

113
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"ESCRUTINIO DE UNA BIBLIOTECA DE ADNc CON
EL OBJETO DE AISLAR EL GEN DE LA
FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA (PEPC) Y SU
EXPRESION EN VAINA DE FRIJOL (*Phaseolus
vulgaris* L.)

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
LEONEL MONTOYA GARCIA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. FEDONIA LOZA TAVERA

MEXICO, D. F.

1997.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

“ Escrutinio de una biblioteca de ADNc con el objeto de aislar el gen de la Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y su expresión en vaina de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

realizado por Leonel Montoya García

con número de cuenta 8955277-7 pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Dra. Herminia Loza Tavera

Propietario

Biól. Miguel Ángel Meneses Pérez

Propietario

M. en C. Martín Pedro Vargas Suárez

Suplente

Biól. José Luis Busto Sánchez

Suplente

Biol. Vicente Castrejón Téllez

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

M. en C. ALEJANDRO MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

A MIS PADRES:

**Zenaida García Sánchez
Angel Montoya Cruz**

Por encauzarme inteligentemente en el inicio de mi camino por la vida, gracias a su confianza su apoyo moral y económico que me han brindado siempre. Por impulsarme a seguir adelante en todo momento y por su invaluable ejemplo de lucha y superación constante.

A ustedes todo mi amor y gratitud.

A MIS HERMANOS:

**Neydi , Luis Angel, y Emir
Por la paciencia y fe que siempre han tenido en mí.**

A TODOS MIS FAMILIARES:

**Abuelos, Tíos, Primos
Por todos los consejos recibidos y por su apoyo constante
A mis sobrinos: Yaroslava, Carlos y Angel**

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias al apoyo recibido por la dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA).

Al proyecto DGAPA IN-203592 titulado "Fosfoenolpiruvato carboxilasa de frijol: regulación y expresión genética" por la beca proporcionada durante la realización de la tesis.

Al Departamento de Bioquímica de la División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Química por permitirme desarrollar este trabajo en sus instalaciones.

A la Dra. Herminia Loza Tavera por aumentar mi interés en la investigación y por la excelente formación que recibí el tiempo que permanecí con ella.

A el Biol. Miguel Angel Meneses Pérez, al M.en C. Martín Pedro Vargas Suárez, al Biol. José Luis Busto Sánchez y al Biol. Vicente Castrejón Téllez por la revisión de este trabajo y por sus puntos de vista críticos.

A mis compañeros y amigos Alfredo, Enrique, Javier, Claudia ,Gaby con los que compartí momentos gratos en el laboratorio y quien siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en cualquier forma.

A todos los chicos del laboratorio 114 por su amistad y apoyo en todo momento durante la realización de esta tesis. Y a todas las personas que de alguna manera ayudaron en la realización de esta tesis.

A todos mis amigos de la Facultad de Ciencias con quien disfrute mi estancia en esta Facultad.

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México. Por brindarme la oportunidad de alcanzar una de mis metas.

CONTENIDO

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
III. REVISION DE LITERATURA	4
III.1. Función de la fosfoenolpiruvato carboxilasa	4
III.2. Isoformas	
III.3. La fosfoenolpiruvato carboxilasa de vaina de frijol	5
III.4. Genes de PEPC	6
III.5. Importancia de las técnicas de biología molecular en el aislamiento de genes	
III.6. Tipos de bibliotecas	6
III.7. Importancia de los escrutinios	7
III.8. Tipos de escrutinios	10
III.9. Tipos de sondas	11
IV. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES	12
V. OBJETIVOS	13
VI. ESTRATEGIA METODOLOGICA	13
VI.1. Estrategia para realizar el escrutinio	
VI.2. Estrategia para determinar los niveles de mensajes de la PEPC de vaina de frijol.	14
VII. MATERIALES Y METODOS	15
VII.1. Material	
1.a. Anticuerpos contra PEPC de maiz	
1.b. Biblioteca de cDNA	
1.c. Tejido de frijol	
1.d. Descripción de sonda empleada	
VII.2. Western-Blot	16
VII.3. Titulación de la biblioteca	18
VII.4. Escrutinio en placas de hibridación	19
VII.5. Marcaje y preparación de la sonda	21
5.a. Purificación de insertos de DNA	
5.b. Marcaje con ³² P.	22
5.c. Preparación de la columna	
5.d. Purificación de la sonda	23
5.e. Cuantificación de actividad específica	

VII.6. Hibridación DNA-DNA y RNA-DNA.	24
6.a. Hibridación	
6.b. Lavados	
VII.7. Utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en escrutinios de bibliotecas	25
VII.8. Amplificación de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	28
VII.9. Obtención de placas de lisis del fago λ	30
VII.10. Escisión <i>in vivo</i> del plásmido pZL1 del fago λ ZIP-LOX	31
VII.11. Extracción de DNA plasmídico a pequeña escala	32
VII.12. Extracción de DNA plasmídico a gran escala	34
VII.13. Cuantificación de DNA	35
VII.14. Análisis de DNA plasmídico mediante el empleo de enzimas de restricción	36
VII.15. Electroforesis de DNA en gel de agarosa	37
VII.16. Transferencia por capilaridad de DNA a membranas de nylon	39
VII.17. Infección a alta multiplicidad	40
VII.18. Aislamiento de RNA	41
VII.19. Electroforesis de RNA en sistema desnaturizante	42
VII.20. Transferencia de RNA	44
VIII. RESULTADOS	44
VIII.1. Western-blot	46
VIII.2. Primer escrutinio (rondas)	48
VIII.3. Segundo escrutinio (rondas)	50
VIII.4. Northern-blot	52
IX. DISCUSION	56
X. CONCLUSIONES	57
XI. BIBLIOGRAFIA	

ABREVIATURAS.

ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albúmina de suero bovino.
C3	Plantas cuyo primer compuesto estable después de la fijación del CO ₂ es un compuesto de tres carbonos (Gliceraldehído 3-fosfato).
C4	Plantas cuyo primer compuesto estable después de la fijación del CO ₂ es un compuesto de cuatro carbonos (ác. málico o aspártico).
CAM	Plantas con el metabolismo ácido de las crasuláceas.
cpm	Cuentas por minuto
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
DNA	Acido desoxirribonucleico
DEPC	Dietil pirocarbonato
dNTP	Deoxirribonucleótidos trifosfato.
ddf	Días después de la floración.
EDTA	Etilendiamino tetra acetato.
IPTG	Isopropil tio β-D-galactósido.
kD	Kilodaltones
kb	Kilopares de bases
LB	Medio Luria-Bertoni.
M	Molaridad
mg	Miligramos
MOPS	Acido 3-[N-morfolino] propano sulfónico.
ng	Nanogramos
NZY	Medio con N-caza aminoácidos
OAA	Oxaloacetato
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
PAGE	Electroforesis en gel de poli(acrilamida)
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Amortiguador de dilución para fagos
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PEG	Poli(etilenglicol)
PMSF	Fenil metilsulfonilfluorido
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSC	Solución de sales Sodio-Citrato.
TAE	Solución de Tris-Acetato

Taq DNA pol.

TEA

TE

µg

µl

ufp

X-gal

(³²P)

DNA polimerasa purificada de la bacteria *Thermophilus acuaticus*

Trietanolamida

Solución Tris-EDTA.

Microgramos.

Microlitros

Unidades formadoras de placas

5-Bromo-4-cloro-3-indoilo-β-D-galactosido.

Isotopo radiactivo de fósforo

I. RESUMEN

La Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) cataliza la fijación del CO_2 en fosfoenolpiruvato (PEP) para formar oxaloacetato y fosfato inorgánico. La PEPC es una enzima importante por que se encuentra implicada en la fijación del CO_2 en plantas y algunos otros organismos. El producto de esta enzima tiene una función metabólica que depende del tejido y del tipo de planta (Mark, 1986). 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), los cuales pasan a formar parte de los aminoácidos (Andreo *et al.*, 1987; O'Leary, 1983). También 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 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 CO_2 en vaina no es clara. En el laboratorio donde se realizó este trabajo se estudia la fosfoenol-piruvato carboxilasa de frijol para entender su regulación y su expresión genética. Los objetivos del proyecto global son analizar la secuencia de la PEPC de frijol, sus regiones reguladoras y determinar el número de genes que codifican esta enzima, para así poder comparar el grado de identidad que existe entre la enzima de frijol y otras PEPC descritas. El objetivo de este trabajo, inserto dentro del proyecto global, fue aislar clonas de cDNA que codificaran la PEPC de vaina de frijol, realizando escrutinios de una biblioteca de cDNA de vaina de frijol de siete días después de la floración, construida en λ ZIPLOX por E. Hernández (1995). Este tipo de bibliotecas construida en el fago lambda, contiene en su secuencia un vector plasmídico multifuncional, el pZL1, que puede ser escindido *in vivo* y ser propagado y analizado en bacterias. Se llevaron a cabo dos escrutinios con varias rondas de purificación. El primer escrutinio se realizó por hibridación convencional de placas partiendo de 300,000 fagos recombinantes. Se utilizó una sonda homóloga (pPvPEPC) marcada radiactivamente, con un tamaño de 650 pb la cual había sido producida por PCR y clonada en el vector pTZ18 en el sitio romo dado por Sma Y y en el otro sitio de restricción introducido Bam HI Ayala (1995). Después de varias rondas de purificación se aislaron dos clonas positivas cuyos insertos hibridaron con la sonda homóloga. La secuencia de estas clonas no mostró

homología con la PEPC de ninguna especie. Para realizar la primer ronda del segundo escrutinio se utilizó la técnica de PCR. El DNA eluido de filtros levantados de cajas con 400,000 placas fue sujeto a un análisis por PCR empleando primeros para un fragmento de 650 pb de la región de unión al substrato de la PEPC. De este escrutinio resultaron varias cajas positivas, las cuales fueron posteriormente analizadas por hibridación convencional. De este escrutinio se aislaron varias clonas positivas las cuales fueron purificadas a través cuatro ronda de purificación. Estas placas positivas han sido escindidas *in vivo* y su inserto ha sido demostrado que se une a la sonda de PEPC de frijol. Estas clonas han sido mantenidas para su posterior secuenciación. También se realizó un análisis de tipo Northern para determinar los niveles de expresión del mensaje en diferentes tejidos de la planta de frijol y durante diferentes momentos del desarrollo de la vaina. La sonda empleada permitió la detección de un mensaje de aproximadamente 3 kb en tallo, hoja y vaina, pero no en raíz. En hoja, el mensaje mayoritariamente expresado, parece ser ligeramente mas pequeño, observándose también una banda de muy ligera intensidad, que presenta un mayor tamaño. En tallo la intensidad de la banda es muy ligera, casi imperceptible. En vaina se observa la mayor cantidad de mensaje presente a los siete días después de floración (ddf), esta cantidad disminuye permaneciendo casi estable hasta el final del estudio (28 ddf). Esos resultados, comparados con los de actividad de PEPC de vaina, presentados por Delgado (1992) indican que muy probablemente estén funcionando distintos niveles de control de la expresión genética a lo largo del desarrollo de la vaina. Al inicio del desarrollo, el control transcripcional es el mas evidente, mientras que en estadios posteriores, el control traduccional o post-traduccional, podría ser el principal punto de regulación de la actividad de la enzima en vaina de frijol.

III. REVISION DE LITERATURA

III.1. Función de la fosfoenolpiruvato carboxilasa

La PEPC cataliza la β -carboxilación de PEP para producir oxaloacetato (OAA) y fosfato inorgánico (O'Leary, 1983; Andreo *et al.*, 1987). La reacción es esencialmente irreversible. La enzima requiere HCO_3^- para su activación, *in vivo* es dependiente de cationes bivalentes, preferentemente Mg^{2+} , pero *in vitro* puede utilizar Mn^{2+} o CO_3^{2-} (O'Leary, 1983).

Aparte de la asimilación fotosintética del carbono, se han atribuido otras funciones a la PEPC tales como, proveer de compuestos de carbono al ciclo de Krebs (función anaplerótica) los cuales pasan a formar parte de aminoácidos, generación de NADH, refijación del CO_2 , asimilación de nitrógeno, síntesis de aminoácidos y mantenimiento del pH/electroneutralidad (Tirumala y Raghavendra, 1992).

III.2. Isoformas.

Actualmente se conocen tres isoformas de PEPC en plantas superiores las cuales se clasifican como: forma fotosintética C4, forma CAM y forma C3. La isoforma de tipo C4 cataliza la fijación del CO_2 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 intensidades luminosas. La isoforma CAM tiene también una función de tipo fotosintético. Está presente en plantas de tipo CAM las cuales son plantas de clima desértico y presentan su fijación de CO_2 durante la noche, cuando la planta abre sus estomas, evitando así la pérdida de agua (Osmond, 1978, Hatch, *et al.*, 1987). El malato producido a expensas del oxaloacetato producto de la actividad de PEPC, es empleado como donador de carbono durante la fotosíntesis que se presenta durante el periodo luminoso. Por último la forma de PEPC no autotrófica, de tipo anaplerótico tiene un papel muy importante en el abastecimiento de compuestos de cuatro carbonos al ciclo de Krebs, lo cuales pasan a constituir aminoácidos (O'Leary, 1982; Andreo *et al.*, 1987). Estas isoformas se distinguen además, por sus propiedades cromatográficas, inmunológicas y cinéticas.

En hojas de sorgo se presentan dos isoformas de PEPC, una forma que ocurre en hojas etioladas, la cual presenta características tipo C3 mientras que la forma presente en hojas verdes muestra propiedades cinéticas y regulatorias de tipo C4. No existe interconversión entre estas, lo que indica que cada forma es codificada por un gen diferente. Tres diferentes isoformas han sido detectadas en hojas verdes, hojas etioladas y en raíz de *Zea mays* además de que cada una se encuentra codificada por un gen (Hudspeth and Grula, 1989; Schaffner and Sheen, 1992). El hecho que se presenten isoformas múltiples 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 y específica de los genes de PEPC (Schaffner and Sheen, 1992)

III.3. La fosfoenolpiruvato carboxilasa de vaina de frijol.

La planta del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) ha sido clasificada dentro de la familia de las leguminosas y en México es una de las especies económicamente más importantes porque su semilla es consumida por gran parte de la población. Debido a que la semilla posee un alto contenido de proteínas es una excelente alternativa en la población mexicana para completar la ración de aminoácidos indispensable en la alimentación.

Flinn *et al.* (1977) observaron en frutos de leguminosas, que la vaina contribuye con aproximadamente un 10% al carbono de la semilla a través de la fijación del CO₂ respirado, lo cual es una cantidad considerable tomando en cuenta la producción total. Al analizar la fijación del CO₂ por medio de las enzimas fijadoras RUBISCO y PEPC en diferentes frutos, se observó que muy poco CO₂ atmosférico es fijado por medio de la RUBISCO, en relación con lo que fijan las hojas (Blanke and Lenz, 1989). En un trabajo realizado por Delgado (1992) en frijol, observó que la actividad de la PEPC se localizaba en mayor cantidad en tejido interno de la vaina, la alta actividad de la PEPC está relacionada con las condiciones que operan dentro de la vaina tales como: altos niveles de CO₂, niveles relativamente bajos de clorofila y una penetración restringida de la luz a través del pericarpio. Esto apoya la hipótesis de que esta enzima juega un papel importante en la reasimilación del CO₂ respirado por la semilla, el cual se acumula en la cavidad de la vaina. Por otro lado, al proporcionar a la vaina ¹⁴CO₂ desde su

cavidad interna observó que aparecían marcados los compuestos sacarosa, glicina, serina, almidón, aspartato, glutamato y glutamina. Esto indica que el CO₂ se está fijando en el tejido interno de la vaina y que los esqueletos carbonados están siendo utilizados para la síntesis de almidón y aminoácidos (Delgado, 1992)

Las características cinéticas de la PEPC de fruto difieren de la PEPC de otros modelos. Esto ha llevado a proponer que en frutos está ocurriendo un tipo de fotosíntesis característico de este órgano el cual llamaron “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 este órgano.

III.4. Genes de la PEPC

Gran parte de los estudios en plantas están enfocados al análisis del papel de PEPC en especies C4 y CAM conociéndose muy poco acerca de la PEPC de plantas de tipo C3. Recientemente se han logrado aislar clonas de DNA complementario y genómicas que codifican a la enzima de especies C4, C3 y CAM así como de formas procarióticas (Tabla 1).

Todas las secuencias de aminoácidos de PEPC de plantas superiores y formas procarióticas mencionadas en este estudio se encuentran en los bancos de datos (Swissprot, Genbank, etc).

La PEPC-C3 esta compuesta de 967 aminoácidos en *Glycine max* (Sugimoto *et al.*, 1992), 966 en *Medicago sativa* (Pathirana *et al.*, 1992), 964 en *Nicotiana tabacum* (Koizumi *et al.*, 1991), 956 en *Solanum* (Merkelbach *et al.*, 1993), 967 en *Flaveria trinervia* (Poetsch *et al.*, 1991), 966 en *Mesembryanthemum crystallinum* (Cushman *et al.*, 1989), 960 en *Sorghum vulgare* (Crétin *et al.*, 1991) y 970 en *Zea mays* (Kawamura *et al.*, 1992).

En la Tabla 2 se muestra una comparación de secuencias de aminoácidos de distintas PEPCs. 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).

III.5. Importancia de las técnicas de Biología molecular en el aislamiento de genes

Dentro de las ciencias modernas un área muy importante que ha generado grandes avances es la Biología Molecular (Schuler y Zielinski, 1989). Una de sus aplicaciones es la Ingeniería Genética la cual es un conjunto de técnicas con las que se realizan manipulaciones

Tabla 1. Especies en las que se han caracterizado clonas genómicas y de cDNA de PEPC. (Tomado de Ayala, 1996)

Espece analizada	Formas de PEPC Tejido analizado	Clona Genómica o cDNA	Referencia
<i>Glycine max</i>	C3 (semilla)	gmpp 16	Sugimoto <i>et al.</i> (1992)
<i>Medicago sativa</i>	C3 (nódulo de raiz)	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 pringlie</i>	C3 (hoja)	pcFppc	Hermans y Westhoff (1992)
<i>Saccharum híbrido var. H 32-8560</i>	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 (raiz)	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 Gruha (1989); Yanagisawa y Izue (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	---	Luinenburg y Coleman (92)
<i>Escherichia coli</i>	Procariótica	pLC20-10	Fugita <i>et al.</i> (1984)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Procariótica	pUC-pp2	Eikmanns <i>et al.</i> (1989)

Tabla 2. Comparación de secuencias de aminoácidos de diferentes PEPCs. Los valores indican el porcentaje de identidad determinado por el alineamiento más favorable individualmente para cada caso mediante el programa GENETYX. *Glycine 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	Sv L2C4	Zm C4
SvLI 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	
Sv 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						

sobre el DNA. Esta disciplina se encarga de aislar genes, conocer su estructura y, por último, de introducir el gen "purificado" y eventualmente modificado en células de un organismo distinto al de origen (Davis, 1987).

La manipulación genética se define como la formación de nuevas combinaciones de material heredable por la inserción de moléculas de ácidos nucleicos (producidos por cualquier medio fuera de la célula) en algún virus, plásmido bacteriano o algún otro vector que permita su incorporación dentro de algún organismo hospedero en el cual no exista naturalmente, pero en el que sean capaces de continuar propagándose (Old y Primrose, 1989). Una de las principales aplicaciones de la tecnología de clonación de DNA es el aislamiento de genes específicos de un organismo. Cuando éste es una planta superior o un animal vertebrado, la tarea de detectar un gen específico para aislarle puede resultar extraordinariamente difícil, considerando que el genoma de las plantas tiene un tamaño que oscila entre 10^8 y 10^{10} pb y un gen individual abarca en promedio, de 3000 a 5000 pb de DNA.

Una de las técnicas importantes que ha permitido el desarrollo de la Ingeniería Genética es la construcción de bancos o bibliotecas de genes. En estas bibliotecas se encuentra reunida la

información genética de un organismo dentro de unos pocos centenares de miles de fagos o plásmidos. Las bibliotecas de cDNA son una herramienta básica muy útil cuando se requiere aislar un gen que se encuentra expresando en ciertos tejidos y en cierto período de desarrollo. El éxito en el aislamiento del recombinante deseado de una población de bacterias o fagos depende en gran parte de las estrategias de clonación y de sondeo empleadas. Una vez encontrada la clona recombinante el siguiente paso es la secuenciación del gen, la cual dará información del tipo y número de aminoácidos, las regiones reguladoras importantes, los extremos 5' y 3', etc. En base a un alineamiento de esta secuencia con secuencias reportadas se puede comparar el grado de homología existente entre esta proteína y otras descritas previamente. Por otro lado, también en base a la secuencia, se pueden conocer los diferentes sitios reconocidos por las enzimas de restricción y realizar un mapa preciso de restricción del gen aislado. La información de la secuencia es un prerrequisito para poder planear una manipulación substancial del DNA. El aislar y secuenciar un gen permite la posibilidad de manipular ese gen produciendo organismos transgénicos que, en el caso de especies vegetales, puedan emplearse con miras a un mejoramiento genético para incrementar el rendimiento en la producción de semillas o frutos y la resistencia a plagas y enfermedades (Tempe y Schell, 1987).

III.6. Tipos de bibliotecas

La construcción de bibliotecas de genes representa un método de gran utilidad para cualquier investigador que esté tratando de esclarecer el papel que algún gen este desempeñando dentro de algún organismo.

De manera general existen dos tipos de bibliotecas comúnmente usadas:

Bibliotecas genómicas. Se construyen a partir del DNA total de un organismo. Este DNA se digiere con endonucleasas de restricción y los fragmentos son clonados en un vector seleccionado. La biblioteca debe contener un número abundante de clonas recombinantes para que exista la posibilidad estadística de que todos los genes se encuentran representados.

Bibliotecas de cDNA. Se parte del RNA mensajero que se encuentra presente en algún tejido o tipo de células específicas y únicamente contiene copias de los genes que se encuentran expresados activamente en ese tejido en particular o tipo de célula (Brown, 1991). Estas

formación de puentes de hidrógeno entre las bases complementarias, generando hélices dobles de DNA, RNA e híbrido DNA-RNA, bajo condiciones de temperatura y fuerza iónica adecuada (Wahl *et al.*, 1987).

Las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos constituyen una poderosa herramienta para la detección de cantidades sumamente pequeñas (del orden de picogramos) de una secuencia dada, en una mezcla compleja de DNA o RNA. Estas técnicas se basan en el uso como "rastreador" o "sonda" de un fragmento de ácido nucleico que sea homólogo (parcial o totalmente complementario) al segmento de DNA o RNA que se desea identificar en la mezcla. Para esto la sonda debe ser marcada ya sea radioactivamente con ^{32}P o con medios no radioactivos.

III.9 Tipos de sondas

Para facilitar el escrutinio por hibridación con ácidos nucleicos, es muy útil contar con una sonda homóloga, es decir que el DNA sea de la misma especie. Sin embargo, se pueden usar sondas heterólogas que presenten una alta homología con la secuencia que se está buscando.

Por otra parte si no se cuenta con una sonda homóloga, esta puede ser obtenida por amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de un fragmento de DNA a partir de DNA genómico o cDNA. Con este objetivo, se diseñan oligonucleótidos complementarios a las regiones más conservadas del gen que se quiere aislar.

IV. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES

En base a los antecedentes mencionados en los puntos III.1, III.2, III.3 y III.4 en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, se ha iniciado una línea de investigación en la que se plantea estudiar la Fosfoenolpiruvato carboxilasa de frijol desde el punto de vista de su regulación y expresión génica. Este proyecto tiene por objeto determinar el número de genes que codifican a la PEPC en vaina de frijol, analizar su secuencia y sus regiones reguladoras, así como comparar el grado de homología existente entre ésta y otras PEPC descritas. Parte de esta información podría dar indicios para proponer cual es la ruta metabólica que sigue el CO₂ fijado en el tejido interno de la vaina de frijol.

Los avances logrados hasta ahora en esta línea de investigación han mostrado que la actividad de la PEPC en vaina de frijol disminuye a partir de los 14 días después de la floración (Delgado, 1992). En base a esto, se decidió construir una biblioteca de cDNA de vaina de siete días después de la floración en DNA del vector lambda de tipo ZIPLOX (Hernández, 1995). Este vector pertenece a una nueva generación de vectores en la cual la manipulación de los genes clonados se hace mas fácil ya que este DNA de lambda contiene un plásmido con un origen de replicación bacteriano funcional. Este plásmido bacteriano se puede escindir *in vivo* en una cepa bacteriana adecuada para tal efecto. Esto permite la "subclonación automática" del cDNA aislado. Al analizar los tamaños de los cDNAs clonados, se observó que estos variaban entre 1 y 7 kb lo que es un indicio de la buena calidad de la biblioteca.

Por otra parte, mediante el empleo de la técnica de PCR, se construyó una sonda homóloga de PEPC de vaina de frijol utilizando el cDNA de la biblioteca como molde (Ayala, 1995). Como primeros se emplearon oligonucleótidos degenerados correspondientes a secuencias que flanquean la región más conservada del gen. Esta región se determinó al analizar las secuencias de diferentes genes PEPCs y corresponde a la zona de la enzima que une el fosfoenolpiruvato (PEP). El producto obtenido después de la reacción de PCR presentó el tamaño esperado de 650 pb, fué clonado en el vector pTZ18 en un sitio romo dado por Sma I y del otro lado un sitio de restricción introducido Bam HI. El fragmento fue secuenciado completamente para comprobar su naturaleza la cual correspondía a un fragmento de PEPC (Ayala, 1995). Este fragmento es el que se empleó como sonda para llevar a cabo el trabajo descrito en esta tesis.

V. OBJETIVOS

- a) Aislar una o varias clonas que contengan el gen de la PEPC que se expresa en vaina de frijol a partir de una biblioteca de cDNA.
- b) Analizar la expresión del mensaje del gen de la PEPC en diferentes tejidos de la planta de frijol mediante la técnica de Northern-blot empleando la sonda homóloga para PEPC de vaina.

VI. ESTRATEGIA METODOLOGICA

VI.1. Estrategias para realizar el escrutinio

Debido a que nuestra biblioteca de cDNA de vaina de frijol fue construida en el vector λ ZIPLOX el cual es un vector de expresión, una de las estrategias que podrían ser utilizadas para realizar el escrutinio de la biblioteca sería por inducción de expresión de los cDNAs clonados, detectando la proteína expresada empleando anticuerpos en contra de la PEPC. Para llevar a cabo esta estrategia se contaba con anticuerpos en contra de la PEPC de maíz, donados por la Dra. Rosario Muñoz Clares. Por tal motivo primero se extrajo la proteína a partir de extractos crudos de frijol, se realizaron pruebas de tipo Western blot para determinar si el anticuerpo en contra de la PEPC de maíz reconocía la PEPC de frijol. Los resultados de este análisis son presentados en la sección VIII.1. Debido a que ese anticuerpo no reconoció claramente a la PEPC en extractos de frijol, fue necesario emplear otra estrategia para realizar el escrutinio.

Para esto, se decidió realizar el escrutinio por Southern blot (hibridación con ácidos nucleicos). La sonda empleada, pPvPEPC, fue construida por Ayala (1995) empleando la técnica de PCR. El usó oligonucleótidos degenerados diseñados específicamente para una región de PEPC altamente conservada y logró amplificar un fragmento de 650 pb a partir de la biblioteca de cDNA de vaina el cuál fue clonado en el vector pTZ18. La secuenciación de este fragmento comprobó que este fragmento era de PEPC (Ayala, 1995). Para este estudio, la sonda se marcara radiactivamente y se utilizara para realizar el escrutinio.

Paralelamente a este análisis se llevará a cabo un escrutinio por medio de la técnica de PCR. Este método consiste en tomar el eluido de las placas de fagos de cada caja petri y

emplearlo como molde con los oligonucleótidos degenerados para PEPC como primeros y llevar a cabo una reacción de PCR. La aparición de una banda de 650 pb indicaría la presencia de un fragmento del gen de PEPC. Rondas subsecuentes de PCR empleando eluidos de regiones más pequeñas de la caja permitirán la disminución del número de fagos en donde habrá de hacerse la selección final de clonas positivas. Las últimas selecciones se harán con el sistema tradicional de hibridación DNA-DNA para poder identificar y aislar clonas recombinantes positivas de manera individual.

VI.2. Estrategia para determinar los niveles de mensajes de la PEPC de vaina de frijol.

Para la realización de este análisis se colectarán vainas de frijol de 7, 14, 21 y 28 días después de floración, de tallo, raíz y hoja. Se extraerá RNA total y se separará en un gel de agarosa desnaturalizante. El RNA será transferido a un soporte sólido(membrana nylon) mediante capilaridad. Se efectuará el análisis de los RNAs de PEPC empleando la sonda pPvPEPC marcada radioactivamente con ^{32}P y se realizara la hibridación a 65°C por 20 horas. Las membranas se expondrán en intensificadores a -70°C con películas de rayos X . Se revelaran las películas y se analizaran los niveles de mensajes de PEPC.

VII. MATERIALES Y METODOS.

VII.1. Materiales.

1.a.- Anticuerpos contra PEPC de hoja de maíz (*Zea mays*) (Donados por la Dra. Rosario Muñoz Clares).

1.b.- Biblioteca de cDNA de vaina de frijol de siete días después de la floración, clonada en el vector λ ZIP-LOX, Not I-Sal I Arms (Gibco BRL No. cat. 15394-018), con un título de 1.25×10^5 ufp/ μ l

1.c.- Tejido de vaina de frijol de 7, 14, 21, 28 días después de floración (ddf), tallo, raíz, para realizar la extracción de RNA y hoja joven para extraer la proteína PEPC y también RNA.

1.d.- La sonda empleada, pPvPEPC, fué un producto de 650 pb obtenido por PCR el cual está cloncando en el vector pTZ18R en un sitio romo dado por Sma I y del otro lado un sitio de restricción introducido Bam HI (Ayala, 1995). La secuencia de nucleótidos del fragmento, con el producto de traducción deducido se muestra en la Figura 1.

VII.2. Extracción de proteína y Western- Blot

Cuando se desea realizar escrutinios con anticuerpos y si estos no son específicos para la especie que se pretende estudiar, es conveniente realizar pruebas con la proteína de la especie de interés para determinar si la proteína es reconocida y a que título debe emplearse el anticuerpo. Por medio de Western-blot podemos probar si es factible utilizar este anticuerpo para el escrutinio de la biblioteca o bien cambiar de estrategia para realizar el escrutinio.

Procedimiento:

- 1.- En un mortero se maceraron los extractos con arena de mar y se adiciono el amortiguador de extracción (TEA 50 mM, EDTA 1 mM, PEG 3 %, PVPP 10 %, β -mercaptoetanol, Quimiostatin 2 μ g/ml, Benzamidina 2 mM, PMSF). Se agito en vortex y se centrifugo a 12 000 rpm por 3 minutos y se recupero el extracto. La cuantificación de la proteína se realizó de acuerdo al método de Bradford (1976)
- 2.- Se realizó una electroforesis desnaturalizante (PAGE-SDS) empleando extractos de hoja de frijol así como de hoja de maíz como control. Se empleo un gel de poliacrilamida al 12% de

acuerdo al protocolo de Laemmli (1970). El gel de poli(acrilamida) se lava brevemente en el amortiguador de transferencia (Tris 20 mM, Glicina 150 mM, Metanol 20 %).

2.- Se recorta una membrana de nitrocelulosa (0.45 μm) del mismo tamaño del gel y se lava con el amortiguador de transferencia.

3.- A continuación se prepara el siguiente sandwich:

1 Scotch brite, 3 papeles filtro, 1 hoja de papel 3MM, Gel (-), Filtro de nitrocelulosa (+), 1 hoja de 3MM, 3 papeles de filtro, 1 Scotch brite

Es importante destacar que todos los componentes deben estar bien embebidos en el amortiguador de transferencia y que no se deben formar burbujas entre ellos. Este sandwich se monta en el aparato de electrotransferencia y las proteínas se transfieren a la membrana por una hora a 200V (8 volts por cm^2) empleando amortiguador de transferencia.

4.- El filtro con las proteínas transferidas se lava 15 min con TBS (NaCl 0.15 M y Tris 50 mM pH 7.4) con agitación constante.

5.- Se incuba con la solución de saturación (0.05% v/v Tween 20 y 5% p/v de leche descremada) durante un mínimo de una hora a temperatura ambiente y con agitación constante.

6.- Se realizan dos lavados con TBS durante 15 min cada lavado.

7.- El filtro se incuba con el anticuerpo contra PEPC de maíz a una dilución de 1:20 en solución de saturación, en una bolsa sellada y con agitación, durante la noche a 4°C.

8.- Pasada la incubación el filtro se lava con TBS durante 15 min.

9.- Lavado con TBS con NaCl 1M.

10.- Lavado con TBS normal (NaCl 0.15 M)

11.- Se incuba con inmunoglobulinas conjugadas con peroxidasa en la solución de saturación a temperatura ambiente durante 2 h con agitación constante.

12.- Se realizan dos lavados con TBS por 15 min.

13.- El revelado con el sustrato insoluble de la peroxidasa se realiza en las siguientes proporciones: 22 mg de 4-cloro-1-naftol (Merck 11952), 11 ml de metanol, 33 ml de TBS y 44 μl de peróxido de hidrógeno al 30%. El producto de la reacción (en forma de precipitado azul sobre la banda de proteína reconocida por el anticuerpo), suele aparecer entre 5 y 30 min.

Los primeros revelados fueron realizados como se describió anteriormente para revelados posteriores se empleó el kit ECL (Amersham), el cual es un método que se basa en la emisión de luz y que se emplea para detectar antígenos específicos, conjugados directa o indirectamente con anticuerpos marcados con peroxidasa. Con este método se observó una mayor claridad en las bandas. Además, por medio de este revelado se tiene la ventaja de poder reusar la membrana después de un lavado para probarse con otra dilución de anticuerpo, si así se desea.

```

GGA AAA CAA GAA GTG ATG GTC GGT TAC TCA GAT TCA GGG AAA GAT GCT GGA AGG
G  E  Q  E  V  M  V  Q  Y  S  D  S  G  E  D  A  G  R
TTC TCA GCA GCG TGG CAG CTA TAT AAG GCT CAA GAG GAA CTT ATA AAA GTT GCC
F  #  A  A  W  Q  L  Y  K  A  Q  E  E  L  Y  K  V  A
AAG TTT GGT GTG AAG CTA ACC ATG TTC CAC GGT CGC GGT GGA ACT GTT GGA AGA
E  F  G  V  K  L  T  M  F  H  O  R  Q  Q  T  V  Q  E
GGA GGT GGA CCT ACC CAT CTT GCT ATT CTG TCT CAA CCA GAA ACA ATC CAG GGA
G  G  G  P  T  H  L  A  Y  L  S  Q  P  E  T  Y  Q  G
TCT CTC CGT GTG ACA GTC CAA GGT GAA GTC ATC GAG CAA TCA TTT AGG ACC CTG
#  L  R  V  T  V  Q  G  E  V  I  E  Q  S  F  R  T  L
CAA CGT TTC ACT GCG GCT ACT CTA GAA CAT GGA ATG CAC CCA CCA ATC TCT CCT
Q  R  P  T  A  A  T  L  E  H  G  W  E  P  P  I  S  F
AAA CCA GAA TGG CCG GCT TTA ATG GAT GAA ATG GCT GTC ATT GCC ACT GAG GAT
E  P  E  W  R  A  L  N  D  E  M  A  V  I  A  T  E  D
TAC CGT TCA ATT GTG TTC AAG GAA CCA CGT TTT GTT GAG TAT TTC CGC CGT GCT
Y  R  S  I  V  F  K  E  E  R  F  V  F  R  L  A
ACA CCC GAG ATG GAG TAT GGT AGG ATG AAC ATT GGA AGT CGA CCG GCA AGG AGA
T  P  E  M  E  Y  G  R  M  M  I  G  S  R  P  A  K  E  R
AGG CCT AGT GGA GGC ATT GAA ACA CTG GGT CGC ATA CCT TGG ATT TTT OCT TGG
E  F  S  G  G  I  E  T  L  R  A  I  P  W  I  F  A  W
ACC CAG ACA AGG TTT CAT CTT CCA GTT TGG CTG GGC TTT GGA GCG GCA TTT AAA
T  Q  T  R  F  H  L  P  V  W  L  G  F  Q  A  A  P  K
CAA GTT CTT CAG AAA GAT GTT AAG AAC CTC CAT ATG CTG CAA GAG ATG TAC AAT
Q  V  L  Q  E  D  V  K  N  L  H  M  L  Q  E  M  Y  M
TGG CCT TTC TTT
W  P  F  F

```

Figura 1. Secuencia de nucleótidos correspondiente al gen de la PEPC de vaina de frijol (pPvPEPC). Las letras en negritas corresponden a la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos

VII.3. Titulación de la biblioteca. (Josefsen, *et al.* 1993)

Esta técnica se usa para conocer el título de la biblioteca dado en ufp/ μ l y poder plaquear en la densidad adecuada para que en caso de encontrar una clona positiva en las rondas de los escrutinios ésta se pueda aislar mas pura.

- 1.- Se activa la cepa Y1090 de *Escherichia coli* con 200 μ l de medio S.O.C.(20 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 0.5 g NaCl, KCl 250 mM pH 7, MgCl₂ 10 mM y glucosa 20 mM por cada litro de medio) incubandose por 20 min a 37°C.
- 2.- La cepa se siembra en un medio rico (LB: 10 g de peptona, 5 g extracto de levadura, 10 g de NaCl por litro de medio) en cajas de Petri y se incuba toda la noche a 37°C.
- 3.- Se toma una colonia perfectamente aislada del resto, y se inocular en 10 ml de medio LB-liquido suplementado con 0.2% de maltosa (p/v).
- 4.- El cultivo se incuba a 37°C toda la noche con agitación constante (200-250 rpm).
- 5.- De la biblioteca almacenada se preparan tres diluciones 1, 0.1, 0.01 μ l en tubos de microcentrífuga, empleando para las diluciones amortiguador PDB (NaCl 100 mM, MgSO₄ 8 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y gelatina al 0.1 %).
- 6.- Un μ l de estas diluciones se agregan a 200 μ l del cultivo de la bacteria Y1090. Se mezclan suavemente incubando a 37°C durante 30 minutos (sin agitación).
- 7.- Al término del tiempo de incubación se agregan 6 ml (cajas de 120 mm de diámetro) de agar suave (Top-agar) (7 g de agar por litro de medio NZY). Este agar suave debe de estar a 50°C, se agita rápidamente y se vierte la mezcla inmediatamente a cajas con medio NZY (21 g de NZY (Gibco), 7 g de agar por litro de medio ajustar el pH a 7.2 con NaOH).
- 8.- Una vez solidificado el agar se invierten las cajas e incuban a 37°C de 8-12 horas hasta observar las unidades formadoras de placas (ufp)
- 9.- Se cuentan las placas de lisis en cada una de las cajas y se valora el título de la biblioteca calculando las ufp.

Nota: Es importante que las cajas se encuentren perfectamente secas para evitar que alguna gota caiga a la superficie del medio y provoque que las placas de lisis se barran. Para prevenir esto es recomendable colocar un papel filtro del tamaño de la caja, en la tapa de la misma para que absorba la humedad excesiva.

VII.4. Escrutinio por hibridación de placas (Benton y Davis, 1977).

Un filtro de nitrocelulosa se aplica directamente en la superficie de la caja sobre las placas del bacteriófago. El filtro seco es mojado por la muestra de la caja. Durante este proceso, las moléculas de DNA del fago no empacado presentes en la placa lisada son unidas al filtro. El DNA se fija y desnaturaliza en el filtro para posteriormente ser sondeado por pruebas de hibridación con DNA ó RNA marcado con ³²P, localizando por autorradiografía el lugar de donde fue donado por la placa del fago. El filtro tratado forma una réplica del patrón de placas de fago y es usado para seleccionar una sola placa (conteniendo una porción de cDNA de una sola clona) de una colección inicial conteniendo millones de fagos recombinantes.

El método detallado comprende los siguientes pasos, los cuales se realizan en dos días:

Día 1.

1.- A 0.2 ml de células competentes Y1090 (*E.coli*) se les adiciona 7.1 µl de la biblioteca de cDNA con un título de 2.28×10^8 ufp/µl de cDNA para obtener una densidad aproximada de 50,000 placas de lisis por caja. Se incuban por 20 minutos a 37°C para permitir que el bacteriófago infecte a la bacteria.

2.- Se adicionan 6 ml de Top-agarosa (LB con 0.7% de agarosa) a 50°C en cada tubo conteniendo bacteria y fago. Se agita bien y la mezcla se vacía inmediatamente en cajas con medio NZY-agar, agitando suavemente la caja para que la mezcla se extienda y cubra la superficie de agar completamente. Se dispone de 5-10 minutos para que la agarosa solidifique. Las cajas se incuban en posición invertida a 37°C hasta que las placas alcancen un diámetro considerable (0.1-0.2 mm).

Día 2

1.- Las placas deben estar cubriendo la mayor parte de la caja, pero la superficie no debe estar totalmente cubierta por las placas de lisis. Se sacan las cajas del incubador y se colocan a 4°C durante al menos 1h para que solidifique la agarosa evitando así que esta se pegue a las membranas.

- 2.- Se numeran los filtros de nylon correspondiendo con el número de las cajas, utilizando un lápiz de punto fino. Es necesario resaltar que deben emplearse guantes al manipular la nitrocelulosa, para evitar que la grasa de los dedos interfiera con la transferencia del ADN hacia el filtro.
- 3.- La colocación del filtro sobre las placas se realiza después de sacar una caja del refrigerador y colocarla a un lado del mechero. Se toma el correspondiente filtro de nitrocelulosa enumerado, ligeramente en la mitad y se coloca esta parte al centro de la caja. Entonces gradualmente se deposita el resto del filtro tocando la superficie de la caja, esto se hace con el propósito de evitar atrapar burbujas de aire entre el filtro y la caja. Se dispone de dos minutos para que el fago se una al filtro. Durante este tiempo, se pican 3 ó 4 agujeros en un patrón asimétrico a través del filtro y dentro del agar. De cada caja fueron hechas, tres replicas en filtros, una para realizar el sondeo por PCR y dos para ser hibridadas.
- 4.- Se quita cuidadosamente el filtro de la superficie de agar usando pinzas. Las cajas conteniendo el fago son envueltas con parafilm y almacenadas de manera invertida a 4°C. Es importante no mover el filtro de la caja una vez colocado para evitar que se barran las placas.
- 5.- Se coloca el filtro (con el DNA hacia arriba) en amortiguador de desnaturalización (NaOH 0.5 N, NaCl 1.5M) por 45-60 seg.
- 6.- Se transfiere el filtro a un amortiguador de neutralización (NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5 M pH 7.5) por 5 minutos.
- 7.- El lavado de los filtros se realiza en una solución 2X SSC (NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M) durante 10 minutos con agitación suave.
- 8.- El filtro se seca en papel absorbente por 20 minutos. Este proceso se repite con cada nuevo filtro de cada una de las cajas.
- 9.- El DNA se fija a la membrana por medio de radiación ultravioleta a $120,000 \text{ J/cm}^2$ por 2 minutos, en un entrecruzador de luz ultravioleta (Stratalinker).
- 10.- Los filtros son almacenados entre papeles filtro en una cámara de vacío hasta su posterior utilización.

VII.5 Marcaje y preparación de la sonda

a) Purificación de insertos de DNA

Este método se realizó empleando el Kit GENE CLEAN II® (BIO 101 Inc.). La purificación se realiza en un periodo de 15-20 minutos y permite la recuperación de cualquier tipo de ADN en cualquier concentración de agarosa.

- 1.- El gel se observa bajo una lámpara de U.V de baja longitud de onda para evitar dañar el DNA. La banda deseada de DNA se corta y coloca en un tubo de microcentrifuga, se mide el volumen de agarosa, considerando que 1 g equivale aproximadamente a 1 ml de agarosa y se adicionan tres volúmenes de NaI 6M. En el caso de que se hubiera utilizado amortiguador TBE en el gel de agarosa, se agrega medio volumen de modificador TBE y 4.5 volúmenes de NaI por peso de agarosa.
- 2.- El tubo se calienta de 45 a 55°C hasta que la agarosa se derrita completamente.
- 3.- Se agregan 5 µl de Glassmilk para una solución que tenga menos de 5 µg de DNA. Se incuba en hielo por 5 min mezclando cada minuto, tratando de que el Glassmilk se mantenga en suspensión. En caso de que se hubiera una mayor cantidad de DNA, se adiciona 1 µl de Glassmilk por cada 0.5 µg de DNA adicional.
- 4.- Se da un pulso de centrifugación de 5 seg en microfuga y se descarta el NaI.
- 5.- La pastilla del Glassmilk se lava con 200-700 µl de New Wash frío (solución concentrada de NaCl, Tris, EDTA y Etanol). Dar un pulso de centrifugación de 5 seg y descartar el sobrenadante. El proceso de lavado se repite dos veces con New Wash.
- 6.- La pastilla resultante se resuspende en 5 µl de amortiguador TE o agua estéril e incubó a 45-55°C por 2 ó 3 min.
- 7.- El tubo se centrifuga por 30 segundos recuperando la fase acuosa, la cual contiene el DNA. Este paso se repite una vez más y se colecta el sobrenadante en el mismo tubo (la pastilla se guarda hasta no saber si el DNA fue eluido eficientemente del Glassmilk).
- 8.- Para verificar cuanto inserto se obtuvo es conveniente tomar una alícuota de la elución final y correrla en un gel de agarosa al 1%, teñirla con Bromuro de etidio y observar en un transiluminador de UV.
- 9.- Los insertos obtenidos a partir de la purificación están listos para ser utilizados como sonda o bien para cualquier reacción enzimática.

Nota: es necesario cuantificar espectrofotométricamente a 260 nm la cantidad de inserto purificado para marcar de 50-100 ng de DNA por reacción.

Para tener la sonda marcada radioactivamente y purificada para ser empleada en las hibridaciones se requieren una serie de pasos los cuales se describen a continuación.

b) Marcaje del inserto con ^{32}P para ser utilizado como sonda.

Los insertos son marcados con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ usando el sistema de marcaje Random primer extensión (Du Pont/NEN)

1.- La marca o isótopo radioactivo dCTP^{32}P (actividad específica = 3000-6000 Ci/mmol, con una concentración de 20 $\mu\text{Ci/ml}$) se retira del congelador y se coloca en un lugar de trabajo para que se descongele.

2.- Se prepara la siguiente mezcla en un tubo de microcentrifuga en el siguiente orden:

- 50-100 ng de inserto desnaturalizado en baño maría por 10 min.
- 6 μl de amortiguador RPE [5X: hexanucleótidos al azar en Tris pH 7.6, MgCl_2 , albúmina de bovino fracción V y 2-mercaptoetanol].
- 6 μl mezcla de nucleótidos fríos dATP, dGTP, dTTP.
- agua estéril a un volumen complementario a 30 μl de la reacción total.
- X volumen de μl de nucleótido radioactivo (40 μCi por ensayo) considerar decaimiento.

-1 μl fragmento Klenow (ADN polimerasa I, 2.5 unidades).

El volumen total (30 μl) se agitó en vortex y se dió un pulso de centrifugación.

3.- Se deja incubando a 37°C mínimo por 2 horas o toda la noche a temperatura ambiente.

4.- Se agregan 70 μl de STE.

c). Preparación de la columna (Sambrook, *et al.*, 1989).

Para conseguir buena señal en la hibridación es necesario poner solamente el fragmento de DNA correspondiente a la sonda, eliminando los nucleótidos radioactivos marcados que no se incorporaron a la sonda. Para esto se sigue el siguiente protocolo:

1.- A una jeringa desechable de plástico de 1 ml con aguja desprendible se le coloca una malla de pelo de ángel estéril y se compacta en la punta de la jeringa empleando un émbolo.

- 2.- Se llena la jeringa con Sephadex G-50-80 (1 gr/10 ml de STE). La resina se equilibra con amortiguador STE.
- 3.- Se coloca la jeringa en un tubo cónico de 15 ml y centrifuga a $700 \times g$ (3000 rpm) en una centrifuga clinica (Damon/IEC División) por 3 min a temperatura ambiente. La columna se empacka a un volumen final de 0.9 ml.
- 4.- Se adiciona 0.1 ml de amortiguador STE y centrifuga como se describió anteriormente. Repetir dos veces más.

d). Purificación de la sonda (Sambrook, *et al.*, 1989).

- 1.- Una vez preparada la columna de Sephadex G-50 se coloca en un tubo cónico de 15 ml con un tubo de microcentrifuga sin tapa en el fondo del tubo. La columna debe estar soportada en el borde del tubo cónico y llegar al tubo de microcentrifuga.
- 2.- Se agrega a la columna 100 μ l de la reacción radioactiva.
- 3.- Se centrifuga por 3 min a $700 \times g$, siendo el mismo tiempo y rpm que se utilizó para empackar la columna.
4. Se agregan 100 μ l mas de solución STE a la columna y se centrifuga nuevamente a las mismas condiciones. Se recupera el tubo de microcentrifuga y se mide el volumen de la solución que contiene el DNA radioactivo.

e). Cuantificación de la actividad específica.

Antes de agregar la sonda radiactiva al sistema de hibridación es necesario cuantificar la actividad específica.

- 1.- Se toma 1 μ l de la sonda purificada y se coloca en una solución fria de ácido tri-cloroacético (TCA) al 10%
- 2.- Se adicionan 5 μ l deDNA de esperma de salmón desnaturalizado (10 mg/ml) y se agita.
- 3.- Esta solución se filtra en vacío a través de un filtro GF/C Whatman y se lava en vacío con 10 ml TCA al 10% y posteriormente con 20 ml de etanol frio.
- 4.- El filtro se seca a temperatura ambiente.
- 5.- Este filtro se introduce en un vial con 5 ml de liquido de centelleo (0.1 g POPOP [2,2-P-Fenilenbis (5-feniloxasol)], 5 g PPO [2,5-Difeniloxasol], 1000 ml de Tolueno).

6.- Se toma la lectura en un contador de centelleo líquido en un canal de apertura de 50 a 1700 (Packard, Minaxi B) y se calcula la actividad específica (en cpm/ μg de DNA) por el volumen recuperado, realizándose de la siguiente manera:

El valor de la actividad en cuentas por minuto (cpm) dado en el contador de centelleo es el resultado de medir 1 μl de la sonda. Este valor se multiplica por el volumen total de la sonda recuperada, para obtener la actividad en los microlitros de sonda recuperada. Posteriormente, este valor se multiplica se divide entre los nanogramos del inserto que se adicionaron en la reacción de marcaje para obtener la actividad específica de la sonda (la actividad recomendada para una buena hibridación es de $1 \times 10^8 - 10^9$ cpm/ μg de DNA).

7. Una vez cuantificada la sonda se congela hasta su uso.

VII.6 Hibridación DNA-DNA y DNA-RNA.

El análisis del DNA por hibridación tipo Southern blot se realiza por la transferencia del DNA o RNA desnaturalizado *in situ* a un soporte sólido, generalmente a una membrana de nylon o nitrocelulosa. La posición relativa del DNA o RNA se conserva durante la transferencia al soporte y de esta manera los ácidos nucleicos ya unidos al filtro puede ser hibridados con DNA marcado radiactivamente (Southern, 1975; Sambrook *et al.*, 1989).

a) Hibridación

Una vez que ya se tiene la membrana de nitrocelulosa con los ácidos nucleicos fijados a ella y la sonda radiactiva lista, la última parte del procedimiento se realiza de la manera siguiente:

1. Se prepara la solución de hibridación la cual contiene: albúmina bovina fracción V 1 %, SDS 7 %, EDTA 1 mM y amortiguador de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.5 M pH 7
2. Se prehibridaron las membranas con esta solución por lo menos dos horas
3. La sonda se desnaturaliza a ebullición en baño María por 10 min.
4. Se coloca inmediatamente en hielo y se deja mínimo 10 minutos antes de ser utilizada.
5. La sonda se adicionada cuidadosamente al sistema de hibridación.
6. Se incuba por toda la noche a 63°C.

b) Lavados

Este paso es muy importante, ya que de ello depende que la sonda se mantenga pegada a la membrana, en función a la complementariedad con moléculas de ácidos nucleicos fijadas a ella, o se desprenda por la baja concentración de sales o alta temperatura. Es decir, este tratamiento es lo que determina la astringencia de la hibridación.

Para las hibridaciones efectuadas en este trabajo, los lavados fueron los siguientes:

- 1) Un lavado a 63 °C con SSC 2X (NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M), SDS 0.1 % por 15 min.
- 2) Un lavado a 63 °C con SSC 1X, SDS 0.1 % por 10 min.
- 3) Un lavado a temperatura ambiente con SSC 1X, SDS 0.1 % por 10 min.

Nota: Es importante monitorear las cuentas que presenta la membrana después de cada lavado por medio del contador Geiger

Cuando ya no se detecta mucha señal inespecífica, el filtro se coloca en contacto con una película de rayos X (KODAK X-Omat) en un cassette con intensificadores y se deja a -70 °C por periodos variables dependiendo de la cantidad de marca fijada a la membrana.

Para hibridación tipo northern o RNA-DNA, el RNA es separado en un gel de agarosa desnaturalizante(VII.19), transferido a una membrana (VII.20) e hibridado con una sonda específica marcada radioactivamente tal como se describió anteriormente (VII 6). La hibridación y los lavados fueron similares a la hibridación DNA-DNA.

VII. 7. Utilización de PCR en escrutinios de bibliotecas

El aislamiento de una clona a partir de una biblioteca ya sea de cDNA o DNA genómico, involucra escrutinios por varias rondas de plaqueo e hibridación de filtros. Este proceso es laborioso y tardado, además de ser propenso a artefactos tales como falsos positivos, comúnmente encontrados en la hibridación sobre el filtro. Esos problemas pueden ser resueltos por el uso de la técnica de PCR en las primeras rondas del escrutinio previo a la hibridación convencional (Ausubel, 1992)

1.- El fago (portador de cDNA o biblioteca genómica) se plaquea con una cepa bacteriana apropiada de *E.coli* sobre cajas de NZY-agar con Top-agarosa. Después que las placas de fagos

crecieron a 37°C a tamaño deseado, las placas se colocan a 4°C para solidificar el top-agarosa por lo menos una hora.

2.- Se coloca el filtro de nitrocelulosa o membrana nylon sobre la placa, teniendo cuidado de no dejar burbujas de aire atrapadas entre el filtro y el agar. El filtro puede ser humedecido por unos pocos segundos si la placa estuviera fresca. Para placas almacenadas por un periodo de tiempo y para posteriores rondas en múltiples réplicas se requiere mayor tiempo para humedecer el filtro completamente.

3.- Se levanta el filtro cuidadosamente con un par de pinzas de punta redonda (Millipore), teniendo cuidado de no rasgar la capa de top-agarosa. El filtro se coloca con los fagos hacia arriba, sobre una caja de petri estéril conteniendo 3 ml de amortiguador de dilución del fago PDB (NaCl 100 mM, MgSO₄ 8 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y 0.1 % de gelatina). Las partículas se eluyen levantando el filtro arriba y abajo por tiempos acoplados. Finalmente, el filtro se levanta y se deja que la solución gotee por un momento (10-20 seg.), después del cual el filtro se descarta.

4.- El fago eluido se transfiere a un tubo y se toman 20 µl los cuales se ponen en tubo que se coloca en un baño de agua hirviendo por cinco min, posteriormente se enfría sobre hielo. El DNA contenido en los fagos es el molde para su análisis por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se guarda un poco de la elución del fago en un tubo de microcentrifuga por si se considerara necesario realizar posteriores PCRs.

5.- Se analizan los productos de PCR por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v) disuelto en amortiguador TBA. Si un gel presenta bandas del tamaño esperado significa que la caja de Petri contiene al menos una placa de fago que contiene el cDNA buscado, por lo tanto esta caja es considerada como positiva.

6.- En este punto, uno puede tomar las cajas positivas y proceder a un escrutinio por el método de hibridación convencional. Alternativamente, uno puede proceder a otra ronda de escrutinios por PCR, para reducir la complejidad del pool de fagos sobre una placa positiva

7.- Se coloca un nuevo filtro de nitrocelulosa o nylon sobre una caja positiva. Con unas tijeras estériles se corta el filtro, en varias secciones en forma de pastel. Entre cuatro y ocho por caja pueden ser fácilmente manipulables, en nuestro caso se cortaron en seis secciones.

8.- Cada sector del filtro se levanta y humedece en amortiguador de dilución del fago PDB como en el paso 2. Debido al pequeño tamaño del sector del filtro, se puede humedecer en una pieza de película plástica como Saram Wrap. Se usa una alícuota de 0.2-0.5 ml de amortiguador.

9.-Con la sección cluida se realiza PCR como en el paso 4.

10.-Un sector que contiene la señal positiva del fago se identifica por PCR, otra membrana puede ser levantada de este sector y usada alternativamente en la hibridación convencional.

El método se muestra en la Figura 2.

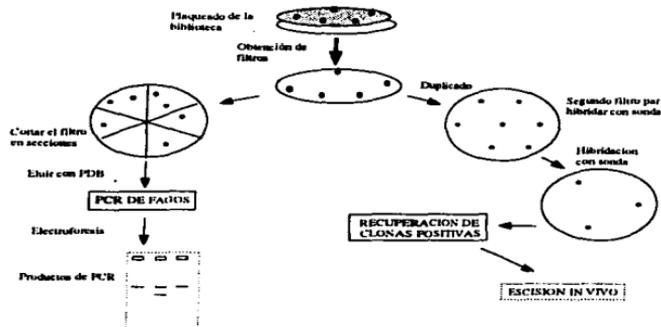


Figura 2. Pasos en el desarrollo del escrutinio por PCR

Las ventajas del escrutinio mediante PCR son tres:

- 1) Las clonas positivas son identificadas por bandas de DNA de acuerdo a tamaños esperados.
- 2) Evita el consumo de tiempo valioso, especialmente en las rondas iniciales del escrutinio .

3) El escrutinio de múltiples genes puede ser llevado a cabo en la misma mezcla de reacción de PCR empleando iniciadores apropiados para cada uno de ellos.

Después que la complejidad de todo el pool de fagos es reducida y la existencia de clonas positivas es confirmada; clonas individuales pueden ser aisladas por métodos convencionales.

VII.8. Amplificación de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica en la actualidad es una herramienta básica en biología molecular. Es un método enzimático de síntesis de múltiples copias de un segmento específico de ADN elegido que se encuentra entre regiones de secuencia conocida. Una amplificación de esta magnitud se puede emplear en las primeras rondas de escrutinio previo a la hibridación convencional. El escrutinio de múltiples genes puede ser llevado a cabo en la misma mezcla de reacción de PCR, con el uso de primers apropiados para cada uno de ellos. Después que la complejidad de todo el pool del fago es reducida y la existencia de clonas positivas es confirmada, clonas individuales pueden ser aisladas por métodos convencionales.

La reacción de amplificación se lleva a cabo con dos oligonucleótidos que son utilizados como iniciadores para una serie de reacciones sintéticas que son catalizadas por una DNA polimerasa termoestable de bacteria *Thermophilus acuaticus* (taq DNA polimerasa). Estos oligonucleótidos son diferentes secuencias que son complementarias a secuencias que se sitúan en cadenas opuestas del DNA utilizado como molde y flanquean el segmento de DNA que va a ser amplificado. Los oligonucleótidos iniciadores (Ayala, 1995) utilizados en estas reacciones fueron los siguientes:

OLIGO SENTIDO (FORWARD)

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

OLIGO ANTISENTIDO (REVERSE)

5' AA(A)GAA(CGT)AGGCCA(T)CT(G)C(G)ATT(A)GTACAT(T)CTC 3'

Los paréntesis indican degeneraciones en el código genético tomando en cuenta el probable uso de codones.

Estos dos oligonucleótidos fueron sintetizados flanqueando una región altamente conservada que codifica las secuencias deducidas de aminoácidos de PEPCs hasta ahora conocidas. En esta región están comprendidas secuencias muy conservadas que contienen residuos de aminoácidos los cuales se ha propuesto que son esenciales o se encuentran involucrados en el sitio activo de la enzima (GYSDSGKDAG) y el sitio de unión al sustrato (FHGRGGTVGEGGGP) (Cushman *et al.*, 1989; Jiao *et al.*, 1990; Crétin *et al.*, 1991; Poetsch *et al.*, 1991). Los pasos empleados en la reacción de PCR fueron los siguientes:

1.- En un tubo de microcentrifuga estéril de 0.5 ml se adicionan en este orden: 34 µl de agua estéril, 5 µl de amortiguador de amplificación 10X (Tris-HCl [pH 8.4] 200 mM y KCl 500 mM), 4 µl de MgCl₂ 50 mM, 1 µl de una mezcla 10 mM de deoxinucleótidos trifosfato, 200 ng (en 2 µl de agua) de oligo iniciador forward (sentido) y 200 ng (en 2 µl de agua) de oligo iniciador reverse (antisentido), ADN molde (10 µl de PDB con el fago) y por último 1 unidad de Taq DNA polimerasa (Gibco BRL). (Ver Tabla 3)

2.- Se mezcla perfectamente y se adicionan 40 µl de aceite mineral (Sigma M-3516) para prevenir la evaporación de la muestra durante los ciclos de calentamiento y enfriamiento.

3.- Se incuba la muestra en un ciclador térmico (Gibco BRL) a 94°C por 10 min para desnaturalizar completamente el ADN.

4.- Se programa la temperatura de la reacción de los ciclos 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

c) extensión a 72°C por 2 min. El número de ciclos debe repetirse de 40-50 veces.

5.- Al finalizar los ciclos programados se incuba la reacción a 72°C por 10 min.

6.- Se analizan los productos de amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% empleando los marcadores de peso molecular apropiados.

Nota: Para múltiples reacciones es conveniente preparar una mezcla maestra para minimizar la pérdida de reactivos y disminuir en lo posible el pipeteo evitando contaminar los reactivos.

Tabla 3. Componentes de la mezcla de PCR.

	Concentración
Oligonucleótidos iniciadores:	Entre 0.1-0.5 μ moles
Magnesio:	2.5-4 mM es generalmente el óptimo
Deoxinucleótidos trifosfatos:	20-200 μ M, las concentraciones para cada dNTP tienen que ser equivalentes.
Taq DNA-Polimerasa:	1-2.5 unidades por 50 μ l de reacción
DNA-molde:	En forma simple o doble cadena de 0.01-0.1 μ g
Ciclos	Temperatura y Tiempo
Desnaturalización	Condiciones típicas, 94-96° C por 1 min.
Complementación	50-57° C por 1 min esto dependiendo de la composición de bases, tamaño y concentración del DNA
Extensión	Usualmente 72° C por 1-2 min

VII.9. Obtención de placas de lisis del bacteriófago λ

Es importante recuperar las placas positivas que se han detectado en cada ronda de escrutinios, para esto una vez que se obtiene la película se marca circularmente la señal de hibridación y se alinea perfectamente con la caja de Petri que contiene las placas de lisis, identificando la placa de lisis positiva se procede a recuperar picando esta clona.

- 1.- Se agregan 500 ml de PDB a un tubo de microcentrifuga, adicionadole 1 gota de cloroformo
- 2.- Usando una pipeta pasteur o bien una punta de micropipeta, se pica la placa en un radio de un centímetro cuadrado y se succiona con todo y agar para poder recuperar toda la placa, por que es común que los fagos migren alrededor de la placa.
- 3.- Se coloca el fragmento de agar en amortiguador de fago PDB previamente preparado (paso 1). Se mezcla con vortex y se deja por dos h a temperatura ambiente o bien durante toda la noche a 4°C para que los fagos se liberaran del agar. Una placa se supone que tiene aproximadamente 10^6 - 10^7 partículas bacteriofagos infecciosas.
- 4.- Titular esta clona (como se describió anteriormente) para poder plaquear en una densidad adecuada para las siguientes rondas de escrutinio.

VIII. 10. Escisión *in vivo* del plásmido pZLI del fago λ ZIP LOX

Con esta técnica lo que se realiza es la escisión o liberación del cDNA del fago λ ZIPLOX (GIBCO, BRL). El fago λ ZIPLOX es un vector de expresión derivado del bacteriofago λ el cual combina la capacidad de clonación de DNA complementario en el DNA de lambda, con la conveniente y fácil manipulación de plásmidos. En este sistema el DNA puede ser recuperado sin necesidad de subclonar efectuando la escisión *in vivo* para generar la replicación autónoma del plásmido pZLI empleando la cepa DH10B (ZIP) de *E. coli* (Fig. 3)

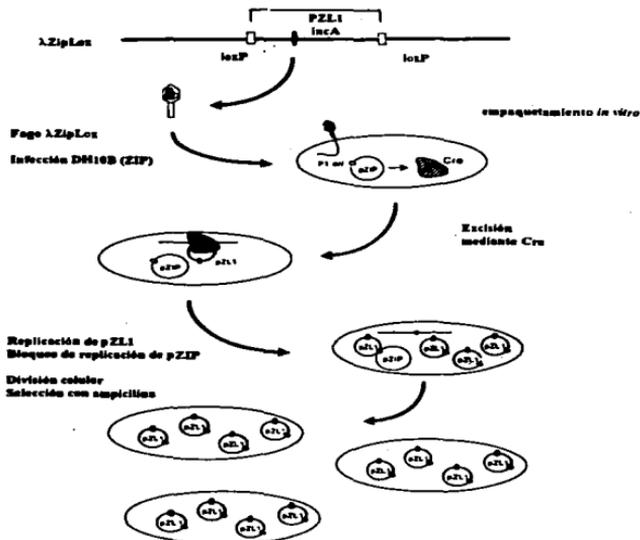


Figura 3. Mecanismo de escisión *in vivo* de pZLI de Fago λ ZIPLOX

El proceso de escisión *in vivo* se basa en la existencia, en el bacteriofago P1, de un sistema de recombinación sitio-específico 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 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 *et al*, 1992).

Para liberar el plásmido de λ ZIPLOX se siguió el siguiente protocolo.

1. Se activan las bacterias de la cepa *DH10B* con 200 μ l de medio S.O.C. e incuban a 37°C por 10 minutos.
2. Se siembra esta cepa en una caja de petri con medio rico conteniendo el antibiótico kanamicina a una concentración de 10 μ g/ml. Se incuba toda la noche a 37°C.
3. Se toma una colonia e inocula en 10 ml de medio LB suplementado con kanamicina 10 μ g/ml y maltosa al 0.2%.
4. Se incuba el cultivo durante toda la noche a 37°C con agitación constante a 200 rpm.
5. Una alícuota de los fagos eluidos de los fragmentos de agar obtenidos de las placas positivas, las cuales habían sido previamente purificadas a través de varias rondas, se emplea para infectar 400 μ l de bacterias del cultivo cultivado toda la noche.
- 6.- Estas bacterias *DH10B* infectadas con fagos son plaqueadas en cajas de petri con medio (LB), antibiótico ampicilina (100 μ g/ml) y $MgCl_2$ 10 mM.
- 7.- Se dejan toda la noche a 37°C y al día siguiente aparecen las colonias que tienen la resistencia a ampicilina, es decir las colonias con el *pZL1*.
- 8.- Venticinco ml de medio líquido LB y ampicilina se inoculan con una asada de una de las colonias de las cajas de petri y se incuba toda la noche a 37°C con agitación constante (200-250 rpm). Al siguiente día se realiza la extracción del plásmido como se describe en extracción a pequeña y a gran escala (VII.11 y VII.12).

VII. 11. Extracción de DNA plasmídico a pequeña escala (Brown, 1991)

Con este método se reproduce una sola clona bacteriana que contenga el DNA plasmídico de interés, que en nuestro caso fue el que contiene el fragmento de cDNA clonado.

- 1.- De las células transformadas y cultivadas en medio con ampicilina en caja petri, se selecciona una colonia y se inocula en 20 ml de medio líquido LB, dejando toda la noche a 37°C con agitación (200rpm).
- 2.- Se transfiere 1.5 ml de cultivo con las bacterias a un tubo de microcentrifuga, centrifugándolo por 5 min a 12000 rpm
- 3.- El sobrenadante se descarta y la pastilla se resuspende en 100 µl de amortiguador (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris HCl 25 mM [pH 8.0], lisozima 2mg/ml), incubando sobre hielo por 10 min.
- 4.- Se adicionan 200 µl de amortiguador de lisis (NaOH 0.2 M, SDS 1%) se mezcla suavemente e incuba en hielo por 10 min.
- 5.- Se adicionaron 150 µl de acetato de potasio 3 M mezclando suavemente por inversión, y centrifugando posteriormente a 12,000 rpm por 15 min.
- 6.- El sobrenadante se transfiere a un tubo de microcentrifuga nuevo agregándole 150 µl de una solución fenol-cloroformo (50:50 v/v). Se mezcla y centrifuga a 12000 rpm a temperatura ambiente por 15 min.
- 7.- La fase acuosa superior se recupera con micropipeta y coloca en otro tubo nuevo. Se adiciona un ml de etanol absoluto frío (-20°C) y se incuba en hielo 15 min.
- 8.- Se centrifuga a 12000 rpm y 4°C por 30 min, posteriormente se descarta el sobrenadante y se lava la pastilla cuidadosamente con 500 µl de etanol al 70%.
- 9.- Se centrifuga a 12000 rpm a 4°C por 10 min y descarta el sobrenadante
- 10.- Se lava nuevamente la pastilla con etanol frío al 70% y se seca la muestra al vacío.
- 11.- La muestra se resuspende en 50 µl de agua deionizada estéril.
- 12.- Se adiciona 1µl de RNAasa para eliminar el RNA de la muestra (1µg de RNA es totalmente degradado por 1×10^{-4} unidades de RNAasa, libre de DNasa por 30 min a 37°C). Se incuba durante 1 h a 37°C.

13.-Se precipita con 2 volúmenes de etanol absoluto (-20°C) incubando por 30 min. a -70°C y centrifugando por 5 min a 12000 rpm. La pastilla se lava con etanol al 70% y se resuspende en 30 µl de agua estéril

14.- La cuantificación de DNA se realiza de manera espectrofotométrica leyendo una alícuota a 260 y 280 nm. El valor obtenido de 260/280 debe ser de entre 1.8 a 2. esto nos indica qué tan limpio está el DNA.

15.- Por otro lado se corre una alícuota en una electroforesis en gel de agarosa al 1 % para confirmar la existencia del vector con el inserto (sin cortar) o bien cortar el DNA con endonucleasas para observar el vector y el inserto liberado por la acción de las enzimas.

Nota: Es indispensable correr el DNA cortado junto con un marcador de peso molecular por ejemplo DNA de fago (λ) digerido con endonucleasas de restricción Hind III, Eco RI o ambas.

VII. 12. Extracción de DNA plasmídico a gran escala (Sambrook, *et al.*, 1989)

Es de gran importancia tener un DNA completamente puro para poder emplearlo en cualquier método de secuenciación o bien en reacciones de PCR. Con este método es posible obtener un DNA puro y con buen rendimiento.

- 1.- Se cultiva la clona deseada en 25 ml de medio LB líquido, con el antibiótico requerido a 37°C durante la noche con agitación constante.
- 2.- Se centrifugaron las células a 5000 x g durante 10 minutos en rotor JA-20.
- 3.- El sobrenadante se descarta y la pastilla de células se resuspende en 5 ml de NaCl 10 mM, repitiendo la centrifugación
- 4.- La pastilla se resuspende en 0.6 ml de amortiguador de lisis (Tris-HCl 25 mM [pH 8.0], EDTA 10 mM, sacarosa 15% y Lisozima 2 mg/ml), se incubó 20 min en hielo.
- 5.- Se agrega 1.2 ml de una solución que contenía NaOH 0.2 % y SDS 1%. Se mezcla suavemente e incuba 10 min en hielo.
- 6.- Se adicionan 0.75 ml de acetato de sodio 3 M [pH 5]. Mezclando 20 seg e incubando 20 min en hielo.
- 7.-Se centrifuga 15 min a 6500 x g en rotor JA-20.

- 8.- El sobrenadante se transfiere a un tubo corex estéril. Adicionandole 5 μ l de RNAsa (10 mg/ml) e incubando 30 min a 37°C (es preferible dejarlo 1h)
- 9.- La extracción se realiza dos veces con un volumen igual de fenol-cloroformo (v/v) 50:50.
- 10.- Se centrifuga 15 minutos a 7000 rpm, recuperando la fase superior.
- 11.- Se precipita con dos volúmenes de etanol absoluto (-20°C), por 10 min a temperatura ambiente.
- 12.- Una vez transcurrido el tiempo, se centrifuga a 8000 x g 10 min eliminando el sobrenadante.
- 13.- La pastilla se lava dos veces con etanol al 70%, para posteriormente centrifugar a 7000 x g 5 min eliminando el sobrenadante.
- 14.-La pastilla se resuspende en 168 μ l de agua estéril y se transfiere a un tubo de microcentrifuga, adicionándole 32 μ l de NaCl 5M. Se mezcla perfectamente y se adicionan 200 μ l de PEG 8000 (polietilenglicol) al 13%.
- 15.- Se mezcla perfectamente e incuba en hielo durante 1 h.
- 16.- Se centrifuga en frío a 4°C y 12000 x g por 10 min.
- 17.- El sobrenadante se remueve y se centrifuga nuevamente por 30 seg para tratar de remover todo el PEG posible con una pipeta.
- 18.- La pastilla se lava dos veces con etanol al 70 %, centrifugando 5 min en microcentrifuga a máxima velocidad. Se desecha el sobrenadante y se deja que la pastilla seque perfectamente de las trazas de etanol.
- 19.- La pastilla se resuspende en 50 μ l de agua estéril.

VII.13. Cuantificación de DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

Después de extraer el DNA es necesario conocer la concentración a la cual se encuentra. Un método comúnmente utilizado es la cuantificación espectrofotométrica de la cantidad de radiación ultravioleta absorbida por las bases nitrogenadas.

- 1.- Se toma 1 μ l de DNA y se afora a 100 μ l con agua estéril mezclando suavemente. Se coloca en una celda de cuarzo de un volumen de 50-100 μ l.

2.- Se lee la absorbancia en espectrofotómetro a las longitudes de onda de 230 nm (detecta polisacáridos y fenol), 260 nm (para ácidos nucleicos) y 280 nm (para proteínas).

3.- La cuantificación de la concentración de DNA se calcula en $\mu\text{g/ml}$ mediante la siguiente ecuación:

$(\text{Abs } 260 \text{ nm}) (50 \mu\text{g/ml}) (\text{factor de dilución}) (\text{vol de material recuperado}) = \mu\text{g/ml de DNA.}$

4.- La relación de Absorbancia a 260/280 debe de ser 1.8 a 2 para considerar que el DNA está puro y limpio para su uso.

VII.14. Análisis de DNA plasmídico mediante el empleo de enzimas de restricción (Sambrook *et al.*, 1989).

Con el fin de observar la liberación de un inserto clonado en algún plásmido o bien observar fragmentos de DNA genómico se emplean enzimas de restricción que reconocen y cortan en sitios específicos. El método empleado es el siguiente:

1.- Resuspender 3 μg de ADN plasmídico en un volumen de 1-5 μl de agua estéril.

2.- Agregar 2 μl de amortiguador con una concentración de sales adecuada a la enzima de restricción que se utilizará y se llevar a un volumen final de 19 μl con agua estéril.

3.- Agregar 1 μl de la enzima de restricción (5-10 unidades) e incubar a la temperatura con la que trabaja la enzima, por lo general a 37°C durante 3 h o bien durante toda la noche. Cuando es necesario una doble restricción con enzimas que requieran diferente concentración de sales, se digiere el ADN por una hora con la enzima que emplea el amortiguador con menos concentración de sales y posteriormente se incuba otra hora con la enzima que requiera el amortiguador más concentrado.

VII.15. Electroforesis de DNA en gel de agarosa (Sambrook *et al.*, 1989).

Este método es básico en biología molecular y es comúnmente utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de DNA. Cuando una molécula es colocada en un campo eléctrico, migrara al electrodo apropiado a una velocidad, o movilidad electroforética, proporcional a la fuerza de la corriente eléctrica y la carga neta de la molécula.

- 1.- Se prepara un minigel de agarosa al 1.0-1.2% en amortiguador Tris-boratos (Tris-HCl 45 mM [pH 8], 1 mM EDTA). La concentración de agarosa va a depender del tamaño de las moléculas de DNA a separar. Se calentó a ebullición en un horno de microondas. Cuando la agarosa estuvo completamente derretida y la temperatura de la mezcla era de 60°C, se agregó bromuro de etidio (solución stock de 10 mg/ml en agua) a una concentración final de 0.5 µg/ml y se mezcló. La mezcla se vació sobre el molde del gel con el peine puesto. Esto se hizo con mucho cuidado para evitar que se formaran burbujas en el gel o bien entre los dientes del peine.
- 2.- Una vez que la agarosa gelificó (30-45 min), se retiró el peine cuidadosamente. El gel se colocó en el aparato de electroforesis HE33 Horizontal Submarine Unit (Hoefer Sci. Inc.). Se utilizó amortiguador TBE 1X como solución de corrida, en una cantidad suficiente para cubrir completamente el gel.
- 3.- Se prepararon las muestras de DNA adicionando amortiguador de carga quedando a una dilución 1X (azul de bromofenol 0.25%, xilen cianol 0.25%, sacarosa al 40% en agua etéril). Las muestras se cargaron con cuidado en los pozos del gel con la ayuda de una micropipeta automática.
- 4.- Es importante poner un control de peso molecular, éste puede ser ADN del fago λ digerido con Eco RI, Hind III o bien con Eco RI /Hind III, así como una alícuota del plásmido sin cortar, para confirmar que la migración del DNA cortado si corresponde a la migración de DNA lineal.
- 5.- Para separar el DNA en el gel se aplicó una corriente de 60 volts aproximadamente por dos horas (los fragmentos correrán hacia el polo positivo). La corrida terminó cuando la banda de azul de bromofenol se encontró a dos centímetros del borde anódico del gel ya que bajo estas condiciones, el colorante migra con moléculas de ADN de unos 300 pb de longitud.
- 6.- Los patrones de restricción fueron observados en transiluminador de luz ultravioleta de onda corta (UVP, INC)
- 7.- Se tomó una fotografía para registrar y analizar la restricción.

VII.16. Transferencia por capilaridad de DNA a membranas de nylon o soporte sólido
(Southern, 1975, Sambrook *et al.*, 1989)

Los análisis de DNA por hibridación son usualmente realizados en un soporte sólido (nitrocelulosa o nylon) en el cual se ha transferido DNA que ha sido desnaturalizado *in situ*. El procedimiento que se sigue es el siguiente:

- 1.- Se corta la membrana de nylon (Gene Screen TM) del mismo tamaño que el gel.
- 2.- La membrana se humedece en agua destilada por 40 segundos.
- 3.- Esta se equilibra en SSC 10X (NaCl 3M, Citrato de sodio 0.3 M) por 15 minutos.
- 4.- El gel se coloca en una solución de HCl 0.25 N por 15 min en agitación constante.
- 5.- Se lava el gel con agua desionizada con el fin de remover el exceso de HCl.
- 6.- Se coloca el gel en una solución desnaturalizante (NaOH 0.4 N / NaCl 0.6 M) por 30 min con agitación constante.
- 7.- El gel se lava dos veces con agua estéril por 5 min.
- 8.- Posteriormente se coloca el gel en una solución amortiguadora (NaCl 1.5 M / Tris-HCl 0.5 M [pH 7.5]) a temperatura ambiente por 30 min con agitación.
- 9.- El gel se enjuaga en agua estéril.
- 10.- Sobre un molde pyrex rectangular se coloca una caja de petri y encima de ella una placa de vidrio de un tamaño mayor que el gel que se transfiere.
- 11.- Se cortan tres piezas de papel 3 MM Whatman del mismo ancho del gel y de una longitud que le permita tocar la solución de transferencia (SSC 10X) que se encontraba en un pyrex.
- 12.- Las tres piezas de papel se humedecen con la misma solución de transferencia y se colocan una por una sobre la placa de vidrio, evitando que queden burbujas entre el papel y el gel.
- 13.- El gel se coloca encima de ellas con la parte superior hacia abajo, evitando dejar burbujas entre el papel y el gel.
- 14.- La membrana de nylon previamente humedecida en agua estéril (20 min), se coloca sobre el gel cuidando de no atrapar burbujas.
- 15.- Tres piezas de papel 3 MM del mismo tamaño del gel se colocan sobre la membrana de nylon.
- 16.- Se apila papel absorbente (periódico) del tamaño del gel, encima de los papeles filtro. Una altura de 10 cm es suficiente. Se pone un peso de aproximadamente 500 g por encima del papel absorbente.

17.- El pyrex debe contener aproximadamente 500 ml de solución de transferencia (SSC 10X). La transferencia se deja de 12 a 18 horas.

18.- Una vez que la transferencia se lleva a cabo se retira la membrana del gel, se coloca en una solución de NaOH 0.4 N por 1 min y se agita suavemente.

19.- La membrana se neutraliza en Tris-HCl 0.2 M [pH 7.5], SSC 1X por un minuto.

20.- Se lava la membrana en SSC 2X para eliminar los residuos de agarosa y se seca sobre un papel filtro. El DNA es fijado a la membrana por radiación ultravioleta a 120,000 J/cm² por dos minutos.

VII.17. Infección a alta multiplicidad

Esta técnica se utiliza para infectar bacterias hospederas de *Echerichia coli* con el bacteriófago λ y así lograr obtener DNA de fago λ que se utilizará como control negativo en las reacciones de amplificación por PCR, debido a que la biblioteca se encuentra clonada en fago λ (λ ZIPLOX)

1.- Una asada de bacterias hospederas Y1090 es cultivada en 10 ml de medio líquido (LB) suplementado con maltosa % y MgCl₂ 10 mM, por 8 h a 37°C, con agitación.

2.- En un matraz de 1500 ml con 250 ml de medio líquido NZY se inocula un ml del cultivo de bacterias hospederas Y1090. Se incuba a 37°C con agitación vigorosa (250-300 rpm) hasta que la densidad óptica del cultivo fuc de 0.5 a 600 nm (3-4 h)

3.- El matraz se inocula con aproximadamente 10⁶-10⁷ ufp (unidades formadoras de placas) del bacteriófago λ y se continua con la incubación a 37°C con agitación vigorosa (200-250 rpm) hasta que ocurra la lisis (dejar toda la noche).

4.- Se adicionan al matraz 5 ml de cloroformo para terminar de lisar las células que aún no se hubieran lisado y se continua agitando por 20 min. Se decanta cuidadosamente la fase acuosa a tubos corex .

5.- Se centrifuga por 10 min a 12000 x g en rotor JA-20 a 4°C recuperando el sobrenadante.

6.- Para 50 ml de líquido con fago, se adicionan 10 μ l de DNasa 5 mg/ml y 25 μ l de RNasa 10 mg/ml se incuba por 2 h a 37°C sin agitación.

7.- Se centrifuga 1.5 hrs a 43000 x g (en rotor 60 Ti) a 4°C.

- 8.- Se remueve el sobrenadante e invierte el tubo en papel absorbente.
- 9.- La pastilla translúcida del fago fue resuspendida en 200 μ l de Tris-Cl 0.05 M [pH 8].
- 10.- La solución fue transferida a un tubo de microcentrifuga y se adicionan 200 μ l de fenol (saturado con Tris pH 7.5).
- 11.- Se agita durante 20 min en vortex y centrifuga 6 min en microfuga, recuperando la fase superior y adicionando 200 μ l de fenol, se agita 20 min y centrifuga 10 min en microfuga. Se recupera la fase superior.
- 12.- Se agregan 200 μ l de cloroformo, se agita en vortex por 20 min y se centrifuga tres min recuperando nuevamente la fase acuosa superior.
- 13.- A la fase recuperada, se le adicionan 20 μ l de acetato de Na 3 M [pH 4.8]. Se precipita con dos volúmenes de etanol frío por 40 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifuga durante 15 min.
- 14.- La pastilla se lava dos veces con etanol al 70%.
- 15.- En el último lavado se deja la pastilla perfectamente seca y se resuspende el DNA con buffer TE [pH 8.0] o bien con agua estéril (50 μ l).
- 16.- La cuantificación del DNA se realiza tomando 1 μ l y aforando a 100 μ l para poder leer en el espectrofotómetro a 260 y 280 nm. Posteriormente se carga una alícuota de DNA sin digerir en un gel de agarosa separándose por electroforesis. Se observa en transiluminador. Posteriormente otra alícuota se digiere con enzimas de restricción.

VII.18. Aislamiento de RNA con tiocianato de guanidina (Chomczynski and Sacchi, 1987).

La razón más común para el aislamiento de RNA es la necesidad de evaluar el tamaño, la expresión tejido específica y la cantidad relativa de mensaje. La extracción de RNA y la hibridación tipo Northern es una alternativa para lograr conocer el mensaje de alguna proteína en particular, saber en que tejido se encuentra expresándose y en que determinado momento del desarrollo de un organismo.

Al trabajar con RNA se deben tener cuidados especiales ya que es una molécula muy lábil y susceptible a degradación. La mayor fuente de problemas al aislar RNA proviene de las ribonucleasas que son enzimas muy estables y que no requieren de cofactores. Para evitar

problemas de contaminación, todos las soluciones usadas deben tratarse con dietilpírocarbonato (DEPC) que inactiva las ribonucleasas. EL material de plástico debe esterilizarse por al menos 30 min y el material de vidrio hornearse a 300°C por al menos cuatro horas (Strommer *et al.*, 1993). Otros cuidados son, el emplear siempre guantes y trabajar cerca del mechero.

- 1.- Un g de tejido de vaina de frijol, de los diferentes días muestreados (7, 14, 21 y 28 días después de floración [ddf]) se tritura con nitrógeno líquido en un mortero pre-enfriado. hasta obtener un polvo fino.
- 2.- Se adicionan 10 ml de solución D (tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25 mM [pH 7], Sarcosyl 0.5%, 2-mercapto etanol 0.1 M), se mezcla perfectamente.
- 3.- Se adiciona 1 ml de Acetato de Sodio 2 M [pH 4] y se mezcla.
- 4.- Se agregan 10 ml de fenol saturado con agua y se mezclan.
- 5.- Se adicionan 2 ml de cloroformo-alcohol isoamílico.
- 6.- Esta suspensión final se agita vigorosamente por 10 seg.
- 7.- Se incuba en hielo por 15 min.
- 8.- Se centrifuga a 10000 rpm por 20 min a 4°C.
- 9.- La fase acuosa se transfiere a nuevo tubo y se añade 10 ml de isopropanol helado, se mezcla e incuba por 1 h a -20°C.
- 10.- Se centrifuga a 10000 rpm por 20 min a 4°C.
- 11.- La pastilla de RNA se resuspende en 3 ml de solución D.
- 12.- Se precipita añadiendo un volumen de isopropanol e incubando por 1 h a -20°C.
- 13.- Se centrifuga a 10 000 rpm por 20 min a 4°C.
- 14.- La pastilla se lava con 10 ml de etanol al 75%, centrifugando 15 min a 10 000 rpm.
- 15.- La muestra se resuspende en 0.5 ml de agua tratada con DEPC.

VII.19. Electroforesis de RNA en sistema desnaturalizante (Thomas, 1980)

Geles de agarosa y formaldehído son los recomendables para muestras de RNA y para usarse con membranas Hybond cargadas positivamente para lograr una transferencia mas eficiente del RNA.

Para poder efectuar el análisis de los cambios en los niveles relativos de los trascritos, es muy importante asegurarse de que se cargue la misma cantidad de RNA en cada carril del gel, de manera que sea posible atribuir las diferencias detectadas únicamente a la cantidad de mensaje.

1.- La preparación de muestras de RNA se hizo en el siguiente orden.

RNA (volumen final 30 µg en 6 µl)

Formamida (dicionizada) 12.5 µl

Amortiguador MOPS 10X 2.5 µl

Formaldehído (37%) 4.0 µl

MOPS 10X (0.2 M ácido sulfónico, 0.5 M acetato de sodio pH 7, 0.01 M Na₂ EDTA)

2.- Se incuba el RNA 5 minutos a 65°C.

3.- Colocar en hielo y adicionar 2.5 µl de amortiguador de carga (Glicerol 50 % (v/v), Azul de bromofenol 0.1 mg/ml, Xilen cianol 0.1 mg/ml)

4. El gel de agarosa fue preparado de la siguiente forma

Agarosa 1-1.5g

Buffer MOPS 10 X 10 ml

Agua estéril 75 ml

Esta mezcla se calienta en horno de microondas hasta disolver la agarosa.

5. Se verifica el volumen y se ajusta a 83 ml para un volumen final de 100 ml.

6. Se espera a que la agarosa se enfríe (45-50° C) y se adicionan 17 ml de formaldehído (37%) se mezcla y se vacía inmediatamente en el molde del gel para que polimerice.

7. El gel se corre en amortiguador MOPS 1 X por 4 h a 50 volts

VII.20. Transferencia de RNA por capilaridad a membranas nylon Hybond N+

En la transferencia de RNA el gel no requiere un tratamiento de desnaturalización como en el DNA y esto debido a que el gel de RNA es desnaturalizante. Por lo tanto la transferencia se realiza como está descrito en la técnica de transferencia de DNA (VIII.12) con la variante de que para RNA comienza a partir del paso 10.

1.- Sobre un molde pyrex rectangular se coloca una caja de petri y encima de ella una placa de vidrio de un tamaño mayor que el gel que se transferirá.

- 2.- Se cortan tres piezas de papel 3 MM Whatman del mismo ancho del gel y de una longitud que le permita tocar la solución de transferencia (SSC 20X) que se encuentra en el pyrex.
 - 3.- Las tres piezas de papel se humedecen totalmente con la misma solución de transferencia y se colocan una por una sobre la placa de vidrio, evitando que quedaran burbujas entre el papel y el gel.
 - 4.- El gel se coloca encima de ellas con la parte superior hacia abajo, evitando atrapar burbujas entre el papel y el gel.
 - 5.- La membrana nylon Hybond-N⁺ del mismo tamaño del gel previamente humedecida en agua estéril (20 min.). se coloco sobre el gel sin atrapar burbujas.
 - 6.- Tres piezas de papel 3 MM del mismo tamaño del gel se colocan sobre la membrana de nylon.
 - 7.- Se apila papel absorbente (periódico) del tamaño del gel, encima de los papeles filtro, un grosor de 10 cm es suficiente. Se pone un peso de aproximadamente 500 g por encima del papel absorbente.
 - 8.- El pyrex tiene aproximadamente 500 ml de solución de transferencia (SSC 20 X). La transferencia se deja de 12 a 18 horas.
 - 9.- Una vez que la transferencia se lleva a cabo (12-18 hrs) se retira la membrana del gel y se lava la membrana en SSC 2X para eliminar los residuos de agarosa. La membrana se deja secar sobre papel filtro y el DNA se fija a la membrana por radiación ultravioleta a 120,000 J/cm² por dos minutos.
- Nota: es recomendable guardar los filtros envueltos en papel 3MM y dentro de una bolsa de plástico o bien en una cámara de vacío si no se emplearán inmediatamente.
- La hibridación de estas membranas se realiza de acuerdo a la descripción del punto VII.6.

VIII. RESULTADOS

VIII.1. Western-blot

Al realizar el análisis por Western blot de las electroforesis con las muestras problema, no se observó un reconocimiento de los anticuerpos de PEPC de maíz con la proteína PEPC de frijol empleando 10, 15 y 20 µg de proteína total extraída de hoja de frijol. Por esto se decidió incrementar la cantidad de proteína en los geles a 30 y 40 µg de proteína total y con esta concentración si se logró un reconocimiento de una banda de aproximadamente 100 kD semejante a la banda control de maíz. Sin embargo, el reconocimiento no fue del todo claro ya que la banda se observaba un poco barrida y también había un fondo inespecífico contrario a lo que se observa en el carril con maíz en donde se nota una banda específica y sin fondo inespecífico. Aparte del control que fue extracto total de de hoja de maíz también se utilizó como control proteína pura PEPC de germen de trigo (Boehringer), la cuál también mostró un cruzamiento específico. Una modificación que se realizó en los siguientes Western fue el revelado, el cual se realizó con el Kit ECL (Amersham). Los resultados obtenidos son mostrados en la Figura 4.

La inmunoelectroforesis se repitió varias veces para tratar de determinar las condiciones para obtener un mejor cruzamiento. Esto no se pudo lograr, ya sea debido a que había muy poca PEPC en los extractos totales de frijol, o porque el anticuerpo no reconoce a PEPC de frijol. En base a estos resultados, si se utilizaran anticuerpos contra PEPC de maíz en el escrutinio de la biblioteca de cDNA de frijol, no sabemos si sería posible lograr identificar clonas positivas. Por tal motivo, se decidió cambiar la estrategia para el sondeo de la biblioteca y fue mediante hibridación convencional con una sonda de DNA marcada con ³²P.

VIII.2. Primer escrutinio

En este primer escrutinio se plaquearon seis cajas de petri grandes con 50,000 placas recombinantes por caja. Se empleó como sonda el fragmento de 650 pb correspondiente a PEPC de frijol (pPvPEPC) marcado radiactivamente (Figura 5). En la primer ronda se aislaron seis clonas y se diluyeron en 1 ml de PDB. Se determinó el título de cada clona para poder plaquear

en una densidad adecuada. En la segunda ronda de cada caja se aislaron tres placas positivas y nuevamente se plaquearon con una menor densidad para ir purificando estas clonas y en esta

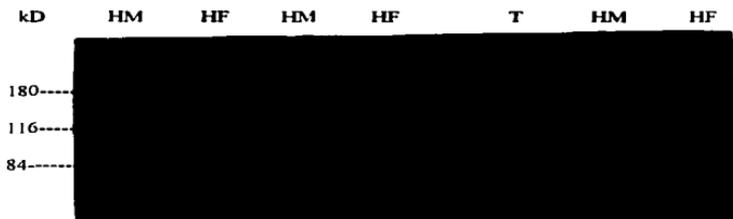


Figura 4. Resultados del análisis de inmunolectroforesis para determinar el reconocimiento de PEPC de frijol empleando anticuerpos contra PEPC de maíz. HM proteína de hoja de maíz (15 μ g). HF proteína soluble de hoja de frijol (40 μ g), y T 5 μ g de PEPC purificada de trigo (Boehringer). Los anticuerpos se emplearon en una dilución 1:200 y se reveló con el kit ECL (Amersham).

tercer ronda se encontró que casi todas las clonas hibridaban y en este paso se procedió a purificar cuatro clonas mas, representativas de cada caja es decir las que mostraran una mejor hibridación y las que se encontraran mas separadas entre sí para evitar que se diera una contaminación con otras clonas cercanas.

De estas clonas se procedió a realizar la escisión *in vivo* para obtener el plásmido pZL1 y a partir de éste cortar con BamHI y SmaI para liberar los insertos, los cuales, al observar en gel de agarosa mostraron un tamaño de aproximadamente 2.5 kb (Fig. 6A) que nos indicaba que era una clona con un tamaño cercano al tamaño del gen reportado de PEPC que es de 3.5 kb. Para confirmar que estas clonas eran positivas se procedió a transferir el DNA de las clonas del gel a

un soporte sólido de nylon, para posteriormente hibridarlo con la misma sonda homologa de PEPC de frijol con la que se realizó el escrutinio de la biblioteca (Fig. 6B). En la Figura 6B se

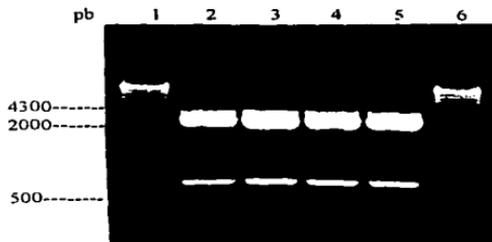


Figura 5. Gel de agarosa para observar el inserto empleado como sonda. Liberado del vector pTZ18 con las enzimas Eco RI y Hind III. Carril 1, 6 marcador DNA de λ cortado con Hind III. Carriles 2, 3, 4, 5 inserto de 650 pb.

muestra la película obtenida de la hibridación de las clonas positivas, en las que se observa hibridación con los insertos, lo cual confirma que las clonas pueden ser positivas.

Para confirmar lo anterior es necesario secuenciar los insertos de cDNA, para descartar falsos positivos o bien saber si se tiene un fragmento de la PEPC de frijol. Se llevó a cabo la secuenciación del extremo 3' de estas clonas, la cual fue realizada en Universidad de California en Berkeley por la Dra. Herminia Loza. Las clonas resultaron ser falsas positivas porque al obtener la secuencia y compararla con secuencias reportadas en el GeneBank no mostraron homología con las PEPC descritas (su secuencia fue parecida a la de una proteína viral). Por lo tanto, se decidió realizar un nuevo escrutinio. Sin embargo, en base a la hibridación se piensa que si tenemos clonas positivas y que habría que intentar secuenciar el otro lado del cDNA para realmente confirmar que no corresponde a la PEPC. Esto en base a que los extremos 3' no

traducibles presenten baja homología entre genes con secuencias codificadoras de alta homología, por lo que habría que analizar esas clonas con mas cuidado.

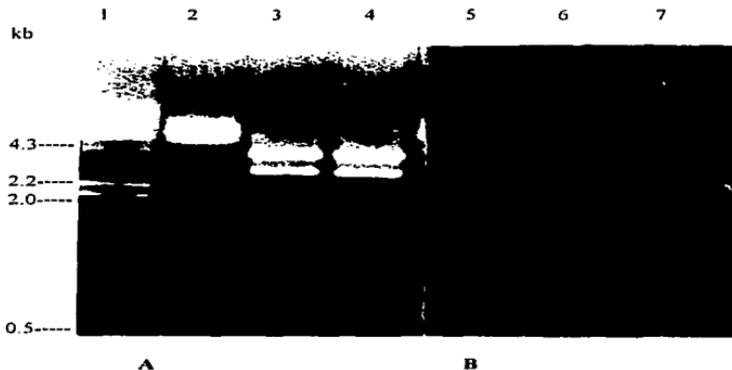


Figura 6. A) Análisis de restricción de los productos de escisión *in vivo* de λ ZIPLOX de dos clonas de la biblioteca de cDNA. Carril 1, DNA de λ cortado con Hind III. Carril 2, clona 1 sin cortar. Carriles 3 y 4, clonas 1 y 2 cortadas con Bam HI/Sma I, para liberar el inserto clonado en el vector pZLI. B) Hibridación por Southern-blot de estas clonas empleando sonda homóloga de PEPC de frijol pPvPEPC. Carril 5, clona 1 sin cortar. Carril 6 y 7 clonas 1 y 2 respectivamente sin cortar

VIII.3. Segundo Escrutinio. Escrutinio por PCR seguido de hibridación convencional.

Esta técnica combinada de PCR se usó en la primera ronda del segundo escrutinio previo a la hibridación convencional. Para esto se plaquearon 400,000 ufp y de estas cajas se obtuvieron dos filtros uno para hibridación y otro para PCR el cual se dividió en 6 secciones a manera de pastel. Después de colocar la membrana sobre la caja se esperaron dos minutos para que se transfiriera el DNA de los fagos el cual se eluyó con PDB de cada sección. Al eluido se le hicieron lavados con fenol-cloroformo y de esta solución se procedió a realizar los PCRs empleando los oligonucleótidos descritos en la sección VII.8. Los productos amplificados se corrieron en geles de agarosa al 1 %. En estos geles se observaron productos de un peso aproximado al esperado de 650 pb (Fig. 7)

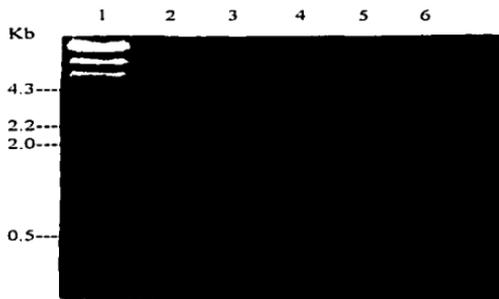


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa donde se observan los productos de amplificación de PCR. Se utilizó el DNA de los fagos recombinantes, eluido de los filtros de las cajas utilizadas en el segundo escrutinio. Carril 1, marcador de DNA de λ cortado con Hind III. Carriles 2, 3, 4, 5, 6, productos obtenidos de los eluidos de las cajas 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente.

Este gel se transfirió a una membrana de nylon y se hibridó con la sonda homóloga PEPC de frijol (pPvPEPC). Los resultados se muestran en la Figura 8. En esta figura se observa hibridación con los productos obtenidos a partir de la elución de algunas secciones de 6 cajas. Con estos resultados obtenidos se procedió a realizar el escrutinio por hibridación convencional con el segundo filtro. La hibridación se realizó a una temperatura de 63°C y confirma que hay placas positivas en estas cajas. Estas clonas coinciden con la secciones de las cajas positivas de PCR. Se aislaron dos clonas por cada caja, se realizó la titulación para conocer el título de los fagos y plaquear a una densidad adecuada para poder realizar la segunda ronda del escrutinio.



Figura 8. Hibridación mediante southern de los productos de amplificación por PCR de las cajas con fagos del segundo escrutinio. Carril 1, caja 1. Carril 2, caja 2. Carril 3, caja 3. Carril 4, caja 4. Carril 5, caja 5. Hibridación con sonda homóloga de PEPC de frijol.

En esta ronda nuevamente se repitió la hibridación de clonas y se realizó la tercer ronda para purificar las clonas positivas se aislaron clonas y por último se realizó una cuarta ronda con una densidad baja con la finalidad de obtener clonas positivas individuales y puras para poder

aislarlas fácilmente y así emplearlas en los análisis posteriores. En la Tabla 4 se muestra la totalidad de clonas aisladas de los escrutinios llevados a cabo.

	Método de escrutinio	No. de rondas	No. de clonas
		Primera	4
Primer escrutinio	Hibridación	Segunda	18
		Tercera	30
			2 secuenciadas
Segundo escrutinio	PCR	Una	6 cajas positivas
	Hibridación	Primera	8
		Segunda	16
		Tercera	32
	Cuarta	20	

Tabla 4. Clonas aisladas en las rondas de los escrutinios

VIII.4. Northern-Blot

El segundo objetivo del presente trabajo fue analizar la expresión de la PEPC en diferentes tejidos de la planta de frijol. Para llevar a cabo dicho objetivo se procedió a extraer RNA de hoja, tallo, raíz y vaina de 7, 14, 21 y 28 días después de la floración. Se calibró la cantidad de RNA a cargar en los geles por medio de cuantificación espectrofotométrica y observando geles de agarosa en transiluminador con las concentraciones apropiadas hasta coincidir con la cantidad obtenida por espectro y por observación en fotos de geles de calibración. Una vez calibrada la cantidad de RNA de todas las muestras se procedió a realizar electroforesis desnaturizante cargando los carriles con 50 µg de RNA. El RNA de estos geles

fue transferido a membranas de nylon e hibridado con la sonda homóloga de pPvPEPC de acuerdo a como se describe en el punto VII.6.

Analizando los resultados de los Northernblots se observa que en vaina de 7 días se presenta un transcrito abundante de aproximadamente 3 kb el cual decrece en vaina de 14 y permanece mas o menos estable en el muestreo de 21 y 28 ddf. En esta hibridación se analizaron tambien, RNAs obtenidos de hoja, tallo y raíz de frijol. En hoja se observa gran cantidad de mensajero, mientras que en tallo la cantidad es muy baja y en raíz no es detectable (Fig. 9).



Figura 9. Northern-blot de RNA total de varios tejidos de frijol. (HF) hoja de frijol, (T) tallo, (R) raíz, V7, V14, V21, V28 vaina de frijol de diferentes días después de la floración. La hibridación se realizó con sonda homóloga de frijol como se describe en Materiales y Métodos. Cada carril fue cargado con 50 µg de RNA.

IX. DISCUSION

Escrutinio de la biblioteca de cDNA de vaina de frijol para aislar el gen de la PEPC.

Cuando se está interesado en buscar un gen que se expresa en cierto tejido un escrutinio de una biblioteca de DNA complementario es la táctica adecuada. Este sería el primer paso para lograr el objetivo del aislamiento del gen de la PEPC que se expresa en vaina de frijol. Para lograr ese objetivo, empleamos una biblioteca que fue construida en nuestro laboratorio (Hernández, 1995) a partir de RNAm expresado en vaina de frijol de 7 días después de la floración. Se sintetizó DNA complementario empleando la Transcriptasa Reversa SuperScript II (RT) (GIBCO 200 U/ μ l) y el cDNA se clonó en el vector λ ZIP-LOX. Este sistema tiene la ventaja que permite realizar la excisión *in vivo* con el fin de obtener DNA plasmídico de PZLI de donde a su vez, se pueden extraer los insertos clonados más fácilmente que empleando DNA de fago, y facilitando el trabajo pues se evita la subclonación del cDNA de interés.

Teniendo la biblioteca de cDNA de una buena calidad el siguiente punto determinante en el alcance de nuestro objetivo es la estrategia empleada en el escrutinio de la biblioteca. Otra ventaja que presenta el sistema de ZIP-LOX es que el cDNA se encuentra clonado bajo la dirección de un promotor inducible por IPTG (β -galactosidasa), lo cual brinda la posibilidad de efectuar el escrutinio con anticuerpos anti-PEPC. Por esa razón y debido a que contábamos con anticuerpos contra PEPC de maíz, primeramente se realizaron pruebas para determinar si el anticuerpo reconocía a la proteína PEPC de frijol. Después de muchas pruebas no se logró obtener un buen cruzamiento y se optó por realizar el escrutinio por otro medio. Por tal motivo se decidió realizar el escrutinio por hibridación con una sonda homóloga la cual fue producida en nuestro laboratorio por Ayala en 1996, por medio de la técnica de amplificación por PCR a partir de cDNA de la biblioteca de vaina de frijol.

Contando ya con una sonda homóloga se comenzaron los escrutinios por medio de hibridación convencional con la sonda marcada radiactivamente con 32 P. En esta sección el punto importante fue definir las condiciones de hibridación (Tiempo y Temperatura) y esta elección es en base a ensayos previos de hibridaciones con esta sonda. Después de estas pruebas la temperatura de hibridación que se eligió fue de 63° C y un tiempo de 20 h. En base a el título de la biblioteca se tiene que definir la densidad a plaquear y en nuestro caso partimos de

300,000 clonas recombinantes divididas en seis cajas de petri grandes con 50,000 placas por caja.

Se realizaron dos rondas de escrutinio de la biblioteca empleando sonda homóloga de frijol, plaqueando un total de 900,000 clonas recombinantes de las cuales se aislaron 30 clonas positivas en los dos escrutinios. Se realizó la escisión *in vivo* de 10 de estas clonas y se realizaron cortes con enzimas de restricción con los cuales se observó que el tamaño de estos insertos fue variable, encontrando clonas de entre 1 y 2.5 kb. Es importante mencionar que al secuenciar las clonas positivas obtenidas en este primer escrutinio y alinearlas con otras secuencias de PEPC reportadas, no presentaban gran homología. Sin embargo, desafortunadamente estas clonas no pudieron ser analizadas con más detalle, ya que debido a que fueron secuenciadas en el extremo 3', cabría la posibilidad de que no se haya llegado a secuenciar la región codificadora y que la región no traducible esté poco conservada.

Independientemente de esto, se decidió realizar un segundo escrutinio, primeramente por medio de PCR y aquí se emplearon seis cajas las cuales se plaquearon con 50,000 clonas recombinantes cada una. Los filtros levantados de cada caja se dividieron en seis secciones y de cada sección se tomó el eluido, el cual se empleó como molde en la reacción de PCR. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa y fueron del tamaño esperado (650 pb). Estos se transfirieron e hibridaron con la sonda homóloga observándose una hibridación de los insertos en las secciones de las seis cajas (Fig 6). En esta figura solo se observa de cinco cajas. Esta hibridación indica que en cada caja hay clonas positivas. Por esta razón se decidió continuar el escrutinio con hibridación convencional y en este escrutinio se encontraron clonas positivas las cuales se purificaron hasta una tercera y cuarta ronda de escrutinio. De estas clonas positivas se aislaron las clonas representativas y se realizó escisión *in vivo*. El tamaño de estas clonas fue de 1 a 2 kb. Con esto se terminó el trabajo con respecto al aislamiento de clonas recombinantes que contengan un fragmento o bien el gen completo de PEPC y como en nuestro caso en base a el tamaño de los insertos podríamos decir que no se tiene el gen completo y que una posibilidad de encontrarlo completo sería el sondear nuevamente la biblioteca de cDNA empleando como sonda la clona con el mayor tamaño de cDNA, también sería posible emplear la técnica de Extensión de Primero, con lo cual sería factible lograr tener la clona completa

(Boni 1993). En conclusión sobre el escrutinio se puede decir que en este trabajo lograron aislarse clones positivas que presentan una secuencia del gen que codifica a PEPC, fallando por confirmar por medio de la secuenciación que tan parecidos son los genes aislados, con las otras secuencias ya reportadas en el GeneBank.

Expresión de PEPC en diferentes tejidos la planta de frijol.

Con respecto a los análisis de expresión de los mensajes de la PEPC, se observó que la sonda empleada detectó un RNA complementario en tejidos de tallo, hoja y vaina de frijol. En raíz, no fue posible detectar la presencia de este RNA aunque se sabe que la expresión de PEPC durante el proceso del establecimiento de la simbiosis con *Rhizobium*, es un punto determinante en el éxito de esta relación y esta enzima se encuentra en niveles altos en nódulos meristemáticos de alfalfa, en zona de infección y en tejidos vasculares (Pathirana 1997). Al no detectarlo quizás sea debido a que el gen que se expresa en raíz de frijol corresponda a alguna isoforma que la sonda empleada no detecta, aunque esto sería muy extraño considerando la naturaleza de la sonda (región de unión al sustrato).

En los tejidos en los que se detecta el mensaje, se observa un RNA de aproximadamente 3 kb, tamaño un poco menor al determinado para otras especies. Por ejemplo, en raíz de maíz se ha determinado un tamaño de 3.5 kb (Mark, 1986). En hojas de maíz se ha detectado un mensaje de 3.5 kb el cual corresponde a el gene que codifica a la isoenzima involucrada en fotosíntesis C4 (Richard, 1989)

En hoja se presentó una abundante cantidad de mensaje que se observa con un tamaño ligeramente menor al observado en vaina. Esto no se analizó con mas detalle, pero sería interesante definirlo. En hoja se observa además, una ligera hibridación con otra banda de mayor tamaño; aproximadamente 3.8 kb. Esto es interesante ya que podría estar relacionado con los datos obtenidos en el laboratorio de la Dra. Rosario Muñoz, quien al tratar de purificar PEPC de hoja de frijol aislan dos formas de diferente peso molecular. (XVIII Reunión de Bioquímica Vegetal, Morelia Michoacán 1993). Sin embargo, no ha queda claro si estas dos formas son independientes o interconvertibles. Será posible realizar estudios mas detallados

para definir esta incógnita cuando se tenga un fragmento de DNA de PEPC de frijol de mayor tamaño.

La expresión de PEPC en tallo no ha sido descrita detalladamente, solamente hay un estudio en *Glycine max* en donde se observa que el correspondiente mensaje esta presente en un nivel similar en hoja, tallo, raiz y semillas en desarrollo (Sugimoto, 1992). Pero los datos de este trabajo indican que existe una casi nula presencia de este mensaje en este tejido.

En tejido de vaina, la mayor cantidad de mensaje se presenta a los 7 ddf. Sin embargo, conforme madura este tejido la cantidad de ese mensaje es menor, manteniendose mas o menos estable a lo largo del desarrollo de la vaina (Fig. 9). Analizando estos resultados y comparandolos con lo encontrado por A. Delgado (1992) cuando mide la actividad de la PEPC de vaina de frijol, se observa que al principio los niveles de PEPC debieron haberse incrementado paralelamente a la actividad de la enzima. Sin embargo, la actividad continúa incrementandose después del día 7 mientras que los niveles de RNA disminuyen. En ese estudio se observa que la máxima actividad de la enzima es alcanzada entre los 14 y 21 ddf. Aunque la falta de información a cerca de los niveles de esta proteína en este sistema no nos permite hacer una conclusión definitiva, si podemos sugerir que al principio del desarrollo de la vaina, existe una regulación a nivel transcripcional ya que la actividad de la enzima aumenta conforme aumenta el RNA mensajero, pero que en etapas posteriores, la existencia de un control a nivel traduccional o post-traduccional debe estar involucrado en la expresión de esta proteína.

X. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas de este trabajo son:

1. Se tienen clonas positivas que presentan una secuencia del gen que codifica la PEPC de vaina de frijol, faltando por confirmar la secuencia completamente.
2. El mensaje de PEPC de frijol es de aproximadamente 3 kb.
3. El mensaje de PEPC de frijol fue detectado en hoja y vaina, claramente, muy ligeramente en hoja y no se detectó en raíz.
4. Al comparar la actividad de la PEPC en vaina de frijol con los niveles de mensajes presentes durante su desarrollo es posible sugerir que muy probablemente estén funcionando distintos niveles de control de la expresión genética a lo largo del desarrollo de la vaina. Al inicio del desarrollo, el control transcripcional es el más evidente, mientras que en estadios posteriores, el control traduccional o post-traduccional, podría ser el principal punto de regulación de la actividad de la enzima en vaina de frijol.
5. Debido a que el frijol es una fuente de alimento importante en la población Mexicana el realizar este tipo de estudios podría brindar una alternativa para un posterior mejoramiento del cultivo en base al conocimiento de las enzimas importantes en la fijación de CO_2 durante el desarrollo de la vaina.

XI. BIBLIOGRAFIA

- Andreo, C.S., Gonzalez, D.H. and Iglesias, A.A.** (1987). Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase. Structure and regulation. *FEBS Lett.* 213: 1-8.
- Ayala, O.A.** (1995). Obtención de una sonda molecular homóloga para el gen de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) expresado en frijol (*Phaseolus vulgaris* L). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Berben, G., and Gilliquet, V.** (1993) Improved colony grids. *Focus* 15:4.
- Birbion, H, C. and Doley, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid ADN. *Nucl. Acids. Res.* 7:1513-1517.
- Blanke, M.M. and Lenz, F.** (1989). Fruit photosynthesis. *Plant Cell and Environ.* 12: 31-46.
- Boni, J. and Schupbach J.** (1993). Primer extension analysis provides a sensitive tool for the identification of PCR-amplified DNA from HIV-1. *J Virol Methods* 42: 309-322
- Brown, T.A.** (1991). *Essential Molecular Biology. A Practical Approach. Vol.II* Oxford University, New York.
- Chomczynski, N. and Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159
- Crétin C., Sant S., Keyler E., Lepiniec L., Tagu FD., Vidal J., and Gadal P.** (1991). The phosphoenolpyruvate carboxylase gene family of *Shorgum*. Promoter structures, amino acid sequences and expression of genes. *Gene* 99: 87-94.
- Cushman JC, Mayer G, Michalowsky CB, Scmitt JM and Buhnett HJ** (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.
- D'Alessio, J.M., Bebec, R., Hartley, J.L., Noon, M. C., and Polayes, D.** (1992). Lambda ZIPLOX. Automatic subcloning of cDNA. *Focus* 14:76.
- Delgado, A.A.** (1992). Metabolitos formados por la fijación de CO₂ en la cavidad de la vaina de *Phaseolus vulgaris* L: Tesis de maestría. Colegio de Posgraduados. Montecillo, México.
- Davies, J.** (1987). La ingeniería genética. *Mundo Científico.* 7: 71.

- Delaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B.** (1985). Molecular Biology of plants. A laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
- 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.
- Flores E., J.** (1994). Expresión de los genes de la PEPC en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Licenciatura: Universidad Autonoma de Sinaloa.
- 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.
- Hatch MD** (1987) C4 photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. Biochem. Biophys. Acta 895: 81-106
- 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.
- Hoess, R. And Abremski, K.** (1985). Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site specific recombination system. J. Mol. Biol. 181: 351-52.
- Hudspeth, R.L., Grula, 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.
- Jiao, J.A., Podesta F.E., Chollet, R., O'Leary M.H. and Andreo, C.S.** (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.
- Josefsen, K., Wollike, M., and Buschard, K.** (1993). Rapid quantification of cDNA clones on agar plates. Focus. 15:4-5.
- Laemmli UK.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685

- 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.
- Mark, H. and William, C.** (1986). Maize Phosphoenolpyruvate Carboxylase. *J. Biol. Chem.* 261: 6132-6136
- Old, R. W. and Primrose, S.B.** (1989). Principles of gene manipulation an introduction to genetic engineering. Blackwell Scientific Publications. Oxford, England.
- Osmond CB** (1978). Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Ann.Rev. Plant. Physiol.* 29: 379-414.
- Pathirana, MS, Samac, DA, Roeven, R, Yoshioka, H, Vance, CP, Gantt, JS.** (1997). Analyses of phosphoenolpyruvate carboxylase gene structure and expresión in alfalfa nodules. *Plan J* 12: 293-304
- Poetsch W., Hermans J. and Westhoff P.** (1991). Multiple cDNAs of phosphoenolpyruvate carboxylase in the C4 dicot *Flaveria trinervia*. *FEBS Lett.* 292: 133-136.
- 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 analysis of the gene and gene expression. *J. Biochem.* 107: 165-168.
- Richard, L, Hudspeth and Jhon W. Grula** (1989). Structure and expression of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme involved in C4 photosynthesis. *Plant Molecular Biology* 12: 579-589
- SARH** (1995). Censo Agrícola Granadero y Ejidal 1990.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Schaffer AR and Sheen J.** (1992). Maize C4 photosynthesis involves differential regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase genes. *Plant J.* 2: 221-232
- Schuler, M. A., and Zielinski, R. E.** (1989). *Methods in Plant Molecular Biology*. Academic Press, Inc. San Diego California.
- Southern EM.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-517

- Sugimoto T, Kawasaki T, Whittier RF, Shibata D, Kiwamura Y. (1992).** cDNA sequence and expression of a phosphoenolpyruvate carboxylase gene from soybean. *Plant Mol Biol* 20: 743-747
- Temple J., and Schell, J. (1987).** La manipulación de las plantas. *Mundo Científico*. 7:71.
- Terada K., and Izui. (1991).** Site-directed mutagenesis of the conserved histidine residue of phosphoenolpyruvate carboxylase. His 138 is essential for the second partial reaction. *Eur. J. Biochem.* 202: 797-803.
- Thomas, P.S. (1980).** The C4 pathway: The biochemistry of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:5201-15205.
- Tirumala, M., and Raghavendra, S.A. (1992).** Light activation of phosphoenolpyruvate carboxylase in maize mesophyll protoplasts. *J. Plant Physiol.* 139: 431-435.
- Yaganisawa S, Izui K, Yamaguchi Y, Shigesada K and Katsuki H. (1988).** Further analysis of cDNA clones for maize phosphoenolpyruvate carboxylase involved in C4 photosynthesis. *FEBS Lett.* 229:1: 107-110