

66

2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

"EXPRESION DE LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA  
DEL COLERA EN PROTOPLASTOS DE  
ZANAHORIA"

**T E S I S**

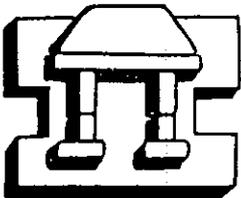
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G A**

**P R E S E N T A :**

ROXANA <sup>ESTELA</sup> MALPICA CALDERON

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. JOSE LUIS SANCHEZ VARGAS.



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA

1998

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

268070 I



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

1954

1954

## DEDICATORIAS

A mis papás *Martha y Alfonso*

Gustosos me han obsequiado, el mayor ejemplo de amor, fortaleza y coraje.

Por permitirme aprender de ustedes, de sus aciertos, de sus errores, de la forma como se entregan a la vida.

*Son ustedes Ponchito y Marthita los cimientos de este logro.*

Muchas Gracias

A mis hermanas *Verónica y Berenice*

Por su jovialidad, sus sonrisas, sus enojos, las fantasías en los juegos compartidos y el cariño puesto en sus abrazos.

**VICTOR**

Haz llegado a mi vida, dándole nuevos matices de felicidad; ahora vamos tomados de la mano, uno junto al otro buscando realizar nuestros sueños. Tu comprensión, compañía y motivación han sido trascendentales para culminar esta meta.

Porque eres parte importante de mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Jose Luis Sánchez Vargas, por dedicar importante parte de su tiempo en mi formación profesional, por su valiosa asesoría, consejos, apoyo, paciencia y confianza, que fueron de vital importancia para la realización de este trabajo.

Al Dr. Rubén López Revilla, con especial énfasis, por permitir y apoyar la realización de la mayor parte de este trabajo en el laboratorio a su cargo, No. 17 del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Por su invaluable asesoría, sus consejos y enseñanza; por que ejerce una gran motivación en mí para seguir en el camino de la investigación científica.

A los revisores de mi trabajo: Dra. Leticia Moreno, M. en C. Ernesto Aguirre, M. en C. Sergio Vaca y M. en C. Ramón Moreno por sus sugerencias y comentarios que permitieron enriquecerlo.

A la Dra. Ana Ramos y al M. en C. Eduardo Valencia por proporcionarnos el cultivo en suspensión de *D. carota* además de su asesoría para su mantenimiento.

A Gerardo Pérez, por su participación, apoyo y continuación de este trabajo. Por su amistad.

A Rocío Huerta por sus ánimos, su gran ayuda y asesoría en la técnica de Western blot.

A Carlos Zárate por su asesoría en microscopía de fluorescencia.

A Lucía Chavez, Leticia Neri y Cesarea Bermudez por su incondicional disposición técnica y humana.

Y en general a todos los miembros del laboratorio 17 con especial afecto, por sus gratos momentos de compañía, amistad y apoyo.

A mis amigos: Araceli, Eloisa, Miguel, Toño, Angeles, Carlos Hdez., Israel, Carlos Vital, Ceci, Martha, Norma, Juan y Angel E.; por todas las vivencias compartidas.

## ÍNDICE

Lista de tablas y figuras	6
Resumen	7
Introducción	8
Antecedentes	11
Justificación	16
Objetivos	17
Materiales y Métodos	18
Resultados	29
Discusión	46
Conclusiones	50
Apéndices	51
Referencias	66

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Plásmidos utilizados _____	19
Tabla 2. Ensayos de purificación y electroporación de protoplastos de <i>D. carota</i> _____	36
Tabla 3. Porcentajes de viabilidad de los protoplastos a las 24 h de la electroporación _____	39
Tabla 4. Porcentajes de expresión de GFP en protoplastos a las 24 h de la electroporación _____	42
Figura 1. Clonación de <i>ctxB1.1</i> en pUI235-5.1 _____	31
Figura 2. Clonación de <i>ctxB0.4</i> en pUI235-5.1 _____	32
Figura 3. Clonación de <i>ctxB0.3</i> en pZERO 2.1 _____	33
Figura 4. Clonación de <i>ctxB0.3</i> en pUIEFI-5.1 _____	34
Figura 5. Electroforesis de pUI235CTB1.1 y pBSCTB1.1 _____	35
Figura 6. Electroforesis de pUIEFICTB0.3 _____	35
Figura 7. Viabilidad de protoplastos electroporados antes de la cotransformación _____	36
Figura 8. Actividad de $\beta$ -glucuronidasa en protoplastos cotransformados con PBI221 o pBI426 (22 h de incubación con p-nitrofenil-glucurónido) _____	40
Figura 9. Actividad de $\beta$ -glucuronidasa en protoplastos cotransformados con pBI221 o pBI426 (96 h de incubación con p-nitrofenil-glucurónido) _____	41
Figura 10. Expresión de GFP en protoplastos cotransformados con pBIN35S-mGFP4 _____	43
Figura 11. Inmunoblot de los protoplastos cotransformados _____	45

## RESUMEN

*Vibrio cholerae* tiene importancia en la salud pública debido al síndrome diarreico que provoca al colonizar el intestino delgado, por acción de la toxina del cólera (CT) compuesta por la subunidad A (CTA) y un pentámero de subunidades B (CTB). Varios investigadores han demostrado que CTB es un inmunógeno oral muy potente y eficiente acarreador de epítomos relevantes, por lo que el diseño de sistemas alternativos de expresión y producción de esta proteína es fundamental para el desarrollo de una vacuna oral. Las plantas transgénicas se están estudiando como sistemas novedosos de biomanufactura, con un interés especial en las que produzcan proteínas de valor biomédico. La expresión de antígenos microbianos en plantas comestibles y su uso para la inmunización oral de mamíferos se ha realizado exitosamente. Con el fin de construir vehículos de expresión de CTB en plantas y evaluar su funcionalidad mediante ensayos de expresión transitoria en protoplastos de zanahoria, clonamos *ctxB1.1* y *ctxB0.4*, que codifican la proteína CTB, en los vectores de expresión para plantas pUI235-5.1 y pUIEFI-5.1 que poseen, respectivamente, los promotores P235SCaMV y PeEF $\beta$ At. Se obtuvieron tres construcciones: pUI235CTB1.1, pUI235CTB0.4 y pUIEFICTB0.3 las cuales introdujimos junto con uno de los plásmidos pBI426, pBI221 o pBIN35S-mGFP4, que contienen genes reporteros ( $\beta$ -glucuronidasa o proteína verde fluorescente) mediante ensayos de cotransformación por electroporación en protoplastos de zanahoria purificados por sedimentación o flotación; los obtenidos por flotación tuvieron la mayor densidad ( $30 \times 10^6$  protoplastos/ml). A las 24 h de la cotransformación el 44.6% de los protoplastos coelectroporados a 675V/cm-800  $\mu$ F con pBIN35S-mGFP4 expresaron la proteína verde fluorescente, por lo que inferimos que estas condiciones fueron suficientes para la entrada del ADN plasmídico. No detectamos actividad de  $\beta$ -glucuronidasa en protoplastos cotransformados con pBI426 o mediante los pulsos eléctricos aplicados. En un ensayo de inmunodetección por Western blot en los protoplastos coelectroporados, no encontramos niveles detectables de CTB.

## INTRODUCCIÓN

*Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* enterotoxigénica son bacterias Gram negativas con importancia en salud pública debido a los síndromes diarreicos que provocan al colonizar el intestino delgado de humanos y animales, que varían desde la “diarrea leve del viajero” hasta deshidratación severa (cólera) que si no es tratada adecuada y oportunamente, puede conducir a la muerte. Dichos síndromes diarreicos son causados por la acción de la enterotoxina termolábil (LT) de *E. coli* y la toxina del cólera (CT) de *V. cholerae*. Estas toxinas son proteínas estructural y funcionalmente muy similares (Sixma, 1991) cuya química y genética se han estudiado extensamente.

La CT (producto del operón *ctxAB* en el cromosoma de *V. cholerae*) es una proteína oligomérica compuesta por la subunidad A (CTA) de 27.23 kDa (tóxica por su actividad de adenilato ciclasa) y un pentámero de subunidades B (CTB) de 58.38 kDa (con capacidad de unión al gangliósido GM1 presente en la superficie de células epiteliales), que es secretada a través de la membrana exterior bacteriana al ambiente extracelular durante la colonización del intestino (Mekalanos, 1983). Se ha demostrado que esta toxina es un inmunógeno extremadamente potente (Elson, 1984), pero su uso como antígeno se restringe debido a su capacidad tóxica.

La prevención del contagio, junto con el control de la dispersión de la enfermedad, es una de las medidas más importantes para eliminar el cólera, que requiere, aparte de una higiene adecuada, una vacuna efectiva, cuyo desarrollo es objeto de investigación de numerosos grupos científicos.

Entre las vacunas desarrolladas contra el cólera están las vacunas de organismos completos atenuados o muertos, lipopolisacáridos y toxoide administrados por vía parenteral, que inducen escasa protección de muy corta duración contra la infección.

Las vacunas consistentes en células bacterianas muertas combinadas con CTB (vacuna B-WC) administradas oralmente, han conferido hasta 85% y 75% de protección contra cólera y contra *E. coli* enterotoxigénica respectivamente (Mekalanos, 1994), cuya eficacia protectora se cree es debida, principalmente al componente CTB que permite estimular una respuesta inmune local en la mucosa intestinal que se traduce en niveles altos

de anticuerpos IgA antitoxina y antibacterianos (por el componente celular), así como en memoria inmunológica duradera (Holmgren, 1992). Sin embargo sus principales limitantes son su proceso complejo y caro de manufactura y su eficacia reducida contra cepas diferentes al biotipo clásico de *V. cholerae* (Mekalanos, 1994).

Finalmente mencionaremos las cepas de *V. cholerae* recombinantes con delección del gen *ctxA* utilizadas como vacunas contra el cólera que han mostrado ser seguras y protectoras (una dosis confiere 89% de protección contra el cólera)(Spangler 1992; Holmgren, 1992). Entre las principales desventajas de estas vacunas están los efectos colaterales moderados como diarrea, náusea, fiebre, etc. Debido a estas reacciones adversas que pueden provocar las vacunas basadas en organismos completos, se ha propuesto el uso de péptidos sintéticos para obtener “vacunas antipéptidos” o “vacunas de subunidades”, que consisten en las proteínas inmunogénicas purificadas del agente infeccioso que son responsables de la respuesta inmune protectora (Bloom, 1989). Al respecto, Guyón-Gruaz y col. (1986) demostraron que la administración oral o intraperitoneal en ratones, de un péptido sintético que incluye los aminoácidos 50 a 75 de CTB condujo a la formación de anticuerpos policlonales séricos capaces de neutralizar la toxicidad de CT. Este trabajo constituye uno de los primeras investigaciones exitosas de inmunización oral en ratones, con péptidos sintéticos, aunque entre de sus principales limitantes está el costo de la producción de péptidos sintéticos para su aplicación como vacunas.

### **Plantas transgénicas como sistemas de expresión de inmunógenos**

La manipulación genética de plantas por técnicas de ADN recombinante ha permitido que las plantas transgénicas, a las que se les ha incorporado secuencias de ADN foráneo, puedan servir como biorreactores para la producción de proteínas de interés medicinal o farmacéutico (Watson, 1992).

Para lograr la expresión de transgenes en plantas, se siguen dos estrategias diferentes; la **transformación genética estable del genoma nuclear** (por la introducción de genes foráneos mediada por la infección con *Agrobacterium* y el uso de vectores T-DNA, o por transformación directa del DNA) que genera plantas con la capacidad permanente de expresar el transgen a niveles constantes o inducibles; y la **expresión transitoria**, la cual

puede ser medida por la expresión de genes reporteros o de los genes blanco de los vectores introducidos por métodos de transformación directa del DNA plasmídico mediada por; biobalística, electroporación, sustancias químicas o con vectores virales (virus patogénicos de plantas manipulados genéticamente) (Arntzen, 1997).

Actualmente las plantas se están estudiando como sistemas novedosos de biomanufactura, con un interés especial en las que produzcan proteínas de valor farmacéutico potencial o "vacunas de subunidades" debido a que grandes cantidades del inmunógeno podrían producirse a un costo relativamente bajo. Las plantas transgénicas que expresen antígenos en sus tejidos comestibles pueden usarse como sistemas económicos de producción y administración de vacunas comestibles (Mason, 1995).

Entre las investigaciones recientes que han aplicado la estrategia de transformación genética del genoma nuclear para el desarrollo de vacunas comestibles, están las realizadas por Mason y col. (1992) quienes demostraron la expresión del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) en hojas de plantas de tabaco en las que habían introducido el gen de la proteína HBsAg. El antígeno recombinante (rHBsAg) resultante, que fue obtenido a niveles de 0.01% de la proteína total soluble de hojas de las plantas transgénicas, fue reconocido específicamente por anticuerpos monoclonales inducidos por HBsAg presente en el suero de pacientes con hepatitis B. Posteriormente Thanavala y col. (1995) reportaron que la respuesta inmunológica hacia el rHBsAg purificado de las hojas de plantas transgénicas de tabaco es cualitativamente similar a la respuesta obtenida al inmunizar ratones con el rHBsAg producido en levaduras, que hoy en día constituye la vacuna recombinante contra la hepatitis disponible en el comercio.

Más recientemente Dalsgaard y col. (1997) aplicando la estrategia de expresión transitoria en plantas mediada por virus, lograron la expresión de la proteína VP2 de la cápside del virus de la enteritis del visón (MEV) en plantas de *Vigna unguiculata*, al ser infectadas con partículas virales quiméricas del virus del mosaico del garbanzo (CPMV) que contienen la secuencia codificante del epítipo VP2. De manera muy importante, encontraron que la administración subcutánea de 1 mg de partículas virales quiméricas (CVP) purificadas a visones sanos y posterior exposición a MEV les confirió protección contra la enfermedad provocada por el virus, sin el desarrollo de ningún síntoma clínico.

## ANTECEDENTES

### La subunidad B de la toxina del cólera como inmunógeno oral

Los anticuerpos neutralizantes contra CT reaccionan principalmente con CTB (Mekalanos, 1983; Apter, 1993), por lo que CTB se ha propuesto como un inmunógeno oral eficiente que estimula la formación de anticuerpos intestinales de clase IgA, además de generar memoria inmunológica duradera, que ofrece protección tanto contra el cólera como contra la diarrea causada por *E. coli* enterotoxigénica (Dertzbaugh, 1993).

La CTB puede utilizarse como un vehículo de otros antígenos o epítopos relevantes fusionados química o genéticamente con ella para inducir la inmunización de mucosas (Czerkinsky, 1989).

Se han construido varios vectores recombinantes de *ctxB* en *Vibrio cholerae* (Sánchez, 1989), en los cuales se han fusionado oligonucleótidos que codifican para epítopos relevantes al extremo amino ó carboxilo terminal de la subunidad B de la LT (LTB) para lograr la sobreexpresión de proteínas híbridas (Sánchez, 1988; Sánchez, 1990). La aplicación de estos sistemas de sobreexpresión de *ctxB* en *V. cholerae* en vacunas como la B-WC o en vacunas de subunidades tienen limitantes, ya que requiere fermentadores a gran escala y protocolos estrictos de purificación para obtener suficientes cantidades de proteína recombinante para su administración por vía oral, por lo que los costos de su producción son altos en países en vías de desarrollo. Actualmente se investigan otros sistemas alternos de su producción, como las plantas transgénicas.

La construcción de sistemas de inmunización para enteropatógenos microbianos basados en plantas comestibles, puede ser una alternativa más barata que los sistemas convencionales de fermentación para la producción de vacunas, ya que las plantas pueden crecer económicamente en grandes cantidades usando sólo energía solar y las técnicas agrícolas adecuadas. Además las vacunas recombinantes basadas en plantas comestibles serían fáciles de transportar y administrar en las zonas rurales donde no existen sistemas de refrigeración requeridos para la preservación de vacunas obtenidas de manera tradicional. Los títulos de anticuerpos podrían reforzarse por la administración oral de vacuna comestible presente en tejidos vegetales cuando los títulos protectores declinan. De esta

manera las plantas comestibles pueden ser una fuente continua de vacuna oral para dosis de refuerzo (Arakawa, 1998).

La producción de CTB pentamérica en plantas comestibles puede ser muy útil en proporcionar de manera segura y a bajo costo la inmunización de las mucosas contra otros patógenos entéricos que pueden ser controlados por vacunas de subunidades recombinantes.

#### **Administración de inmunógenos expresados en plantas transgénicas comestibles**

Haq y col. (1995) construyeron plantas de tabaco y de papa transgénicas introduciendo el gen de LTB en dos vectores de expresión (pLTB-110 y pLTK-110) que se transfirieron a las plantas mediante transformación con *Agrobacterium tumefaciens*. Extractos de las plantas transformadas con pLTK-110 contenían más de 14 µg de antígeno recombinante/g de proteína soluble total en hojas de tabaco y 110 µg de antígeno recombinante/g de masa total de microtubérculos de papa. Los mismos autores determinaron la inmunogenicidad oral dando a ratones Balb/C por vía intragástrica un extracto crudo soluble de las hojas de tabaco transformadas con pLTK-110; cada dosis tenía 12.5 µg de antígeno recombinante que se administró los días 0, 4, 21 y 25 del tratamiento. Los ratones tratados formaron anticuerpos contra LTB por lo que ésta resultó inmunogénica. Los ratones que ingirieron papas transgénicas (una sola dosis de 15 a 20 µg de rLTB) desarrollaron anticuerpos específicos de clase IgG en el suero y de clase IgA en las mucosas; los anticuerpos producidos contra LTB derivada de plantas de tabaco fueron capaces de neutralizar la actividad de LT. Estos resultados indicaron la posibilidad de usar componentes comestibles de plantas transgénicas como sistemas de expresión y aplicación de vacunas orales.

La selección del sistema vegetal para la administración de la vacuna comestible es importante ya que es necesario expresar la proteína inmunogénica en una planta que sea consumida en forma cruda para evitar la desnaturalización de la vacuna por cocimiento. Entre los actuales modelos experimentales se incluyen los tubérculos de las papas (sin embargo, dentro de la dieta humana la papa se incluye como alimento cocido).

Usando como vegetal comestible la papa, Mason y col. (1996) expresaron la proteína recombinante de la cápside del virus Norwalk (rNV) en tubérculos de esta planta.

La proteína resultó oralmente inmunogénica en ratones que consumieron los tubérculos transgénicos y desarrollaron anticuerpos IgG séricos específicos para rNV.

La demostración de la producción de LTB en plantas transgénicas, una molécula relacionada con CTB, abre el campo para la exploración de la expresión de esta subunidad en sistemas vegetales. Hein (1996) y colaboradores construyeron vectores binarios de expresión de *ctxA* y *ctxB* que transfirieron via *Agrobacterium* a plantas de tabaco. Estos investigadores encontraron que las plantas transgénicas con el gen *ctxB* contenían una proteína que migró en un sistema de electroforesis de SDS-PAGE en presencia de urea 8M en la misma posición que CTB monomérica derivada de *V. cholerae* y fue reconocida por un anticuerpo de ratón anti CTB. En ausencia de urea, los extractos de las plantas con el gen CTB mostraron evidencia de CTB pentamérica. Las plantas que expresaron las proteínas CTA o CTB no demostraron diferencias en el patrón de expresión de proteínas con las plantas silvestres, como se vió en geles de acrilamida SDS-PAGE teñidos con azul Coomassie.

Arakawa y col. (1998) crearon papas transgénicas que expresan CTB pentamérica con las cuales lograron la inmunización oral de ratones CD-1. Con el vector pPCV701FM4-CTB:SEKDEL (el cual posee el cassette de expresión *luxF*/CTB:SEKDEL) con los promotores bidireccionales P1 y P2 de la manopina sintasa (mas) flanqueados por los extremos derecho e izquierdo de la secuencia T-DNA (en la cual la señal de retención de retículo endoplásmico SEKDEL se fusionó al extremo 3' del gen *ctxB*). Después de la transformación de hojas de papa mediada por *Agrobacterium*, CTB se expresó tanto en el microtubérculo como en las hojas, por arriba del 0.003% de la proteína soluble total. Además los monómeros de la proteína quimérica se ensamblaron en pentámeros que exhibieron antigenicidad nativa, la cual se unió específicamente al gangliósido GM1 (lo que indicó que se retuvo la actividad biológica de CTB). Un gramo de microtubérculo de papa transgénica o tejido caloso de hoja produjo aproximadamente 30 µg de CTB pentamérica y la cantidad de CTB fue uniforme en los tejidos de papa transformados. Después de hervir los tubérculos hasta que el tejido se suavizara detectaron 50% de CTB en su forma pentamérica, capaz de unirse a GM1. Este material se utilizó para la inmunización de ratones durante 1 mes con 4 dosis semanales con un refuerzo final en el día 65. Los ratones inmunizados con 30 µg de CTB bacteriana o 3 g de tejido de papa transformada mostraron

títulos similares de IgA en la mucosa en el día 70 del tratamiento. Probaron la neutralización de la CT por el antisuero anti-CTB proveniente de ratones inmunizados con 3 g de papa transgénica en células Vero encontrando un título de neutralización de 1:8 (definido como la dilución de suero más alta que dió neutralización completa de la citotoxicidad por CT).

### **Evaluación de la expresión génica por ensayos de expresión transitoria**

Entre los métodos de transformación que permiten la introducción directa de DNA en plantas está la electroporación, que consiste en la descarga de pulsos eléctricos que permeabilizan reversiblemente las biomembranas (Fromm, 1985). En plantas los protoplastos aislados de hojas, callos o cultivos celulares en suspensión son utilizados para los experimentos de electroporación. Los protoplastos son idóneos para electroporación debido a la carencia de pared celular a pesar de que tienen una alta mortalidad por el tratamiento enzimático y el shock eléctrico (Saunders, 1995). La transferencia directa del DNA a protoplastos por electroporación constituye un eficiente y rápido sistema de monitoreo de la expresión génica que permite la evaluación de construcciones consistentes en el gen reportero o gen blanco con distintos promotores, potenciadores (enhancers) de la transcripción o traducción, intrones y señales de terminación y poliadenilación de diversas fuentes.

Se denomina gen reportero a aquel gen cuyo producto proteico es usado para estimar la funcionalidad de las regiones regulatorias y de terminación de genes en sistemas homólogos o heterólogos de las secuencias bajo estudio y que nos indican la complejidad de la regulación del gen donador de la secuencia. Entre los genes reporteros que se han utilizado en plantas, están la neomicina fosfotransferasa (NPTII), cloramfenicol acetil transferasa (CAT),  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) (Davey, 1989) y GFP (Chiu, 1996).

El gen *uidA* de *E. coli* K12, que codifica la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), ha sido ampliamente empleado como gen reportero en estudios de expresión en tejidos vegetales por ser una enzima muy estable, con niveles mínimos o nulos de actividad endógena en plantas superiores, además de que puede ser detectada pocas horas después del evento de transformación (Jefferson 1987).

La proteína verde fluorescente (GFP) proveniente de la medusa *Aequorea victoria*

es un eficaz reportero en estudios de la expresión transitoria y estable en plantas (Reichel, 1996; Chiu, 1996). GFP emite luz verde brillante ( $\lambda$  max 509 nm) cuando se excita con luz UV o azul ( $\lambda$  max= 395 nm, pico menor a 470 nm). El cromóforo en GFP es intrínseco a la estructura primaria de la proteína, y la fluorescencia de GFP no requiere sustrato ni cofactor (Niwa, 1996), razón por la cual se puede observar su expresión directa en células, tejido u organismo transformado con este gen reportero.

Una gran mayoría de los estudios realizados con la transformación directa de protoplastos se han realizado con un solo vector para expresar tanto el gen reportero como el gen blanco, sin embargo a veces no es posible localizar en el mismo plásmido a ambos genes por lo que la cotransformación de protoplastos es posible cuando se mezclan dos o más plásmidos durante la liberación del shock eléctrico. Schocher y col. (1986) mostraron que después de la transformación de protoplastos de tabaco con pABDI (que porta el gen NPTII) y pMS1 (con el gen de la zeína), 88% de las colonias celulares resistentes a kanamicina contenían secuencias de la clona genómica de zeína. En experimentos con pABD1 y pGV0422 (que porta el gen de la nopalina sintasa, nos), 47% de las colonias resistentes a kanamicina contenían el gen nos.

## JUSTIFICACIÓN

La construcción de vectores para la expresión de CTB en plantas permitiría transformar células vegetales que por regeneración originarían plantas adultas con uso potencial como "vacunas comestibles".

La zanahoria (*Daucus carota*) tiene características deseables como sistema de expresión de vacunas comestibles, por ser un vegetal incluido en la dieta humana y que no requiere ser cocido para su consumo. *D. carota* es además una planta modelo, en la que se han realizado varios estudios de regeneración y embriogénesis a partir de células individuales y de transformación mediada por infección con *Agrobacterium*.

Como la introducción de DNA a protoplastos vegetales mediante electroporación permite desarrollar sistemas de expresión transitoria para evaluar rápidamente la funcionalidad de construcciones génicas, la introducción de vectores de expresión de CTB a protoplastos de zanahoria mediante electroporación podría servir para evaluar la funcionalidad de dichas construcciones, antes de realizar la transformación estable con ellas y obtener zanahorias transgénicas.

## OBJETIVOS

### *General*

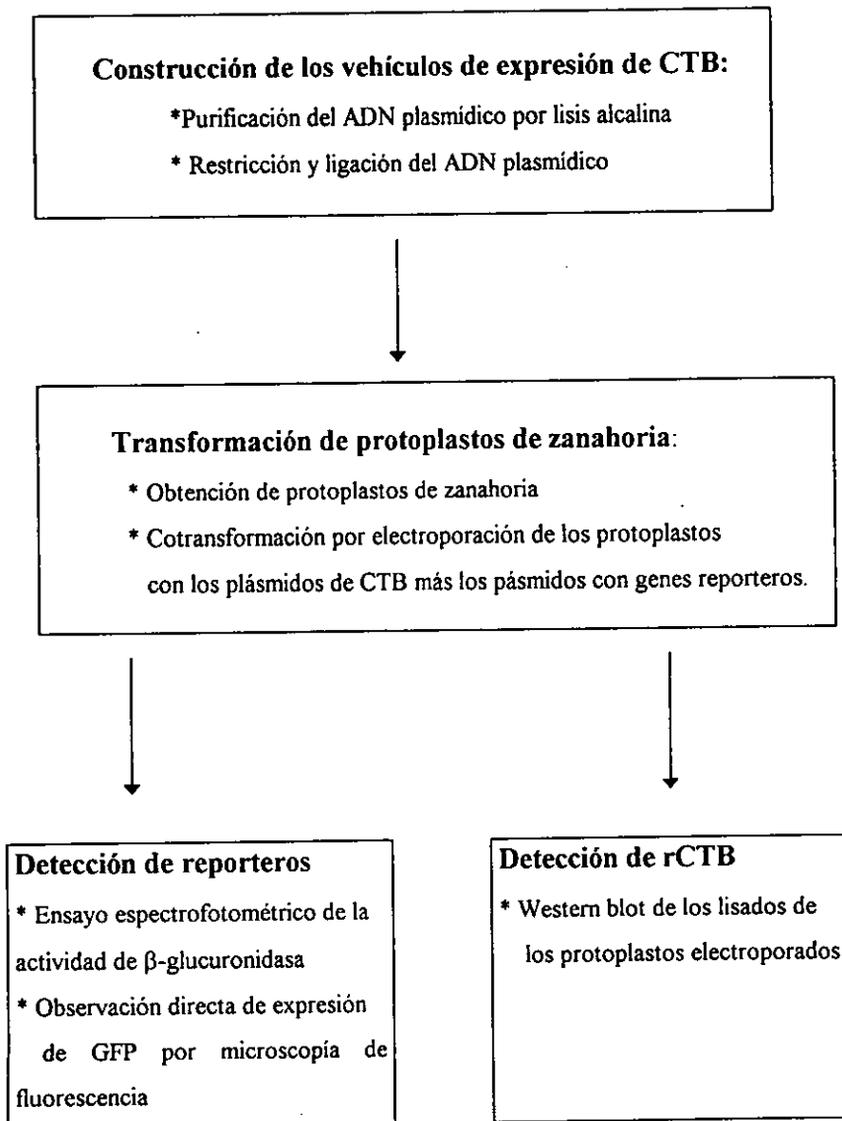
Construir vehículos de expresión de CTB y evaluar su funcionalidad en ensayos de expresión transitoria de genes reporteros y de CTB en protoplastos de zanahoria.

### *Particulares*

- Construir tres vehículos de expresión de CTB usando como base los vectores pUI235-5.1 y pUIEFI-5.1, que poseen respectivamente los promotores constitutivos en plantas el P235SCaMV y el PeEF-1 $\beta$  de *A. thaliana*.
- Cotransformar protoplastos de zanahoria mediante electroporación empleando simultáneamente los vectores de expresión de CTB (pUI235CTB1.2, pUI235CTB0.4 y pUIEFICTB0.3) con los plásmidos pBI426, pBI221 que portan el gen reportero que codifica la  $\beta$ -glucuronidasa y pBIN35S-mGFP4 que posee el gen reportero de la proteína verde fluorescente.
- Evaluar la eficiencia de la transformación por detección de la expresión de los reporteros  $\beta$ -glucuronidasa y GFP.
- Determinar mediante inmunodetección por Western blot, la expresión de rCTB en los protoplastos cotransformados con los genes reporteros.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia experimental general que se siguió fue la siguiente:



## I. Construcción de los vectores de expresión de CTB

Los plásmidos utilizados para la construcción y detección de los vehículos recombinantes y algunas de sus características se mencionan en la Tabla 1.

Tabla 1. Plásmidos utilizados para la construcción y detección de los vehículos recombinantes.

Plásmidos	Características relevantes
pJS18 (5.0 kb)	pkk223V con el gen quimérico de <i>ctxB</i> como inserto <i>EcoR</i> <i>VHind</i> III de 0.42 kb (incluye secuencia codificante de péptido líder de LTB y secuencia codificante de CTxB madura). Usado para expresar <i>ctxb</i> en <i>Escherichia coli</i> y <i>Vibrio cholerae</i> .
pAI004 (3.9 kb)	pUC18 con <i>ctxb</i> quimérico como inserto <i>EcoR</i> <i>VHind</i> III de 1.1 kb (que además de la secuencia codificante del péptido líder de LTB y secuencia codificante de CTB madura, incluye la región 3' no traducida del gen <i>ctxB</i> ).
pUI235-5.1 (9.5 kb)	Vector binario que posee los extremos flanqueantes del T-DNA del plásmido Ti y el gen de selección <i>nptII</i> . Es utilizado para la expresión en plantas por transformación mediada por <i>A. tumefaciens</i> . Tiene como base al vector pGV1511 con el promotor doble 35 S del CaMV (P235SCaMV), que tiene multisitios de restricción únicos.
pUIEFI-5.1 (9.3 kb)	Vector para la expresión en plantas con características similares posee el promotor del gen <i>eEF-1β</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (PeEF-1βAt), el primer intrón y dos exones de <i>eEF-1β</i> .
pBI426 (6.3 kb)	PUC18 con el promotor P235SCaMV y el potenciador $\Omega$ del virus del mosaico del tabaco gen bifuncional <i>uidA-nptII</i> que está bajo el control del promotor doble CaMV35S.
pBI221.1 (5.6 kb)	pUC19 con el inserto <i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI P35SCaMV- <i>uidA-NOS</i> en la región lac Z. Expresa el reportero $\beta$ -glucuronidasa.
pBIN35S-mGFP4	pBIN19 con la secuencia codificante para el gen reportero <i>gfp</i> delimitada por <i>Bam</i> HI y <i>Sac</i> I y con el promotor P235SCaMV.
pZero (3.3 kb)	Promotor Plac, gen fusionado lacZ $\alpha$ -ccdb. Vector para la clonación de genes por selección directa de transformantes, vía ruptura del gen letal ccdB

La secuencia del gen *ctxB* nativo predice una proteína de 124 aminoácidos con una masa molecular de 11.67 kDa que incluye un péptido señal de 21 residuos.

El plásmido pA1004 posee el gen *ctxB* quimérico que posee la región 3' no traducida (aproximadamente 800 pb) del gen *ctxB* (proveniente de la cepa Ogawa clásica 0395 de *V. cholerae*) que tiene importancia para la expresión de *ctxB* en *V. cholerae*. El plásmido pJS18 posee el gen quimérico *ctxB* sin esta región 3' y el gen se colocó bajo el control del promotor tac. Sánchez y col. (1990) crearon este gen quimérico de *ctxB* por inserción de la secuencia codificante del péptido líder de LTB de *E. coli* enteropatógena en sustitución del péptido líder original en CTxB, en el que la secuencia codificante de la proteína madura CTxB está fusionada (por su extremo 5' *Nde* I) al extremo 3' *Sac* I de la secuencia codificante del péptido líder de LTB (mediante un linker de seis deoxinucleótidos sintéticos) y se ha retirado la región 3' no traducida para dejar solamente la secuencia codificante de la proteína CTB madura que consta de 103 aminoácidos.

*ctxB1.1* y *ctxB0.4* son las secuencias de 1.1 y 0.42 kb que contienen el gen *ctxB* delimitados por sitios *Eco*RI y *Hind*III que fueron aislados de geles de agarosa preparativos. El primero es un fragmento derivado de pA1004 y el segundo es un fragmento de 0.42 kb proveniente de pJS18 (Tabla 1) ambos plásmidos fueron proporcionados por el Dr. Joaquín Sánchez (Depto. de Biología Molecular del CIEIP del INSP, SSA, Cuernavaca, Mor.).

Para lograr la clonación de los insertos *CTB1.1* y *CTB0.4* en los vectores pUI235-5.1 y pUIEFI-5.1 que contienen respectivamente, los promotores doble 35S (P235S) y el promotor eEF $\beta$  de *A. thaliana* (PeF $\beta$ At) (Kay y col. 1987 y Gidekel y col. 1996) constitutivos en plantas, se siguieron los protocolos de restricción y ligación como lo recomiendan los folletos que comercializan las enzimas de restricción y ligación.

Se utilizó *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  como cepa receptora para la transformación con los plásmidos recombinantes construidos en este trabajo.

### 1.1 Aislamiento y purificación del ADN plasmídico

Todos los plásmidos utilizados en este trabajo se aislaron por el método de lisis alcalina como se describe en el manual de Sambrook y col. (1989).

Para construir los plásmidos recombinantes se utilizaron preparaciones de ADN

plasmídico a pequeña escala (minipreps) obtenidas de la siguiente forma: la cepa bacteriana con el plásmido de interés se sembró en estrias sobre cajas Petri con medio LB sólido con adición del antibiótico correspondiente (para mantener el plásmido y seleccionar transformantes). Las placas fueron incubadas durante 16-18 h a 37°C, se inoculó una de las colonias aisladas en 3 ml de caldo LB con antibiótico en tubos de ensayo de 15 ml. Después de su incubación a 37°C con agitación constante de 200 rpm durante 14 h, el cultivo se centrifugó en tubos Eppendorf (o de microcentrifuga) estériles a 15000 rpm durante 1 min. Se decantó el sobrenadante y se secaron los tubos por colocarlos boca abajo sobre papel absorbente, posterior a lo cual la pastilla obtenida sin ningún residuo de medio de cultivo, fue resuspendida en 150 µl de solución I (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y Tris-Cl 25 mM, pH 8.0); posteriormente se añadieron 300 µl de solución II (NaOH 0.2 N y SDS 1%) preparada al momento de su uso, la mezcla se agitó por inversión del tubo varias veces y se incubó en hielo por 5 min. Se agregaron 225 µl de solución III (Acetato de potasio 5 M, ajustado a pH 4.8 con ácido acético glacial) preenfriada y después de mezclar por inversión varias veces y mantener en hielo durante 15 min se centrifugó a 15000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue centrifugado a 15000 rpm por 5 min después de haber sido transferido a un tubo nuevo de microcentrifuga al que se le agregó 1 volumen de isopropanol frío que se mantuvo a -20°C por 30 min. Para purificar el ADN plasmídico la pastilla fue resuspendida en 200 µl de agua estéril con 1.5 µl de RNAsa (20 µg/ml) sin actividad de DNAsa (eliminada por ebullición durante 10 min) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Se agregaron 250 µl de fenol, se mezcló por inversión, se añadieron 250 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se agitó hasta obtener una mezcla homogénea que se centrifugó a 15000 rpm durante 1 min. La fase acuosa se recuperó en un tubo nuevo de microcentrifuga y se repitió el lavado con fenol y luego con cloroformo-alcohol isoamílico. Para asegurarnos de eliminar residuos de fenol, se agregaron 250 µl de cloroformo a la fase acuosa, se agitó y centrifugó a 1500 rpm durante 1 min. Se mezcló la fase acuosa con dos volúmenes de etanol absoluto y un décimo de volumen de solución III preenfriados a -20°C y se centrifugó a 15000 rpm por 15 min. Después de desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 500 µl de etanol al 70%, se centrifugó nuevamente a 15000 rpm por 15 min. La pastilla se secó (por inversión de los tubos sobre papel

absorbente y eliminación total del alcohol por evaporación) y finalmente se resuspendió en 50 µl de agua estéril.

Los plásmidos construidos también se aislaron de la forma anterior, sólo que en mayor escala (partimos de cultivos de *E. coli* transformados con los vectores construidos, en 50 ml de LB. El ADN plasmídico fue purificado por eluir el sobrenadante de la lisis alcalina en columnas QUIAGEN (Palo Alto California) siguiendo el protocolo recomendado por la compañía fabricante.

## I.2 Manipulación del ADN in vitro

Todas las digestiones con endonucleasas de restricción y ligación del ADN se realizaron de acuerdo a las condiciones recomendadas por el distribuidor (Boehringer, Mannheim, Alemania).

### *Restricción del ADN*

Se realizó en volúmenes de reacción de 20 µl consistentes en 2 µl del amortiguador (10x) correspondiente a la enzima de restricción apropiada para los sitios únicos presentes en los vectores de clonación, de la cual se utilizaron de 1 a 2 unidades y 0.2 a 1 µg del ADN sustrato en solución acuosa y se realizaron las incubaciones por lo menos 1 h a 37°C.

La concentración del ADN fue determinada por tinción con bromuro de etidio en geles de agarosa y comparando la intensidad de la banda con la de los marcadores de peso molecular de concentración conocida (200-250 ng por banda).

Los fragmentos de restricción obtenidos fueron separados por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X. Se aplicó en cada pozo el ADN plasmídico restringido con amortiguador para corrimiento de muestras que contenía el colorante azul de bromofenol. La electroforesis se realizó a 80 V durante 1 h.

### *Purificación de los fragmentos de restricción*

Para la purificación de las bandas correspondientes al gen *ctxB* de 0.4 y 1.1 kb se siguió el método de fractura del gel con fenol: se cortaron del gel de agarosa los fragmentos de interés y se transfirieron a tubos de microcentrifuga. Se añadió un volumen igual de fenol.

Los tubos fueron congelados sumergiéndolos en nitrógeno líquido durante 10 seg, posteriormente se centrifugaron a 12 000 rpm durante 15 min. El sobrenadante (con el ADN plasmídico) se transfirió a tubos nuevos estériles.

#### *Ligación del ADN*

Las reacciones de ligación fueron efectuadas en 20 µl de amortiguador de ligación (Tris-HCl 66 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ditioeritritol 1 mM y ATP 1 mM , pH 7.5) con una unidad de ligasa T4 (Boehringer) y concentraciones de ADN variables, de 100 a 500 ng por reacción y empleando una proporción de ADN de vector/inserto de 1:10. Incubamos la mezcla de reacción a temperatura ambiente si se trataba de ADN con extremos cohesivos ó a 4°C si los extremos eran parejos.

#### I.3 Transformación de células electrocompetentes de *E. coli* DH5α

Utilizamos la electroporación para introducir los productos de ligación. Se utilizó el equipo "Cell Porator Pulse control + Power suply" y "Cell Porator Voltage Booster" (BRL, Life Technologies) y celdas desechables con electrodos separados por 0.2 cm.

#### *Preparación de células electrocompetentes*

La cepa DH5α fue sembrada por estrías en cajas con agar LB y se incubó a 37°C durante 16 h. Una colonia aislada se cultivó en 3 ml de SOB líquido a 37°C con agitación de 270 rpm durante 12 h. Posteriormente se inoculó 1 ml de este cultivo en 300 ml de SOB que se mantuvieron bajo las mismas condiciones de cultivo hasta llegar a la fase exponencial de crecimiento (DO<sub>600</sub> de 0.5 a 1.0); el cultivo se enfrió por inmersión en hielo por 15 min y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min a 4°C después de transferirse a tubos de centrifuga estériles preenfriados de 50 ml. La pastilla se resuspendió en agua fría estéril y nuevamente se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min a 4°C; este paso de lavado se repitió otra vez. Cada pastilla fue resuspendida en 10 ml de glicerol frío al 10% y se centrifugó igual. Cada pastilla se resuspendió en 2 ml de glicerol frío al 10% y se distribuyó en alícuotas de 50 y 80 µl que se almacenaron a -70°C hasta el momento de su utilización.

### *Electroporación*

Se mezclaron 20  $\mu$ l de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  con 2  $\mu$ l del ADN de los productos de ligación en una celda estéril desechable para electroporación. Preincubamos la mezcla por 30 seg. en hielo y se aplicó un pulso de 1.5 kV, 200 Ohms y 4  $\mu$ F. Inmediatamente transferimos las mezclas electroporadas a tubos de microcentrifuga con 1 ml de medio LB que se incubaron durante 1 h a 37°C con agitación a 200 rpm; concentramos el cultivo centrifugando a 15000 rpm por 1 min, sembramos por espatulado en cajas de Petri con medio LB y ampicilina (100  $\mu$ g/ml) para seleccionar colonias transformantes (colonias que adquirieron el plásmido recombinante que porta genes que codifican para la resistencia a ciertos antibióticos). Posterior a lo cual se purificó el ADN plasmídico con el método ya descrito.

## **II. Obtención y transformación de protoplastos de zanahoria**

### **II.1 Aislamiento de los protoplastos**

Para la obtención de protoplastos se utilizó la línea celular "S" obtenida por Nava (1995), a partir de hipocotilo de plántulas de *Daucus carota* L. var Nantes del lote 210-0802 (Distribuidora de Semillas Master de México). Esta línea fue proporcionada por la Dra. Ana C. Ramos del laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Bioingeniería y Biotecnología del CINVESTAV Zacatenco.

El mantenimiento de la línea celular se realizó mediante subcultivos efectuados cada 15 días en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio Ms modificado pH 5.8 (Monier 1990), con 2,4D 0.45  $\mu$ M y cinetina 0.976  $\mu$ M, a una concentración de inóculo de 20 % v/v; a 25°C con agitación continua de 85 rpm en una agitadora orbital (New Brunswick Scientific modelo G-53).

Para el aislamiento de protoplastos fueron utilizadas suspensiones celulares de 3 días de subcultivo. Se separaron las células del medio de cultivo por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min. El paquete celular se sometió a tratamiento enzimático en 40 ml de una solución de manitol 0.7 M con una mezcla de pectinasa (de *Rhizopus sp*, SIGMA) al 1%,

celulasa (*Trichoderma viride*, SIGMA) al 2 %, en MES 3 mM y CaCl<sub>2</sub> 4 mM durante 18 a 24 h, a temperatura ambiente y con agitación de 40 rpm.

La purificación de los protoplastos resultantes se realizó mediante sedimentación o flotación como sigue:

Sedimentación. La solución enzimática con los protoplastos se filtró a través de una tela de poliéster (poro de 100 µm de diámetro), para eliminar los cúmulos celulares no digeridos; después de precipitar los protoplastos por centrifugación a 800 rpm por 5 min para descartar la solución enzimática; los protoplastos fueron resuspendidos en 25 ml de una solución de manitol 0.7 M, CaCl<sub>2</sub> 4 mM; este procedimiento de lavado se repitió una vez más.

Flotación. Se centrifugaron los protoplastos a 800 rpm por 5 min para separarlos de la solución enzimática, y fueron resuspendidos en 40 ml de sacarosa al 20%, posteriormente se centrifugó a 1500 rpm durante 30 min se formó una fase de protoplastos flotantes que se recuperaron en un tubo Falcon de 50 ml estéril.

## II.2 Electroporación de protoplastos de zanahoria

La concentración de los protoplastos se determinó en un hematímetro y se ajustó a  $2 \times 10^6$  protoplastos/ml en solución de electroporación (HEPES 10 mM, manitol 0.7 M, CaCl<sub>2</sub> 4 mM y KCl 150 mM), mantenida a 4°C.

Las mezclas para electroporar contenían 0.5 ml de la suspensión de protoplastos, 5 µl (5 µg) de uno de los vectores reporteros (pBI426 o p35Sgfp) y 5 µl (10 µg) de uno de los vectores de expresión de CTB (pUI235CTB0.42, pUI235CTB1.2, pUIEFICTB0.38). Las mezclas se transfirieron a cubetas (BRL GIBCO) de electroporación (0.4 cm de separación entre los electrodos) que fueron mantenidas en hielo durante 5 min antes y después de la electroporación. Se aplicaron pulsos eléctricos de 675 V/cm-800 µF, o 750V/cm, 330 µF, o 1 kV/cm-330µF a través del capacitor Cell-Porator (BRL, Life technologies, Inc.) y cultivamos los protoplastos electroporados en 2 ml de MS, glucosa 0.4 M., en oscuridad a 25°C.

A las 24 h de la electroporación se estimó la viabilidad de los protoplastos transformados mediante tinción con diacetato de fluoresceína (FDA) 0.5 mg/ml (Widholm, 1972) o con azul de Evans al 0.5%. Se mezcló una gota de solución de tinción con una

gota de la suspensión de protoplastos en un portaobjetos de vidrio, después de colocar el cubreobjetos, a los 5 min se observó la fluorescencia en un microscopio Olympus (modelo BHS) equipado con lámpara de mercurio utilizando el filtro excitatorio EY-455 (luz azul) y filtro barrera 0-515 para detectar la luz amarillo-verdosa emitida por la fluoresceína. Las observaciones se realizaron en varios campos y se reportó la viabilidad como el porcentaje de células fluorescentes sobre el total de células observadas.

A las 24 hrs de la cotransformación se realizaron los ensayos de actividad de  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) en los lisados de los protoplastos y de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) por la observación en microscopía de fluorescencia de protoplastos intactos co-electroporados con el plásmido pBIN35S-mGFP4.

#### *Lisis de protoplastos y extracción de proteínas*

Veinticuatro horas después de la electroporación los protoplastos cotransformados fueron colectados y centrifugados en tubos Eppendorf a 6000 rpm por 5 seg; para lisarlos fueron resuspendidos en 50 a 400  $\mu$ l de solución de lisis o sol. I ( $\text{NaPO}_4$  50 mM pH 7.0, NaCl 0.1 M, EDTA 0.1 mM, Tritón X-100 al 0.2% y  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM) y sonicados con 2 pulsos de 15 segundos a 4°C y centrifugados a 15000 rpm durante 2 min para separar los restos celulares del lisado celular. Los extractos fueron congelados y almacenados a -70°C hasta el momento de la determinación de la actividad del gen reportero.

#### *Determinación de concentración de proteínas*

Se realizó por el método de unión de colorante (Bradford, 1976) por un ensayo espectrofotométrico. Se colocaron en pozos de placas ELISA 40  $\mu$ l de una dilución 1:4 o 1:8 de los lisados de los protoplastos en amortiguador PBS; se añadieron 160  $\mu$ l de reactivo de Bradford. Las placas se mantuvieron por 10 min a temperatura ambiente y se determinó la concentración de proteína por colorimetría con un lector de ELISA usando una longitud de onda de 620 nm y se interpoló en una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA).

### II.3 Ensayo de $\beta$ -glucuronidasa

Se realizaron ensayos espectrofotométricos de la actividad de glucuronidasa a las 24 h de la electroporación en mezclas de 1 ml que incluyeron 950  $\mu$ l de sol. de reacción (p-nitrofenol  $\beta$ -D-glucurónido 1mM, fosfato de sodio 50 mM pH 7.0,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, Triton X-100 al 0.2%) con 50  $\mu$ l del lisado de proteínas (18 a 43  $\mu$ g de proteína total). Las reacciones ocurrieron a 37°C y fueron bloqueadas por la adición de 0.4 ml de 2-amino-2-metilpropanodiol 2.5 M. La actividad enzimática fue medida en función de la absorbancia a 415 nm del p-nitrofenol liberado (Jefferson, 1986) que se registró en el lector de ELISA.

### II.4 Expresión de GFP

Se extrajo, con una pipeta Pasteur, una muestra de los cultivos de 24 h de los protoplastos cotransformados con pBIN35S-mGFP4 y se colocó en un portaobjetos para ser observada en el microscopio de campo claro y de fluorescencia. Se empleó un microscopio Olympus equipado con los filtros excitatorio EY-455 (luz azul) y protector 0-515 para registrar la emisión de luz verde brillante ( $\lambda=509$  nm) de la proteína reportera. Se tomaron microfotografías de células fluorescentes con la película Fujichrome (ISO 400) con un tiempo promedio de exposición de 3 min. Se evaluó la expresión de GFP como porcentaje de células fluorescentes sobre el total de células observadas en diferentes campos vistos en microscopía de fluorescencia.

## **III. Electroforesis de las proteínas de los lisados de zanahoria e inmunoblot**

### III.1 Lisis de protoplastos

Veinticuatro horas después de la electroporación, los protoplastos fueron sedimentados por centrifugación a 6000 rpm por 5 seg, se resuspendieron en 127.5  $\mu$ l de regulador de muestra (RM) 1x (SDS 2%, azul de bromofenol 0.2%, glicerol 10%, Tris-Cl 50 mM pH 6.8, con o sin  $\beta$ -mercaptoetanol) y se calentaron a 100°C durante 3 min.

### III.2 Electroforesis

Se separaron las proteínas de los lisados de los protoplastos por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. Se aplicaron 17  $\mu$ l de los lisados de los protoplastos (contenido aproximado de 70  $\mu$ g de proteína total) en RM (regulador de muestra) 1x, en los carriles de un minigel de SDS-poliacrilamida (gel concentrador al 5% y gel separador al 15%) en el cual se efectuó la electroforesis a 120 V durante 2 h. Como control positivo se separaron 850 ng de toxina de *Vibrio cholerae* auténtica (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

### III.3 Electrotransferencia

El gel fue electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa durapore SIGMA en papel filtro Whatman 3MM en amortiguador de transferencia (Tris, glicina, SDS y metanol) a 200 mA durante 30 min en una cámara semiseca.

### III.4 Detección inmunológica de CTB (Western Blot)

Para anular los sitios potenciales de unión inespecífica con proteínas irrelevantes; la membrana electrotransferida fue incubada con un coctel de bloqueadores (leche Svelty descremada al 5%, albúmina bovina fracción V al 1% y glicina 100 mM en PBS-Tritón al 1%) durante una hora; después de desechar la solución bloqueadora, la membrana fue lavada 3 veces con PBS-Tritón al 1% e incubada durante 20 h con el anticuerpo primario antiCTB CG8 diluido 1:4000 en el coctel de bloqueadores en agitación suave constante a 4°C. Se lavó la membrana 3 veces con PBS-Tritón al 1% y se incubó con el segundo anticuerpo (anticuerpo anti-Ig de ratón acoplada a peroxidasa de rábano Zymed, 1:4000 en coctel de bloqueadores) a temperatura ambiente durante una hora. La membrana fue lavada con PBS-Tritón al 1% y para su revelado se mantuvo en una mezcla de Luminol durante 1 min. Posteriormente la membrana se expuso durante 10 min en una placa para rayos X X-Omat. Para el revelado de la placa fotográfica, ésta se sumergió en solución de revelado durante 2 min. Se enjuagó abundantemente con agua, se colocó en solución fijadora por varios segundos y luego de enjuagar se dejó secar la película a temperatura ambiente.

## RESULTADOS

### I. Construcción de los vectores de expresión de CTB

#### Clonación de *ctxB* con el promotor doble 35S

Los plásmidos pA1004 y pJS18 fueron restringidos con *Eco* RI y *Hind* III para liberar los insertos *ctxB1.1* y *ctxB0.4*, respectivamente. El inserto *ctxB1.1* que posee la región 3' no traducida del gen *ctxB*, fue ligado en los sitios *Eco*RI y *Hind*III de pUI235-5.1. El plásmido recombinante resultante se denominó pUI235CTB1.1 (Fig.1 y Fig.5). Por otra parte el inserto *ctxB0.4* también se clonó en los mismos sitios en pUI235-5.1 originando al plásmido pUI235CTB0.4 (Fig. 2). En estas construcciones la expresión del gen *ctxB* fue colocado bajo el control del promotor y enhancer doble 35S de CaMV (promotor 35S con una duplicación de los nucleótidos -343 a-90), que amplifica la actividad transcripcional del promotor hasta 10 veces (Kay, 1987).

#### Clonación de *ctxB* con el promotor de eEF-1 $\beta$

Con el fin de clonar sólo la secuencia codificante de CTB en pUIEFI-5.1, fue necesario restringir al plásmido pJS18 con *Sac* I para obtener un fragmento de 333 pb que contiene al gen *ctxB* separado de la secuencia codificante del péptido líder de LTB, ya que éste posee un triplete de terminación de la traducción antes del codón de inicio (Sánchez y Holmgren, 1989) y por lo cual sería imposible el diseño de fusiones traduccionales utilizando el fragmento *Eco*R I/*Hind* III. Este fragmento denominado *ctxB0.33* fue subclonado en el sitio *Sac* I de pZERO 2.1 (Fig. 3), con la finalidad de añadirle en el extremo 5' el sitio *Hind*III y en el extremo 3' el sitio *Eco*R I (los cuales permitirían la clonación en fase de *ctxB0.33* en el gen *eEF-1b* del plásmido pUIEFI-5.1). Debido a que el fragmento *Sac* I/*Sac* I liberado podía insertarse en pZERO en dos orientaciones, seleccionamos la construcción correcta con base en la longitud de los fragmentos resultantes de la digestión de los vectores recombinantes con *Sma* I y *Spe* I. El sitio *Sma* I está ubicado a 5 pb del inicio de *ctxB0.33* y mantiene una distancia de 340 nucleótidos con el sitio *Spe* I de pZERO2.1 si la orientación es correcta.

El plásmido recombinante con la inserción de *ctxB0.33* en antisentido liberó un fragmento *Sma I/Spe I* de 17 pb mientras que **pZEROCTB0.3**, que tiene la orientación adecuada, liberó un fragmento *Sma I/Spe I* de 340 pb.

El fragmento *Hind III/EcoR I* de **pZEROCTB0.3** de 382 pb se adaptó en el vector de expresión en plantas **pUIEFI-5.1** en los mismos sitios y finalmente se obtuvo el plásmido **pUIEFICTB0.33** (Fig. 4 y Fig. 6), en el cual se hizo una fusión traduccional, ya que el gen *ctxB* se fusionó al segundo exón de *eEF-1 $\beta$*  por lo que *ctxB0.3* está bajo el control del promotor **PeEF-1 $\beta$ At**. La secuencia reguladora incluye el primer intrón del gen de *eEF-1 $\beta$*  que posee un elemento con propiedades de enhancer que es importante para lograr altos niveles de expresión (Gidekel, 1996) que parece actúa como un enhancer traduccional (muchos vectores de expresión en eucariontes incorporan un intrón, debido a que el procesamiento del ARNm incrementa la eficiencia de salida del ARNm del núcleo para su traducción en este último compartimento; Watson, 1992).

#### Clonación de *ctxB* en pBSISK:

El fragmento *EcoR I/Hind III* de 1.1 kb de *CTB* se insertó en los mismos sitios en **pBSISK**. El plásmido resultante **pBSCTB1.1** (Fig. 5) fue utilizado como control negativo de expresión de *ctxB* por no poseer un promotor específico de plantas que permita su expresión en ellas.

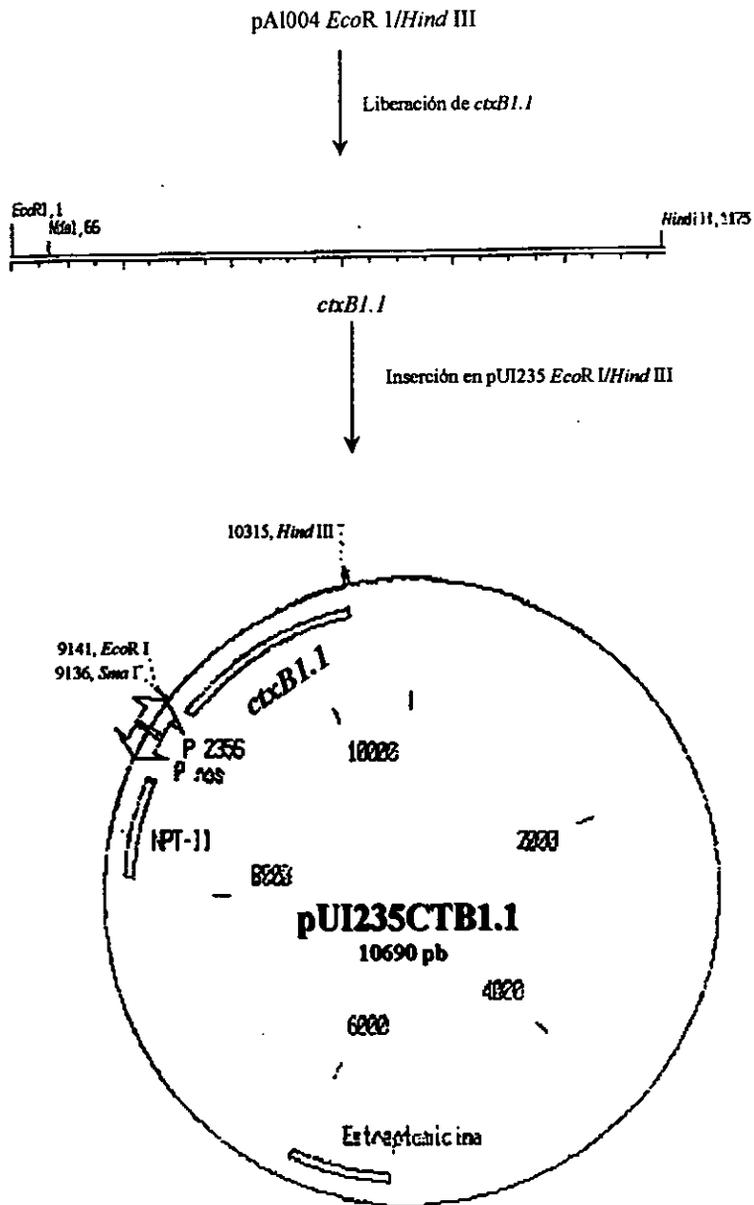


Fig. 1. Clonación de *ctxB1.1* en los sitios *EcoR* I y *Hind* III de pUI235-5.1.

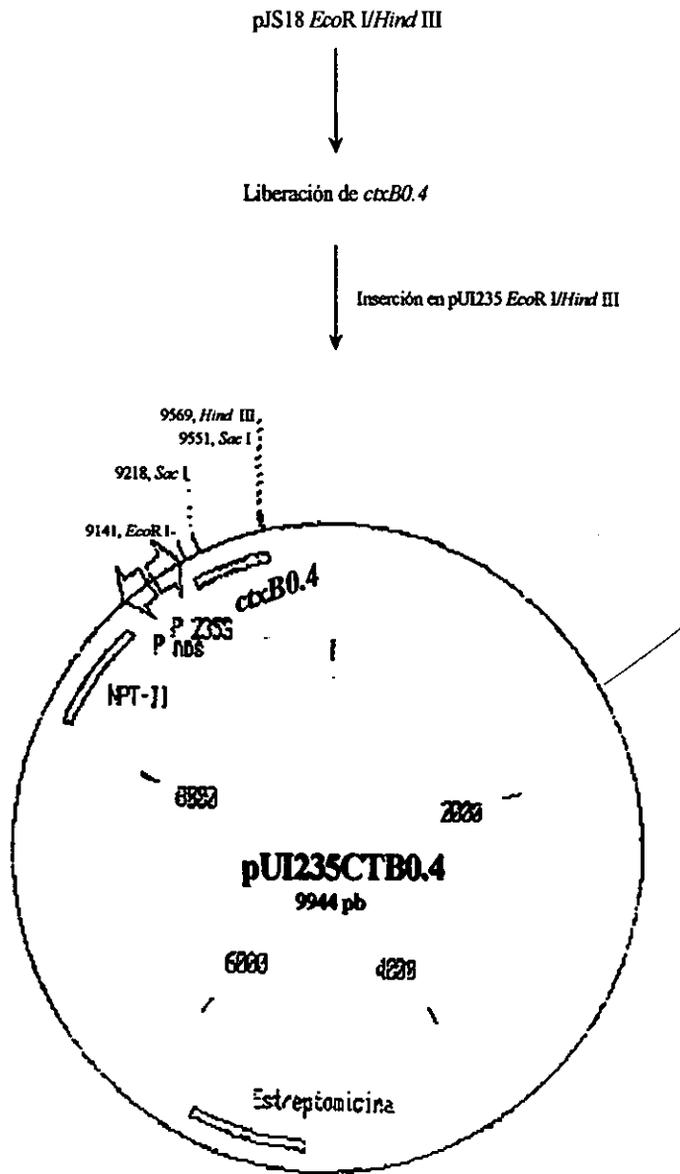


Fig. 2. Clonación de *ctxB0.4* en los sitios *EcoR* I y *Hind* III de pUI235-5.1

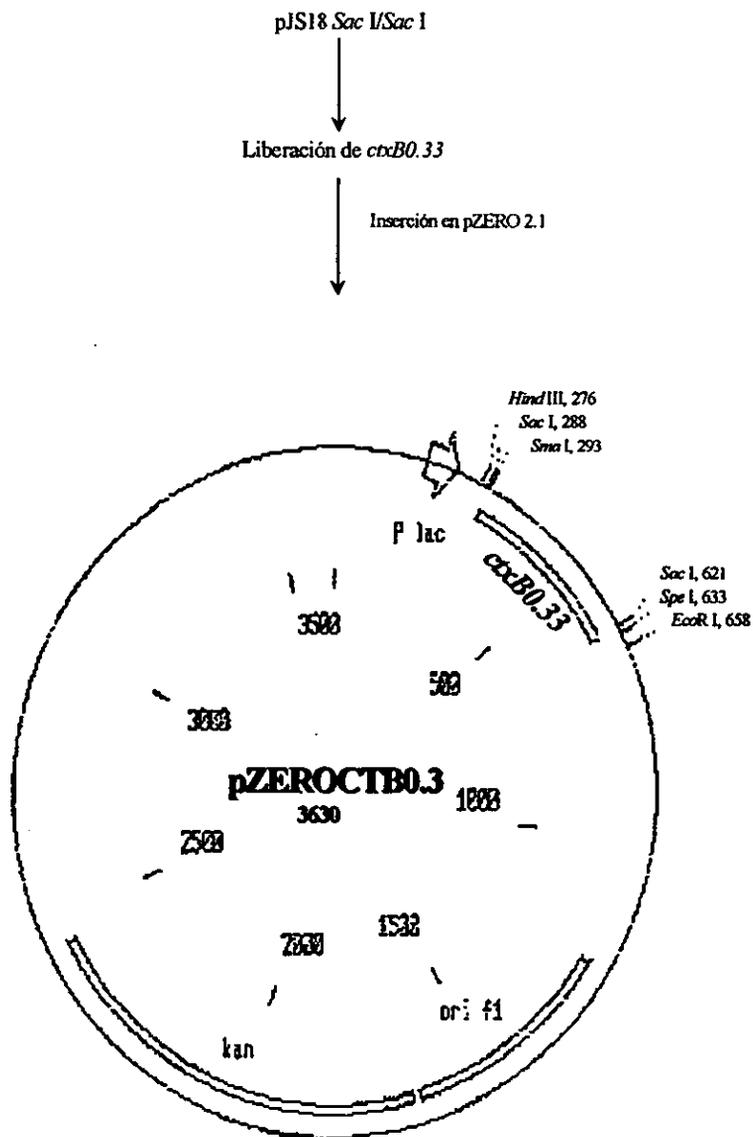


Fig. 3. Clonación de *ctxB0.33* en pZERO 2.1

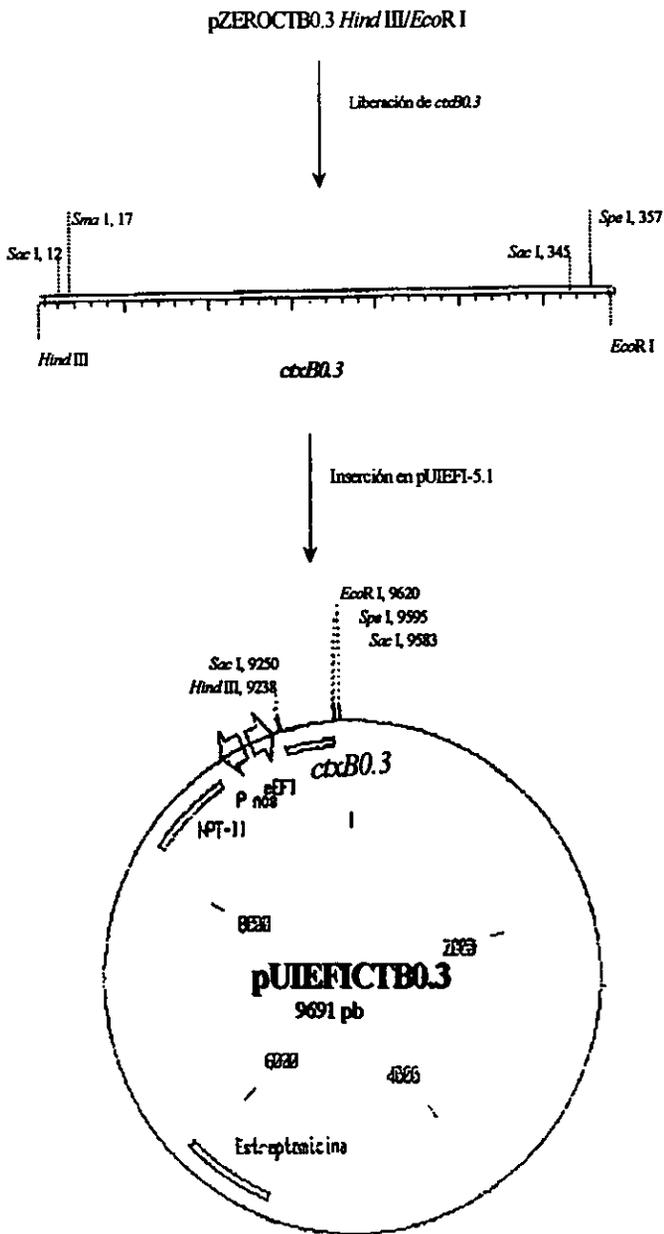
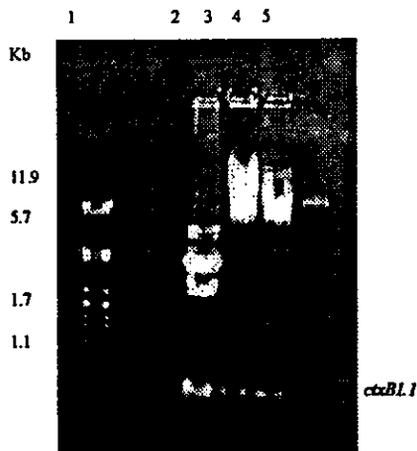
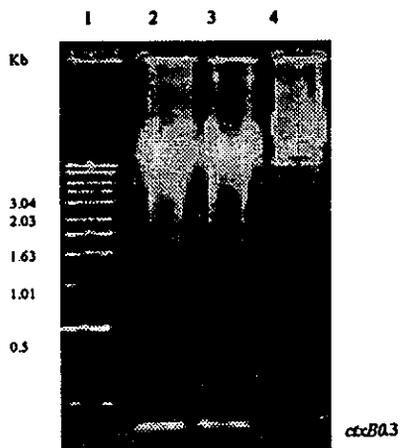


Fig. 4. Clonación de *ctxB0.3* en pUIEFI-5.1



**Fig. 5. Electroforesis de pUI23SCTB1.1 y pBSCTB. 1. 1.**  
 1) *Pst* I; 2) pBSCTB1.1 *Eco* RI/*Hind*II; 3) pUI23SCTB1.1 *Eco* RI/*Hind*III,  
 4) pUI235AMVCTB1.1 *Eco* RI/*Hind*III; 5) pUI235AMVCTB1.1.



**Fig. 6. Electroforesis en agarosa al 1% de pUIEFICTB0.3.**  
 1) DNA ladder 1 kb; 2) pUIEFICTB0.3 *Sma* I; 3) pUIEFICTB0.3 *Hind* III/*Eco* RI  
 4) pUIEFICTB0.3

Tabla 2. Registro de los ensayos de purificación y electroporación de protoplastos de *D. carota*

Método de purificación de protoplastos	Protoplast/ml	Electroporación	Proteínas (ug/ml) de 10 <sup>6</sup> protoplast	Actividad GUS (incremento en la D.O. de p-nitrofenol)	GFP	Viabilidad	Observaciones
Sedimentación sin tamizaje	200x 10 <sup>6</sup>	675 V/cm, 800 uF	260.43	Interferencia por restos celulares. Ensayo con 21.7 ug proteína total. *pBI426	Fluorescencia en protoplastos aislados y subcultivos celulares.	Determinación no cuantitativa. Azul de Evans al 0.5%	Protoplastos obtenidos por sedimentación sin tamizaje. Obtención de # alto de protoplastos debido a que recuperamos celi por sedimentación (glucosa 0.4M). Purificación no óptima (restos celulares y cúmulos celi. sin digerir). No sonificación. Ensayos de proteínas y GUS en restos celi (factor de error que quizás influyó en lecturas).
Sedimentación con tamizaje	27.3x10 <sup>6</sup>	675 V/cm, 800 uF	179.64	No se observó incremento en la D.O. de p-nitrofenol. Ensayo con 17.96 ug *pBI426	Fluorescencia en 44.6% protoplastos	55.0	Protoplastos obtenidos por sedimentación y tamizaje (menor cantidad de agregados celulares). Sonificación; lisados mantenidos a -70 durante 1 semana, después ensayos de proteínas y GUS, probable acción de proteasas (diminución concentración?) sin inhibidor de proteasas
Sedimentación con tamizaje	20x10 <sup>6</sup>	750 V/cm, 330 uF	210.6	No se observó incremento en la D.O. de p-nitrofenol. Ensayo con 43.16 ug *pBI426 y *pBI221	Fluorescencia en protoplastos (no se evaluó % de expresión) No ensayada	49.0	Extracción por sonificación, determinación de proteínas y ensayo GUS a las 24 h de electroporación
Flotación en sacarosa al 20%	30 x10 <sup>6</sup>	1 kV/cm, 330 uF	167.6	Ensayo con 20.9 ug prot total *pBI426 y *pBI221		47.5	Protoplastos obtenidos por flotación en sacarosa (protoplastos separados de agregados celulares). Extracción por sonificación, determinación de proteínas y ensayo GUS a las 24 h de electroporación. se incluyó inhibidor de proteasas.

D.O.= densidad óptica  
\*plásmido(s) utilizados para la expresión de GUS

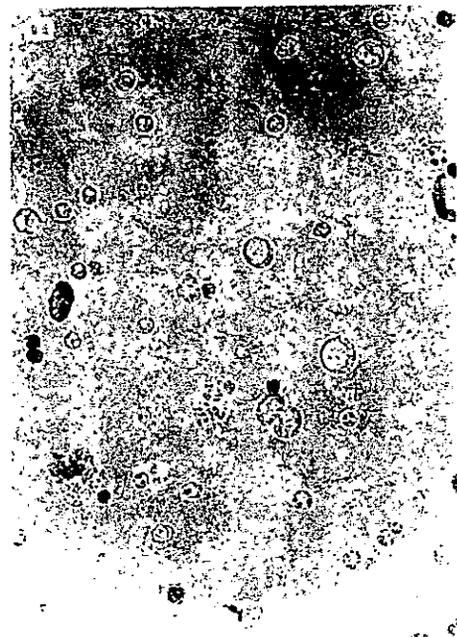
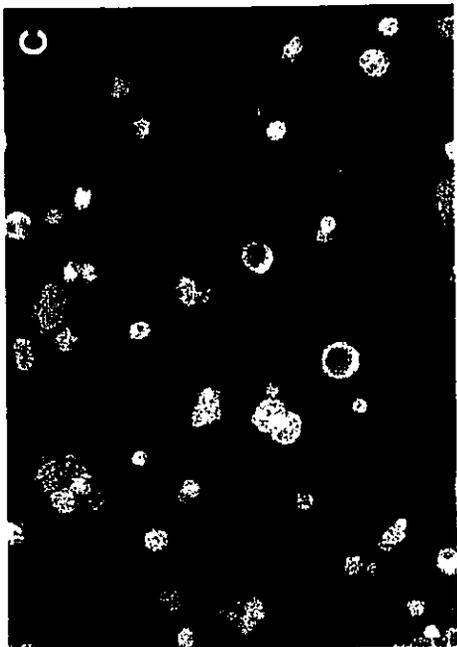


Fig.7. Determinación de la viabilidad de *D. Carota*. (A) Tinción con FDA de células cultivadas en suspensión. (B) Exclusión de azul de Evans, (C) tinción con FDA de protoplastos antes de la transformación

## II. Obtención y transformación de protoplastos de zanahoria

Se utilizó como estrategia de cotransformación la electroporación de los protoplastos de zanahoria con los plásmidos pUI235CTB1.1, pUI235CTB0.4, pUIEFICTB0.33 y pBSCTB junto con uno de los genes reporteros *uidA* (incluido en los plásmidos pBI426 y pBI221) o *gfp* (presente en el plásmido pBIN35S-mGFP4).

A partir de 300 ml de cultivos celulares de *Daucus carota* de tres días de proliferación, tratados con pectinasa 1% y celulasa 2% en manitol 0.7 M, se purificaron en promedio  $27.6 \times 10^6$  protoplastos/ml.

La purificación de protoplastos realizada por flotación de las células en sacarosa 20% o por sedimentación pero posterior tamizaje a través de una malla de poliéster, permitió separar con más eficiencia a los protoplastos de los agregados celulares no digeridos por el tratamiento enzimático (Tabla 2) que por sedimentación sin tamizaje de las células. La aplicación del método de purificación por sedimentación y tamizaje resultó en la obtención de 81.02% de viabilidad de los protoplastos aislados, como se detectó por exclusión de azul de Evans 0.5% y tinción con FDA (Fig. 7).

Se realizaron 4 ensayos de electroporación de protoplastos de zanahoria con los plásmidos pUIEFICTB0.33, pUI235CTB1.1 y pUI235CTB0.42 junto con los plásmidos pBI426, pBI221 y pBIN35SGFP (Tabla 2).

Las electroporaciones se realizaron en alícuotas de  $1 \times 10^6$  protoplastos con 5 a 10  $\mu\text{g}$  de cada uno de los plásmidos recombinantes de *ctxB*, aplicando pulsos eléctricos de 675 V/cm -800  $\mu\text{F}$ , 750 V/cm-330  $\mu\text{F}$  y 1 kV/cm-330  $\mu\text{F}$  (en diferentes experimentos).

La viabilidad celular, registrada 24 h después del evento de transformación, fue de 47.1% a 55.0 %; observando el menor valor en los protoplastos electroporados a 1 kV/cm-330  $\mu\text{F}$  y el mayor en los protoplastos sometidos a un pulso de 675 V/cm -800  $\mu\text{F}$  (Tabla 3).

La cantidad promedio de proteínas por  $10^6$  protoplastos presentó variaciones. La mayor cantidad se observó en el grupo experimental electroporado a 750 V/cm -330  $\mu\text{F}$  (210.34  $\mu\text{g}/10^6$  células) y valores semejantes en los grupos tratados con descargas eléctricas de 675 V/cm-800  $\mu\text{F}$  (179.64  $\mu\text{g}/10^6$  células) y 1 kV/cm-330  $\mu\text{F}$  (167.6  $\mu\text{g}/10^6$  células)(Tabla 2).

Tabla 3. Viabilidad de los protoplastos teñidos con FDA, 24 horas después de la coelectroporación con pBI426 o pBI221 y los vectores recombinantes de CTB a diferentes voltajes.

condiciones transfección	muestra	fluorescencia (%)	fluorescencia promedio (%)
	pre-electroporado	80.8	81.02
	pre-electroporado	81.25	
750V/cm 330 $\mu$ F	sin DNA	40.9	49.01
	pBI221+pUI235CTB1.1	57.1	
675V/cm 600 $\mu$ F	sin DNA	56.25	55.02%
	pUI235CTA + pBIN35SGFP	61.11	
	pUI235CTB.4+ pBIN35Sgfp	47.72	
1kV/cm 330 $\mu$ F	DNA acarreador	42.04	47.1
	pBI221 +pBSCTB	50.97	
	pBI426 + pUIEFICTB0.3	69.9	
	pBI426 + pUI235CTB1.1	43.27	
	pBI426 + pUI235CTB0.4	29.53	

### Detección de los genes reporteros

Para evaluar la eficiencia del evento de cotransformación, y por tanto la transferencia de los vectores de expresión de CTB a los protoplastos de zanahoria, se determinó la actividad enzimática de  $\beta$ -glucuronidasa en lisados de protoplastos y la expresión de la proteína verde fluorescente en protoplastos intactos por su observación directa en un microscopio Olympus de fluorescencia.

### $\beta$ -Glucuronidasa

Los plásmidos pBI221.1 y pBI426 tienen el gen *uidA* bajo el control de los promotores CaMV35S sencillo y CaMV35S con la duplicación de la región enhancer (235S) respectivamente y fueron usados conjuntamente con los vectores recombinantes de *ctxB* para la electroporación de protoplastos. De esta forma la actividad de  $\beta$ -Glucuronidasa reflejaría la eficiencia del evento de transformación que se relacionaría con la eficiencia de entrada de los vectores de expresión de *ctxB*.

La prueba de la actividad GUS se realizó a las 24 h de la electroporación mediante un ensayo espectrofotométrico en el que la actividad de la enzima se determina por la hidrólisis del sustrato p-nitrofenol glucurónido 1 mM (SIGMA) que genera ácido

glucurónico y p-nitrofenol, cuya presencia se detectó con el lector de ELISA con luz de 415 nm.

Se usó una cantidad variable de proteína total (18-43  $\mu\text{g}$ ) de los lisados de los protoplastos en presencia de p-nitrofenol-glucurónido 1mM. Se realizaron lecturas de la absorbancia del p-nitrofenol a los 10 min e incluso hasta las 22 horas de incubación (en uno de los experimentos, Fig. 8) con el sustrato sin observar incremento notable en ninguno de los eventos de electroporación. Fue solo hasta las 96 hrs de incubación de los lisados de los protoplastos con p-nitrofenol glucurónido que se obtuvieron lecturas a 415 nm (Fig 9). Sin embargo los grupos experimentales no transformados con pBI426 o pBI221 también dieron lecturas a 415 nm semejantes a las obtenidas de los grupos transformados con pBI426 o pBI221.

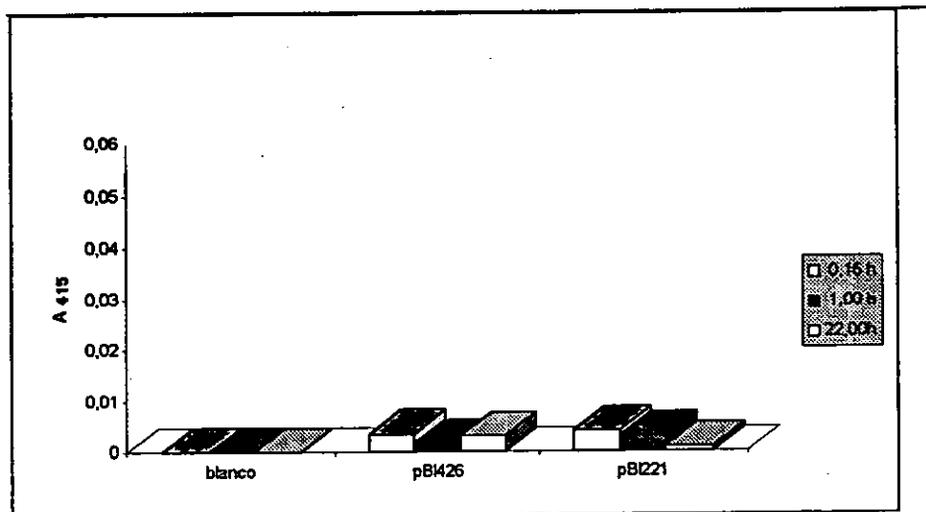


Fig. 8. Actividad de  $\beta$ -glucuronidasa en protoplastos electroporados con pBI426 o pBI221 a 750 V/cm- 330  $\mu\text{F}$  incubados con p-nitrofenil-glucurónido durante 22 h.

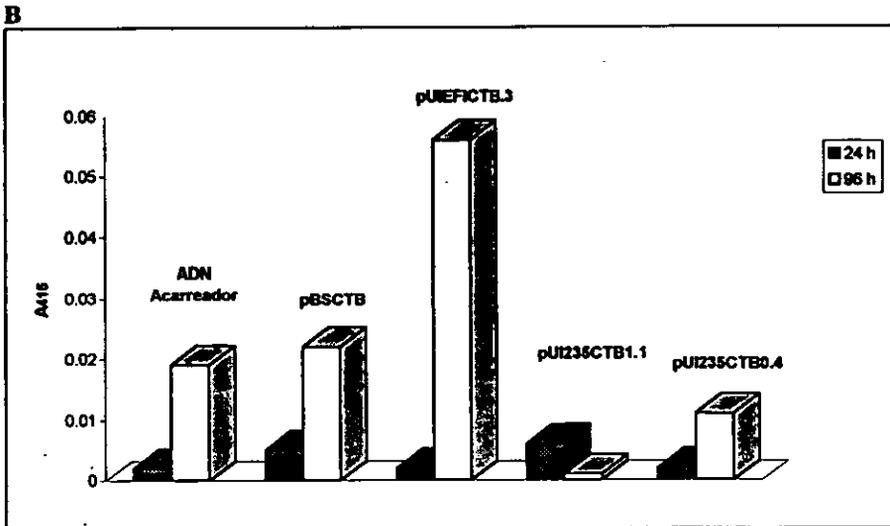
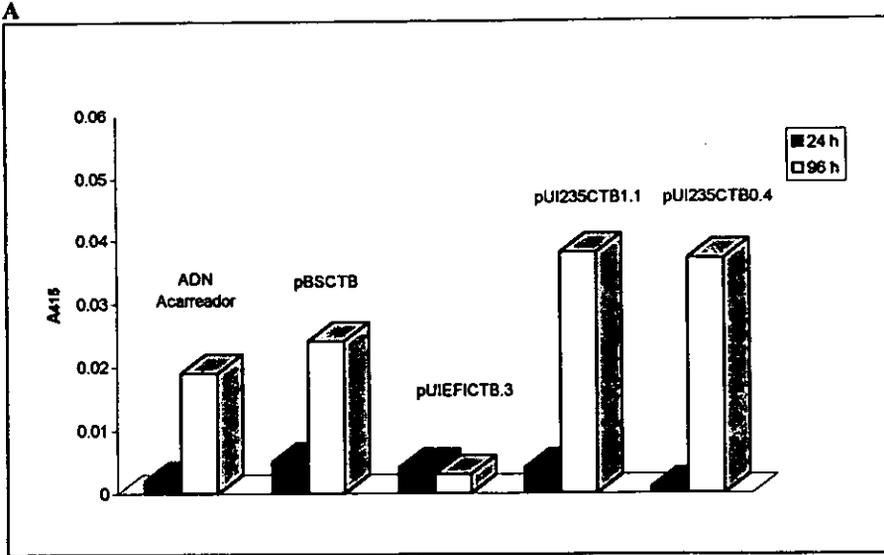


Fig.9. Actividad de  $\beta$ -glucuronidasa en protoplastos electroporados con pBI221(A) o pBI426 (B) y con los vectores de expresi3n de CTB a 750 V/cm- 330  $\mu$ F incubados con p-nitrofenil-glucur3nido durante 96 h.

Bajo las mismas condiciones de ensayo que en los protoplastos, la actividad enzimática de GUS presente en *E. coli* DH5 $\alpha$  fue de 99.2 pmolas de p-nitrofenol/h/mg, lo que indica que las condiciones de ensayo son óptimas para la detección de GUS.

### **Proteína verde fluorescente (GFP)**

La proteína verde fluorescente en el presente trabajo se utilizó como un parámetro de la eficiencia de la transformación por permitir la identificación visual rápida y simple de protoplastos transformados.

Para coelectroporar a los protoplastos de zanahoria conjuntamente con los vectores de expresión del gen *ctxB* se empleó el plásmido pBIN35S-mGFP4 que posee la región codificante para GFP fusionada al promotor P35SCaMV. Se hicieron observaciones de muestras de estos protoplastos coelectroporados en microscopía de fluorescencia y se detectó la emisión de la GFP que no fue visible en el grupo de protoplastos electroporados bajo las mismas condiciones pero a los que no se les añadió pBIN35S-mGFP4 (Fig. 10). En los protoplastos coelectroporados a 675 V/cm- 800 $\mu$ F, la fluorescencia se presentó en el 44.6% del total de células observadas a las 24 hrs del evento de transformación (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de protoplastos fluorescentes cotransfectados con pBINGFP y vectores de expresión de CTB, con un pulso eléctrico de 270 V-800  $\mu$ F, en aumento 40X, a las 24 hrs del evento de transfección.

Tratamiento*	Protoplastos		Fluorescencia (%)
	Totales	Fluorescentes	
pUI235CTB1.1	18	9	50
pUI235CTB0.4	42	20	47.6
pUI235CTB1.1	17	7	41.17
pUI235CTB1.1	23	10	43.47
pUI235CTB1.1	17	7	41.17
--no ADN--	13	0	
		promedio	44.6

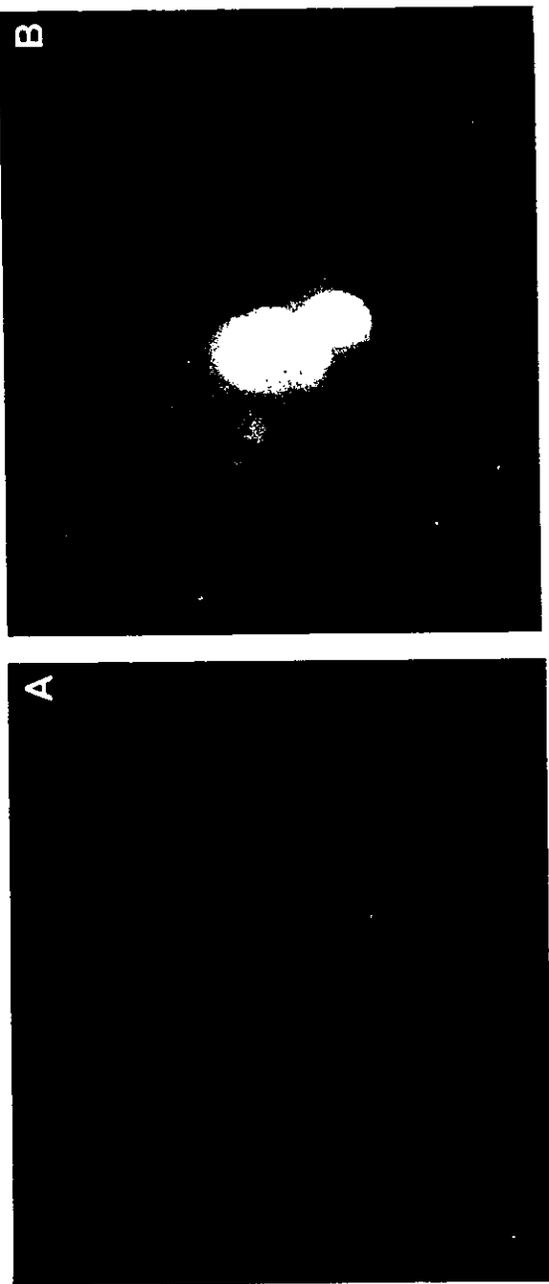


Fig. 10. Expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en los protoplastos coelectroporados sin (A) o con (B) pBIN35S-mGFP4 y PUI235CTB0.4 a las 24 hrs del pulso eléctrico a 675 V/cm, 330 $\mu$ F.

La detección positiva de GFP indica que las condiciones de electroporación (675 V/cm) fueron suficientes para permeabilizar a los protoplastos y permitir la entrada y expresión del ADN plasmídico.

### III. Detección inmunológica de CTB

Finalmente, para evaluar la funcionalidad de los vectores de expresión de *ctxB* se realizó la inmunodetección de CTB para revelar su presencia en los extractos celulares.

Aproximadamente 70  $\mu$ g de proteína total de los protoplastos transfectados con cada uno de los diferentes vectores fueron separados por electroforesis y se electrotransfirieron del gel de acrilamida a la membrana de nitrocelulosa en donde fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-CTB CG8 seguida por un anticuerpo policlonal de chivo anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano y como control positivo se empleó toxina de cólera auténtica (0.85  $\mu$ g). Vislumbrando la posibilidad de su expresión quisimos determinar si no solamente se manifestaba CTB monomérica sino quizás también en su forma pentamérica (es esta forma la que da inmunidad protectora contra los efectos biológicos de CT, por unión a GM1), por lo que en algunas de las muestras separadas por SDS-PAGE no añadimos el agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol, sin embargo como lo muestra la fig. 8 con o sin  $\beta$ -mercaptoetanol el anticuerpo monoclonal CG8 sólo reaccionó con la proteína CTB monomérica usada como control positivo, y no reaccionó con ninguna otra proteína de los diferentes grupos experimentales transformados con los diferentes vectores de expresión de *ctxB*.

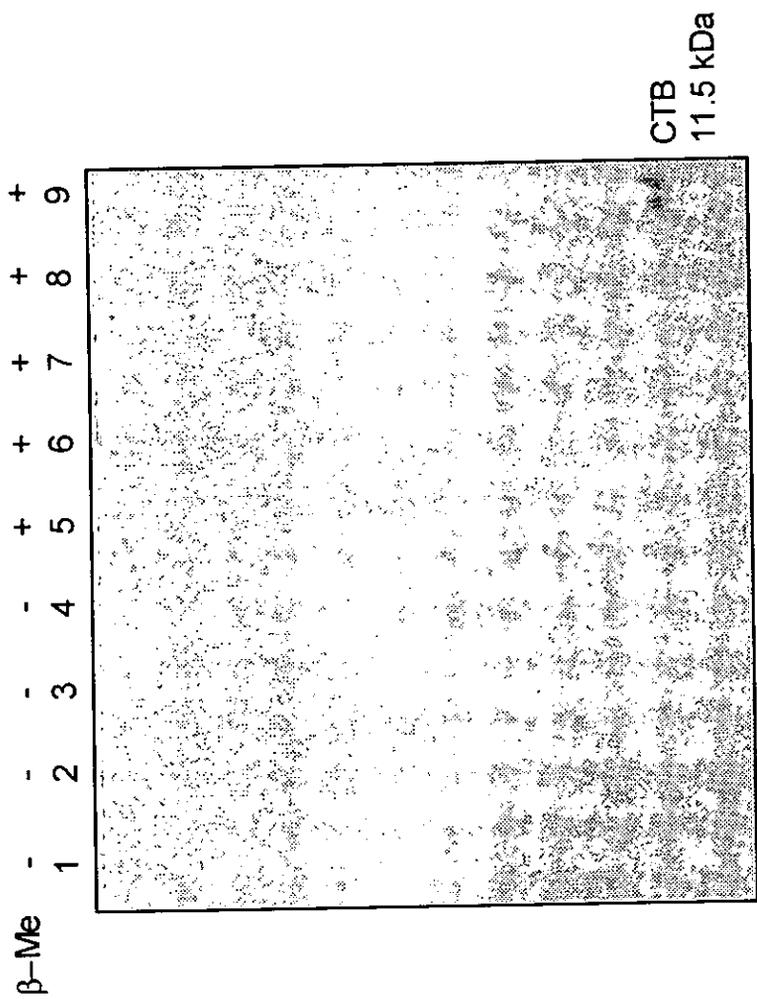


Fig. 11. Inmunoblot de los lisados de protoplastos coelectroporados a 1 kV/cm (330 $\mu$ F) con los vectores de expresión de *cxB*. 1) y 5) pBSCTB; 2) y 6) pUI235CTB1.1; 3) y 7) pUI235CTB0.4; 4) y 8) pUIEFICTB0.3; 9) control positivo: CT (Sigma).

## DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó la construcción de tres vectores plasmídicos para la expresión del gen *ctxB*, además de su evaluación en protoplastos de zanahoria, como un antecedente para realizar la transformación estable con el (o los) plásmido(s) más eficientes de estos ensayos preliminares. Por la falta de información sobre la secuencia de los vectores utilizados, se realizaron ensayos de cotransformación de protoplastos, introduciendo dos plásmidos (uno con *ctxB* y otro con el gen reportero) durante el procedimiento de transformación por electroporación, con la finalidad de obtener un sistema de expresión transitoria para el rápido monitoreo de la expresión de *ctxB*. Aunque la electroporación se utiliza principalmente como medio para la expresión transitoria, también se usa para la obtención de transformantes estables con integración genómica de las construcciones transferidas después del shock eléctrico y una adecuada selección.

Extensos estudios de expresión génica transitoria y estable en protoplastos muestran que la introducción del vector y la expresión de los genes que posee, están influenciados por varios factores, como son la concentración del plásmido, voltaje, duración del pulso y solución amortiguadora ( en el caso de utilizar la electroporación como método de introducción directa del ADN). La naturaleza y el estado fisiológico de los protoplastos influye de manera determinante en la eficiencia con que son transformados.

Se demostró en el presente trabajo que un pulso eléctrico de 675 V/cm-800  $\mu$ F fue suficiente para la expresión de la proteína reportera GFP. Sin embargo se debe mejorar el sistema y optimizar los parámetros de la electroporación. Además de hacer énfasis en la técnica de purificación de los protoplastos (se obtienen mayores densidades de protoplastos y mejor purificados por flotación ), la concentración adecuada del ADN, el diseño de vectores de expresión, etc.

La no detección de actividad GUS en los protoplastos cotransformados con pBI426 o pBI221 puede tener diversas explicaciones, como que los niveles de expresión de la enzima a las 24 h eran mínimos para su detección. Rasmussen (1993) reporta que protoplastos de zanahoria transfectedos con pBI221 por incubación con polietilenglicol tuvieron niveles máximos de expresión GUS de las 66 a las 72 h después de la introducción del ADN a parte de que los valores de expresión variaron según la línea celular usada (480

pmol MU/ proteína/ h en la línea celular Risϕ y 1250 MU/ proteína/ h en la línea celular Apollo) y también observó que la densidad de los protoplastos es un factor determinante en la eficiencia de la transfección donde la mayor actividad GUS se logra en  $10^6$  protoplastos/ml y valores menores a  $0.2 \times 10^6$ /ml conduce a una actividad GUS muy baja. En nuestro sistema la concentración inicial de protoplastos fue de  $10^6$ /ml pero después de la electroporación su viabilidad disminuyó hasta en más del 50% por lo que posiblemente la densidad final de protoplastos en la que se ensayó la actividad GUS no fue la óptima para permitir la detección de la actividad de la enzima. Probablemente los 5 min de preincubación del ADN con los protoplastos antes de la electroporación a  $4^\circ\text{C}$  también influyeron negativamente en la expresión de GUS, ya que se ha demostrado un rápido decremento en la actividad de la enzima cuando protoplastos de zanahoria y el plásmido pBI221.1 se mantienen mezclados por más de 2 min (Rasmussen, 1993) debido a una rápida degradación del ADN.

Las anteriores explicaciones nos conducen a no descartar aún la expresión de GUS en los protoplastos electroporados en las condiciones manejadas en este trabajo hasta que se realicen pruebas en las que estas variables sean controladas (aumentar la densidad de protoplastos a  $2 \times 10^6$ , electroporar inmediatamente después de agregar el ADN, detectar la actividad a tiempos mayores después de la electroporación).

La ausencia de actividad GUS en los protoplastos cotransformados con pBI426 o pBI221 nos indicaría que las condiciones empleadas fueron no óptimas para la poración de las células, sin embargo la evaluación del reportero GFP que fue positiva (hasta en un 50 % de eficiencia de transformación) y la medición de la permeabilidad celular medida por entrada inmediata de azul de Evans (Pérez, 1998) nos revela que las condiciones eléctricas de la transformación si son permisivas a la entrada de ADN.

Es decir, la eficiencia de la transfección medida por expresión de *gfp* (44.9%) nos indica que los vectores de expresión de *ctxB* tuvieron las condiciones para ser transferidos al interior de los protoplastos.

Los protoplastos transformados con las construcciones que tenían fusionado transcripcional, o traduccionalmente a *ctxB* no produjeron niveles detectables de CTB en el Western blot.

Recientemente se ha demostrado la expresión estable del gen *ctxB* en plantas de tabaco (Hein 1998) y de papa (Arakawa, 1998), por lo que puede ser factible su expresión también en zanahoria. La inmunodetección negativa de CTB indicaría que no se están dando las condiciones para su adecuada transcripción y/o traducción en plantas. Existen varios factores que pueden influir en ello ( en los niveles de transcripción, traducción y procesamiento de la proteína que involucran el extremo 5' del gen secuencias reguladoras óptimas para la expresión génica en plantas como un promotor fuerte constitutivo, una secuencia líder 5' no traducida (5'UTL) adecuado que permita un mejor inicio de traducción y por el extremo 3' una región no traducida (3'UTR) y señales de poliadenilación que medien el procesamiento 3' del transcrito.).

Se ha demostrado que las secuencias del 5'-UTL que rodean al AUG se involucran en la eficiencia traduccional (Lewin, 1997). en el cual una purina (A o G) en posición -3 forma parte del contexto óptimo en sistemas animales, mientras que en las plantas parece no guardar relación con la eficiencia traduccional, siendo en éstas más importante una guanina en posición -4, encontrando que el contexto adecuado que rodea al codón de iniciación en plantas es UAAACAAUGGCU (Joshi, 1987).

En las construcciones que hicieron uso de pUI235-5.1 para hacer fusiones transcripcionales con *ctxB0.4* y *ctxB1.1* (pUI235CTB0.4 y pUIEFICTB1.1) poseen la secuencia [UGAAUUAUGA] dentro de la cual está el codón de iniciación que originaría respectivamente, un péptido CTB de 103 aminoácidos y un péptido de 124 aminoácidos (incluye péptido señal). Se observa que en la posición +4 hay una adenina en vez de guanina lo cual también podría disminuir la eficiencia de traducción (según Kosiel 1996).

El uso de codones en genes bacterianos es diferente del uso de codones encontrados típicamente en genes de plantas, los cuales poseen un mayor contenido de G+C ( $\geq 50\%$ ), mientras que el contenido en G-C en genes de endotoxinas nativas como cryIIIA es cerca del 37% (Kosiel 1996). Se ha observado que la baja expresión génica de genes bacterianos se origina más en la traducción que en la transcripción. Por lo tanto se ha optado por construir genes sintéticos para incrementar la expresión de endotoxinas en plantas. Debido a que éste es un importante factor que influyó en la expresión de la endotoxina cryIIIA en plantas, sería deseable construir un gen sintético *ctxB* en el que la preferencia de codones sea semejante a la que se manifiesta en la planta hospedero.

Recientemente Mason y col. (1998) demostraron que la expresión de genes bacterianos en plantas mejora si se modifica la secuencia codificante hacia los codones más usados por *Solanum tuberosum*. Construyeron el plásmido pTH110 en el que el cassette de expresión de sLT-B y para la neomicin fosfotransferasa se localizan respectivamente, cercanos a los extremos derecho e izquierdo del T-ADN. La transferencia del T-ADN a planta de papa mediada por *Agrobacterium* dirige su inserción dentro del ADN cromosomal nuclear. La transcripción del gen es dirigida por el promotor CaMV. Obtuvieron valores máximos de 7.3 a 17.2  $\mu\text{g}$  de LT-B por gramo de tubérculo sin epidermis. La máxima acumulación de LT-B se encontró en hojas de transformantes con 1.9% de la proteína total soluble de hoja. Lograron inducir en ratones, títulos de anticuerpos más altos que con la LT-B bacteriana aunque no totalmente protectores.

pUI235 y pUIEFI son vectores binarios, poseen las secuencias de 25 pb flanqueantes del T-ADN, por lo que tienen la posibilidad de poderse transferir (por conjugación o electroporación) a *Agrobacterium* y así realizar su transferencia génica e integración genómica a plantas. El siguiente paso hubiera sido, de haber resultados exitosos en la expresión transitoria, realizar la transformación estable, mediante *Agrobacterium*, de explantes de zanahoria con los vectores de expresión de *ctxB*.

## CONCLUSIONES

1. Se adaptaron dos versiones del gen *ctxB* (*ctxB1.1* y *ctxB0.4*) en dos vectores de transformación de plantas, para obtener la construcción de tres vectores de expresión de *ctxB*:

pUI235CTB1.1, pUI235CTB0.4 que consisten en fusiones transcripcionales de las secuencias de *ctxB1.1* y *ctxB 0.4*, en pUI235-5.1, respectivamente y

pUIEFICTB0.3 que incluye la secuencia codificante de CTB madura como fusión traduccional a la secuencia reguladora que abarca el promotor y primer intrón del gen *eEF-1 $\beta$*  de *A. thaliana* del plásmido pUIEFI-5.1.

2. La expresión de la proteína reportera GFP en los protoplastos de zanahoria cotransformados, indica que las condiciones de electroporación empleadas permiten la entrada del ADN a las células

3. No fue posible la inmunodetección de rCTB con el anticuerpo monoclonal antiCTB CG8 en los protoplastos de zanahoria cotransformados con las construcciones que portan a *ctxB*.

## APENDICE I. Mantenimiento del cultivo en suspensión de *Daucus carota*.

### MATERIAL

matraces de 500 o 1000 ml estériles (recientemente).

1 tubo falcon estéril de 50 ml

micropipetas de 20 y 1000  $\mu$ l con puntas

cultivo en suspensión de *D. carota*.

M<sub>Sm</sub> (sacarosa al 3%, pH 5.8)

stock de vitaminas 100x de tiamina y piridoxina

stock de glutamina 50x

stock de 2,4-D [2 mg/ml]

stock de cinetina [0.21 mg/ml]

### PROCEDIMIENTO

1) a 400 ml de MS agregar:

stock	cantidad ( $\mu$ l)	concentración final
2,4-D [2 mg/ml]	16	0.45 $\mu$ M
cinetina [0.21 mg/ml]	400	0.976 $\mu$ M
vitaminas 100 x	4000	1g/l
glutamina 50x	8000	4g/l

2) Mezclar bien y alicuotar 100 ml de esta mezcla en cada matraz de 500 ml.

3) Agregar a cada matraz 25 ml del (pre)cultivo de *D. carota*.

4) Mantener los cultivos a 25°C  $\pm$  2°C, en agitación constante a 85 rpm.

5) Al día 15 de cultivo transferir a medio fresco.

Medio MS (modificado por Monier) líquido utilizado para el mantenimiento del cultivo en suspensión de *D. carota*.

<b>Compuestos inorgánicos</b>	<b>mg/ml</b>
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	880.0
KNO	1900.0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.0
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	11.1
Na <sub>2</sub> EDTA	14.9
MnSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	33.6
KI	1.66
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	21.0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	12.4
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370.0
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.05
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.05
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.5
KCl	350.0
<b>Compuestos orgánicos</b>	
Tiamina (Vit. B <sub>1</sub> )	1.0
Piridoxina (Vit. B <sub>6</sub> )	1.0
Glutamina	400.0
Sacarosa	30000.0
<b>Reguladores de crecimiento</b>	<b>concentración</b>
Cinetina	0.96 μM
2,4-Diclorofenoxiacético	0.45 μM

#### STOCKS:

**Stock glutamina 50x:** 40 g de glutamina en 1000 ml de agua bidestilada (si es necesario disolver aplicando calor), alicuotar y mantener a 4°C.

**Stock vitaminas (tiamina y piridoxina) 100x:** 100 g de cada vitamina en 1000 ml de agua bidestilada.

## APENDICE II. Determinación de proteínas con el método de Bradford

### MATERIAL

placa de microtitulación

PBS

puntas amarillas

multipipeta

canal para multipipeta

Lector de ELISA

#### b. Albúmina (BSA 1 mg/ml) soln. madre:

BSA fracción V 10 mg

PBS 10 ml

Disolver en tubo falcon de 15 ml, agitar suavemente por inversión (evitar formación de espuma). Alicuotar en volúmenes de 1 ml. Mantener en congelación.

#### c. Reactivo de Bradford.

### PROCEDIMIENTO:

#### 1. Diluciones de soln madre de BSA, en tubos Eppendorf como sigue:

clave	μl BSA	μl PBS	BSA (μl/40 μl)	BSA (μg/ml)
1	0	1000	0	0
2	10	990	0.4	10
3	20	980	0.8	20
4	30	970	1.2	30
5	40	960	1.6	40
6	50	950	2.0	50
7	60	940	2.4	60
8	70	930	2.8	70
9	80	920	3,2	80
10	90	910	3.6	90

2. añadir 40 μl de c/dilución de BSA a pozos de placa de microtitulación (curva tipo) por triplicado.

3. Añadir reactivo de Bradford, 160 μl.

4. Incubar 10 min a temperatura ambiente

5. Lectura a  $A_{620}$  (blanco ajustar a cero).

6. Cálculo de contenido de proteínas:

a) Por regresión lineal obtener la ecuación de la curva tipo:  $[BSA] = (A_{620} - b) / m$

b) Calcular coeficiente de correlación con la recta

c) Gráfica

Con la ecuación, calcular la concentración de proteínas en las diluciones apropiadas.

## APENDICE III. Ensayos de purificación y electroporación de protoplastos con los vectores de expresión de *ctxB* y plásmidos con genes reporteros

### PURIFICACION Y ELECTROPORACION DE PROTOPLASTOS (050697)

#### PROCEDIMIENTO

1. Colectar por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min las células de *D. carota*
2. Resuspenderlas en 40 ml de solución enzimática
3. Incubar durante 20 hrs con agitación ligera (40 rpm/min) y a temperatura ambiente
4. Agregar 40 ml de sol. de lavado
5. Sedimentar cels. a 800 rpm durante 5 min. (repetir paso 5 y 6).
6. Ajustar a  $2 \times 10^6$  protoplastos/ml en sol. de electroporación y mantener en hielo.
7. En alícuotas de  $1 \times 10^6$  protoplastos hacer las siguientes combinaciones:

clave	pBSctxB ( $\mu$ l)	pBI426 ( $\mu$ l)	p35SGFP ( $\mu$ l)	pUI235CTB0.4 ( $\mu$ l)	pUIEFICTB0. ( $\mu$ l)	pUI235CTB1.1 ( $\mu$ l)	pI5ctxA ( $\mu$ l)
1 A							
1 B							
1 C	5						
2 A		10		5			
2 D			5	5			
3 A		10			5		
3 D			5		5		
4 A		10				5	
4 D			5			5	
5 A			5				10

9. Aplicar un pulso de 270 V, 800  $\mu$ F
10. Mantener en hielo por 5 min.
11. Transferir a placas de cultivo (con 2 ml de cultivo)
12. Mantener placas en oscuridad a 25°C, por 24 hrs
13. A las 24 hrs, ensayos de detección de GFP y  $\beta$ -glucuronidasa.

#### RESULTADOS

Se obtuvieron  $2 \times 10^8$  protoplastos/ml

gran concentración debido a que recuperamos las cels. por sedimentación (glucosa 0.4 M), por lo tanto quedaron junto con los restos celulares, cúmulos celulares sin digerir.

Muy cualitativamente se vio viabilidad con azul de Evans (0.5%): "gran proporción de protoplastos excluyeron el colorante, no así los restos celulares (hubo gran cantidad) que se tiñeron.

### ENSAYO ESPECTROFOTOMETRICO DE $\beta$ -GLUCURONIDASA

#### PROCEDIMIENTO

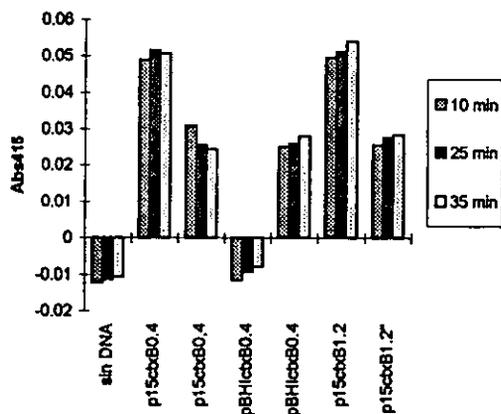
1. Sedimentamos las células por centrifugación en tubos Eppendorf a 6000 rpm por 5 seg
2. Las resuspendimos en 60  $\mu$ l de solución de lisis
3. congelamos a -70 C por 1 semana

4. colocamos en placa de lectura de 96 pozos 5  $\mu$ l de cada extracto celular (21.7  $\mu$ g de proteína total) más 95  $\mu$ l de reacción
5. Que se incubaron a 37 C, se registró la Abs<sub>415</sub> a intervalos de 10 min.

## RESULTADOS

Lectura de la Absorbancia a 415 nm de los lisados de los protoplastos a los 10, 25 y 35 min. de incubación con p-nitrofenil glucuronido 1Mm después de las 24 hrs (A) y 48 hrs (B) de la electroporación con pBI426

clave	plásmido	tiempo (min)		
		10	25	35
1B	sin DNA	-0,0123	-0,0113	-0,0106
2 A	pUI235CTB0.4	0,0490	0,0516	0,0506
2 B	pUI235CTB0.4	0,0310	0,0256	0,0243
3A	pUIEFICTB0.3	-0,0116	-0,0093	-0,0080
3 B	PUIEFICTB0.3	0,0250	0,0260	0,0280
4A	PUI235CTB1.1	0,0495	0,0510	0,0540
4 B	PUI235CTB1.1	0,0256	0,0276	0,0283



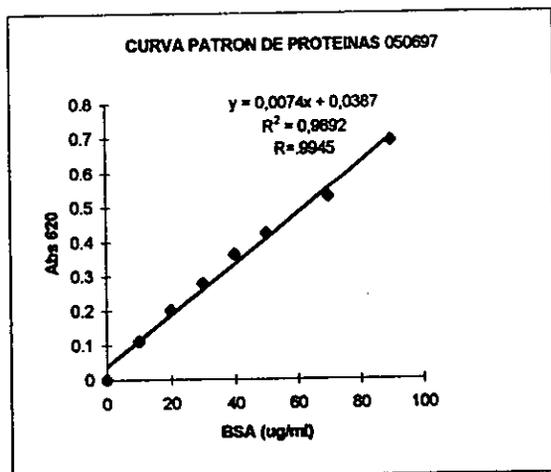
## Expresión de GFP

Los protoplastos transfectados con pBINGFP mostraron fluorescencia a las 24 hrs del evento de electroporación.

foto	muestra	obj	exposición
00	pUI235CTB0.4/pBIN35GFP	500	4'62"
0	" "	500	2'50"
1	pUI235CTB.4/pBIN35SGFP	500	41"

**CURVA PATRON DE PROTEINAS 050697**

BSA ug/ml	A620	A620
0	0	
10	0.115	0.108
20	0.195	0.204
30	0.296	0.261
40	0.362	0.362
50	0.432	0.417
60	0.479	0.457
70	0.542	0.518
80	0.565	0.532
90	0.703	0.679



BSA ug/ml	A620 promed
0	0
10	0.1105
20	0.1995
30	0.2785
40	0.362
50	0.4245
70	0.53
90	0.691

BSA (ug/ml)=  
 $(A620-0.0387)/0.0074$

**Abs620 de los lisados de protoplastos electroporados el 060697**

	24hrs	24hrs	prom	48hrs	48hrs	prom
sin pBI426: *	0.733	0.693	0.713			
con pBI426:						
pUI235CTB0.4	0.603	0.501	0.552	0.407	0.419	0.413
pUIEFICTB0.3	0.445	0.392	0.4185	0.313	0.328	0.3195
pUI235CTB1.1	0.589	0.593	0.591	0.414	0.472	0.443

**Determinación de proteínas a las 24 hrs de electroporación**

con pBI426:	A620 promedio	proteínas (ug/ml) dil 1:4 (A620-0.0387)/0.0074	proteínas (ug/ml)
pUI235CTB0.4	0.552	69.3648649	277.459459
pUIEFICTB0.3	0.4185	51.3243243	205.297297
pUI235CTB1.1	0.591	74.6351351	298.540541

\*No se determinó su concentración de proteínas porque su Abs620 quedó fuera de curva patron

## PURIFICACION Y ELECTROPORACIÓN DE PROTOPLASTOS (170697)

### PROCEDIMIENTO

1. Colectar por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min las células de *D. carota*
2. Resuspenderlas en 40 ml de solución enzimática
3. Incubar durante 20 hrs con agitación ligera (40 rpm/min) y a temperatura ambiente
4. Filtrar la mezcla a través de una malla de poliéster.
5. Agregar 40 ml de sol. de lavado
6. Sedimentar cels. a 800 rpm durante 5 min. (repetir paso 5 y 6).
7. Ajustar a  $2 \times 10^6$  protoplastos/ml en sol. de electroporación y mantener en hielo.
8. En alícuotas de  $1 \times 10^5$  protoplastos hacer las combinaciones con los vectores de expresión de CTB y plásmido reportero.
9. Aplicar un pulso de 270 V, 800  $\mu$ F
10. Mantener en hielo por 5 min.
11. Transferir a placas de cultivo (con 2 ml de cultivo)
12. Mantener placas en oscuridad a 25°C, por 24 hrs
13. A las 24 hrs, ensayos de detección de GFP y GUS

### RESULTADOS

Obtención de  $27.3 \times 10^6$  protoplastos/ml.

Viabilidad determinada con FDA a las 24 hrs de 55.02%

tratamiento	protoplastos		% viabilidad
	totales	fluorescentes	
sin DNA	16	9	56.25
pUI235CTA/pBIN35sGFP	18	11	61.11
pUI235CTB0.4/pBIN35sGFP	44	21	47.72

### DETECCIÓN DE PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE:

Registro en diapositivas.

Aumento	tratamiento*	Protoplastos		
		totales	fluorescentes	Fluorescencia (%)
250 x	pUI235CTB1.1	18	9	50
500	pUI235CTB0.4	42	20	47.6
500	pUI235CTB1.1	17	7	41.17
550	pUI235CTB1.1	23	10	43.47
500	pUI235CTB1.1	17	7	41.17
250	no DNA	13	0	0
			promedio	44.6

\*a parte de p35sGFP

### Extracción de proteínas de protoplastos:

Se tomaron los 2.5 ml de cultivo de protoplastos a las 24 hrs de transformación. y se centrifugaron en tubos eppendorf a 6000 rpm por 5 seg. Resuspendimos en 50  $\mu$ l de Sol. de lisis. Sonicamos y separamos de restos celulares. Lisados mantenidos a -70 C durante 1 semana, antes de realizar los ensayos de determinación de proteínas y actividad de  $\beta$ -glucuronidasa.

### Determinación de proteínas

Colocamos en pozos de placa Elisa 40  $\mu$ l de una dilución 1:8 de los lisados de protoplastos con 160  $\mu$ l reactivo Bradford. Lecturas por duplicado.

**Actividad gus:**

Lecturas por duplicado a intervalos de 10 min. Incubar a 37 C durante 12 horas. No se registraron cambios.

	plásmido	Abs415	Abs415	Abs415	Abs415 prom
blanco *		0,000	0,000	0,000	0,000
A1 (5ul)	sin DNA electropor	0,003	0,001	0,001	0,002
A2	pBSCTB (5 ul)	0,002	0,005	0,001	0,003
A3	pBSCTB (5 ul)	0,003	0,005	0,003	0,004
B1	pUI235CTB1.1 (5 ul)	0,001	0,003	0,008	0,004
B2	pUI235CTB1.1 (5 ul)	0	-0,003	-0,001	-0,001
C2	pUI235CTB0.4 (5 ul)	0,004	-0,001	0	0,001
C3	pUI235CTB0.4 (5 ul)	0,002	0,004	0,005	0,004
D2	pUI235CTB.3 (5 ul)	-0,007	0	-0,001	-0,003
D3	pUI235CTB.3 (5 ul)	0,002	0,007	0,007	0,005
E1	p15CTA (5 ul)	0,002	-0,004	-0,002	-0,001
E2	p15CTA (5 ul)	0,007	0,002	0,005	0,005

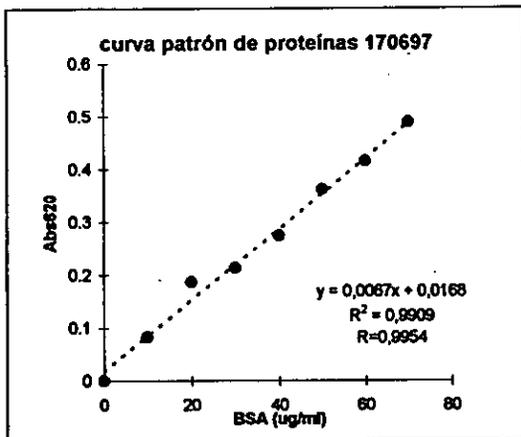
\* 100 ul de sol. de p-nitrofenil-glucurónido 1mM.

**CURVA PATRON DE PROTEINAS 170697**

BSA (ug/ml)	A620	A620
0	0	
10	0.124	0.091
20	0.185	0.198
30	0.315	0.289
40	0.336	0.35
50	0.411	0.392
60	0.466	0.447
70	0.493	0.54
80	0.557	0.56

BSA (ug/ml)	A620 prom
0	0
10	0.108
20	0.192
30	0.302
40	0.343
50	0.402
60	0.457
70	0.517
80	0.559

0.425  
0.529



Para encontrar la dilución adecuada:

muestra	dilución	Abs620	Abs620
control (-)	1:40	0.015	0.021
control (-)	1:08	0.217	0.235
control (-)	1:04	0.451	0.41

# tubo		A620	A620	A620 prom	proteinas (ug/ml) dil 1:8 (A620-0.0168)/0.0067	BSA(ug/ml)
C1	sin DNA electrop	0.159	0.183	0.171	23.015	184.12
A1	sin DNA electrop	0.181	0.134	0.1575	21.000	168.00
A2	pBSCTB	0.191	0.196	0.1935	26.373	210.99
A3	pBSCTB	0.146	0.195	0.1705	22.940	183.52
A4	pBSCTB	0.164	0.181	0.1725	23.239	185.91
B1	pUI23SCTB1.1	0.147	0.141	0.144	18.985	151.88
B2	pUI23SCTB1.1	0.181	0.194	0.1875	25.478	203.82
B3	pUI23SCTB1.1	0.107	0.113	0.11	13.910	111.28
C2	pUI23SCTB0.4	0.167	0.18	0.1735	23.388	187.10
C3	pUI23SCTB0.4	0.159	0.175	0.167	22.418	179.34
C4	pUI23SCTB0.4	0.165	0.171	0.168	22.567	180.54
D2	pUIEFICTB0.3	0.165	0.172	0.1685	22.642	181.13
D3	pUIEFICTB0.3	0.141	0.151	0.146	19.284	154.27
D4	pUIEFICTB0.3	0.169	0.187	0.178	24.060	192.48
E1	p15cbA	0.17	0.187	0.1785	24.134	193.07
E2	p15cbA	0.164	0.176	0.17	22.866	182.93
E3	p15cbA	0.181	0.194	0.1875	25.478	203.82

promedio

179.65935

## PURIFICACION Y ELECTROPORACIÓN DE PROTOPLASTOS (050897)

### PROCEDIMIENTO

1. Colectar por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min las células de *D. carota*
2. Resuspenderlas en 40 ml de solución enzimática
3. Incubar durante 18 hrs con agitación ligera (40 rpm/min) y a temperatura ambiente
4. Filtrar la mezcla a través de una malla de poliéster.
5. Agregar 40 ml de sol. de lavado
6. Sedimentar cels. a 800 rpm durante 5 min. (repetir paso 5 y 6).
7. En alícuotas de  $1 \times 10^6$  protoplastos hacer las combinaciones con los vectores de expresión de CTB y plásmido reportero.
9. Aplicar un pulso de 300V, 330  $\mu$ F
10. Mantener en hielo por 5 min.
11. Transferir a placas de cultivo (con 2 ml de cultivo)
12. Mantener placas en oscuridad a 25°C, por 24 hrs
13. A las 24 hrs, ensayos de detección de GFP y GUS

### RESULTADOS:

La viabilidad fue registrada en fotos y fue la siguiente:

tratamiento	cels. totales	cels. fluorescentes	% cels. fluorescentes	Viabilidad (%)
pre-electrop	47	38	80.8	81.02
pre-electrop	16	13	81.25	
post-electrop	22	9	40.9	36.05
post-electrop	14	8	57.1	

### Extracción de proteínas de protoplastos

1. Sedimentamos cels. en tubos Eppendorf a 6000 rpm durante 5 seg.
2. Resuspendimos pastilla en 300  $\mu$ l de sol de lisis.
3. Congelamos a -70 C
4. Sonicamos con dos pulsos de 10 seg.. Mantener a 4 C.
5. , centrifugamos a 13 000 rpm durante 5 min. para separar de restos celulares.
6. Transferimos sobrenadante a tubos nuevos.

### ENSAYO GUS 050897

1. En alícuotas de 950  $\mu$ l de sol. de reacción (p-nitrofenil-glucurónido 1 mM) agregamos 50  $\mu$ l del extracto de proteínas (en promedio 43.13  $\mu$ g de proteína total).
2. Incubamos a 37 C y registramos la Abs415 a las 22 hrs de la incubación.

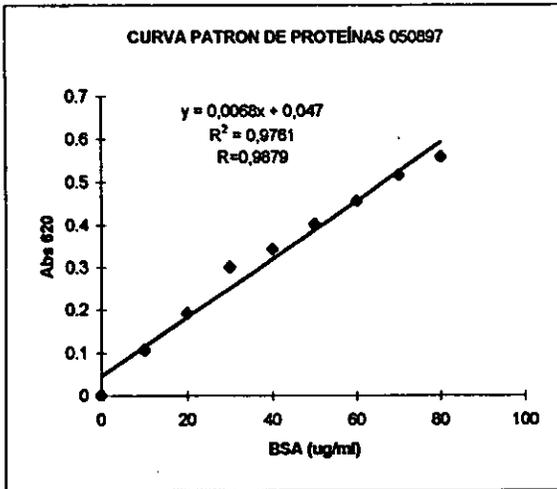
### Actividad GUS (050897)

tiempo (h)	blanco	pBI426	pBI221
0,16	0	0,0035	0,004
1,00	0	0,0015	0,003
22,00	0	0,003	0,001

**CURVA PATRON DE PROTEINAS 050897**

tubo No.	C. patron		
blanco (1)	0	0.006	0.008
2	0.086	0.084	0.08
3	0.226	0.173	0.16
4	0.222	0.205	0.213
5	0.247	0.29	0.287
6	0.354	0.337	0.394
7	0.412	0.426	0.409
8	0.523	0.464	0.477
9	0.531	0.514	0.447

BSA(ug/ml)	A620prom
0	0
10	0.08333333
20	0.18633333
30	0.21333333
40	0.27466667
50	0.36166667
60	0.41566667
70	0.488



**Determinación de proteínas de lisados de protoplastos 050897**

**Lectura A620 de los lisados de los protoplastos (dil 1:4)**

plásmido	A620	A620	A620 prom	proteínas dil 1:4 (A620-0,047)/0,0068	proteínas (ug/ml)
sin DNA	0.405	0.388	0.397	51.3970588	205.59
pBI426	0.412	0.423	0.4175	54.4852941	217.94
pBI221	0.409	0.394	0.4015	52.1323529	208.53

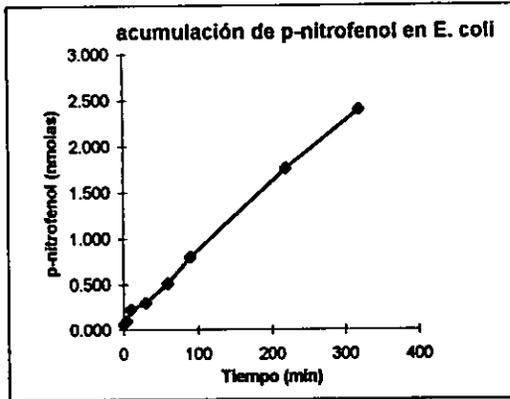
promedio 210.686275

**Determinación de proteínas en lisado de *E. coli* DH5alfa**

Ditución	A620	A620	A620	A620 prom	(A620-0,047)/0,0068	proteínas (ug/ml)
1:400	0.112	0.094	0.103	0.103	12.87	5146.27

min	Abs 415	A415	A415 prom	
1	0.007	0.004	0.006	
5	0.012	0.007	0.010	
10	0.018	0.027	0.023	
30	0.03	0.03	0.030	
60	0.05	0.052	0.051	
90	0.081	0.079	0.080	
220	0.167	0.165	0.176	
320	0.239	0.24	0.240	

min	p-nitro (nmol)
1	0.060
5	0.100
10	0.230
30	0.300
60	0.510
90	0.800
220	1.760
320	2.400



Actividad GUS en E. coli:

si A415 = 0,051 a los 60 min  
 y DO415 de 0.01 = 0.1 nanomol producto

Act. enzimát 99.2 pmolas p-nitrofenol/h/mg proteína

PURIFICACION Y COELECTROPORACIÓN DE PROTOPLASTOS (120898)

PROCEDIMIENTO

1. Colectar por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min las células de D. carota
2. Resuspenderlas en 40 ml de solución enzimática
3. Incubar durante 24 hrs con agitación ligera (40 rpm/min) y a temperatura ambiente
4. Sedimentar cels. a 800 rpm durante 5 min. (repetir paso 5 y 6).
5. Resuspender los protoplastos en 40 ml en sacarosa al 20%
6. Centrifugar a 1500 rpm durante 30 min
7. Recuperar fase de protoplastos flotantes.
8. En alícuotas de  $1 \times 10^6$  protoplastos hacer las combinaciones con los vectores de expresión de CTB y plásmido reportero.
9. Aplicar un pulso de 400V, 330  $\mu$ F
10. Mantener en hielo por 5 min.
11. Transferir a placas de cultivo (con 2 ml de cultivo)
12. Mantener placas en oscuridad a 25°C, por 24 hrs
13. A las 24 hrs, ensayos de detección de GFP y GUS

RESULTADOS:

La viabilidad fue registrada en fotos y fue la siguiente:

Viabilidad a las 24 hrs

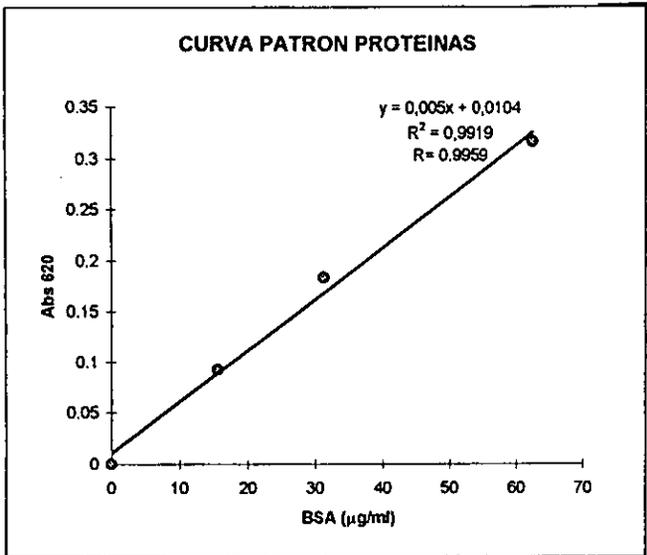
(FDA 3  $\mu$ l de stock 100x en 100  $\mu$ l)

Muestra	totales	fluorescentes	fluorescencia(%)	%
DNA acarreador	59	25	42.37	42.04
	12	5	41.66	
	16	8	50.00	
	41	14	34.14	
pBI221+p17	18	8	44.44	49.33
	14	6	42.85	
	28	17	60.71	
pBI221+pBSCTB	10	8	80.00	50.97
	12	5	41.66	
	16	5	31.25	
pBI426+pUIEFICTB0.3	13	9	69.23	69.90
	17	12	70.58	
pBI426+pUI235CTB1.2	19	8	42.10	43.27
	27	12	44.44	
pBI426+pUI235CTB0.4	40	5	12.5	29.53
	6	2	33.33	
	12	4	33.33	
	11	5	45.45	
	13	3	23.07	

promedio= 47.5

PORACION (evaluada por entrada de azul de Evans inmediatamente despues de electroporación)

Voltaje (V)	muestra	protop. totales	protop. porados	% poración
300	1	44	23	52.27
	2	28	8	28.57
400	1	40	27	67.5



BSA µg/ml	A620
0	0
15.62	0.0925
31.25	0.1835
62.5	0.3165

m= 0.005  
 b= 0.0104

Concentración de proteínas en protoplastos electroporados				
gen reportero	tratamiento	Abs620 promedio	concentración (µg/ml) (0.1x)	concentración (µg/ml) (1x)
	DNAacarreador	0.117	21.32	213.2
	DNAacarreador	0.064	10.72	107.2
pBI221	p17cbB	0.070	11.92	119.2
	p17cbB	0.075	12.92	129.2
	pBSCTB	0.091	16.12	161.2
	pBSCTB	0.105	18.92	189.2
	pUIEFICTB0.3	0.109	19.72	197.2
	pUIEFICTB0.3	0.100	17.92	179.2
	pUI235CTB1.1	0.069	11.72	117.2
	pUI235CTB1.1	0.076	13.12	131.2
	pUI235CTB0.4	0.078	13.52	135.2
pUI235CTB0.4	0.104	18.72	187.2	
pBI426	p17cbB	0.095	16.92	169.2
	p17cbB	0.107	19.32	193.2
	pBSCTB	0.093	16.52	165.2
	pBSCTB	0.093	16.52	165.2
	pUIEFICTB0.3	0.074	12.72	127.2
	pUIEFICTB0.3	0.098	17.52	175.2
	pUI235CTB1.1	0.113	20.52	205.2
	pUI235CTB1.1	0.137	25.32	253.2
	pUI235CTB0.4	0.101	18.12	181.2
	pUI235CTB0.4	0.103	18.52	185.2

Ensayo de actividad GUS en protoplastos cotransformados (120898) con pBI426 o pBI221 a 1kV/cm, incubación con p-nitrofenol glucurónido 1 mM durante 96 hrs.

Hoja 2

vector GUS	vector CTB	24 hrs.		96 hrs.		
		A415	A415	A415 prom	A415	A415
pBI426	Acarreador	0.002	0.001	0.002	0.01	0.027
	p17cbxB	0.001	-0.001	0.000	0	0.004
	p17cbxB	0.004	0.001	0.003	0.009	0.001
	pBSCTB	0.003	0.005	0.004	0.018	0.017
	pBSCTB	0.004	0.006	0.005	0.02	0.033
	pUIEFICTB0.3	0.008	0.003	0.006	0.027	0.041
	pUIEFICTB0.3	0	-0.003	-0.002	0.077	0.077
	pUI235CTB1.1	0.002	0.003	0.003	0.007	0.008
	pUI235CTB1.1	0.009	0.011	0.010	-0.012	0.002
	pUI235CTB0.4	0.004	-0.001	0.002	0.003	0.003
	pUI235CTB0.4	0.002	0.002	0.002	0.018	0.02
pBI221	p17cbxB	0.007	0.005	0.006	0.012	0.015
	p17cbxB	-0.003	0	-0.002	0.041	0.016
	pBSCTB	0.002	0.008	0.005	0.015	0.013
	pBSCTB	0.01	-0.002	0.004	0.031	0.036
	pUIEFICTB0.3	0.002	0.005	0.004	-0.011	-0.003
	pUIEFICTB0.3	0.005	0.002	0.004	0.006	0.019
	pUI235CTB1.1	0.003	0.001	0.002	0.05	0.051
	pUI235CTB1.1	0.008	0.002	0.005	0.022	0.03
	pUI235CTB0.4	-0.004	0.001	-0.002	0.012	0.018
	pUI235CTB0.4	0.002	0.006	0.004	0.06	

## REFERENCIAS

1. Apter, F., I.L. Wayne, R. A. Finkelstein, J. Mekalanos y M. Neutra. (1993). Monoclonal Immunoglobulin A Antibodies directed against Cholera Toxin Prevent the Toxin-induced chloride secretory response and block toxin binding to intestinal epithelial cells in vitro. *Infection and Immunity* 61 (12): 5271-5278.
2. Arakawa, T., D. K.X. Chong y W.H.R. Langridge. (1998). Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nature Biotechnology* 16: 292-297.
3. Arntzen, C.J.(1997). High-tech herbal medicine: Plant-based vaccines. *Nature Biotechnology* 15: 221-222.
4. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
5. Bloom, B. R. (1989). Vaccines for the Third World. *Nature* 342: 115-120.
6. Chiu, W, Y. Niwa, W. Zeng, T. Hirano, H. Kobayashi y J. Sheen. (1996). Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology* 6(3):325-330.
7. Czerkinsky, C., M.W. Russell, N. Lycke y J. Holmgren. (1989). Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. *Infect. Immun.* 57: 1072-1077.
8. Dalsgaard, K., A. Uttenthal, T.Jones, F. Xu, A. Merryweather, W. Hamilton, R. Boshuizen, G. Lomonosoff, C. Porta, C. Vela, I. Casal, R. Meloen y P. Rodgers. (1997). Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nature Biotechnology* 15: 248-252.
9. Davey, M.R., E.L. Rech y B.J. Mulligan. (1989). Direct DNA transfer to plant cells. *Plant Molecular Biology.* 13:273-285.
10. Dertzbaugh, M.T. y C.O. Elson. (1993). Comparative effectiveness of the cholera toxin B subunit and alkaline phosphatase as carriers for oral vaccines. *Infect. Immun.* 61:48-55
11. Elson, C.O., W. Ealding. (1984). Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin. *J. Immunol.* 132 (6): 2736-2741.

12. Finkelstein, R.A. (1995). Why do we not yet have a suitable vaccine against cholera?. *Adv. Exp. Med. Biol.* 371 B: 1633-160.
13. Fromm, M., L.P. Taylor y V. Walbot. (1985). Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5824-5828.
14. Gidekel, M., Jimenez, B., Herrera-Estrella L. (1996). The first intron of the *Arabidopsis thaliana* gene coding for elongation factor 1 $\beta$  contains an enhancer-like element. *Gene* 170:201-206.
15. Guyon-Gruaz, A., A. Delas, S. Pedoussaut, H. Halimi, B. Milhaud, B. Raulais y P. Rivaille. (1986). Oral immunization with a synthetic peptide of cholera toxin B subunit. Obtention of neutralizing antibodies. *Eur. J. Biochem.* 159:525-528.
16. Haq, T.A., H.S. Mason, J.D. Clements y C.J. Arntzen. (1995). Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268:714-716.
17. Hein, M. B., T-C. Yeo, F. Wang y A. Sturtevant. (1996). Expression of cholera toxin subunits in plants. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 729: 50-56.
18. Holmgren, J. (1992). Cholera as a model for research on mucosal immunity and development of oral vaccines. *Current Opinion in Immunology* 4: 387-391
19. Jefferson, R. A., S.M. Burgess y D. Hirsh. (1986).  $\beta$ -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 8447-8451.
20. Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh y M.W. Bevan. (1987). GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO* 6 (13): 3901-3907.
21. Jefferson, R.A. (1989). The GUS reporter gene system. *Nature* 342 (14):837-838.
22. Joshi, CP. (1987). An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucl Acids Res* 15: 6643-6653.
23. Kay, R., Chan A., Daly M. y McPherson J. (1987). Duplication of CaMV 35S Promoter Sequences Creates a Strong Enhancer for Plant Genes. *Science* 236:1299-1302.
24. Koziel, M.G., N. B. Carozzi y N. Desai. (1996). Optimizing expression of transgenes with emphasis on post-transcriptional events. *Plant. Mol. Biol.* 32:393-405.

25. Langridge, W., B.J. Li y A.A. Szalay. (1985). Electric field mediated stable transformation of carrot protoplasts with naked DNA. *Plant Cell Rep* 4:355-359.
26. Lau, C.F. y Sheu, S.S. (1992). Rapid and direct recovery of DNA fragments from agarose gels: an extremely simple method. *Methods in molecular and cellular biology* 3:190-192.
27. León, P. y E. Ortiz. (1990). Transformación vegetal. *ICyT* 12 (166-167): 73-77.
28. Lewin, B. (1997). *Genes VI*. Oxford University Press and Cell Press N.Y. 1260 pp.
29. Lutcke, H.A., K.C. Chow, F.S. Mickel, K.A. Moss, H. Kern y G. Scheele. (1987). Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J* 6: 43-48.
30. Mason, H.S., D. M-K. Lam, y C. Arntzen. (1992). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11745-11749.
31. Mason, H.S. y C.J. Arntzen. (1995). Transgenic plants as vaccine production systems. *Trends in Biotechnology* 13:388-392.
32. Mason, H.S., J.M. Ball, J.J. Shi, X. Jiang, M.K. Estes y C.J. Arntzen. (1996). Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93: 5335-5340.
33. Mason, H.S., T.A. Haq, J.D. Clements y C.J. Arntzen. (1998). Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* 16(13): 1336-1343.
34. Mekalanos, J.J., D.J. Swartz, G.D. Pearson, N. Harford, F. Groyne y M. DE Wilde. 1983. Cholera toxin genes: Nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature* 306:551-557.
35. Mekalanos, J. y J. Sadoff. (1994). Cholera Vaccines: Fighting an ancient scourge. *Science* 265: 1387-1389.
36. Monier, M. (1990). Induction of embryogenesis in suspension culture. En *Methods in molecular biology*, Vol. 6. Plant cell and Tissue culture. Ed. J.W. Pollard y J.M. Walter. The Human Press. U.S.A. pp.149-157.
37. Nava P. (1995). Establecimiento de embriogénesis somática de *Daucus carota* L. var. Nantes (zanahoria), en cultivo en suspensión a nivel de matraz y biorreactor airlift. Tesis de Maestría. CINVESTAV -IPN Biotecnología y Bioingeniería.

38. Niwa, H., S. Inouye, T. Hirano, T. Matsuno, S. Kojima, M. Kubota, M. Ohashi y F. Tsuji. (1996). Chemical nature of the light emitter of the *Aequorea* green fluorescent protein. Proc. Natl. Aca. Sci. USA 93: 13617-22

39. Power J. B. y Davey M. R. Protoplast of Higher and lower plants. Isolation, culture and Fusion. Methods in Molecular Biology, vol. 6: 237-259. Plant Cell and Tissue Culture. 1990.

40. Rasmussen, J.O., O.S. Rasmussen. (1993). PEG mediated DNA uptake and transient GUS expression in carrot, rapeseed and soybean protoplasts. Plant Science 89: 199-207.

41. Reichel, C., J. Mathur, P. Eckes, K. Langenkemper, C. Koncz y C. Maas. (1996). Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5888-5893

42. Sambrook, J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (1989). Molecular Cloning. 2ª. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

43. Sánchez, J., A.M. Svennerholm y J. Holmgren. (1988). Genetic fusion of a non-toxic heat-stable enterotoxin-related decapeptide antigen to cholera toxin B-subunit. FEBS Letters. 241 (1,2):110-114.

44. Sánchez, J. y Holmgren J. (1989). Recombinant system for overexpression of cholera toxin B subunit in *Vibrio cholerae* as a basis for vaccine development.. Proc. Natl. Acad. Sci. 86:481-485.

45. Sánchez J. Johanson S. Löwenadler, B, Svenneholm A.M. y Holmgren J. 1990. Recombinant cholera toxin B subunit and gene fusion proteins for oral vaccination. Res. Microbiol. 141:971-979.

46. Saunders, J.A., Chin Ho Lin, Bi Huei Hou, Jianping Cheng, Nombasa Tsengwa, Jhy Jhu Lin, Camelia R. Smith, Marla S. McIntosh, y Sally Van Wert. (1995). Rapid optimization of electroporation conditions for plant cells, protoplasts and pollen. Molecular Biotechnology 3: 181-190.

47. Schocher, R.J., R.D. Shillito, I. Potrykus. (1986). Co-transformation of unliked foreign genes into plants by direct gene transfer. Bio/Technology 4:1093-1096

48. Sixma, T.K., S.E. Pronk, K.H. Kalk, et al. (1991). Crystal structure of cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. Nature 351: 371-377.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

49. Spangler, B.D. (1992). Structure and function of Cholera Toxin and the related *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin. *Microbiol. Rev.* 56(4):622-647.

50. Thanavala, Y., Y.F. Yang, P. Lyons, H.S. Mason y C. Arntzen. (1995). Immunogenicity of transgenic plant -derived hepatitis B surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3358-3361.

51. Watson, J.D., M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller. (1992). Recombinant DNA. 2ª. ed. Scientific American Books. N.Y. 626 p.

52. Widholm, J.M. (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain technology* 47(4):189-193.