etanol absoluto por 5 min a temperatura ambiente.
10. Centrifugar 10 min a 8000 xg.
11. Lavar la pastilla con etanol al 70% y resuspender en 168  $\mu$ l de agua estéril y transferir a un tubo eppendorf. Adicionar 32  $\mu$ l de NaCl 5M. Mezclar perfectamente y agregar 200  $\mu$ l de PEG (polietilenglicol) 8000 al 13%.
12. Mezclar perfectamente e incubar en hielo por una hora.
13. Centrifugar en frío durante 10 min a 12,000 xg.
14. Descartar el sobrenadante, centrifugar nuevamente tratando de eliminar lo más posible el polietilenglicol.
15. Lavar la pastilla con etanol al 70%, centrifugar 5 min y secar en vacío 1-2 min.
16. Resuspender la pastilla en 50  $\mu$ l de TE [pH 8.0] o bien agua estéril y cuantificar su concentración leyendo 1  $\mu$ l a 260 nm.

•INMOBILIZACION DE ADN Y ANALISIS DE HIBRIDACION.

**IV.14. Transferencia por capilaridad de ADN a membranas de nylon.**

Los análisis de ADN con hibridación por Southern-blot son usualmente realizados por la transferencia de ADN que es desnaturalizado *in situ* y transferido del gel a un soporte sólido generalmente membrana de nylon o nitrocelulosa. La posición relativa del ADN es conservada durante la transferencia al soporte y de esta manera el ADN unido al filtro puede ser hibridado con ADN marcado radiactivamente (Sambrook, 1989).

1. Cortar la membrana de nylon (Gene Screen <sup>TM</sup>) exactamente del mismo tamaño del gel.
2. Humedecer la membrana en agua destilada por algunos segundos.

3. Equilibrar la membrana en SSC 10X (NaCl 3 M, Citrato de sodio 0.3 M) por 15 min.
4. Colocar el gel en una solución 0.25 N HCl por 15 min en agitación constante.
5. Lavar el gel con agua destilada para remover el exceso de HCl.
6. Colocar el gel en una solución 0.4 N NaOH/0.6 M NaCl por 30 min con agitación constante.
7. Posteriormente colocar el gel en una solución 1.5 M NaCl/0.5 M Tris-HCl [pH 7.5] por 30 min con agitación constante.
8. En la movilización capilar de ADN de geles de agarosa a un soporte sólido se utilizó como solución de transferencia SSC 10X. La solución es llevada de un reservorio inferior pasando a través del gel hasta una pila de papel absorbente. El ácido nucleico es eluido del gel por la corriente en movimiento de la solución y es depositado en la membrana de nylon. Un peso aplicado encima de la pila de papel absorbente ayuda a asegurar estrechamente la conexión entre las capas de material utilizado en el sistema de transferencia.

—Fijación de ADN.—

9. Una vez que la transferencia se ha completado (12-18 hrs) se retira la membrana del gel y se pone en una solución 0.4 N de NaOH por 1 min en agitación.
10. Neutralizar la membrana en 0.2 M Tris-HCl [pH 7.5]/SSC 1X por un minuto.
11. Para fijar el ADN una vez que la transferencia se completó, la membrana debe ser lavada en SSC 2X para eliminar los residuos de agarosa. Una vez hecho esto, se coloca la membrana en una pieza de papel filtro y se fija utilizando UV Crosslinker (Hoefer Scientific Ins.) por 2 min con una energía de 12000 microjoules por  $\text{cm}^2$  (Sambrook, 1989).

**IV.15. Marcaje y preparación de la sonda.**

Es conocido que los oligonucleótidos pueden servir como iniciadores para la síntesis de ADN en moldes de cadena sencilla por DNA polimerasas. Cuando los oligonucleótidos son de secuencias heterólogas pueden hibridar en muchas posiciones del ADN molde sirviendo de esta manera para iniciar la síntesis de cadena complementaria. El ADN sintetizado es marcado radiactivamente con

---

MATERIALES Y METODOS

una alta actividad específica utilizando [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dNTPs como precursores, (Sambrook, 1989).

—Reacción de marcaje.—

Para el marcaje del ADN se utilizó el Kit Random Primer Extensión System (DuPont).

1. El ADN para poder ser marcado requiere estar linearizado. La cantidad de ADN utilizado en la reacción es de 50-100 ng en un volumen no mayor a 12  $\mu$ l.
2. Desnaturalizar el ADN calentando la muestra a 95-100 °C por 10 min e inmediatamente poner en hielo.
3. Agregar 6  $\mu$ l de amortiguador 5X de Random Primer Extensión (5X hexanucleótidos al azar en Tris [pH 7.6], MgCl<sub>2</sub> 0.1 M, BSA y 2-mercaptoetanol).
4. Agregar 6  $\mu$ l de una mezcla 5X de desoxinucleótidos trifosfatos al tubo de reacción.
5. Agregar la cantidad de agua desionizada requerida considerando un volumen final de reacción de 30  $\mu$ l.
6. Adicionar 2  $\mu$ l de dCT<sup>32</sup>P (actividad específica 3000-6000 Ci/mmol, con una concentración de 20 mCi/ml).
7. La reacción es iniciada por la adición de 1  $\mu$ l del fragmento Klenow ADN polimerasa (2.5 unidades).
8. Mezclar y dar un pulso de centrifugación. La reacción se deja incubando 3 hrs a temperatura ambiente.

—Purificación de la sonda.—

La purificación de la sonda se hizo por medio de columna de Sephadex, esto es con el fin de separar el ADN marcado de los nucleótidos no incorporados (Sambrook).

9. A una jeringa desechable de plástico de 1 ml colocarle una malla de fibra de vidrio estéril y compactarla con el émbolo.
10. Llenar la jeringa con Sephadex G-50 equilibrado con amortiguador STE [pH 8.0] y empaquetar centrifugando a 700 xg por 3 min a temperatura ambiente.

Agregar el sephadex y recentrifugar hasta que el volumen de la columna empacada sea aproximadamente de 0.9 ml.

11. Agregar 0.1 ml de amortiguador STE a la columna y recentrifugar. Repetir 3 veces más.

12. Aplicar la muestra de ADN en la columna en un volumen total de 0.1 ml (utilizando STE para ajustar el volumen). Colocar la columna en un tubo cónico de 15 ml conteniendo en el fondo un tubo eppendorf sin tapa.

13. Colectar la muestra centrifugando a 700 xg por 3 min a temperatura ambiente. Medir el volumen recuperado.

—Cuantificación de la actividad específica.—

Antes de agregar la sonda radiactiva al sistema de hibridación es indispensable cuantificar su actividad específica (Sambrook, 1989). Para esto se realiza lo siguiente:

14. Tomar 1 µl de la sonda purificada y ponerla en una solución fría de TCA al 10% (Acido tricloro acético).

15. Adicionar 5 µl de ADN-esperma de salmón desnaturalizado (10 mg/ml).

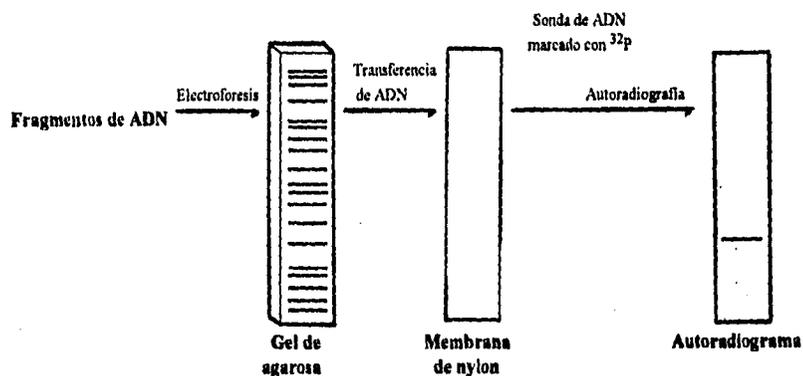
16. Filtrar al vacío a través de un filtro GF/C Whatman y posteriormente hacer lavados en vacío con 10 ml TCA al 10% y luego con 20 ml de etanol frío.

17. Secar el filtro a temperatura ambiente.

18. Introducir el filtro en un vial con 5 ml de líquido de centelleo (0.1 gr 2,2-P-Fenilenbis[5-feniloxazol] 5 gr 2,5-Difeniloxazol, 1000 ml de Tolueno) y leer en un contador de centelleo en un canal de apertura de 50 a 1700.

**IV.16. Hibridación por Southern-blot.**

La hibridación con ácidos nucleicos es una técnica fundamental en biología molecular. Virtualmente cualquier aspecto de clonación, caracterización y análisis de genes involucra la hibridación de una cadena de ADN con otra para analizar la localización y complementaridad de secuencias particulares (Brown, 1991).



**Figura 6. Hibridación por Southern blot. Un fragmento de ADN que contiene determinada secuencia puede ser identificado hibridando con una sonda marcada con  $^{32}\text{P}$  complementaria a la secuencia que se busca. El fragmento que contiene la secuencia se visualiza después por autoradiografía.**

1. Humedecer la membrana de nylon en SSC 2X por aproximadamente 1 min.
2. Colocar la membrana adherida a la pared del tubo de hibridación, con el lado en el que se transfirió el ADN hacia el interior del tubo.
3. Agregar la solución de prehibridación (fosfatos 0.25 M [pH 7.0], SDS 7%, EDTA 1 mM y BSA 1%) en una cantidad aproximada de 50  $\mu\text{l}$  por  $\text{cm}^2$  de membrana.
4. Prehibridar por 2 hrs o durante toda la noche en el horno de hibridación (R. Scientific) a 3.5 rpm a una temperatura adecuada en función a la homología existente entre el ADN utilizado como sonda y el ácido nucléico a detectar. La temperatura de hibridación en nuestro caso fue de 65 °C.
5. Desnaturalizar la sonda purificada calentando a 95-100 °C por 10 min y pasar inmediatamente a hielo por 15 min antes de agregar a la solución de prehibridación.

6. La actividad específica de la sonda marcada debe estar alrededor de  $10^8$ - $10^9$  dpm/ $\mu$ g de ADN y en una concentración aproximada de 10 ng/ml para una hibridación óptima.
7. Hibridar 12-16 hrs a 3.5 rpm. La temperatura de hibridación en este caso fue de 55 °C.
8. Los lavados de la membrana fueron de la siguiente manera: 2 lavados SSC 2X, 0.1 % SDS por 10 min a temperatura ambiente (T.A.), 2 lavados SSC 0.5X, 0.1 % SDS por 10 min a T.A y un lavado 0.125X SSC, 0.1 % SDS a 60 °C por 30 min. En cada caso se monitoreó la radiactividad fijada al filtro con un contador Geiger (Techn. Asoc. mod PUG) hasta observar un contraste notorio entre el fondo y el sitio de hibridación específico.
9. Después del último lavado, envolver la membrana cuidadosamente en plástico autoadherente procurando que no se seque.
10. Exponer con películas para rayos X (Cronex DuPont) a la membrana con intensificadores (Dupont Cronex Lighting plus-TML 400015) a -70 °C por el tiempo que se considere necesario.

•SECUENCIACION DE ADN.

**IV.17. Reacción de secuenciación por el método de Sanger.**

La técnica de secuenciación por el método de terminación de cadena tiene como principio el método enzimático Sanger (Sanger and Coulson, 1975) que se basa en la producción de poblaciones separadas de oligonucleótidos marcados radiactivamente a partir de un punto determinado y terminando en un residuo específico o en una combinación de residuos. Debido a que varias bases de ADN tiene la misma oportunidad de comenzar las terminaciones variables, cada población consiste de una mezcla de oligonucleótidos donde el tamaño está determinado por la localización de una base particular en el ADN original (Sambrook, 1989).

Un importante avance en esta técnica fue la introducción de los terminadores de cadena didesoxinucleótidos trifosfatos (ddNTPs). Estos difieren de los convencionales dNTPs en que carecen de un grupo hidroxilo en la posición 3' de la desoxiribosa. Estos pueden ser incorporados

por las ADN polimerasas en la síntesis de una cadena de ADN por medio de sus grupos 5' trifosfato, pero debido a la ausencia del residuo 3' hidroxilo, la formación de un enlace fosfodiéster con el dNTP sucesivo es prevenido. La extensión de la síntesis de la cadena es por esta razón imposible. De esta manera cuando un ddNTP es incluido con los cuatro dNTPs convencionales en una reacción de síntesis de ADN, se lleva a cabo una competencia entre la extensión de la cadena y la infrecuente, pero específica terminación. Los productos de la reacción son una serie de cadenas de oligonucleótidos en las que el tamaño está determinado por la distancia entre el iniciador usado para la síntesis de ADN y los sitios de terminación prematura. Utilizando los cuatro diferentes ddNTPs en cuatro reacciones enzimáticas separadas, son generadas poblaciones de oligonucleótidos con terminaciones en las posiciones A, C, G y T en el ADN original.

1. El ADN para poder ser secuenciado requiere estar desnaturalizado. La cantidad de ADN utilizado en cada una de las reacciones es de aproximadamente 5-10 µg.
2. Desnaturalizar el ADN agregando 2 µl de una solución recién preparada de NaOH 2N, 2 mM EDTA. Mezclar perfectamente e incubar 10 min a temperatura ambiente.
3. Agregar 8 µl de Tris-HCl 1M [pH 7.5] frío y 3 µl de NaOAc 3 M [pH 5.2] secuencialmente y mezclar. Adicionar 75 µl de etanol absoluto frío, mezclar e incubar a -70 °C por 20 min.
4. Centrifugar 10 min a 4 °C, remover el sobrenadante cuidadosamente y dar un lavado con etanol al 70% centrifugando 2 min y descartando el sobrenadante. Secar la pastilla perfectamente.

Para cada serie de cuatro líneas de secuenciación, una sola reacción de annealing y marcaje es utilizada.

—Reacción de complementación (annealing).—

5. En un tubo eppendorf de 0.6 ml mezclar lo siguiente: aproximadamente 20 ng de los oligonucleótidos iniciadores universales M13/pUC de secuenciación forward o reverse, 2 µl del amortiguador de reacción 5X (Tris HCl [pH 7.5] 1 M, MgCl<sub>2</sub> 1M, NaCl 5 M ) y 5 µg de ADN. El volumen total debe ser de 10 µl.

6. Para ADN de doble cadena la reacción de complementación es incubada a 37 °C por 30 min.

—Reacción de marcaje.—

7. Para reacciones clásicas, usualmente se diluye la mezcla de marcaje (dTTP 2 μM, dCTP 2 μM, dGTP 2 μM) 5 veces con agua estéril y la polimerasa 1:10 (sequenasa 2.0 BRL) con amortiguador de dilución frío.

8. A cada reacción de annealing agregar lo siguiente: 10 μl de ADN-iniciador (paso anterior), 1 μl de ditioneitol 0.1 M, 2 μl de mezcla de marcaje diluido, 0.5 μl de [α-<sup>32</sup>S] dATP y 2 μl de sequenasa diluida. Mezclar perfectamente e incubar 2-5 min a temperatura ambiente.

—Reacción de terminación.—

9. Marcar cuatro tubos con A, C, G y T y agregar 2.5 μl de la correspondiente mezcla de terminación ddNTP a cada tubo.

10. Cuando la reacción de marcaje se ha completado, transferir 3.5 μl de ésta a cada tubo de terminación A, C, G, y T.

11. Incubar a 37 °C por 5-10 min. Agregar 4 μl de solución de terminación (formamida 0.1%, xilencianol 0.1%, azul de bromofenol 0.1%, EDTA 10 mM [pH 8.0]) a cada reacción.

12. Las muestras pueden ser almacenadas a -20 °C por varios días. Cuando estas van a ser cargadas en el gel de secuenciación, calentar a 75-80 °C por 2 min y cargar inmediatamente de 2-3 μl.

#### IV.18. Electroforesis de gel de secuenciación.

—Preparación de gel desnaturante de poliacrilamida (Brown, 1991).—

Las poblaciones de oligonucleótidos producto de las reacciones de secuenciación son resueltas por electroforesis desnaturante con poliacrilamida de alta resolución bajo condiciones en las que se puede discriminar entre ADNs individuales que difieren en tamaño hasta por un solo nucleótido.

1. Lavar las placas de vidrio y separadores con detergente y enjuagar completamente con agua corriente, seguido por agua destilada asegurándose de que las placas queden perfectamente limpias.

2. Limpiar meticulosamente la superficie de las placas que van a estar en contacto con el gel con

---

MATERIALES Y METODOS.

acetona y posteriormente con metanol.

3. Tratar una superficie de cada placa con 200  $\mu$ l de una solución de silicón (Sigmacote) esparciendo uniformemente la solución con kimwipes. Dejar secar.

4. Ensamblar las placas colocando entre ellas los separadores y sellar alrededor con cinta aislante, asegurarse de que el sellado sea completo teniendo especial cuidado con las esquinas de las placas.

5. Para preparar 50 ml de gel desnaturizante de poliacrilamida (40-50 cm):

Disolver 24 g de urea, 2.5 g de acrilamida y 100 mg de bisacrilamida en amortiguador TBE 1.25X calentando a 37 °C. Desionizar por agitación con amberlita MB1 (2% p/v). Una vez que esté completamente disuelto filtrar a través de un disco Whatman.

6. Adicionar 25 mg de persulfato de amonio y 20  $\mu$ l de TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-1,2-diaminooctano). Mezclar y vaciar utilizando una jeringa de 50 ml. Iniciar el vaciado del gel con un ángulo horizontal de 45° aproximadamente y gradualmente disminuir la inclinación conforme el molde se llene tratando de que el flujo a través de las placas sea continuo y minimizando la entrada de aire.

7. Una vez que el vaciado es completo colocar el gel en posición vertical e inmediatamente insertar el peine colocándolo por la parte no dentada a una distancia aproximada de 0.5 cm. Colocar en las placas directamente sobre los separadores las pinzas de unión. Dejar polimerizar 1-2 hrs.

8. Remover la cinta aislante y lavar el exceso de urea con agua. Cuidadosamente remover el peine y reinsertarlo con la parte dentada justamente sobre la superficie del gel.

9. Colocar el gel en el aparato de electroforesis (Gibco BRL). Utilizar amortiguador TBE 1.25X como solución de corrida (alrededor de 300 ml por cámara) en las cámaras superior e inferior.

10. Conectar los electrodos con un poder constante de 35-40 watts (1500-2000 volts) y esperar aproximadamente 30 min antes de iniciar la corrida.

11. Lavar los pozos con amortiguador TBE utilizando una pipeta pasteur teniendo cuidado de remover totalmente los residuos de urea.

---

MATERIALES Y METODOS.

12. Las muestras deben ser desnaturalizadas a 75-80 °C por 2 min y cargadas inmediatamente en un volumen de 2-3 µl por reacción. Cada serie de secuenciación debe colocarse adyacentemente y en un mismo orden.

—Autoradiografía del gel de secuenciación.—

13. Una vez que la electroforesis se ha completado, desmontar el gel del aparato y descartar el amortiguador TBE.

14. Separar las placas de vidrio cuidadosamente, utilizando para esto una espátula y procurando que el gel permanezca adherido a una de las placas.

15. Cortar una pieza de papel 3MM ligeramente mas grande que el gel y colocarlo encima de éste aplicando una ligera presión para que el gel quede firmemente adherido a la superficie del papel.

16. Cubrir el gel con plástico autoadherente y secar bajo vacío a 80 °C por 30-40 min.

17. Quitar el plástico autoadherente y exponer el gel con películas para rayos X (Kodak XAR-5) por 16-24 horas a temperatura ambiente.

---

## V. RESULTADOS.

---

El objetivo práctico del presente trabajo fue la obtención por amplificación selectiva de un segmento particular de ADN conteniendo una secuencia exacta del gen de la fosfoenolpiruvato carboxilasa expresado en frijol utilizando la técnica PCR. Las aplicaciones técnicas utilizadas en el desarrollo del mismo son esenciales en biología molecular, en este sentido no es difícil entender la importancia que tiene desarrollar de manera confiable y eficiente este tipo de metodologías, en todo caso, los protocolos y manipulaciones experimentales presentados están basados en métodos bien establecidos.

---

**Tabla 4. Componentes de PCR y optimización de la metodología básica.**

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Oligonucleótidos iniciadores:	Entre 0.1-0.5 $\mu$ M
Magnesio:	2.5-4mM es generalmente óptimo
Desoxinucleótidos trifosfatos:	20-200 $\mu$ M, las concentraciones para cada dNTP deben ser equivalentes
Taq ADN-Polimerasa:	1-2.5 unidades por 50 $\mu$ l de reacción
ADN-molde:	En forma de simple o doble cadena de 0.01-0.1 $\mu$ g

<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura/Tiempo</b>
Desnaturalización:	Condiciones típicas, 96 °C por 1min
Complementación:	50-57 °C por 1 min dependiendo de la composición de bases, tamaño y concentración del DNA molde
Extensión:	Usualmente 72 °C por 1-2 min

---

---

RESULTADOS.

La etapa más crítica en este tipo de análisis es en la cual se definen las condiciones para determinar la especificidad de la serie de reacciones sintéticas catalizadas por la ADN polimerasa por lo que fueron probadas diferentes condiciones en los componentes de PCR así como combinaciones de éstas con el fin de optimizar el método; se realizaron curvas de concentración de magnesio, reacciones con diferentes cantidades de ADN molde y oligonucleótidos iniciadores así como el establecimiento de los ciclos de desnaturalización, iniciación de la complementación y extensión enzimática del ADN (Tabla 4).

---

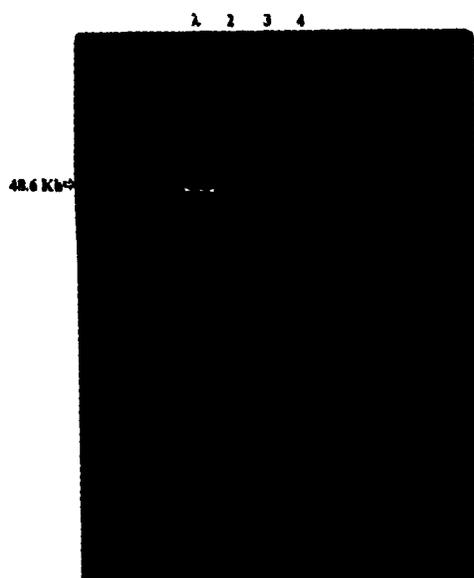


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de ADN genómico de hoja de frijol (carriles 2, 3 y 4). En el primer carril se observan marcadores de alto peso molecular de ADN del fago  $\lambda$ . En los pozos del gel (parte superior) se puede observar ADN remanente.

---

---

RESULTADOS

La primera aproximación para lograr el mencionado objetivo se inició estableciendo, en series de reacciones, las condiciones para la detección específica de la secuencia de este gen utilizando como material de análisis ADN genómico extraído de hoja de frijol, lo que obviamente implica selección y aislamiento del fragmento específico a partir de complejas mezclas de secuencias. El ADN genómico fue extraído y purificado por tratamiento con bromuro de cetil-trimetilamonio. Posteriormente fue caracterizado cuantificando su rendimiento y pureza con mediciones espectrofotométricas resultando sin cantidades significativas de contaminantes y por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (Fig. 7) con lo que se verificó su integridad al observarse una sola banda de ADN de alto peso molecular, además de la ausencia de otros ácidos nucleicos.

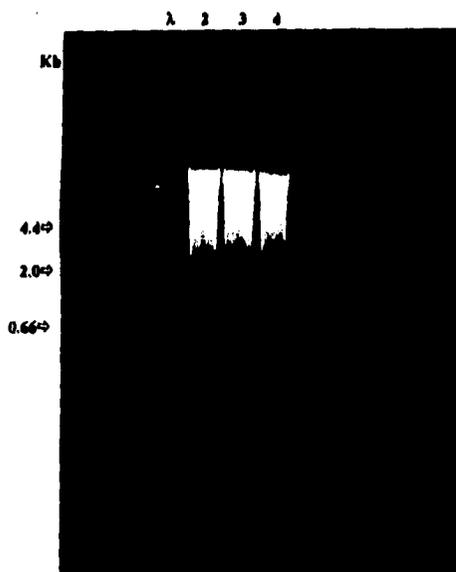


Figura 8. Amplificación por PCR de un fragmento de ADN genómico de hoja de frijol de aproximadamente 660 pb (carriles 2, 3 y 4) utilizando oligonucleótidos iniciadores de secuencias específicas de PEPC. El marcador estándar corresponde a ADN de  $\lambda$  cortado con Hind III.

---

RESULTADOS.

Una vez comprobada la calidad del ADN se procedió a efectuar la reacción de síntesis amplificadora por PCR. Para este propósito, dos oligonucleótidos iniciadores 5'GGCAGCAAGAAGTCATGATTGGCT y 5'AAGAAAGGCCACTCAQTTGTACATCTC3' fueron sintetizados flanqueando una región altamente conservada de PEPC (Fig. 4) incluyendo secuencias codificadoras involucradas en el sitio activo GYSDSGKDAG y la unión al sustrato FHGRGGTVGEGGGP (las flechas indican la dirección de la extensión por la Taq polimerasa). Estos iniciadores fueron utilizados, analizando el éxito del experimento por la presencia o ausencia del fragmento amplificado en los productos de PCR por electroforesis en geles de agarosa (Fig. 8). Los experimentos de amplificación de ADN genómico dieron como resultado un producto de extensión amplificadora de aproximadamente 660 pb, el tamaño de este fragmento era el esperado en secuencia codificadora, es decir siempre y cuando no existieran intrones intermedios entre los oligos iniciadores.

Para confirmar la identidad de este producto de amplificación, primeramente se realizó su clonación en el vector pTZ18R en un sitio de restricción Bam HI/SmaI para su posterior secuenciación por el método didcoxi de terminación en cadena. Al proceder con el análisis de localización y complementariedad, determinado por el programa Genetic Computer Group, esta secuencia no mostró ninguna homología con las secuencias conocidas del gen pero se observó una amplificación de moléculas inespecíficas, ya que la extensión iniciadora de este segmento fue dada únicamente por el oligo iniciador forward (datos no mostrados).

Estos resultados obligaron a considerar un cambio en la manera en la cual se venían realizando estos experimentos, por lo que se decidió intentar hacer nuevas series de reacciones teniendo como ADN molde original una biblioteca de ADNcomplementario de vaina de frijol (Hernández, 1995) clonada en  $\lambda$ ZipLox y que posee un título de  $2.28 \times 10^8$  ufp. en lo que sería una especie de escrutinio del gen en una población molecular menos compleja y que únicamente contiene copias de aquellos genes que están siendo activamente expresados.

---

RESULTADOS

---

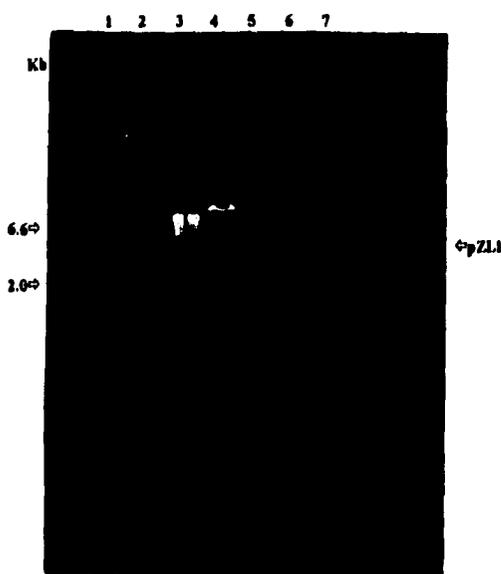


Figura 9. Análisis de restricción de los productos de excisión *in vivo* de la biblioteca completa de ADNc de vaina de frijol; sin digerir (carriles 1 y 5), EcoRI (2 y 6) y EcoRI/Hind III (3 y 7) en donde se observan diferentes tamaños de moléculas clonadas y al plásmido pZLI de 4.3 Kb. El marcador estándar corresponde a ADN de  $\lambda$  cortado con Hind III (carril 4).

---

De este modo se procedió entonces a realizar la escisión *in vivo* de la genoteca completa obteniendo ADN plasmídico, el cual fue digerido en un ensayo de restricción con las enzimas EcoRI y Hind III, para posteriormente analizar los productos de restricción por medio de electroforesis en agarosa (Fig. 9) observándose fragmentos de tamaño diverso en donde el rango de ADN clonado esta entre 1-7 Kb. Esto nos llevaba a considerar que la biblioteca de ADN tenía las características adecuadas para realizar nuestra búsqueda, siendo representativa por su título elevado de moléculas recombinantes y por el tamaño de ADN clonado, lo que nos daría buenas probabilidades de encontrar la secuencia de PEPC y de este modo generar una sonda homóloga.

---

RESULTADOS

La extensión amplificadora de un segmento de tamaño adecuado de aproximadamente 660 pb nuevamente fue obtenido con resultados altamente reproducibles. En esta ocasión se buscó poder eliminar la posibilidad de contaminación y amplificaciones inespecíficas por un lado teniendo precaución de la transferencia física de ADN entre las muestras y por otro, incluyendo controles positivo y negativo en cada serie de amplificaciones. ADN de lambda ZipLox fue incluido como control negativo de reacción y pKS PEP61 que contiene el gen de PEPC de alfalfa como positivo (Phatirana *et al.* 1992). Además de lo anterior se hizo necesario otro tipo de prueba con hibridaciones por Southern-blot (Fig. 10) utilizando como sonda a pKS PEP61.

---

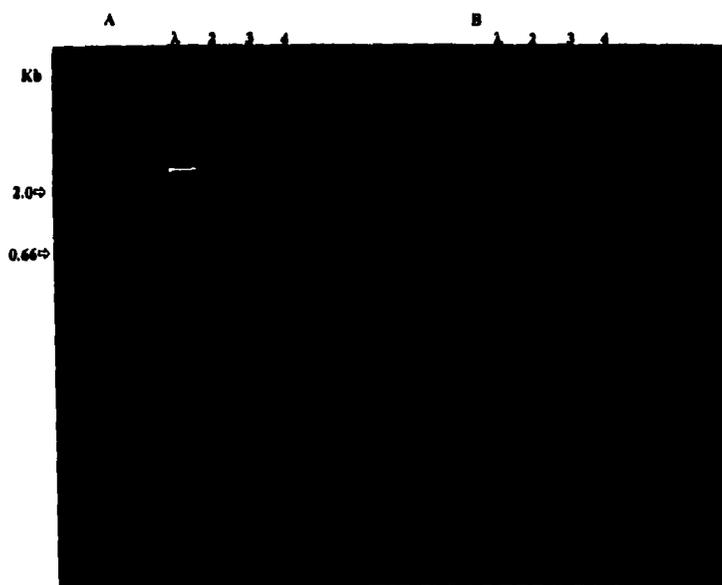


Figura 10. A. Producto de amplificación por PCR de DNA de la genoteca de vaina de frijol (carril 3), incluyendo una reacción con DNA de  $\lambda$  ZipLox como control negativo (2) y pKSPEP61 como positivo (4). B. Hibridación por Southern-blot de este mismo, utilizando como sonda el gen de PEPC de alfalfa.

---

RESULTADOS

La señal de hibridación fue significativamente intensa, dando directamente una idea de un nivel alto de similitud entre la secuencia del fragmento de ADN sintetizado y la sonda de PEPC, independientemente del número de copias del gen amplificado ya que ambas muestran intensidades de señal muy parecidas. Este tipo de evidencias: amplificación selectiva y condiciones de alta severidad de hibridación (65 °C), son criterios por los cuales es posible descartar la existencia de falsos positivos que resultan de reacciones de síntesis e hibridaciones inespecíficas.

Con estos experimentos se lograron dos propósitos: asegurar que la clona con el gen de PEPC se encontraba presente en la biblioteca de ADN complementario y estimar su abundancia relativa con probabilidades estadísticas reduciendo de entrada la complejidad del escrutinio de la misma.

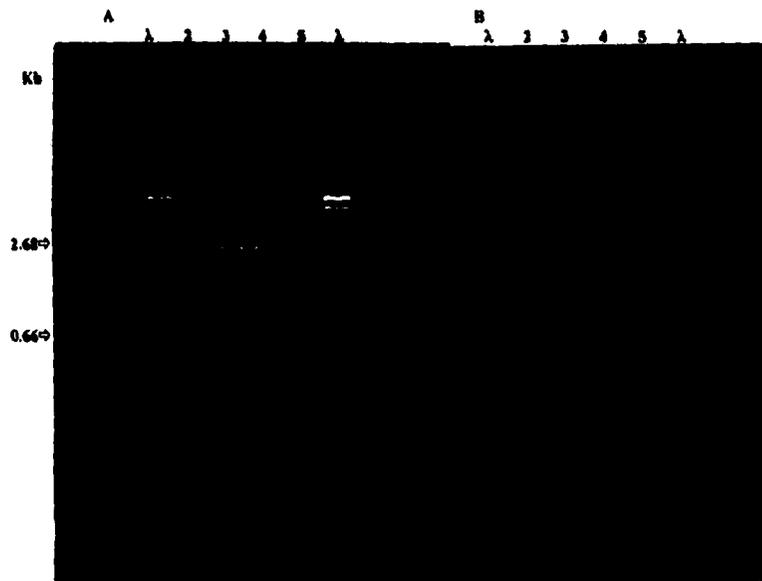


Figura 11. A. El fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 660 pb fue clonado en un sitio BamHI/SmaI de pTZ19N (2.59 Kb) carriles 2, 3, 4 y 5 B. Hibridación por Southern-blot de el plásmido recombinante con la sonda pKSPEP61.

Con el fin de confirmar la identidad de este fragmento era necesario precisar su secuencia por lo que se realizó su clonación en el vector pTZ18R. Con el fin de incrementar la eficiencia de la clonación de los fragmentos de PCR en esta ocasión se incluyó un sitio de restricción BamHI (G/GATCC) en el extremo 5' del oligonucleótido forward, esta modificación no afectó el patrón ni la eficiencia de amplificación del producto.

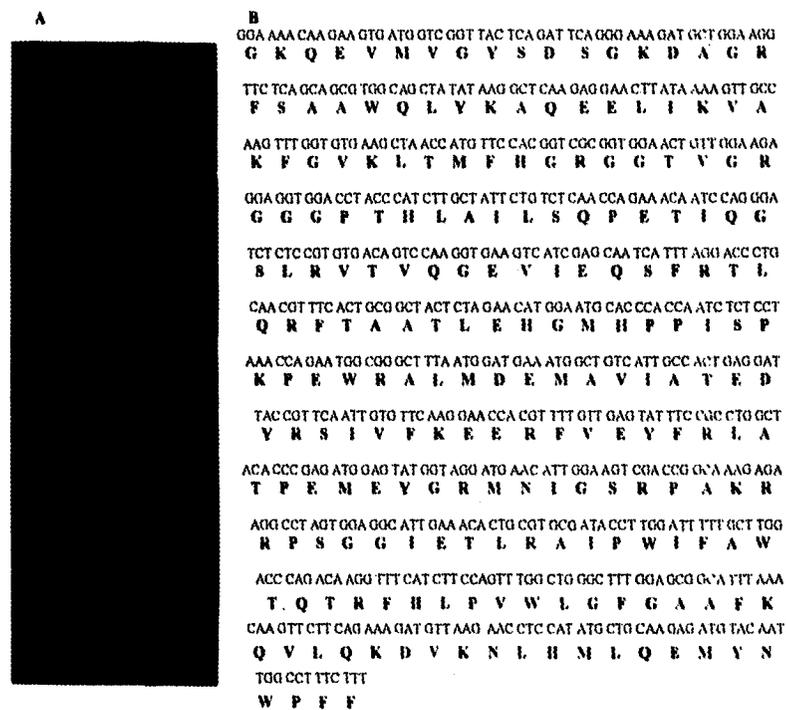


Figura 12. A. Autoradiografía del gel de secuenciación B. Secuencia de nucleótidos del fragmento sintetizado por PCR, con el producto de traducción deducido en secuencia de aminoácidos señalado bajo la secuencia codificadora.

---

## RESULTADOS

El ADN sintetizado fue ligado entonces en el vector y el plásmido recombinante posteriormente fue utilizado para transformar células competente de *E coli* cepa Epicurean coli NM322. Las colonias positivas resultantes de la  $\alpha$ -complementación fueron analizadas con ensayos de restricción para detectar las moléculas recombinantes que tuvieran el fragmento del gen de PEPC clonado y posteriormente se repitió la hibridación con la sonda pKS PEP61 (Fig. 11). La hibridación en estas condiciones fue reproducible, esto permitió asegurar con mayor confianza que el fragmento clonado correspondía al gen de PEPC y de esta manera continuar con su secuenciación (Fig. 12). Cuatro clones individuales seleccionadas fenotípicamente fueron secuenciadas simultáneamente resultando idénticas.

La técnica de secuenciación completa del fragmento se llevo a cabo por el método dideoxi de terminación en cadena, pudiendose precisar una secuencia de 660 nucleótidos. Una vez obtenida la secuencia de nucleótidos se realizó el análisis de esta, determinando por el programa GCG, los posibles marcos de lectura abierta para de esta manera predecir la secuencia de aminoácidos que codifican a la proteína. Una vez obtenida la secuencia deducida se realizó el análisis de localización, complementariedad, identidad y homología del gen amplificado con las secuencias hasta el momento conocidas. (fig.13).

En el análisis de la secuencia de este producto de PCR clonado, utilizando el programa GCG/FASTA, se observa que el segmento sintetizado entre los oligonucleótidos iniciadores diseñados para PEPC muestra una gran homología con el gen que codifica esta enzima de otras plantas. Analizando esta comparación puede observarse que el número de aminoácidos altamente conservados a través del fragmento entero es notable. De esta manera se logró detectar y aislar un fragmento de ADN complementario que corresponde a una región codificadora de la enzima PEPC que se expresa en vaina de frijol.

<i>F. trinervia</i>	REYHIKIPLR VVPLFEKLAD LEAAPAASTR LFSMDWYRNR IDGKQEVNIG YSDSGKDAGR FSAAWQLYKT
<i>F. punglei</i>	REYHIKIPLR VVPLFEKLAD LEAAPAASTR LFSMDWYRNR IDGKQEVNIG YSDSGKDAGR FSAAWQLYKT
<i>S. tuberosum</i>	RECRVQPLR VVPLFEKLAD LDAAPAAVAR LFSIEWYRNR INGKQEVNIG YSDSGKDAGR LSAAWQLYKA
<i>N. tabacum</i>	RECHVKPLR VVPLFEKLDD LESASAAVAR LFSIEWYRNR INGKQEVNIG YSDSGKDAGR FSAAWQLYKA
<i>G. max C3</i>	RECHVKPLR VVPLFEKLAD LEAAPAALAR LFSVDWYRNR INGKQEVNIG YSDSGKDAGR FSAAWQLYKA
<i>G. max C4</i>	RECHVKPLR VVPLFEKLAD LEAAPAALAR LFSVDWYRNR INGKQEVNIG YSDSGKDAGR FSAAWQLYKA
<i>M. sativa</i>	RECKVRNPLR VVPLFEKLDD LESAPAAALAR LFSIDWYRNR IDGKQEVNIG YSDSGKDAGR FSAAWQLYKA
<i>*P. vulgaris</i>	RECHVKTLR VVPLFEKLAD LEAAPAALAR LFSIDWYRQR INGKQEVNIG YSDSGKDAGR LSAAWQLYKA
<i>Z. mays</i>	RECHVKQPLR VVPLFEKLAD LEAAPAAVLR LFSIDWYRNR INGKQEVNIG YSDSGKDAGR LSAAWQIVKA
<i>S. vulgare C3</i>	RECKVKPLR VVPLFEKLAD LEAAPAASTR LFSVDWYKNR IDGKQEVNIG YSDSGKDAGR LSAAWQIVKA
<i>M. crystallinum</i>	RECKVKPLR VVPLFEKLAD LEAAPAASTR LFSVDWYKNR IDGKQEVNIG YSDSGKDAGR LSAAWQIVKA
<i>S. vulgare C4</i>	RECKVQPLR VVPLFEKLAD LEAAPAAVAR LFSVDWYRNR IDGKQEVNIG YSDSGKDAGR LSAAWQLYKA
<i>F. trinervia</i>	QEQIVKIAKE FGVKLTMFHIG RGGTVORGGG PTHLALLSQ PDIINGSLRV TVQGEVIEQS FQEEHLCFRT
<i>F. punglei</i>	QEQIVKIAKE FGVKLTMFHIG RGGTVORGGG PTHLALLSQ PDIINGSLRV TVQGEVIEQS FQEEHLCFRT
<i>S. tuberosum</i>	QEELIKVAKE FGVKLTMFHIG RGGTVORGGG PTHLAILSQ PDIINGSLRV TVQGEVIEQS FQEEHLCFRT
<i>N. tabacum</i>	QEELIKVAKE FGVKLTMFHIG RGGTVORGGG PTHLAILSQ PDIINGSLRV TVQGEVIEQS FQEEHLCFRT
<i>G. max C3</i>	QEELIKVAKE FGVKLTMFHIG RGGTVORGGG PTHLAILSQ PDIINGSLRV TVQGEVIEQS FQEEHLCFRT
<i>G. max C4</i>	QEELIKVAKE FGVKLTMFHIG RGGTVORGGG PTHLAILSQ PDIINGSLRV TVQGEVIEQS FQEEHLCFRT
<i>M. sativa</i>	QEELIKVAKE FGVKLTMFHIG RGGTVORGGG PTHLAILSQ PDIINGSLRV TVQGEVIEQS FQEEHLCFRT
<i>*P. vulgaris</i>	QEELIKVAKE FGVKLTMFHIG RGGTVORGGG PTHLAILSQ PDIINGSLRV TVQGEVIEQS FQEEHLCFRT
<i>Z. mays</i>	QEELIKVAKE FGVKLTMFHIG RGGTVORGGG PTHLAILSQ PDIINGSLRV TVQGEVIEQS FQEEHLCFRT
<i>S. vulgare C3</i>	QEELIKVAKE FGVKLTMFHIG RGGTVORGGG PTHLAILSQ PDIINGSLRV TVQGEVIEQS FQEEHLCFRT
<i>M. crystallinum</i>	QEELIKVAKE FGVKLTMFHIG RGGTVORGGG PTHLAILSQ PDIINGSLRV TVQGEVIEQS FQEEHLCFRT
<i>S. vulgare C4</i>	QEELIKVAKE FGVKLTMFHIG RGGTVORGGG PTHLAILSQ PDIINGSLRV TVQGEVIEQS FQEEHLCFRT
<i>F. trinervia</i>	LQRFTAATLE HGMNPPISPR PEWRALMDQM AVVATEEYRS VVFKPRFVE YFRLATPELE YGRMNIGSRP
<i>F. punglei</i>	LQRFTAATLE HGMNPPISPR PEWRALMDQM AVVATEEYRS VVFKPRFVE YFRLATPELE YGRMNIGSRP
<i>S. tuberosum</i>	LQRFTAATLE HGMNPPVSPK PEWRALMDEI AVVATEKYRS IVFKPRFVE YFRLATPELE YGRMNIGSRP
<i>N. tabacum</i>	LQRFTAATLE HGMNPPVSPK PEWRALMDEI AVVATEKYRS IVFKPRFVE YFRLATPELE YGRMNIGSRP
<i>G. max C3</i>	LQRFTAATLE HGMNPPVSPK PEWRALMDEM AVVATEEYRS IVFKPRFVE YFRLATPELE YGRMNIGSRP
<i>G. max C4</i>	LQRFTAATLE HGMNPPVSPK PEWRALMDEM AVVATEEYRS IVFKPRFVE YFRLATPELE YGRMNIGSRP
<i>M. sativa</i>	LQRFTAATLE HGMNPPVSPK PEWRALMDEM AVVATEEYRS IVFKPRFVE YFRLATPELE YGRMNIGSRP
<i>*P. vulgaris</i>	LQRFTAATLE HGMNPPVSPK PEWRALMDEM AVVATEEYRS IVFKPRFVE YFRLATPELE YGRMNIGSRP
<i>Z. mays</i>	LQRFTAATLE HGMNPPVSPK PEWRALMDEM AVVATEEYRS IVFKPRFVE YFRLATPELE YGRMNIGSRP
<i>S. vulgare C3</i>	LQRFTAATLE HGMNPPVSPK PEWRALMDEM AVVATEEYRS IVFKPRFVE YFRSATPETE YGRMNIGSRP
<i>M. crystallinum</i>	LQRFTAATLE HGMNPPVSPK PEWRALMDEM AVVATEEYRS IVFKPRFVE YFRLATPELE YGRMNIGSRP
<i>S. vulgare C4</i>	LQRFTAATLE HGMNPPVSPK PEWRALMDEM AVVATEEYRS IVFKPRFVE YFRSATPETE YGRMNIGSRP
<i>F. trinervia</i>	SKRKPSSGIE SLRAIPWIFS WTQTRFHLPV WLGFQAAFKH AIQKDSKNLQ MLQEMYKTWP FFRVTIDLVE
<i>F. punglei</i>	SKRKPSSGIE SLRAIPWIFS WTQTRFHLPV WLGFQAAFKH AIQKDSKNLQ MLQEMYKTWP FFRVTIDLVE
<i>S. tuberosum</i>	SKRKPSSGIE SLRAIPWIFA WTQTRFHLPV WLGFQAAFKY AIQKDKNLR MLQEMYNAWP FFRVTIDLVE
<i>N. tabacum</i>	SKRKPSSGIE SLRAIPWIFA WTQTRFHLPV WLGFQAAFKY AIQKDKNLR MLQEMYNAWP FFRVTIDLVE
<i>G. max C3</i>	AKRRPSSGIE TLRAIPWIFA WTQTRFHLPV WLGFQAAFKH VIEKDVNRNH VLQEMYNQWP FFRVTIDLVE
<i>G. max C4</i>	AKRRPSSGIE TLRAIPWIFA WTQTRFHLPV WLGFQAAFKH VIEKDVNRNH VLQEMYNQWP FFRVTIDLVE
<i>M. sativa</i>	AKRRPSSGIE TLRAIPWIFA WTQTRFHLPV WLGFQAAFKQ VVQKDVKNLH MLQEMYNQWP FFRVTIDLVE
<i>*P. vulgaris</i>	AKRRPSSGIE TLRAIPWIFA WTQTRFHLPV WLGFQAAFKQ VVQKDVKNLH MLQEMYNQWP FFRVTIDLVE
<i>Z. mays</i>	SKRKPSSGID SLRAIPWIFA WTQTRFHLPV WLGFQAAFKN VLQKDIRNLH MLQEMYNEWP FFRVTIDLVE
<i>S. vulgare C3</i>	SKRKPSSGIE SLRAIPWIFA WTQTRFHLPV WLGFQAAFKH IMQKDIRNLH VLKEMYNEWP FFRVTIDLLE
<i>M. crystallinum</i>	SKRKPSSGIE SLRAIPWIFA WTQTRFHLPV WLGFQAAFKH VLEKDIRNLH MLRDMYNNFP FFRVTIDLLE
<i>S. vulgare C4</i>	AKRRPSSGIT TLRAIPWIFS WTQTRFHLPV WLGFQAAFKW AIQKDKNLFQ MLQEMYNEWP FFRVTIDLLE

Figura 13. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de PEPCasas con el segmento del gen de frijol utilizando en programa GCG e indicando las regiones conservadas de residuos que están involucrados en actividad enzimática.

RESULTADOS

Para la determinación del posible número de genes que codifican a PEPC en frijol, DNA genómico de hoja de frijol fue cortado con diferentes enzimas de restricción e hibridado con el fragmento del gen amplificado, utilizandolo como sonda homóloga, observandose un patrón simple de hibridación en cada caso (Fig. 14). El tiempo de exposición de la autoradiografía fué de 4 semanas, por esta razón se observa en extremo oscura, además de que los métodos de reproducción para este tipo de material no permiten una buena calidad en la misma.

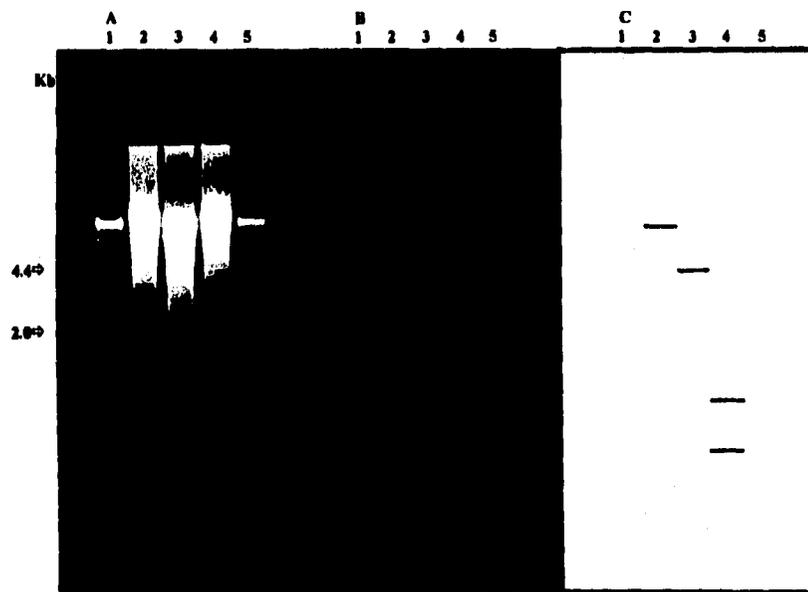


Figura 14. A. Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico de hoja de frijol cortado con diferentes enzimas de restricción: EcoRI (carril 2), BamHI (3) y HindIII (4). B. Southern blot utilizando el fragmento del gen amplificado por PCR. C. Ideograma de la autoradiografía en donde se representa un patrón simple de hibridación.

---

## **VI. DISCUSION.**

---

### **VI.1. PCR, sensibilidad y validación del metodo.**

La amplificación exponencial de ADN por PCR ha venido a desarrollar significativamente a la biología molecular, incrementando la velocidad y precisión de muchos de los métodos utilizados para la manipulación de ADN en la clonación molecular. Nuevas metodologías y aplicaciones basadas en esta idea se están descubriendo por lo que PCR se ha convertido en una de las técnicas más poderosas utilizadas en biología molecular y en análisis clínicos. Esto ha venido a cambiar mucho la manera en la cual eran realizados una gran cantidad de experimentos, lo cual puede verse reflejado en el número de trabajos y publicaciones que utilizan esta técnica los cuales también han aumentado exponencialmente en tiempos recientes.

Los productos de esta síntesis enzimática pueden ser utilizados para una amplia variedad de procedimientos analíticos por ejemplo, como fue el propósito en nuestro caso, para la obtención por amplificación selectiva de una secuencia de ADN única que corresponda al gen que codifica a la fosfoenolpiruvato carboxilasa en frijol, con el fin de ser utilizada como sonda homóloga.

La detección específica de genes, sin duda puede facilitarse con este tipo de procedimientos ya ampliamente utilizados. Sin embargo, la sensibilidad y validación de PCR lógicamente van a depender de las condiciones que los experimentos demanden, involucrando una evaluación en cuanto a sensibilidad, especificidad, precisión y reproductibilidad, necesitando además un esfuerzo adicional para el análisis y el establecimiento de los límites de este método.

Cuando hablamos de amplificar un gen, es imperativo que se encuentre un balance entre eficiencia

---

DISCUSIONES.

y exactitud en el proceso de amplificación. En este sentido hay que señalar que la etapa más crítica en estos análisis fue definir y establecer en series de reacciones, las condiciones para lograr la especificidad de la síntesis amplificadora, lo que condujo a que el procedimiento de optimización y validación fuera muy complejo, convirtiendolo por decirlo así, en el factor limitante en el uso de esta técnica.

Obviamente, la amplificación de moléculas inespecíficas es probable, como ocurrió precisamente en el caso de los experimentos en los que se empleó ADN genómico como molde, los cuales se describen en resultados, siendo difícil controlar las variables contra esa posibilidad. Esto se complica por el hecho de que el mismo producto inespecífico de amplificación sirve para la generación de más producto; un solo ciclo de amplificación puede producir un gran número de moléculas amplificables que pueden ser contaminaciones o productos inespecíficos que sirvan como molde para las subsecuentes amplificaciones. De lo anterior se deriva que resulta sumamente importante la información que se pueda tener de las secuencias de genes completos y regiones codificadoras para facilitar la detección de un producto amplificado de tamaños predecible; sin olvidar claro está, tomar en cuenta la especificidad de los oligonucleótidos iniciadores y la localización de posibles intrones en el fragmento amplificado. En este tipo de estrategias se debe considerar el hecho de que las secuencias de los intrones son generalmente menos conservadas que las regiones codificadoras además de que su tamaño es muy variable entre las especies.

En este punto es importante señalar lo significativo que puede resultar que este tipo de experimentos se realicen empleando ADN genómico. Hay que recordar que el principio del método permite la detección y el aislamiento de un segmento preseleccionado a partir de complejas mezclas y múltiples poblaciones de secuencias. Obviamente que esto puede verse dificultado al tratarse de genomas en extremo grandes y complejos, como es el caso de angiospermas. Dentro de las especies vegetales, *Phaseolus vulgaris* posee 22 cromosomas y un genoma de aproximadamente 3.5 millones de kilobases (Bennet y Smith, 1991).

### VI.2. Obtención de una sonda molecular homóloga para PEPC.

En este trabajo se pudo detectar y aislar un fragmento de ADN complementario que corresponde a una región codificadora de la enzima PEPC que se expresa en vaina de frijol, el cual posteriormente se clonó y secuenció. En el análisis de la secuencia de este producto de PCR clonado, utilizando el programa GCG/FASTA, se observa que el segmento sintetizado entre los oligonucleótidos iniciadores diseñados para PEPC muestra una gran homología con el gen que codifica esta enzima de otras plantas (Fig. 13). Analizando esta comparación puede observarse que el número de aminoácidos altamente conservados a través del fragmento entero es notable, siendo más importante en la región carboxilo-terminal, esto es la región que correspondería a los residuos 600-826 de otras secuencias ya conocidas. Una conservación tan fuerte a lo largo de especies filogenéticamente distintas puede ser un reflejo funcional de importancia del producto codificado. Esta región de ADN altamente conservada tanto en especies C3 como C4, probablemente ha estado sujeta a una mayor presión selectiva lo cual la ha mantenido casi invariable. Este hecho sugiere que esta región pudiera ser indispensable para el adecuado funcionamiento de la enzima, pudiendo estar comprometida en la formación del sitio catalítico o de la enzima activa.

Ahora bien, la secuencia deducida de aminoácidos de PEPC en frijol contiene todos los residuos de aminoácidos que se ha propuesto son esenciales o están involucrados en: el sitio activo de la enzima (GYSDSGKDAG) y el sitio de unión al sustrato (FHGRGGTVGRGGGP) (Cushman *et al.*, 1989; Jiao *et al.*, 1990; Crépin *et al.*, 1991; Poetsch *et al.*, 1991). Además de un residuo de cisteína (cis<sup>687</sup>) de las 5 a 7 que pueden estar involucradas en las interacciones entre las subunidades para mantener la estructura tetramérica de la enzima (Andreo *et al.*, 1987) o en la regulación redox (Chardot y Wedding, 1992). Esto lo que nos podría decir es que posiblemente la actividad enzimática en frijol, puede estar regulada de manera semejante a otras PEPCas de otras especies de plantas.

Es también de interés hacer notar que se detectó una homología significativa en secuencia de este fragmento del gen en frijol, como es de esperarse, con las especies de tipo C3 teniendo un porcentaje de identidad para *Medicago sativa* de 91.7, *Glycine max* 83.0, *Flaveria pringlei* 74.5, *Nicotiana tabacum* 74.1, *Zea mays* (Isoforma C3) 74.0, *Mesembryanthemum crystallinum* 73.9, *Sorghum vulgare* (Isoforma C3) 73.7, *Solanum tuberosum* 73.3. De esto podríamos sugerir que el gen de PEPC expresado en vaina de frijol muy probablemente sea una isoforma de tipo C3 pues al parecer no diverge significativamente de los otros miembros de la familia de genes que ya han sido clonados. Sin embargo, no podemos asegurar que lo anterior sea cierto ya que en este trabajo sólo fueron secuenciadas 660 pb del gen que se expresa en vaina de frijol, un gen cuyo mensaje es de aproximadamente 2.9 Kb (Pathirana *et al.*, 1992). Estos datos no excluyen evidentemente el hecho de que la secuencia completa revelará importante información adicional.

Sin embargo, la gran homología observada entre el fragmento amplificado por PCR de ADN complementario de vaina de frijol y la isoforma de tipo C3 apoya la idea de que probablemente la posible función de PEPC en este tejido sea la de proveer esqueletos de carbono a ciclo de Krebs como respuesta al abatimiento que este ciclo presenta cuando la síntesis de aminoácidos se lleva a cabo (Andreo *et al.*, 1987; O'Leary, 1983). Esto en contraste con el trabajo realizado por Delgado (1992) en vaina de frijol se observa que la actividad de la PEPC y sus características cinéticas son distintas a las típicas de isoformas C3 y ya que en la secuencia la enzima es más parecida a estas, quizá la diferencia pudiera radicar en los mecanismos de regulación de la actividad enzimática más que en la estructura primaria de la proteína.

#### **VI.3. Relaciones filogenéticas con otras PEPCasas.**

Un árbol filogenético fue construido utilizando el programa Genetic Computer Group, en base al análisis de alineamiento e identidad de secuencias deducidas de aminoácidos, obteniéndose las posibles relaciones filogenéticas del segmento del gen de *Phaseolus vulgaris* con otras PEPCasas (Figura 15).

DISCUSIONES.

En este árbol pueden visualizarse claramente algunos aspectos de interés en la homología existente entre estos genes, en donde las leguminosas forman un grupo evolutivamente aparte de las otras especies de tipo C3, esto sugiere que PEPC podría presentar una significancia biológica importante teniendo un papel clave en la provisión de carbono para la biosíntesis de aspartato y ácidos orgánicos que proveen la energía necesaria para el metabolismo bacteroide en los nódulos de raíz, por lo que su actividad estaría íntegramente asociada con la asimilación de nitrógeno en leguminosas.

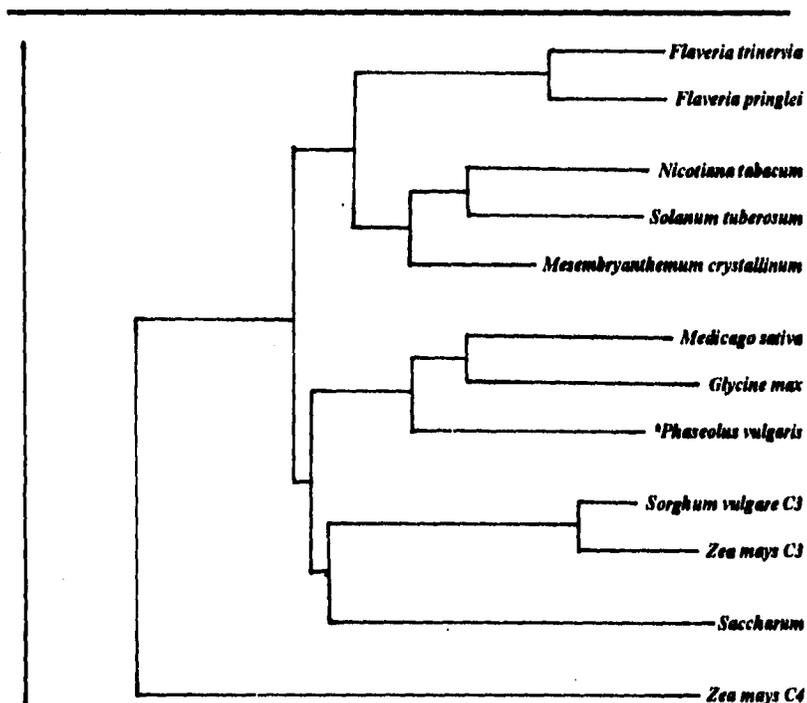


Figura 15. Relaciones filogenéticas del segmento del gen de *Phaseolus vulgaris* con otras PEPCasas. El árbol filogenético fue construido utilizando el programa Genetic Computer Group en base al análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos.

Otro aspecto que resulta interesante es que las PEPCas de leguminosas se encuentran más relacionadas a las formas C3 de monocotiledóneas C4, esta observación apoya la idea de que los grupos de plantas C4 mono y dicotiledóneas evolucionaron independientemente uno de otro (Raghavedra, 1980), además esto sugiere que uno de los eventos más importantes durante la evolución de las plantas fue el desarrollo de mecanismos regulatorios para una expresión diferencial específica de los genes de PEPC.

#### IV.4. Determinación del posible número de genes que codifican a PEPC en frijol.

En el análisis por Southern-blot realizado se observó que el ADN genómico de frijol al ser cortado con diferentes enzimas de restricción e hibridado con el fragmento del gen amplificado, presenta un patrón simple de hibridación, por lo que es probable que el genoma de *Phaseolus vulgaris* posea solamente una copia del gen que codifica a PEPC. Este resultado es consistente con estudios de purificación y caracterización cinética de la enzima en frijol los cuales muestran que una única forma de la enzima, un homotetrámero de 400 Kd, esta involucrada en la función C3 (Yampara *et al.*, 1994).

Todo esto nos lleva a considerar que el presente trabajo fue exitoso, ya que fue obtenida una sonda específica y se demostró que es una secuencia codificadora de la fosfoenolpiruvato carboxilasa expresada en vaina de frijol, siendo una isoforma de tipo C3. Después de haber obtenido una sonda homóloga para la PEPC en frijol, las aplicaciones técnicas, metodológicas y experimentales en cuanto al análisis de la expresión genética están potencialmente abiertos y las perspectivas que de esto puede derivarse son muchas. Experimentos y trabajos posteriores, combinando la elevada capacidad de la biología molecular y la bioquímica podrían definir, ampliar o bien profundizar nuestro conocimiento acerca de esta enzima en especies de plantas C3 y C4 lo que permitirá su manipulación genética con miras a controlar los mecanismos de aprovechamiento y distribución de carbono y nitrógeno en plantas.

---

## VII. REFERENCIAS.

---

- Albert H.A., Martin T. and Sun S.S.M.** (1992). Structure and expression of a sugarcane gene encoding a housekeeping phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Mol Biol* 20: 663-671.
- Andreo C.S., Gonzalez D.H. and Iglesias A.A.** (1987). Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase. Structure and regulation. *FEBS Lett.* 213: 1-8.
- Aoyagi, K. and Bassham J.A.** (1984). Pyruvate orthophosphate dikinase of C3 seeds and leaves as compared to the enzyme from maize. *Plant Physiol.* 75:387-392.
- Bennet M.D. and Smith J.B.** (1991). Nuclear DNA amounts in Angiosperms. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 334: 309-345.
- Blanke M.M. and Lenz F.** (1989). Fruit photosynthesis. *Plant Cell and Environment.* 12:31-46.
- Brown, T.A.** (1991). *Essential Molecular Biology a practical approach, vol.1.* Oxford University Press. New York. 299 pp.
- Chardot T.P. and Wedding R.T.** (1992). Role of cysteine in activation and allosteric regulation of maize phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 98: 780-783.
- Crétin C., Keryer E., Tagu D., Lepiniec L., Vidal J. and Gadal P.** (1990). Complete cDNA sequence of sorghum phosphoenolpyruvate carboxylase involved in C4 photosynthesis. *Nucleic Acids Res.* 18: 658.
- Crétin C., Bakrim N., Keryer E., Sant S., Lepiniec L., Vidal J. and Gadal P.** (1991). Production in *Escherichia coli* of active Sorghum phosphoenolpyruvate carboxylase which can be phosphorylated. *Plant Mol. Biol.* 17: 83-88.
- Crétin C., Sant S., Keryer E., Lepiniec L., Tagu D., Vidal J. and Gadal P.** (1991). The phosphoenolpyruvate carboxylase gene family of *Sorghum*. Promoter structures, amino acid sequences and expression of genes. *Gene* 99: 87-94.
- Cushman J.C., Meyer G., Michalowsky C.B., Schmitt J.M. and Bohnert H.J.** (1989). Salt stress leads to differential expression of two isogenes of phosphoenolpyruvate carboxylase during crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant. *Plant Cell* 1: 715-725.

---

REFERENCIAS

- D'Alessio, J.M., Bebec, R., Hartley, J.L., Noon, M.C. and Polaya, D.** (1992). Lambda ZipLox. Automatic subcloning of cDNA. *Focus* 14,76.
- Davies D.D.** (1979). The central role of phosphoenolpyruvate carboxylase in plant metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 30: 131-158.
- Delgado A.A.** (1992). Metabolitos formados por la fijación del CO<sub>2</sub> en la cavidad de la vaina de *Phaseolus vulgaris* L. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Chapingo. México.
- Deroche M-E and Carrayol E.** (1988). Nodule phosphoenolpyruvate carboxylase: A review. *physiol. Plant* 74: 775-782.
- Eikmanns B.J., Folletie M.T., Griout M.U. and Sinskey A.J.** (1989). the phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* 218: 330-339.
- Flinn A.M., Atkins C.A. and Plate J.S.** (1977). Significance of photosynthetic and respiratory exchanges in the carbon economy of the developing pea fruit. *Plant Physiol.* 60:412-418.
- Fujita N., Miwa T. and Ishijima S.** (1984). The primary structure of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the *ppc* gene and deduced aminoacid sequence. *J. Biochem.* 95: 909-916.
- González D.H. and Andreo C.S.** (1989). The use of substrate analogues to study the active-site structure and mechanism of PEP carboxylase. *Trends Biochem. Sci.* 14:24-27.
- Hatch M.D.** (1987). C<sub>4</sub> Photosynthesis: A unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochem. Biophys. Acta* 895: 81-106.
- Hedley C.L., Harvey D.M. and Kelly R.J.** (1975). Role of PEP carboxylase during seed development in *Pisum sativum*. *Nature.* 258:352-354.
- Hernández H.E.** (1995). Construcción de una biblioteca de ADN complementario de vaina de frijol (*Phaseolus vulgaris* L). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. U.N.A.M.
- Hermans J. and Westhoff P.** (1990). Analysis of expression and evolutionary relationships of phosphoenolpyruvate carboxylase genes in *Flaveria trinervia* (C<sub>4</sub>) and *F. pringlei* (C<sub>3</sub>). *Mol. Gen. Genet.* 224: 459-468.
- Hermans J. and Westhoff P.** (1992). Homologous genes for the C<sub>4</sub> isoform of phosphoenolpyruvate carboxylase in a C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> *Flaveria* species. *Mol. Gen. Genet.* 234: 275-284.
- Hudspeth R.L., Glackin C.A., Bonner J. and Grula J.W.** (1986). Genomic and cDNA clones for maize phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate, orthophosphate dikinase: Expression of different genes-family members in leaves and roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 2884-2888.

---

REFERENCIAS

- Hudspeth R.L. and Grua J.W.** (1989). Structure and expression of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme involved in C4 photosynthesis. *Plant. Mol. Biol.* 12: 579-589.
- Hudspeth R.L., Grua J.W., Edwards G.E. and Ku M.S.B.** (1992). Expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in tobacco plants. Effects on biochemistry and physiology. *Plant Physiol.* 98: 458-464.
- Iglesias A.A. and Andreo C.S.** (1983). The presence of essential histidine residues in phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Biochim. Biophys. Acta.* 749: 9-17.
- Ishijima S., Katagiri F., Kodaki T., Izui K., Katsuki H., Nishikawa K., Nakashima H and Ooi T.** (1992). Comparison of amino acid sequences between phosphoenolpyruvate carboxylase from *Escherichia coli* (allosteric) and *Anacystis nidulans* (non-allosteric): Identification of conserved and variable regions. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 133: 436-441.
- Izui K., Ishijima S., Yamaguchi, Katagiri F., Murata T., Shigesada K., Sugiyama T. and Katsuki H.** (1986). Cloning and sequence analysis of cDNA encoding active phosphoenolpyruvate carboxylase of the C4-pathway from maize. *Nucleic Acids Res.* 14: 1615-1628.
- Izui K., Kawamura T., Okumura S. and Toh H.** (1992). Molecular evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase for C4 photosynthesis in maize. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.* vol.III: 827-830.
- Janc J.W., O'Leary M.H. and Cleland W.W.** (1992). Mechanistic studies of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*. *Biochemistry.* 31: 6441-6426.
- Jiao J.A., Podesta F.E., Chollet R., O'Leary M.H. and Andreo.** (1990). Isolation and sequence of an active-site peptide from maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase inactivated by pyridoxal 5'-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta.* 1041: 291-295.
- Jiao J.A. and Chollet R.** (1991). Posttranslational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C4 and Crassulacean acid metabolism plants. *Plant Physiol.* 95: 981-985.
- Kano-Murakami Y. and Matuoka M.** (1992). Gene expression of PEP carboxylase gene. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.* vol.III: 843-846.
- Katagiri F., Kodaki T., Fujita N., Izui K. and Katsuki H.** (1985). Nucleotide sequence of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene of cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Gene* 38: 265-269.
- Kawamura T., Shigesada K., Yanagisawa S. and Izui K.** (1990). Phosphoenolpyruvate carboxylase prevalent in maize roots: Isolation of a cDNA clone and its use for analyses of the gene and gene expression. *J. Biochem.* 107: 165-168.
- Koizumi N., Sato F., Terano Y. and Yamada Y.** (1991). Sequence analysis of cDNA encoding phosphoenolpyruvate carboxylase from cultured tobacco cells. *Plant Mol. Biol.* 17: 535-539.

---

REFERENCIAS.

- Kawamura T., Shigesad K., Tob H., Okumura S., Yangisawa S. and Izui K. (1992).** Molecular evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase for C4 photosynthesis in maize: Comparison of its cDNA sequence with a newly isolated cDNA encoding an isozyme involved in the anaerobic function. *J. Biochem.* 112: 147-154.
- Latzko E. and Kelly G.J. (1983).** The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C3 plants. *Physiol. Veg.* 21: 805-813.
- Laval-Martin D., Farineau J. and Diamond J. (1977).** Light versus dark carbon metabolism in cherry tomato fruits. *Plant Physiol.* 60:872-876.
- Lepiniec L., Santi S., Keryer E., Amiet V., Vidal J., Gadal P and Crétin C. (1991).** Complete nucleotide sequence of one member of the sorghum phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Mol. Biol.* 17: 1077-1079-
- Lepiniec L., Keryer E., Tagu D., Gadal P. and Crétin C. (1992).** Complete nucleotide sequence of a *Sorghum* gene encoding for the phosphoenolpyruvate carboxylase involved in C4 photosynthesis. *Plant Mol. Biol.* 19: 339-342.
- Lepiniec L., Kerier E., Philippe H., Gadal P. and Crétin C. (1993).** *Sorghum* phosphoenolpyruvate carboxylase gene family: Structure, function and molecular evolution. *Plant Mol. Biol.* 21: 487-502.
- Luinberg I. and Coleman J.R. (1992).** Identification, characterization and sequence analysis of the gene encoding phosphoenolpyruvate carboxylase in *Anabaena* sp. PCC 7120. *J. Gen. Microbiol.* 138: 685-691.
- Matsuoka M. and Hata S. (1987).** Comparative studies of phosphoenolpyruvate carboxylase from C3 and C4 plants. *Plant Physiol.* 85: 947-951.
- Matsuoka M. and Minami E. (1989).** Complete structure of the gene for phosphoenolpyruvate carboxylase from maize. *Eur. J. Biochem.* 181: 593-598.
- Merkelbach S., Gehlen J., Denecke M., Becker I. and Kreuzler F. (1993).** Artículo en revisión, tomado del GeneBank.
- Moore P.D. (1982).** Evolution of photosynthetic pathways in flowering plants. *Nature* 295: 647-648.
- Nelson T. and Langdale J.A. (1992).** Developmental genetics of C4 photosynthesis. *Plant Mol. Biol.* 43:25-47.
- O'Leary M.H. (1982).** Phosphoenolpyruvate carboxylase: An enzymologist's view. *Annu Rev Plant Physiol.* 33: 297-315.

---

REFERENCIAS

- O'Leary M.H.** (1983). Mechanism of action of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Physiol. Veg.* 21: 883-888.
- Pathirana S.M., Vance C.P., Miller S.S. and Grant J.S.** (1992). Alfalfa root nodule phosphoenolpyruvate carboxylase: Characterization of the cDNA and expression in effective and plant-controlled ineffective nodules. *Plant Mol. Biol.* 20: 437-450.
- Poetsch W., Hermans J. and Westhoff P.** (1991). Multiple cDNAs of phosphoenolpyruvate carboxylase in the C4 dicot *Flaveria trinervia*. *FEBS Lett.* 292: 133-136.
- Raghavendra A.S.** (1980). Characteristics of plant species intermediate between C3 and C4 pathways of photosynthesis: Their focus of mechanism and evolution of C4 syndrome. *Photosynthetica.* 14: 271-283.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel, S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. and Erlich, H.A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239:487-492.
- Sambrook J. Fritsch E.F. and Maniatis T.** (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger S. and Coulson A.R.** (1975). *J.Mol.Biol.* 94:441-448. tomado de Sambrook, 1989.
- Schaffner A.R. and Sheen J.** (1992). Maize C4 photosynthesis involves differential regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase genes. *Plant J.* 2: 221-232.
- Sheen J.-Y. and Bogorad L.** (1987). Differential expression of C4 pathway genes in mesophyll and bundle sheath cells of greening maize leaves. *J. Biol. Chem.* 262: 11726-11730.
- Sheen J.Y.** (1991). Molecular mechanisms underlying the differential expression of maize PPKK genes. *Plant Cell.* 3:225-245.
- Sugimoto K., Kawasaki T., Kato T., Whittia R.F., Shibata D. and Kawamura Y.** (1992). cDNA sequence and expression of a phosphoenolpyruvate carboxylase gene from soybean. *Plant Mol. Biol.* 20: 743-747.
- Tagu D., Créatin C., Bergounioux C., Lepinlec L. and Gadal P.** (1991). Transcription of a sorghum phosphoenolpyruvate carboxylase gene in transgenic tobacco leaves: Maturation of monocot pre mRNA by dicot cells. *Plant Cell Reports* 9: 689-690.
- Terada K and Izui.** (1991). Site-directed mutagenesis of the conserved histidine residuc of phosphoenolpyruvate carboxylase. His 138 is essential for the second partial reaction. *Eur. J. Biochem.* 202: 797-803.
- Terada K., Murata T and Izui K.** (1991). Site directed mutagenesis of PEPC from *E. coli*: The role of His 579 in the catalytic and regulatory functions. *J. Biochem* 109: 49-54.

7

---

**Wang Y.H., Duff S.M., Crétin C., Lepiniec L., Sarath G., Vidal J., Gadal P. and Chollet R. (1992).** Site-directed mutagenesis of the phosphorylatable serine in C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum. *J. Biol. Chem.* 267:16759-16762.

**Wedding R.T., Rustin P., Meyer C.R. and Black M.K. (1988).** Kinetic studies of the form of substrate bound by phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 88: 976-979.

**Yampara H., Mujica C. y Muñoz R. (1994).** Purificación y caracterización de la enzima Fosfoenolpiruvato carboxilasa de hoja de frijol. *Memorias XX Congreso Nacional de Sociedad Mexicana de Bioquímica. Zacatecas.Mex.*

**Yanagisawa S. and Izui K. (1989).** Maize phosphoenolpyruvate carboxylase involved in C<sub>4</sub> photosynthesis: Nucleotide analysis of the 5'-flanking region of the gene. *J. Biochem.* 106: 982-987.

**Yanagisawa S. and Izui K. (1990).** Multiple interaction between tissue-specific nuclear proteins and the promoter of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene for C<sub>4</sub> photosynthesis in *Zea mays*. *Mol.Gen.Genet.* 224:325-332.

**Yanagisawa S. and Izui K. (1992).** Maize nuclear factors interacting with the C<sub>4</sub> photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase gene promoter. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.vol.III.*:839-842.