



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE QUÍMICA

Establecimiento de las condiciones para la inmunosubstracción de la 24RNP de un extracto de procesamiento de RNA de cloroplasto de espinaca

**T E S I S**  
Que para obtener el grado de:  
**QUÍMICA DE ALIMENTOS**  
**P R E S E N T A:**  
Andrea Edith Hernández Navarro

198982



México, D.F.



2000

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## JURADO ASIGNADO

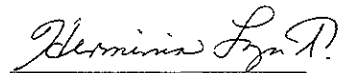
**Presidente:** Dra. Herminia Loza-Tavera  
**Vocal:** M. en C. Elpidio García Ramírez  
**Secretario:** Dr. Javier Plasencia de la Parra  
**1er Suplente:** M. en C. Ismael Bustos Jaimes  
**2do Suplente:** Dr. Francisco Ruíz Terán

### SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

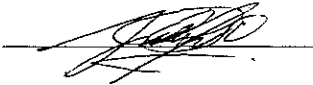
Laboratorio 105, Departamento de Bioquímica  
Conjunto E, Facultad de Química , UNAM

Departamento de Bioquímica,  
Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez"

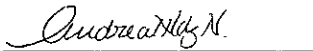
**Asesor del Tema:** Dra. Herminia Loza-Tavera



**Supervisor Técnico:** M. en C. Martín Vargas Suárez



**Sustentante:** Andrea Edith Hernández Navarro



A las personas más importantes en mi vida:

Mi papá, Jaime A. Hernández Baltazar y mi mamá, Ma. Antonieta Navarro Torres, por todo el amor y apoyo incondicional en la realización de esta meta y siempre. Los quiero mucho.

Nadia, Mariana, Igmarr y Fabián por su amor, paciencia y por ser los mejores hermanos del mundo.

## Agradecimientos

A CONACYT (25199N) y DGAPA-UNAM (IN205697) por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, por haberme permitido realizar este trabajo en sus instalaciones.

A todos los integrantes del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez", en especial al Dr. Rafael Moreno, por el gran apoyo brindado en la culminación de este trabajo.

A la Dra. Herminia por su paciencia y enseñanzas durante mi recorrido por el camino de la investigación.

A Martín, por la asesoría brindada para este trabajo así como por su amistad y buenos consejos para la vida.

A mi abuelita, tías y primos por su cariño y compañía en todo momento.

A Dante, por su invaluable cariño y amistad así como el tiempo que hemos compartido toda la vida.

A Sandy, Ale y Karla, por su amistad, cariño y por todo lo que hemos aprendido y crecido juntas.

A Alice, Reyo, Juanito y toda la familia del Lab. 4A, por ser unos grandes amigos y por estar ahí siempre.

A Edith, Omar y todos los miembros del laboratorio 103 por su amistad y por la ayuda que siempre me han brindado.

## CONTENIDO

<b>I. RESUMEN</b>	1
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>III. ANTECEDENTES</b>	3
1. Plastidios	3
2. Cloroplastos	4
3. Regulación de la expresión genética de cloroplastos a nivel postranscripcional	5
4. 28 y 24RNPs, características, función.	6
5. Inmunosustracción como un método de estudio de la función de proteínas	9
<b>IV. OBJETIVOS</b>	10
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	10
1. Selección de hojas de espinaca de diferentes tamaños	10
2. Extracción de proteínas de tejidos vegetales	11
3. Cuantificación de proteínas	11
4. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (PAGE-SDS)	13
5. Western blot	14
6. Elaboración de un extracto de espinaca con capacidad de procesamiento de RNA	15
7. Determinación de la cantidad de 24RNP y 28RNP presente en el extracto de procesamiento	19
8. Inducción y purificación de la 24RNP recombinante nativa y desnaturalizada	19
9. Construcción de una matriz de anticuerpo-proteína-A sefarosa	21
10. Inmunosustracción	23
11. Elución de la matriz de anticuerpo-proteína-A sefarosa	24

12. Transcripción de RNA para procesamiento <i>in vitro</i>	24
13. Procesamiento de RNA <i>in vitro</i>	26
<b>VI. RESULTADOS</b>	28
1. Especificidad del anticuerpo anti-24RNP	28
2. Selección de hojas con mayor cantidad de 24 RNP	29
3. Preparación del extracto de procesamiento de RNA a partir de hojas de espinaca	30
4. Inmunosustracción	30
A. Primera aproximación para llevar a cabo la inmunosustracción de la 24RNP del extracto de procesamiento: adición del suero inmune crudo al EP	31
B. Segunda aproximación para llevar a cabo la inmunosustracción de la 24RNP: matriz-anticuerpo crudo	35
B.1 Construcción de la matriz	35
B.2 Inmunosustracción empleando la matriz con anti-24RNP crudo	36
B.3 Cuantificación de la 24RNP y de la 28RNP en el extracto de procesamiento	37
B.4 Inmunoprecipitación de la 24RNP recombinante nativa y desnaturalizada empleando la matriz con anti-24RNP crudo	38
C. Tercera aproximación para llevar a cabo la inmunosustracción de la 24RNP del EP: matriz-anti-24RNP concentrado	40
C.1 Inmunoprecipitación de la 24RNP recombinante nativa y desnaturalizada con matriz-anticuerpo-concentrado	40
C.2 Inmunosustracción de la 24RNP del EP	42

5. Funcionalidad del extracto sin la 24RNP	45
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	47
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	51
<b>IX. APÉNDICE</b>	52
<b>X. BILIOGRAFÍA</b>	64



## ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amonio
BSA	Albúmina de suero bovino
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidad óptica
DMP	Dimetil pimelimidato
EP	Extracto de procesamiento de RNA de cloroplasto de espinaca
EIS	Extracto de procesamiento de RNA sin 24RNP
IP	Inmunoprecipitación
IS	Inmunosubstracción
SIR	Secuencias invertidas repetidas
kDa	Kilodaltones
MI	Matriz anti-24RNP-proteína A-sefarosa
MP	Matriz de suero preinmune-proteína A-sefarosa
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
TA	Temperatura ambiente
TBS	Solución Tris-Buffer Salino
TBS-T	Solución Tris-Buffer Salino Tween
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
UTR	Región no traducida

## I. Resumen

El estudio de la regulación de la expresión genética a nivel transcripcional, ha llevado al aislamiento de un complejo de alto peso molecular capaz de procesar los extremos 3' no traducibles (UTR) de mensajes cloroplásticos para generar mensajes maduros (Hayes *et al.*, 1996). En este complejo se encuentra una proteína de 24kDa (24RNP) capaz de unirse al RNA y cuya actividad se desconoce.. Para el estudio de la función de esta proteína, se ha generado un anticuerpo policlonal anti-24RNP (Robles, 2000). Dicho anticuerpo, acoplado a una matriz de proteína A-sefarosa, se utilizó para inmunosubstraer a la 24RNP de un extracto de cloroplastos de espinaca capaz de procesar RNA (EP). En este trabajo se probaron diversas aproximaciones hasta lograr establecer las condiciones óptimas de dicha inmunosubstracción (IS).

La 24RNP es semejante a otra proteína que también se encuentra en el EP, la 28RNP, por lo que se verificó por análisis de Western blot con un anticuerpo anti-24RNP/28RNP que no se inmunosubstrajera a la 28RNP.

Después de la IS, se debía contar con un EP funcional, lo que se corroboró por medio de experimentos de procesamiento *in vitro* del extremo 3'UTR del gen *petD*. El EP conservó su actividad de procesar mRNA después de la IS por lo que será útil en el estudio de la función de la 24RNP.

## I. Introducción

Existen varios puntos de regulación de la expresión genética de cloroplastos, siendo uno de los más importantes el control post-transcripcional. Uno de los mecanismos de regulación incluye el procesamiento de los extremos 3' no traducibles (UTR) de los mensajes cloroplásticos.

Para el estudio de los mecanismo de regulación de la expresión genética de cloroplastos a nivel postranscripcional, se purificó un extracto protéico con capacidad de procesar mRNAs *in vitro* (EP) (Gruissem *et al.*, 1986). Del EP se aisló un complejo de aproximadamente 550 kDa (Hayes *et al.*, 1996) en el que se pudieron identificar algunas proteínas como la 100RNP con actividad de exoribonucleasa, la p67 con actividad de endoribonucleasa así como tres proteínas de bajo peso molecular (RNPs) que pueden unirse al extremo 3' de diferentes mRNAs de cloroplasto. Entre estas proteínas se encuentran una de 24 kDa y otra de 28 kDa. De ellas, la más estudiada es la 28RNP de la cual se ha propuesto que determina el sitio correcto de procesamiento del extremo 3' UTR (Schuster and Gruissem, 1991).

Debido a que la 24RNP presenta gran parecido con la 28RNP, se propuso que su actividad podría ser semejante. Recientemente se han realizado trabajos de procesamiento de extremos 3' UTR con extractos de cloroplasto de espinaca (Toledo, 1998) en los que se intentó inmunosubstraer a la 24RNP y se vió que su actividad podría estar orientada a dar estabilidad general a los RNAs mensajeros. Sin embargo, esto no está plenamente comprobado debido a que estos experimentos se realizaron con un anticuerpo que reconocía tanto a la 24 como a la 28RNP, por lo que en la inmunosubstracción se secuestraron ambas proteínas. Por otra parte, no fue posible construir una matriz con el anticuerpo unido covalentemente por lo que los experimentos de procesamiento se hicieron en presencia del anticuerpo. Dado lo anterior, se decidió primeramente producir otro anticuerpo contra la 24RNP de

espinaca de origen recombinante, con lo que se logró obtener una mayor especificidad (Robles, 2000).

En este trabajo se buscó determinar las condiciones a las que se lograra una eficiente inmunosustracción de la 24RNP del EP de RNA de cloroplasto de espinaca empleando una matriz con el nuevo anticuerpo unido covalentemente y con lo que se mantuviera funcional dicho extracto. El lograr la inmunosustracción de esta proteína permitirá profundizar en el estudio de su función.

### **III. Antecedentes**

#### **1. Plastidios**

Los plastidos son organelos semiautónomos no diferenciados que contienen su propio material genético así como la maquinaria transcripcional y traduccional requerido para su expresión. El DNA plastídico es una cadena doble circular de 120 a 217 Kb, dependiendo de la especie, que codifica aproximadamente 135 genes. La mayoría de los genes localizados en el genoma plastídico codifican productos que están relacionados directa o indirectamente con la fotosíntesis como son proteínas del fotosistema I y II, la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco), ATP sintetasa, o productos involucrados en la expresión de éstos como son proteínas ribosomales, RNAs ribosomales (rRNA), RNAs de transferencia (tRNA), factores de iniciación de la traducción y factores de elongación. Sin embargo, estos genes no son los únicos que el plastidio requiere para la síntesis de proteínas. El resto de genes, localizados en el núcleo, probablemente fueron transferidos por un ancestro endosimbionte del plastidio. Las proteínas codificadas en el núcleo deben ser transportadas al cloroplasto después de ser traducidas y una vez ensambladas con las proteínas codificadas en el plastidio, forman complejos funcionales. Para que esto se lleve a cabo se requiere que haya una expresión coordinada y diferencial de los genes nucleares y plastídicos (Taylor, 1989).

espinaca de origen recombinante, con lo que se logró obtener una mayor especificidad (Robles, 2000).

En este trabajo se buscó determinar las condiciones a las que se lograra una eficiente inmunosustracción de la 24RNP del EP de RNA de cloroplasto de espinaca empleando una matriz con el nuevo anticuerpo unido covalentemente y con los que se mantuviera funcional dicho extracto. El lograr la inmunosustracción de esta proteína permitirá profundizar en el estudio de su función.

### **III. Antecedentes**

#### **1. Plastidios**

Los plastidos son organelos semiautónomos no diferenciados que contienen su propio material genético así como la maquinaria transcripcional y traduccional requerido para su expresión. El DNA plástidico es una cadena doble circular de 120 a 217 Kb, dependiendo de la especie, que codifica aproximadamente 135 genes. La mayoría de los genes localizados en el genoma plástidico codifican productos que están relacionados directa o indirectamente con la fotosíntesis como son proteínas del fotosistema I y II, la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco), ATP sintetasa, o productos involucrados en la expresión de éstos como son proteínas ribosomales, RNAs ribosomales (rRNA), RNAs de transferencia (tRNA), factores de iniciación de la traducción y factores de elongación. Sin embargo, estos genes no son los únicos que el plastidio requiere para la síntesis de proteínas. El resto de genes, localizados en el núcleo, probablemente fueron transferidos por un ancestro endosimbionte del plastidio. Las proteínas codificadas en el núcleo deben ser transportadas al cloroplasto después de ser traducidas y una vez ensambladas con las proteínas codificadas en el plastidio, forman complejos funcionales. Para que esto se lleve a cabo se requiere que haya una expresión coordinada y diferencial de los genes nucleares y plástidicos (Taylor, 1989).

Los plastidios pueden dar origen a otras estructuras que pueden ser clasificadas como fotosintéticas, específicamente cloroplastos, o no fotosintéticas como son amiloplastos (acumulan almidón), cromoplastos (acumulan pigmentos), etioplastos (precursores de cloroplastos en plantas que crecen en la oscuridad). Algunas de estas estructuras, pueden interconvertirse por rediferenciación, un ejemplo claro de esto es el cambio de color de las hojas en la senectud o de los frutos al madurar. De los organelos que se originan de los plastidios, los cloroplastos son los más estudiados (Mullet, 1988, Taylor, 1989).

## **2. Cloroplastos**

Los cloroplastos son organelos fotosintéticos en cuyo desarrollo está involucrado un cambio morfogénico muy importante ocasionado en gran medida por la luz. Estos organelos están rodeados por una membrana externa y otra interna que juntas se conocen como envoltura. Cada membrana tiene de 6-8 nm de grosor y están separadas por un espacio de 10 a 20 nm. La envoltura encierra un compartimento acuoso llamado estroma. La característica más particular de un cloroplasto es la membrana interna que se extiende a través del organelo, llamada membrana tilacoidal que encierra un compartimento acuoso interno llamado lumen. La membrana del tilacoide puede estar distribuida como una serie de lamelas aplanadas que pueden formar apilamientos llamados grana (Audersik, 1996).

El desarrollo de cloroplastos a partir de proplastidios, involucra la activación de un gran número de genes cloroplásticos. Como ya se ha mencionado, muchas proteínas cloroplásticas están codificadas en el núcleo por lo que el desarrollo de este organelo requiere una coordinación de la expresión de genes tanto del núcleo como del cloroplasto (Goldschmidh, 1998).

Los genes del cloroplasto están típicamente organizados en transcritos policistrónicos que deben ser procesados. Este procesamiento puede incluir eliminación de intrones y splicing de exones, cortes endonucleolíticos entre cistrones, modificaciones del extremo 5' y 3'. La regulación de la expresión de los

genes del cloroplasto puede darse a diferentes niveles incluyendo: iniciación de la transcripción, modificaciones postranscripcionales, recambio de los transcritos, eficiencia de la traducción y recambio de las proteínas (Roell, 1996).

### **3. Regulación de la expresión genética de cloroplasto a nivel postranscripcional**

Se ha observado que algunos transcritos mono y policistrónicos sintetizados en cloroplasto están flanqueados en el extremo 3' por una secuencia invertida repetida (SIR) que forma una estructura de "tallo-asa" (Stern *et al.* 1989). Ésta es similar a la estructura involucrada en la terminación de la transcripción en procariontes (Stern and Grussem, 1987) lo cual hizo pensar que podría funcionar en cloroplastos de la misma manera. Experimentos de Stern y colaboradores (1987,1989) demostraron que estos elementos tallo-asa son necesarios para el procesamiento y estabilización de los extremos 3' de mRNAs, ya que actúan como una barrera de protección contra la degradación exonucleolítica previniendo la degradación del mensaje. Sin embargo, la estabilidad de los mRNA de cloroplastos no puede ser medida sólo por la presencia de esta estructura secundaria, ya que la estabilidad de algunos mRNAs no correlaciona con la presencia de esta estructura. Las observaciones realizadas han podido demostrar que además de la estructura de "tallo-asa" existen proteínas involucradas en la estabilidad del extremo 3' de los mRNAs en cloroplastos (Schuster y Grussem, 1991). Específicamente un complejo de aproximadamente 550 kDa en el que se han podido identificar algunas proteínas (100RNP, p67, 55RNP, 33RNP, 28RNP y 24RNP). Se conoce la función de algunas de estas proteínas (Tabla 1), de otras se ha postulado una función y de otras más, no se sabe qué proteínas son (Schuster y Grussem, 1991, Hayes *et al.*, 1996)

**Tabla 1.** Componentes identificados en el complejo de alto peso molecular con capacidad de procesamiento de RNA aislado de cloroplasto

Proteínas	Peso molecular	Homología	Función
100RNP	100 kDa	PNPasa (polinucleótido fosforilasa) de <i>E. coli</i>	3' - 5' exonucleasa
p67	67 kDa	RNAsa E de <i>E. coli</i>	Endoribonucleasa sitio específica
55RNP	55 kDa		Previene el corte de p67 hacia arriba de la estructura tallo-asa
33RNP	33 kDa		Desconocida, podría estar modulando la actividad de la 100 RNP
28RNP	28 kDa		Dirige el procesamiento correcto del extremo 3'
24RNP	24 kDa		Desconocida, probablemente da estabilidad al extremo 3'

#### 4. 24 y 28 RNPs, características y función

En el complejo de alto peso molecular descrito previamente, se encuentran asociadas tres proteínas pequeñas que se unen a RNA (RNPs), de las cuales, la 24RNP y la 28RNP son codificadas en núcleo y sintetizadas en citoplasma, con un péptido de tránsito en su extremo amino terminal que las dirige al cloroplasto, dos dominios consenso de unión a RNA y un dominio ácido amino terminal (Tabla 2) (Schuster y Gruissem 1991).



**Tabla 2.** Comparación de secuencias de la 24 y 28RNPs. Las letras en minúsculas y negritas muestran los residuos ácidos. Las secuencias en negritas muestran las regiones consenso de unión a RNA.

<b>Dominio ácido</b>	
<b>28RNP</b>	VAQTSeWeQ eGSTNAVLeG eSdPeGVSW GSeTQVSdeG VeGGQGFSeP
<b>24RNP</b>	e SIISSSFVRHV RISSe...F eQeedVMGdd AGRQPNFS..
<b>Primer Dominio de unión a RNA</b>	
PEEAK	<b>LFVGNL</b> PYDVDSEKLAG IFDAAGVVEAE VIYNRETDRSR <b>GFGFVTM</b>
.PDLK	<b>IFVGNL</b> PFNDVSAELAG LFGAGTVEMVE VIYDKLTGRSR <b>GFGFVTM</b>
<b>Segundo dominio de unión a RNA</b>	
EPSCR	<b>VYVGNL</b> PEDVDTSRLEQ FSEHGKV VSAR. VVSDREGRSR <b>GFGFVTM</b>
GSSNR	<b>VHVGNL</b> SWKVDDALK. FSETDGV VEAQV IYDRDTGRSR <b>GFGFVTY</b>
	SSEVNVNDA IAALDGQTL DGRAVRVNVA EERPRRAF
	NSANEVNTA IESLDGVDL NGRSIRVTAA ERQRRG..

Dada la similitud entre ambas proteínas se planteó la hipótesis de que su actividad era parecida pero a pesar de su semejanza, parecen tener actividades distintas; mientras que la 28RNP establece el sitio correcto de procesamiento del extremo 3' de mRNAs, la 24RNP parece estar relacionada con proporcionar estabilidad general al mensaje (Toledo, 1998).

Sin embargo, los experimentos realizados por Toledo para sugerir esto, presentaron algunas limitantes ya que el anticuerpo anti-24RNP utilizado, también reconoce a la 28RNP, dificultando la IS específica de la proteína en estudio. Se buscó la forma de contrarrestar este inconveniente y se decidió utilizar este anticuerpo e inmunosubstraer a las dos proteínas y observar el procesamiento de RNA, obteniéndose información acerca de la función de ambas proteínas. Por otra parte, ya que sí se contaba con un anticuerpo específico contra la 28RNP, se hizo la IS de esta proteína del extracto y se observó lo que ocurría con el procesamiento. La

diferencia entre ambos procesamientos, así como la reconstitución del EP con ambas proteínas proporcionó indirectamente sugerencias acerca de la función de la 24RNP.

Otra limitante fue que para inmunosubstraer a la 24RNP y en consecuencia a la 28RNP, el anticuerpo anti-24RNP se adicionó directamente al EP pero no fue posible eliminarlo de éste antes del procesamiento de RNA. Esto tuvo dos consecuencias, por un lado, se estaba adicionando proteína ajena al sistema y por otro este anticuerpo podía estar en exceso y por tanto estar disponible para reaccionar con la proteína 24RNP y/o 28RNP recombinantes al momento de la reconstitución del extracto. Por lo anterior, se plantearon nuevos controles que consistieron en hacer procesamientos utilizando EP tratados con diferentes cantidades de suero preinmune para verificar que éste no interviniera de alguna forma en el procesamiento. En cuanto a la reconstitución del sistema con la 24RNP o la 28RNP recombinantes, éstas se agregaron en exceso al EP inmunosubstraído (15 a 30 veces la cantidad determinada en el EP) buscando que de esta forma una parte de las proteínas reaccionara con el anticuerpo que pudiera estar en exceso y otra parte quedara disponible para llevar a cabo su función. En cuanto a éste último punto, la determinación de la cantidad de 24RNP y 28RNP en el EP, se hizo comparando visualmente las señales obtenidas por Western blot de la proteína recombinante respecto a la proteína presente en el EP, lo que podría mejorarse con un densitograma.

Aún cuando con los experimentos mencionados se obtuvo información importante, las observaciones acerca de la función de la 24RNP deben ser corroboradas con nuevos experimentos en los que se emplee EP inmunosubstraído con el anticuerpo anti-24RNP de forma tal que la única variante del extracto inmunosubstraído respecto al extracto sin inmunosubstraer sea la ausencia de la 24RNP.

En el laboratorio se han producido anticuerpos contra la 24RNP. Si bien éstos mostraron su eficiencia en el reconocimiento de hasta 20 ng de 24RNP recombinante por el método de Western blot (Robles, 2000), lograr la IS completa

de la 24RNP del EP, es algo más complicado, pues en este caso las proteínas del EP no han sido desnaturalizadas, separadas y transferidas a un soporte inerte. La IS no se trata del reconocimiento una proteína localizada en un lugar específico de una membrana, sino del reconocimiento de una proteína en su conformación nativa inmersa en un extracto donde existen otras proteínas y donde la 24RNP es minoritaria.

## **5. Inmunosubstracción como método de estudio de proteínas**

Existen diversos enfoques para la caracterización y estudio de la función de proteínas, como son, expresión de proteínas recombinantes complementación de mutantes con genes obtenidos de organismos heterólogos, sobreexpresión de genes, genes en antisentido, etc. Algunas de las técnicas mencionadas, permiten el estudio de la función *in vivo*, sin embargo no siempre se cuenta con los modelos ni herramientas adecuadas para llevarlos a cabo. De las técnicas utilizadas para estudios *in vitro*, la inmunosubstracción es una de las más útiles, pues por un lado permite aislar proteínas para su posterior caracterización y por otro, permite concluir acerca de la función de ellas al observar un fenómeno de interés en ausencia de la proteína en estudio y reconstituyendo el sistema con una proteína recombinante.

Ejemplos de ello son el estudio de la función de la 28RNP (Lisitsky, 1995), la caracterización y purificación de la sacarosa sintasa de arroz (Huang, 1998) la caracterización de una cinasa dependiente de calcio NiCDPK1 (Yoon, 1999).

### III. Objetivos

#### Objetivo general

Establecer las condiciones de inmunosustracción específica de la proteína 24RNP a partir de un extracto de procesamiento de RNA de cloroplasto de espinaca.

#### Objetivos particulares

1. Determinar en qué etapa de desarrollo de las hojas de espinaca se da la máxima expresión de la 24RNP.
2. Determinar la cantidad de 24RNP presente en el extracto de procesamiento.
3. Establecer las condiciones de inmunoreconocimiento de la 24RNP recombinante nativa y desnaturalizada y emplearlas para la IS de la 24RNP del EP.
4. Analizar por Western blot si hay coimmunosustracción de la 28RNP.

### IV. Materiales y métodos

#### 1. Selección de hojas de espinaca de diferentes tamaños

Se seleccionaron hojas de espinaca fresca. Se clasificaron en etapas de acuerdo a su tamaño, siendo las hojas más pequeñas las más jóvenes. La clasificación de las hojas se hizo de acuerdo al siguiente criterio:

Etapa	Longitud (cm)
1	Hasta 4.0 (hojas envueltas alargadas)
2	3.5 - 5.5 (hojas medio desenrolladas)
3	5.6 - 7.5 (hojas medio alargadas)
4	7.0 - 9.0
5	9.1 - 11
6	11.1 - 14
7	14.1 - 15
8	> 15

### III. Objetivos

#### Objetivo general

Establecer las condiciones de inmunosubstracción específica de la proteína 24RNP a partir de un extracto de procesamiento de RNA de cloroplasto de espinaca.

#### Objetivos particulares

1. Determinar en qué etapa de desarrollo de las hojas de espinaca se da la máxima expresión de la 24RNP.
2. Determinar la cantidad de 24RNP presente en el extracto de procesamiento.
3. Establecer las condiciones de inmunoreconocimiento de la 24RNP recombinante nativa y desnaturalizada y emplearlas para la IS de la 24RNP del EP.
4. Analizar por Western blot si hay coimmunosubstracción de la 28RNP.

### IV. Materiales y métodos

#### 1. Selección de hojas de espinaca de diferentes tamaños

Se seleccionaron hojas de espinaca fresca. Se clasificaron en etapas de acuerdo a su tamaño, siendo las hojas más pequeñas las más jóvenes. La clasificación de las hojas se hizo de acuerdo al siguiente criterio:

Etapa	Longitud (cm)
1	Hasta 4.0 (hojas envueltas alargadas)
2	3.5 - 5.5 (hojas medio desenrolladas)
3	5.6 - 7.5 (hojas medio alargadas)
4	7.0 - 9.0
5	9.1 - 11
6	11.1 - 14
7	14.1 - 15
8	> 15

Una vez seleccionadas, una parte se congeló con nitrógeno líquido y otra se empleó para hacer extractos de proteína total.

## **2. Extracción de proteínas de tejidos vegetales**

1. Preparar buffer de extracción (ver apéndice ). Añadir inhibidores de proteasas y  $\beta$ -mercaptoetanol. Emplear una proporción de tejido:buffer de extracción de 1:1.5.
2. Enfriar los morteros a  $-20^{\circ}\text{C}$  y preparar recipientes con hielo y nitrógeno líquido.
3. Pesar 1.5 g de hojas de espinaca previamente seleccionadas y lavadas.
4. Colocar el tejido en el mortero y agregar nitrógeno líquido. Hacer la molienda con la mano del mortero hasta obtener un polvo fino. Mantener el tejido congelado durante todo el proceso de molienda agregando nitrógeno líquido las veces que sean necesarias.
5. Agregar el buffer de extracción frío cuando se tenga un polvo fino y aún congelado.
6. Dejar descongelar lentamente. Inmediatamente después colocar el extracto en un tubo eppendorf frío y centrifugar en una microcentrífuga a 5000 rpm 10 s a  $4^{\circ}\text{C}$ .
7. Recuperar el sobrenadante y ponerlo en un tubo limpio, etiquetado y previamente enfriado.
8. Reservar alícuotas de 10  $\mu\text{l}$  del extracto en otros tubos para realizar la medición de proteínas.
9. Congelar el extracto con nitrógeno líquido y almacenar  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## **3. Cuantificación de proteínas (Bradford)**

Se midió la cantidad de proteínas de los extractos con los que se trabajó pues por la naturaleza del trabajo, era indispensable manejar la misma cantidad de muestra en los diferentes experimentos. Dicha medición se hizo con el reactivo de

Bradford (BioRad, Cat. 500-0006) que da una reacción colorida que se mide espectrofotométricamente a 595 nm.

1. Preparar una curva estándar empleando una solución de 1 mg/mL de BSA

$\mu\text{L}$ BSA (1 mg/mL)	$\mu\text{L}$ de agua
1	799
3	797
7	793
10	790
12	788

2. Preparar las muestras, haciendo tres puntos para cada una como sigue:

$\mu\text{L}$ de muestra	$\mu\text{L}$ de agua
1	799
2	798
3	797

3. Agregar 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford a cada uno y agitar perfectamente.
4. Leer en el espectrofotómetro a 595 nm.
5. Graficar los resultados para determinar la linealidad del ensayo.
6. Hacer la regresión lineal de los puntos de la curva estándar. Con la ecuación obtenida y la absorbancia promedio de cada muestra, calcular los  $\mu\text{g}$  de proteína por  $\mu\text{L}$  de muestra, utilizando la fórmula:  $A = C m + b$

Donde:

A = absorbancia

C = concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )

m = pendiente

b = ordenada al origen

#### 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (PAGE-SDS)

1. Hacer geles con separadores de 1 mm con la siguiente composición (ver apéndice).

Gel separador

	% de acrilamida	
	12%	15%
Agua	1.4 mL	1.0 mL
Buffer separador	1.0 mL	1.0 mL
Acrilamida	1.6 mL	2.0 mL
Persulfato de amonio 20%	25 µL	25 µL
TEMED	2.5 µL	2.5 µL

Gel apilador

Agua	1 mL
Buffer apilador	444 µL
Acrilamida	300 µL
Persulfato de amonio 20%	20 µL
TEMED	5 µL

3. Colocar las muestras previamente cuantificadas en tubos eppendorf y agregar buffer de carga 5X hasta una concentración final 1X.
4. Hervir las muestras durante 5 min
5. Cargar las muestras en los pozos de los geles previamente montados en el casting del equipo Mini-protean II (BioRad). El cual se coloca en el tanque del buffer de corrida. El buffer se debe agregar a una concentración 1X.
6. Correr las muestras a 20 mA hasta que se apilen y una vez que entran al gel separador se corren a 100 V. El tiempo de corrida depende de la concentración del gel y de las muestras.



7. Al finalizar la electroforesis los geles pueden ser teñidos con azul de Coomassie durante 20 min y lavados con solución fijadora y desteñidora o ser transferidos a membranas de PVDF o nitrocelulosa para hacer Western blots.

## 5. Western blot

1. Preparar el buffer de transferencia sin metanol (ver apéndice ) con anticipación y mantenerlo en refrigeración hasta su uso. Añadir el metanol al momento de utilizar el buffer.
2. Después de la electroforesis enjuagar el gel en buffer de transferencia para preequilibrarlo.
3. Cortar seis trozos de papel filtro Whatmann 3MM de 7 x 9 cm y una de PVDF de 8.5 x 6 cm. Hidratar la membrana añadiendo metanol durante 5 segundos y después añadir agua hasta observar que la membrana se humedece completamente.
4. Colocar el buffer de transferencia enfriado y con el metanol en una charola, dentro de la que se ensambla la transferencia. Colocar el cassette (gel holder) en el recipiente y sobre éste: una fibra, tres cuadros de papel filtro, la membrana, el gel, tres cuadros de papel filtro, una fibra. Cerrar el cassette y colocarlo en el electrodo mini Trans-Blot en la orientación correcta para que se lleve a cabo la transferencia.
5. Instalar el electrodo en el tanque del buffer. Llenar éste hasta la mitad con buffer de transferencia e introducir una barra magnética. Colocar la unidad de enfriamiento Bio-Ice previamente congelada en el tanque .
6. Hacer la electrotransferencia a voltaje constante de 100V y 250 mA durante 1 h con agitación.
7. Después de la transferencia, enjuagar la membrana con TBS-T (0.1%) para quitar la acrilamida pegada a la membrana.
8. Bloquear la membrana en TBS con 5% de leche durante 1 h a temperatura ambiente (TA) y con agitación.

9. Agregar el primer anticuerpo diluido en TBS con leche 5%. Incubar a 37° con agitación durante 2 h. La dilución a la que se emplea el anticuerpo anti-24RNP es 1:15,000 mientras que la del anti-24RNP/28RNP es 1:20,000.
10. Quitar el primer anticuerpo y lavar la membrana con 20 mL de TBS-T. Hacer un lavado rápido y dos de 15 min con agitación.
11. Añadir el segundo anticuerpo (anti-IgGs de conejo acoplado a peroxidasa de rábano) diluido en TBS y leche 5% a una concentración 1:2000. Incubar durante 2 h a TA.
12. Eliminar el segundo anticuerpo y hacer tres lavados a la membrana con TBS-T. Un lavado rápido y los otros dos de 15 min cada uno y con agitación.
13. Revelar por medio de una reacción de quimiluminiscencia empleando los reactivos de ECL (Amersham Pharmacia Biotech RPN 2106).

## **6. Preparación de un extracto de cloroplastos de espinaca con capacidad de procesamiento de RNA**

Este protocolo es modificado del *Protocol for isolation of spinach chloroplasts and preparation of transcription extract* del Laboratorio del Dr. Gruissem U.C. Berkeley.

Preparar la noche antes y almacenar a 4°C (ver apéndice)

1. GR 1X
2. PCBF
3. Se pueden preparar los tubos con la fracción de 40% de Percoll y dejarlos en el cuarto frío. La fracción de 80% se coloca inmediatamente antes de correr el gradiente.
4. Buffer A y B
5. Buffer de cromatografía DE-52
6. Buffer E
7. Remojar 10 g de la matriz de cromatografía DE-52 en el buffer de equilibrio

8. Moler 10 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a polvo fino en un mortero

El día del procedimiento

1. Comprar 1.5 kg de espinaca fresca. Cosechar 400 a 600 g de láminas foliares de hojas jóvenes (menos de 7.5 cm sin pecíolo). Quitarles el pecíolo y las nervaduras más gruesas, lavarlas con agua fría, quitarles el exceso de agua. Pesar porciones de entre 60 y 80 g y llevarlas al cuarto frío.
2. Tomar las porciones, cortarlas en trozos más chicos con tijeras y molerlas en una licuadora con 150 mL de GR 1X frío. Dar 3 o 4 pulsos cortos y uno largo de aproximadamente 10 s.
3. El homogenado se filtra a través de 8 capas de gasa previamente humedecida en agua desionizada estéril fría y exprimida lo más posible. La gasa se satura rápidamente por lo que hay que tener varias capas de manta listas. El extracto debe ser colectado en un vaso de precipitado estéril de 1 L. Después de que pasa todo el homogenado, la manta de cielo es exprimida para colectar lo más posible de líquido y reteniendo a los restos celulares que después son desechados. Tomar alícuotas del extracto al final en este paso. Medir el volumen obtenido, clorofila y proteína.
4. El filtrado es centrifugado a 6000 rpm en un SS34 (rotor de columpio) ó a 8000 rpm en un JA-20 (rotor de ángulo fijo) por 5 min a 4°C en tubos de plástico opaco de 50 mL en volúmenes sobrepuestos (poner 50 mL por tubo, centrifugar, quitar el sobrenadante (SN) y agregar otros 50 mL en el mismo tubo). Para no perder muchos cloroplastos de la pastilla se recomienda decantar el SN lentamente y no totalmente para evitar que se venga parte de ésta. Al final de las centrifugaciones quitar el SN con una pipeta de 10 mL estéril para evitar que la pastilla se despegue. Tomar alícuota del SN, medir el volumen obtenido, clorofila y proteína.
5. Resuspender las pastillas y juntarlas en el mínimo volumen de buffer (32 mL es lo adecuado para 4 tubos de gradiente, pero si no se deshacen los grumos es

mejor emplear más buffer) empleando un pincel de cerdas suaves. Hacerlo suavemente y deshacer todos los grumos ya que luego afectan el gradiente. Tomar alícuotas de esta fracción, medir el volumen obtenido, clorofila y proteína.

6. Para separar los cloroplastos intactos se emplean gradientes discontinuos 80-40% de percoll (adaptación del protocolo de *Arabidopsis*). Se carga cuidadosamente con 6 a 8 mL de la preparación de cloroplastos y se colocan en un rotor de columpio (HB4) o en uno de ángulo fijo (JA20). Se centrifugan a 7000 rpm a 4°C por 20 min, sin freno para que el rotor se pare lentamente. Los cloroplastos intactos se localizarán en la banda inferior.
7. Las bandas de cloroplastos rotos e intactos son recuperadas por separado empleando una pipeta Pasteur y colectadas en tubos Corex estériles o de 50 mL de plástico transparente estériles. Se colocan todas las fracciones correspondientes de todos los gradientes juntas.
8. La fracción de cloroplastos intactos (y también rotos) es aislada en aproximadamente 15-18 mL de cuatro gradientes (esto puede variar dependiendo de con cuanto tejido se empieza y de cuantos gradientes son necesarios). Los cloroplastos son lavados llenando el tubo con GR 1X y centrifugando a 6000 rpm por 1-2 min a 4°C en un rotor SS34 o a 8000 rpm por 5 min en un rotor JA20. Aspirar el buffer después de este lavado. Este buffer debe quedar claro si los cloroplastos no se rompen
9. Resuspender los cloroplastos en 6 mL de buffer A y colocarlos en un homogeneizador de vidrio con émbolo. Tomar alícuotas de esta fracción, determinar el volumen obtenido clorofila y proteína. Lisar los cloroplastos dando 10 golpes con el émbolo. Dejar sobre hielo por 5 min y dar otros 10 golpes para asegurar la lisis completa. En este punto la preparación se puede guardar en un tubo Falcon de 15 mL estéril a -80°C o continuar con el paso siguiente.
10. Pasar la preparación a un vaso de precipitado de 50 mL. La lisis de los cloroplastos puede observarse en un microscopio antes y después de la

homogeneización. Después de la lisis los cloroplastos no se ven tan refráctiles. Agregar 7 mL de Buffer B y un mosca para agitar. Cortar la mezcla con 2.3 mL de una solución de sulfato de amonio saturada, agregando gota a gota a la solución. Agitar la mezcla a 4°C por 30 min.

11. Centrifugar por 2 h a 4°C y 50,000 rpm (234,780 xg) en un rotor 80Ti, sin freno, en tubos de pared gruesa de policarbonato (13.5 mL). Se puede usar el 75Ti pero centrifugando 2 h a 54,000 rpm, 4°C, sin freno (tarda 1.5 horas en parar). Para el tubo de balance, llenarlo aproximadamente 2/3 con buffer B y luego con agua.
12. Mientras tanto, preparar la columna con la resina DE-52 previamente hinchada con el buffer de cromatografía. Antes de llenar la columna, aspirar las partículas finas que están en el sobrenadante después de haber dejado decantar la resina. Repetirlo tres veces. Con esta resina, se empaca una columna de plástico de 5 mL, la cual se lava con 30 mL del buffer D.
13. Después de la centrifugación del paso 11, tomar el SN y colocarlo sobre la columna y después de eluir 1 mL de buffer (volumen vacío), iniciar la colecta de la muestra. Agregar otros 2 mL de Buffer D a la columna y recoger todo el volumen (15 mL). Esta columna es para quitar ácidos nucleicos.
14. Precipitar las proteínas agregando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  finamente pulverizado a una relación de 0.28 g/mL de muestra. Agregar el polvo lentamente. Agitar la solución por 30 min a 4°C hasta que el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  esté completamente disuelto.
15. Centrifugar la muestra en un rotor de columpio AH627 en tubos de 17 mL por 20 min a 25,000 rpm (116,000 xg al radio máximo), sin freno al final. En el rotor SW40Ti 116,000 xg equivalen a 25,561 rpm. Drenar los tubos cuidadosamente, limpiando la parte interior de líquido.
16. Resuspender el pellet en 800  $\mu\text{L}$  de buffer E. Lavar el tubo con 200 mL adicionales de Buffer E para dar un volumen final de muestra de 1 mL.
17. Dializar la muestra 13 h en contra de 1 L de Buffer E. Cambiar el buffer de diálisis y dializar la muestra por 3 h más en contra de otro litro de Buffer E.

18. Resuspender la muestra de la bolsa de diálisis y centrifugar por 10 min a 12,500 rpm en una microcentrífuga para remover las proteínas precipitadas. Tomar alícuotas de 50  $\mu$ L congelarlas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **7. Determinación de la cantidad de 24RNP y 28RNP presente en el extracto de procesamiento**

Para determinar la concentración de la 24RNP y de la 28RNP se corrieron 8.0, 16 y 32  $\mu$ g de EP y 10, 20, 40, 60 y 80 ng de 24RNP o de 28RNP recombinante desnaturizada en un SDS-PAGE. Se comparó la cantidad de 24RNP o 28RNP del EP con la proteína recombinante por densitometría empleando el programa Molecular Analyst (BioRad).

## **8. Inducción y purificación de 24RNP recombinante nativa y desnaturizada**

El cDNA de la 24RNP, se encuentra clonado en el vector de expresión pQE que genera una proteína recombinante fusionada a una secuencia de histidinas en el extremo amino. Este vector da un alto nivel de expresión de proteínas en *Escherichia coli* (Toledo, 1998). La inducción de la proteína es posible mediante el uso de un inductor (IPTG) ya que el gen está clonado bajo el promotor del operón de lactosa. La purificación de la proteína se basa en la utilización de una resina de Co-NTA o Ni-NTA con una alta afinidad por las histidinas.

El vector se purificó y se transformó *E. coli*, cepa M15, que tiene fusión con el plásmido represor pREP4 que mantiene la expresión inhibida hasta que se añade IPTG. La expresión se indujo a gran escala con el siguiente protocolo:

1. Inocular 1 colonia transformada con PQE-24RNP en 50 mL de medio LB con ampicilina 100  $\mu$ g/mL y kanamicina 25  $\mu$ g/mL. Dejar creciendo a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación vigorosa hasta una  $D.O_{600}$  de 0.7 (aproximadamente 5 h).
2. Inocular en 2 L de medio LB más antibióticos 40 mL del cultivo (relación cultivo: medio fresco de 1:50).

3. Dejar crecer las bacterias hasta alcanzar una  $D.O_{600} = 0.4$  (aproximadamente 3 h) a 33°C con agitación.
4. Inducir la expresión añadiendo IPTG hasta una concentración final de 0.5 mM. Dejar crecer durante la noche (10 h) a 28°C con agitación.
5. Colectar las bacterias centrifugando a 1000 – 3000 xg por 15 min a 4°C y resuspender en 2 mL de buffer de lisis o de sonicación por cada 20 mL de cultivo inicial.
6. Congelar las bacterias con nitrógeno líquido y guardarlas a -70°C para su procesamiento posterior.
7. Descongelar las bacterias y lisarlas con buffer de lisis a TA por 1 h.
8. Centrifugar el lisado a 12000 xg durante 20 min a 4°C y colectar el sobrenadante.
9. Incubar el sobrenadante 12 h a 4°C con la resina Co-NTA (Clontech PT1320-1) previamente equilibrada por 1 h con buffer de lisis. La cantidad de resina que se utiliza es 2 mL por cada 5 mg de proteína etiquetada esperada.
10. Centrifugar 5 min a 700 xg y quitar la mayor cantidad de sobrenadante posible, cuidando de no tomar la resina.
11. Lavar la resina durante 10 min añadiendo 10 volúmenes de buffer de lisis. Hacer 10 lavados.
12. Eluir la proteína de la resina con un gradiente discontinuo de imidazol (50, 100 y 150 mM). Cada elución se debe hacer con la cantidad de imidazol equivalente a un volumen de resina. Para verificar en qué fracción se eluye la proteína, cargar alícuotas de 20 µL de cada fracción en un gel desnaturante de acrilamida al 12%.

Para la obtención de la proteína nativa, seguir el mismo procedimiento hasta el punto 6 y a continuación:

7. Descongelar las bacterias en un baño de hielo y sonicar a 200W con pulsos de 1 min en hielo y 1 min de sonicación. Dar 5 ciclos de 1 minuto.

8. Centrifugar a 10000 –12000 xg durante 20 min a 4°C.
9. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio cuidando de no tomar el pellet.
10. Incubar el sobrenadante con la resina Co-NTA (Clontech PT1320-1) previamente equilibrada durante 1h con buffer de sonicación. La cantidad de resina que se utiliza es 2 mL por cada 5 mg de proteína etiquetada esperada. Llevar a cabo la incubación durante 12 h a 4°C.
11. Lavar la resina durante 10 min añadiendo 10 volúmenes de buffer de lisis. Hacer 10 lavados.
12. Eluir la proteína con un gradiente de imidazol (50, 100 y 150 mM). Cada elución se hace con la cantidad de imidazol equivalente a un volumen de resina. Verificar en un gel de acrilamida desnaturalizante al 12% en qué fracción se eluye la 24RNP.

## **9. Construcción de una matriz de anticuerpo-proteína A-sefarosa**

La proteína A tiene una alta afinidad por las IgGs, especialmente por las de conejo, es por ello que se emplea frecuentemente para unirse a anticuerpos de este tipo. La proteína A comercial se encuentra unida a un soporte inerte de alto peso molecular como la agarosa o la sefarosa lo que permite manejarla con facilidad.

Es posible preparar columnas o matrices en la que se une covalentemente un anticuerpo a la proteína A-sefarosa por medio del dominio Fc del anticuerpo con ayuda de un reactivo bifuncional, dimetilpimelimidato (DMP). Para un mayor rendimiento, es importante que estas matrices tengan a la proteína A-sefarosa saturada con IgGs. Sin embargo debido a que es muy difícil determinar la cantidad de IgGs presentes en un suero, se partió del dato teórico de que existen en promedio 10mg IgGs/ml de suero (Harlow, 1989). Se construyeron matrices con suero inmune anti-24RNP y preinmune que se empleó como control.

1. Incubar el suero con la proteína A-sefarosa en una relación 2:1 durante 12 hrs a 4°C con agitación.



2. Lavar con 10 volúmenes de borato de sodio 0.2 M pH 9.0. Centrifugar a 14,000 rpm durante 35 s. Eliminar el sobrenadante y dar un segundo lavado igual que el primero.
3. Resuspender la resina en 10 volúmenes de borato de sodio y tomar 20  $\mu$ L de la mezcla. Esta alícuota se utiliza como control para analizarlo en un gel de acrilamida al 12%.
4. Sobre la suspensión de la resina, añadir dimetilpimelimidato (DMP) sólido a una concentración final de 20 mM.
5. Incubar 2 h con agitación a temperatura ambiente para llevar a cabo el acoplamiento. Pasado este tiempo tomar 20  $\mu$ L de la suspensión para utilizar como control en un gel de acrilamida al 12%.
6. Detener la reacción lavando la resina durante 5 minutos con etanolamina 0.2 M pH 8.0.
7. Centrifugar a 14,000 rpm durante 35 s. Eliminar el sobrenadante y añadir otros 4 volúmenes de etanolamina. Agitar a T<sub>A</sub> durante 2 h.
8. Centrifugar 35 s a 14 000 rpm y eliminar el sobrenadante.
9. Resuspender la matriz en PBS con azida de sodio al 0.01%. El volumen final al que se lleva debe ser igual al volumen del que se partió.
10. Guardar a 4°C hasta su uso.

Las muestras tomadas antes y después de añadir el DMP (pasos 3 y 5) son controles que se utilizan para hacer un SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie y verificar que se llevó a cabo el acoplamiento. En el carril con las muestras de la resina antes de añadir DMP debe observarse una banda de 55 kDa correspondiente al anticuerpo. Esta banda debe desaparecer en el carril de las muestras de resina después de añadir el DMP.

## **10. Inmunosubstracción**

### **a) Adicionando el suero directamente sobre el EP**

1. Incubar el EP (160  $\mu$ g) con el suero (cantidades variables) a 4°C por 12 h con agitación.
2. Añadir 5  $\mu$ L de proteína A-sefarosa al extracto para quitar a las IgGs del extracto, incubar durante 1 h a TA con agitación.
3. Centrifugar a 14,000 rpm durante 1 min. En caso de que se hagan varias incubaciones del EP con diferentes alícuotas de anticuerpo, entre cada uno se debe poner proteína A y centrifugar.
4. Separar el sobrenadante de la resina con una micropipeta y guardar ambas fracciones. El sobrenadante es el extracto de procesamiento del que se inmunosubstrajo la proteína.
5. Para verificar que ha llevado a cabo la IS en la muestra en la que se usó anti-24RNP, hacer un Western blot cargando una alícuota del extracto inmunoprecipitado con suero inmune, con suero preinmune y un extracto sin inmunoprecipitar.

Se debe considerar que al añadir suero sobre el extracto éste se está diluyendo por lo que se deben hacer los cálculos pertinentes para saber qué cantidad de muestra cargar para que sea comparable al extracto de procesamiento. Esta estimación se hace cuantificando las proteínas como se describió previamente antes de hacer el Western blot .

### **b) Utilizando una matriz de Anticuerpo-proteína A-sefarosa.**

Añadir la matriz Anticuerpo-proteína A-sefarosa al extracto que se deseaba inmunosubstraer. Incubar a 4°C con agitación. Centrifugar el extracto a 14000 rpm durante 1 min para eliminar la matriz del extracto. Hacer lo anterior con la matriz anti-24RNP y con la matriz preinmune. Analizar los extractos inmunosubstraídos por Western Blot.

## 11. Elución de la matriz de anticuerpo-proteína A-sefarosa

1. Lavar la resina con 10 volúmenes de buffer A (ver apéndice) y centrifugar a 14,000 rpm durante 35 s. Descartar el sobrenadante.
2. Lavar la resina con 10 volúmenes de buffer B y centrifugar a 14,000 rpm durante 35 s. Descartar el sobrenadante.
3. Añadir 5 volúmenes de buffer de elución, hervir durante 5 min. Añadir buffer de carga y hervir otros 5 min para luego cargar en un gel de acrilamida 15%.

## 12. Transcripción de RNA para procesamiento *in vitro*

Este protocolo es adaptado del *In vitro Processing of RNA and analysis of RNA:Protein interactions by UV-crosslinking* por Gadi Schuster y Wilhelm Gruissem del curso de Cold Spring Harbor, 1990.

1. Digerir el DNA del plásmido con la enzima de restricción apropiada. La concentración final del DNA linearizado debe ser de 200 µg/mL. En este caso se deberá cortar con XbaI. (P2\* contiene el 3' UTR del gen *petD* de espinaca entre los sitios Xba I y Xho I)
2. En un tubo eppendorf combinar (ver apéndice):

DNA plasmídico (0.4µg)	2 µL
Buffer de reacción 5X (incluido con la enzima)	4 µL
DTT 40 mM	0.5 µL
rNTPs 10X	2 µL
H <sub>2</sub> O para	9 µL
Rnasin	0.5 µL
3. Adicionar 2 µL de alfa-<sup>32</sup>P-UTP
4. Agregar 0.5 a 1 µL (10-20 U) de SP6 o T7 RNA polimerasa dependiendo del promotor bajo el cual esté clonado el gen a transcribir (el plásmido P2\* tiene el 3' de *petD* clonado bajo el promotor T7)
5. Incubar a 37°C (T7) o 40°C (SP6) durante 45 a 60 min (revisar las condiciones especificadas para cada enzima en el protocolo correspondiente).

6. Adicionar 15  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{OAc}$  5M (u 8  $\mu\text{L}$  de 7.5 M) y 100  $\mu\text{L}$  de etanol
7. Incubar durante 10 min a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , centrifugar 10 min en microcentrifuga a máxima velocidad. Quitar el etanol, dejar secar y adicionar 7 $\mu\text{L}$  de colorante (formamida).
8. Hervir las muestras por 3 minutos. Ponerlas en hielo. Cargar las muestras en un gel de acrilamida-urea (5%).
9. Correr el gel a 1000 V (aprox 25 mA) hasta que el colorante llegue al extremo inferior del gel.
10. Colocar el gel sobre un vidrio y cubrirlo con plástico autoadherible. Exponerlo a una película fotográfica (aproximadamente 20 seg) a la que previamente se le hacen algunas muescas en los bordes. Mientras se expone, marcar sobre el plástico la posición de la película. Revelarla. Después de revelada, colocarla bajo el vidrio haciéndola coincidir con las marcas.
11. Cortar la banda del gel que contiene el RNA radiactivo sintetizado y colocarla en un tubo eppendorf de 1.5 mL
12. Añadir al tubo:
 

$\text{H}_2\text{O}$ con DEPC	180 $\mu\text{L}$
$\text{NaOAc}$ 3 M [pH 5.5] tratado con DEPC	20 $\mu\text{L}$
EDTA 0.25 M tratado con DEPC	1 $\mu\text{L}$
SDS 20%	1 $\mu\text{l}$
13. Incubar a  $65^\circ\text{C}$  durante 1-1.5 h o a  $4^\circ\text{C}$  durante toda la noche.
14. Recuperar el buffer de elución. Añadir 500 $\mu\text{L}$  de etanol. Poner el tubo a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  durante 15 min.
15. Recuperar el RNA precipitado centrifugando en una microcentrifuga por 20 min a máxima velocidad. Dejar secar la pastilla en speedvac y resuspenderlo en 20  $\mu\text{L}$  de agua tratada con DEPC. Utilizar 2  $\mu\text{L}$  para medir cuentas Cerenkov. Usar esta solución para el análisis de procesamiento.

### 13. Procesamiento de RNA *in vitro*.

Para llevar a cabo el procesamiento, se empleó *petD*, que codifica la subunidad IV del complejo citocromo *b6/f*, pues se cuenta con su extremo 3'UTR subclonado en pBS. El RNA precursor que codifica es de 267 nucleótidos, de los cuales 70 corresponden a la región codificante y 58 a la SIR. El producto procesado es de 209 nucleótidos.

Este protocolo es adaptado del *In vitro Processing of RNA and analysis of RNA:Protein interactions by UV-crosslinking* por Gadi Schuster y Wilhelm Grissem del curso de Cold Spring Harbor, 1990.

1. En un tubo eppendorf de 1.5 mL combinar lo siguiente (ver apéndice):

Buffer IVT 20X	0.5 $\mu$ L
CPE 20 $\mu$ g	L $\mu$ L
Buffer E	M $\mu$ L (L + M = 5 $\mu$ L)
H-RNA ~0.25 fmol, 2000 cpm	X $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	Y $\mu$ L (X + Y = 4.5 $\mu$ L)
Total	10 $\mu$ L

Concentración final en la mezcla:

HEPES (pH 7.9)	10 mM
KCl	40 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
EDTA	0.05 mM
DTT	3 mM
Glicerol	8.5%

2. Incubar a 25 °C (o a TA) por 60 min (o de 0 a 60 min para cinética). Iniciar la reacción agregando el EP, mezclar suavemente y dar un pulso de centrifugación a la muestra de reacción en una microcentrífuga.

Los tiempos apropiados para realizar la cinética son; 2.5, 5, 10, 20, 40 y 60 min. Tomar siempre un tiempo cero y/o un control sin proteína.

3. Parar la reacción tomando 5  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción y llevarla a 45  $\mu\text{L}$  de solución para parar la reacción, mezclar y mantener en hielo.
4. Agregar 50  $\mu\text{L}$  de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar y centrifugar 2 min a TA. Remover la fase acuosa (roja, arriba) a un tubo limpio y descartar el fenol.
5. Agregar 1  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio (3 M, pH 5.5), 1  $\mu\text{L}$  de tRNA (10 mg/ml) y 125  $\mu\text{L}$  de etanol frío. Incubar 10 min a  $-20^{\circ}\text{C}$  y centrifugar 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
6. Cuidadosamente remover el etanol, secar la pastilla por 5 min en el speedvac, lavar la pastilla con 10  $\mu\text{L}$  de EtOH 70%. Disolver la pastilla de RNA en 7  $\mu\text{L}$  de colorante (formamida).
7. Antes de cargar el gel, hervir las muestras por 3 min, colocar en hielo mientras se cargan en el gel.

## VI. Resultados

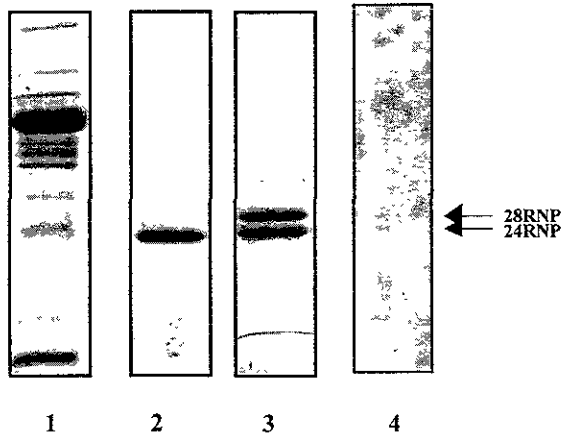
Dado el objetivo planteado en este trabajo, las diferentes aproximaciones para lograrlo fueron diseñadas en función a los resultados que se iban obteniendo. A continuación se resumen las diferentes estrategias empleadas.

1. Primera aproximación para llevar a cabo la IS: adición de suero inmune crudo al EP. Se añadió suero inmune (SI) directamente al EP y se utilizó como control EP con suero preinmune (SP). Se eliminaron los anticuerpos del extracto con proteína A-sefarosa. Se analizó por Western blot al extracto inmunosubstraído de la 24RNP (EIS) así como el anticuerpo y la 24RNP luego de ser eluidos de la proteína A-sefarosa.
2. Segunda aproximación para llevar a cabo la IS: matriz-anticuerpo crudo. Se hizo una matriz con el suero inmune o preinmune unidos covalentemente a proteína A-sefarosa. De esta forma se adicionaron al EP sólo IgGs. Se probó la IP de la 24RNP del EP con diversas cantidades de esta matriz.
3. Al no lograr la IS, había que descartar la posibilidad de que el anticuerpo no reconociera a la 24RNP nativa. Para esto, se realizó una IP con 24RNP recombinante nativa y desnaturalizada. Después de la IS se analizó por Western blot el sobrenadante. El anticuerpo reconoció a las dos proteínas
4. Tercera aproximación para llevar a cabo la IS: matriz-anticuerpo concentrado. Se preparó una nueva matriz utilizando un anti-24RNP concentrado (precipitado con sulfato de amonio) y otra matriz con SP. Se confirmó que este anticuerpo inmunoprecipitaba tanto a la proteína recombinante nativa como a la desnaturalizada. Se utilizaron las condiciones de esta IS para el EP. Paralelamente se hizo una IS de la 24RNP del extracto en condiciones desnaturalizantes para descartar que la 24RNP estuviera unida de forma no covalente a alguna otra proteína que evitara que se pudiera inmunosubstraer. Se analizó por Western blot el EIS así como la elución de las matrices. Se ajustaron los tiempos de IS para llevarla a cabo en el menor tiempo posible.

5. Después de la IS de la 24RNP, se analizó por Western blot al EIS con un anticuerpo anti-24RNP/28RNP con el fin de verificar que la 28RNP no fuera inmunosubstraída.

### 1. Especificidad del anticuerpo anti-24RNP

El anticuerpo anti-24RNP, la herramienta principal de este trabajo, reconoce únicamente a su antígeno de entre una gran cantidad de proteínas presentes en el EP de cloroplasto de espinaca (Fig. 1)



**Figura 1. Especificidad de los anticuerpo anti-24RNP y anti-24RNP** 1) SDS-PAGE con 30 µg de EP teñido con azul de Coomassie, 2) Western blot de 30 µg de EP revelado con anti-24RNP, 3) Western blot de 30 µg de EP revelado con anti-24RNP/28RNP 4) Western blot de 30µg de EP revelado con suero preinmune 2 (SP2)

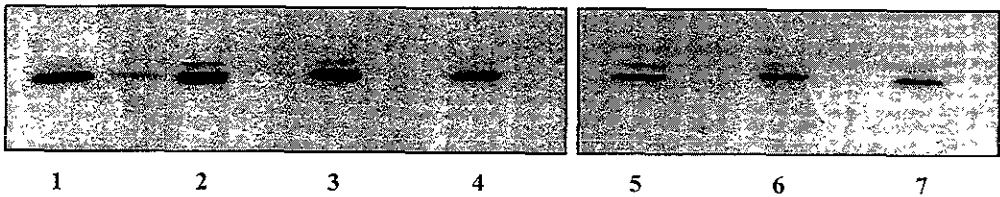
### 2. Selección de hojas con mayor cantidad de 24RNP

Se seleccionaron las hojas de espinaca como se describió en métodos y se realizó la extracción de proteína de cada uno de los tamaños determinados. Se cuantificó la proteína total de cada extracto, se corrieron geles con 20 µg de proteína de cada etapa y se hizo un Western blot. La mayor cantidad de 24RNP se presentó en hojas jóvenes entre 0.4 y 7 cm de longitud (Fig. 2, carriles 1 a 3). En hojas de

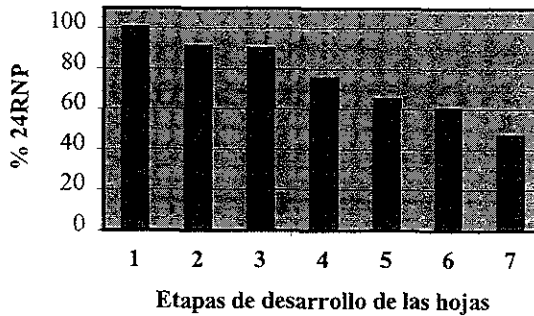


mayor tamaño la cantidad de 24RNP disminuye considerablemente, aunque no desaparece. A partir de estos datos se determinó preparar el extracto de procesamiento de hojas de espinaca con tamaños menores a 7 cm.

A)



B)



**Figura 2. Estimación del contenido de 24RNP en diferentes momentos del desarrollo de la hoja de espinaca.** A) Proteína total (20  $\mu$ g) de hoja de espinaca de diferentes etapas de desarrollo fue separada en un PAGE-SDS al 15% y revelada por Western blot con el anticuerpo anti-24RNP. 1) Hojas de hasta 4 cm 2) Hojas de 3.5 a 5.5 cm 3) Hojas de 5.5 a 7.5 cm 4) Hojas de 7 a 9 cm 5) Hojas de 9.1 a 11 cm 6) Hojas de 11.1 a 14 cm 7) Hojas de 14.1 a 15 cm. B) Densitograma de A)

### **3. Preparación del extracto de procesamiento de RNA a partir de hojas de espinaca**

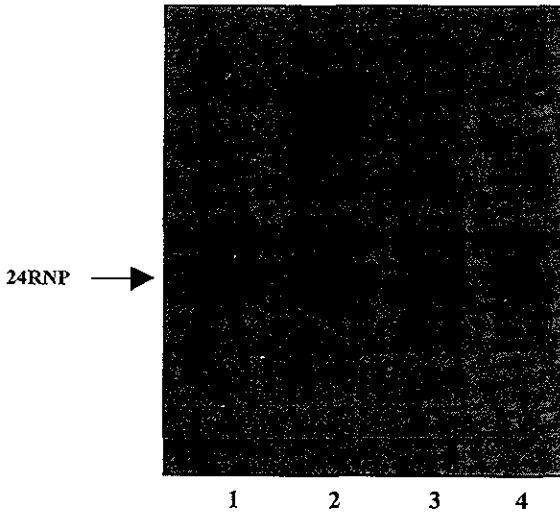
Para la preparación del extracto de procesamiento de RNA de cloroplastos de hojas de espinaca (EP) es necesario primeramente el aislamiento de cloroplastos intactos por centrifugación en gradientes de Percoll. A partir de esta preparación y por una serie de precipitaciones y centrifugaciones se obtiene un extracto proteico con capacidad de procesar fragmentos de RNA *in vitro*. Para este trabajo se hizo una preparación de 800g de hojas de espinaca de tamaño menor a 7 cm. Al final se obtuvo una preparación con una concentración de 16  $\mu\text{g}$  de proteína por  $\mu\text{L}$  de extracto. En la figura 2 se presenta el patrón de proteínas característico del EP y la demostración de la especificidad del anticuerpo anti-24RNP.

### **4. Inmunosubstracción**

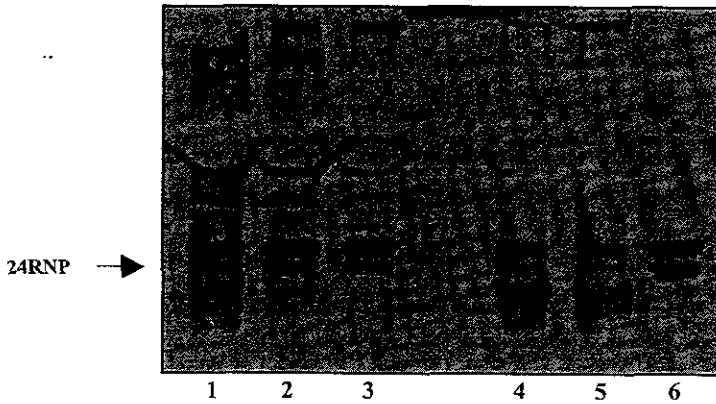
#### **A. Primera aproximación para llevar a cabo la inmunosubstracción de la 24RNP del extracto de procesamiento: adición del suero inmune crudo al EP.**

Este método consistió en añadir anticuerpo anti-24RNP directamente al EP y después quitarlo añadiendo proteína A-sefarosa. En un primer intento, el extracto se incubó con diversas concentraciones de anticuerpo para determinar la más adecuada. Se incubaron 50  $\mu\text{L}$  de extracto con el anticuerpo durante 12 h a 4°C. Para quitar al anticuerpo del extracto se emplearon 5  $\mu\text{L}$  de proteína A en cada muestra.

A)



B)



**Figura 3. Inmunosustracción con anticuerpo anti-24RNP añadido directamente sobre el EP.** Western blot revelado con anti-24RNP/28RNP. En cada carril se cargó el volumen total de EP tratado (50  $\mu$ L) A) 1) EP sin tratar 2) EP tratado con anti-24RNP 1:250 3) 1:500 4) 1:1000 B) EP tratado con anti-24RNP 1) y 2) 1:50; 3) 1:100; EP tratado con SP 4) 1:50 5) 1:100 6) EP sin tratar

En las muestras tratadas con el anticuerpo más diluido (Fig. 3A, carriles 2 a 4) no se observa disminución en la banda de la 24RNP respecto al extracto sin tratar (carril 1). En las muestras donde se utilizó el anticuerpo más concentrado (Fig. 3B) se observa una ligera disminución (carriles 1 a 3) comparado con el control (carril 6). Sin embargo esta disminución también se detecta en el extracto tratado con suero preinmune (carriles 4 y 5). Por otro lado, en los carriles del EP tratado se observan bandas distintas a las de la 24RNP y la 28RNP pues al haber añadido el suero al EP, se agregaron otras inmunoglobulinas que pudo haber reconocido el segundo anticuerpo, eso se apoya con el hecho de que en el EP no tratado no se ven esas bandas.

Estos resultados dieron pauta a pensar que podría trabajarse con concentraciones entre 1:100 y 1:50 donde los resultados no son tan diferentes y donde sí se ve que disminuye la cantidad de 24RNP del EP. Se tomó la concentración 1:100 como la más adecuada, pues añadiendo menor cantidad de proteína da el mismo resultado que la concentración 1:50. Hasta este momento se había estado trabajando con diluciones de anticuerpo (1:50, 1:100, 1:250, etc. ) pero no se había cuantificado la cantidad de proteína del suero por lo que para el siguiente experimento sí se cuantificó. Con ello se aseguraba añadir la misma cantidad de suero a las muestras.

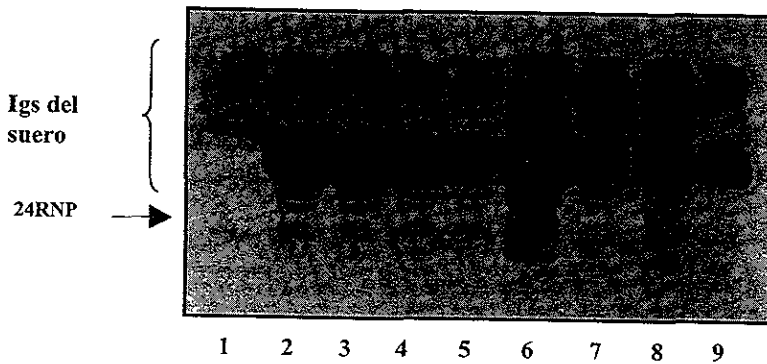
Suero inmune	240 µg de proteína / µL suero
Suero preinmune	193 µg de proteína /µL suero

Se hizo la inmunosubstracción de 50 µL de EP con anticuerpo anti-24RNP y con suero preinmune (control). Como se ha mencionado, la relación de suero inmune y extracto de procesamiento que se deseaba era 1:100 por lo que se

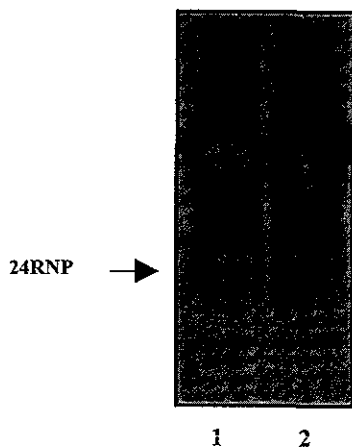
añadieron 0.5  $\mu\text{L}$  (120  $\mu\text{g}$ ) de anticuerpo. Para igualar esta cantidad de SP, se añadieron 0.6  $\mu\text{L}$  (120  $\mu\text{g}$ ).

Por otro lado, en vez de una incubación con anticuerpo, se hicieron tres incubaciones de la siguiente forma: al EP se le adicionaron 120  $\mu\text{L}$  de anti-24RNP o SP, se incubó durante 12 h a 4°C, posteriormente, se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de proteína A-sefarosa y se incubó durante 1 h, después de la cual se centrifugó y el EP se separó de la proteína A-sefarosa. El EP recuperado se trató de la misma manera dos veces más.

Se analizó el extracto tratado con anti-24RNP y suero preinmune así como los lavados (Fig 4) y eluciones (Fig 5) de la proteína A-sefarosa. En la figura 4 puede observarse que no se logró la inmunosubstracción, además de que la proteína A resultó insuficiente para eliminar totalmente el anticuerpo. En el EP se quedó una gran cantidad de anticuerpo a pesar de que en los lavados vemos que se eliminaron muchas proteínas (Fig. 4). En la elución (Fig. 5) se observa un exceso de anticuerpo en ambos carriles y no es claro si se inmunoprecipitó la 24RNP.



**Figura 4. Inmunoprecipitación de la 24RNP por la adición directa del anticuerpo cuantificado.** Western blot del EP tratado con tres lotes de 120  $\mu\text{g}$  de anticuerpo cada uno 1) EP sin tratar 2) y 3) EP tratado con 360  $\mu\text{g}$  de anti-24RNP, 4) y 5) EP tratado con 360  $\mu\text{g}$  de suero preinmune (SP), 6) y 7) Lavados de la proteína A-sefarosa utilizada para quitar al anti-24RNP, 8) y 9) Lavados de la proteína A-sefarosa utilizada para eliminar al SP



**Figura 5. Detección de la 24RNP en la elución de la proteína A-sefarosa.** Western blot de la elución de la proteína-A sefarosa después de la inmunosubstracción por lotes 1) Elución de la proteína-A sefarosa utilizada para eliminar al anti-24RNP del EP 2) Elución de la proteína A utilizada para eliminar al SP del EP

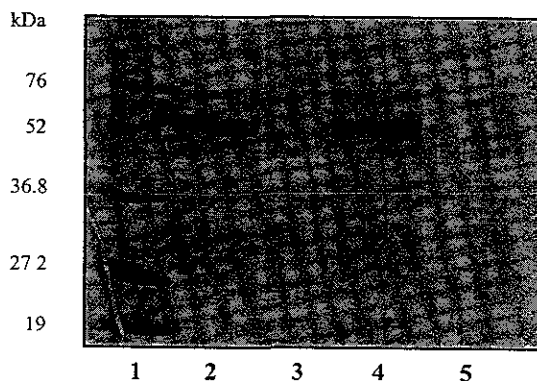
**B. Segunda aproximación para llevar a cabo la inmunosubstracción de la 24RNP: matriz-anticuerpo crudo.**

**B.1. Construcción de la matriz**

Se hizo otra aproximación al problema, para lo cual se hicieron dos matrices con proteína A-sefarosa acoplada covalentemente al suero preinmune y al anticuerpo anti-24RNP crudo respectivamente. Antes de utilizar las matrices fue necesario verificar la eficiencia del acoplamiento mediante un SDS-PAGE al 12%.

En la figura 6 se presenta el análisis del acoplamiento del anticuerpo y la matriz. En los carriles 2 y 4, se observa que antes de añadir DMP hay una banda de aproximadamente 55 kDa correspondiente a la cadena pesada de las IgGs; esta banda desaparece después de la incubación con el DMP (carriles 3 y 5) debido a que el anticuerpo ya está unido covalentemente a la proteína-A sefarosa por lo que ya no se disocia y no entra al gel desnaturalizante. Las bandas que alcanzan a verse en los

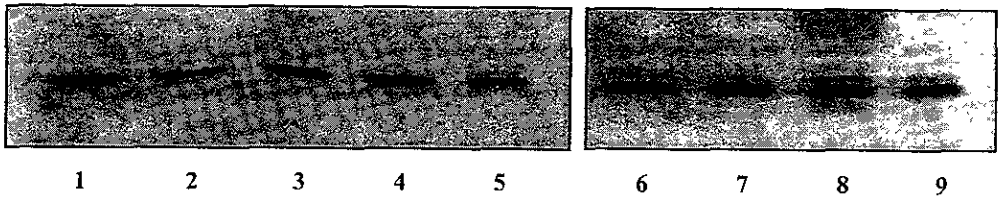
carriles 3 y 5 pueden deberse a la desnaturalización de algunas moléculas del anticuerpo que no se unen de forma covalente (la unión covalente se da por medio del dominio Fc de las IgGs).



**Figura 6. Eficiencia del acoplamiento de los sueros a la proteína A-sefarosa.** SDS PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie 1) Marcador de peso molecular 2) Matriz con SP antes de añadir DMP 3) Matriz con SP después de añadir DMP 4) Matriz con anticuerpo anti-24RNP antes de añadir DMP 5) Matriz con anticuerpo anti-24RNP después de añadir DMP

## **B.2. Inmunosubstracción empleando la matriz con anti-24RNP crudo**

Se hizo un primer intento por inmunosubstraer a la 24RNP con la nueva matriz. Se incubaron 10  $\mu$ L de extracto de procesamiento con tres lotes de 2.0, 5.0, 10 y 20  $\mu$ L de matriz inmune (MI) y matriz preinmune (MP), pero no se logró inmunosubstracción (Fig. 7). Entre cada lote de resina, ésta se separó del extracto por centrifugación. Cada incubación fue de 12 h a 4°C.



**Figura 7. Inmunosubstracción de 24RNP con diferentes cantidades de matriz.** Western blot en el que se cargaron 32  $\mu\text{g}$  de proteína por carril. 1) EP sin tratar, 2) EP tratado con 2  $\mu\text{L}$  de MP, 3) EP tratado con 2  $\mu\text{L}$  de MI, 4) EP tratado con 5  $\mu\text{L}$  de MP, 5) EP tratado con 5  $\mu\text{L}$  de MI 6) EP tratado con 10  $\mu\text{L}$  de MP 7) EP tratado con 20  $\mu\text{L}$  de MP 8) EP tratado con 10  $\mu\text{L}$  de MI, 9) EP tratado con 20  $\mu\text{L}$  de MI

Por los resultados obtenidos hasta el momento, se pensó que tal vez el anticuerpo no reconocía a la 24RNP nativa por haber sido generado contra la proteína parcialmente desnaturalizada. Para descartar esta posibilidad se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación con proteína recombinante tanto nativa como desnaturalizada.

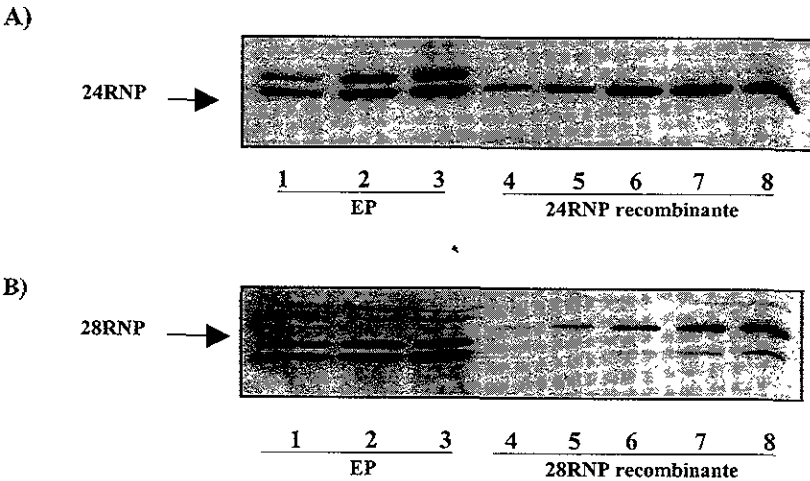
Con el fin de utilizar cantidades semejantes de proteína recombinante respecto a la que regularmente se encuentra presente en el extracto de procesamiento fue necesario determinar primero la cantidad de 24RNP presente en dicho extracto.

### **B.3. Cuantificación de la 24RNP y de la 28RNP en el extracto de procesamiento**

Se hizo un Western blot con diversas cantidades de 24RNP recombinante y extracto de procesamiento (Fig. 8A). Se comparó por densitometría la cantidad de 24RNP presente en el EP y se determinó que existen aproximadamente 2.4 ng de 24RNP por  $\mu\text{g}$  de proteína de EP. Considerando que se obtienen en promedio 3.25 mL de EP con una concentración de proteína de 16  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  a partir de 450 g de hojas de espinaca, se calcula que existen aproximadamente 280  $\mu\text{g}$  de 24RNP por gramo de tejido fresco de hojas de espinaca menores de 7 cm.



Debido a que probablemente se requerirá de la IS y reconstitución del EP con la 28RNP en la repetición de los experimentos de procesamiento y ya que se contaba con el anticuerpo anti-24RNP/28RNP, se decidió hacer también la cuantificación de esta proteína en el extracto (Fig. 8B). De igual forma que para la 24RNP, se compararon diversas cantidades de 28RNP recombinante con EP, de donde se encontró que existen aproximadamente 2.9 ng de 28RNP por  $\mu\text{g}$  de EP y esto equivale a 330  $\mu\text{g}$  de 28RNP por gramo de tejido fresco de hojas de espinaca menores de 7cm.

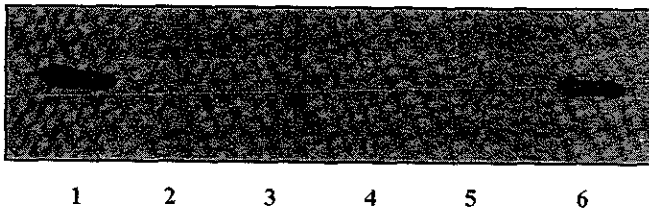


**Fig. 8 Cuantificación de la 24 RNP en el EP.** Comparación de distintas cantidades de EP y 24RNP recombinante A) 1) 2) y 3) carriles con 8, 16 y 32  $\mu\text{g}$  de EP respectivamente 4) a 8) carriles con 10, 20, 40, 60 y 80 ng de 24RNP recombinante B) 1) 2) y 3) carriles con 8, 16 y 32  $\mu\text{g}$  de EP respectivamente 4) a 8) carriles con 10, 20, 40, 60 y 80 ng de 28RNP recombinante

#### **B.4. Inmunoprecipitación de la 24RNP recombinante nativa y desnaturalizada empleando la matriz con anti-24RNP crudo**

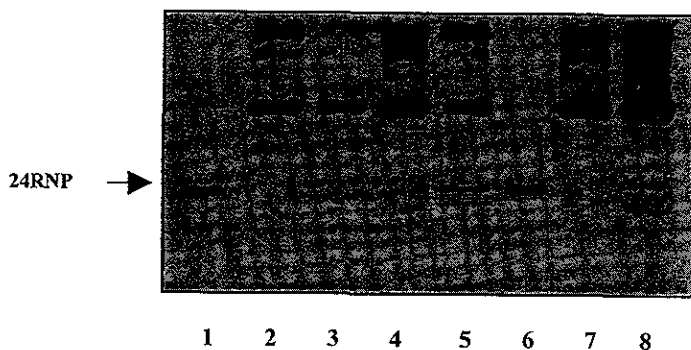
La inmunoprecipitación (IP) se hizo incubando 250 ng de proteína recombinante con 12  $\mu\text{L}$  de matriz anti-24RNP o matriz preinmune. durante 1 día a 4°C. Después se centrifugó para separar a la matriz del sobrenadante y sobre este

mismo se repitió el procedimiento anterior dos veces más. El volumen de matriz empleada se determinó probando 1, 5 y 12  $\mu\text{L}$  de matriz y se observó el mejor resultado con este último volumen. Al analizar el sobrenadante después de la IP se observó que el anticuerpo sí inmunoprecipitó a las proteínas recombinantes aunque también lo hizo el suero “preinmune” (Fig. 9).



**Figura 9. Análisis de sobrenadantes después de la inmunoprecipitación de la 24RNP recombinante nativa y desnaturalizada.** 1) 250 ng de 24RNP recombinante desnaturalizada 2) Inmunoprecipitación (IP) de 24RNP recombinante desnaturalizada con MP 3) IP de 24RNP recombinante desnaturalizada con MI 4) IP de 24RNP nativa con MP 5) IP de 24RNP nativa con MI 6) 250 ng de 24RNP recombinante nativa .

Al llevar a cabo la elución de la proteína retenida en la matriz se observó que la 24RNP fue eluída de la matriz inmune usada para precipitar la proteína recombinante nativa, pero no de la matriz inmune usada para la proteína recombinante desnaturalizada, ni de las matrices preinmunes (Fig. 10). En los carriles con los controles (7 y 8) se ve el patrón de proteínas propio de la matriz después de ser eluída y tratada en condiciones desnaturalizantes al igual que las muestras cargadas en el gel.



**Figura 10.** En la elución de la matriz empleada para la inmunoprecipitación de las proteínas recombinantes no se recupera toda la 24RNP inmunoprecipitada. Aunque en el sobrenadante no se encuentra la 24RNP, ésta no se recupera totalmente después de eluir las matrices inmune y preinmune. 1) 250 ng de 24RNP recombinante desnaturalizada, 2) Elución de MP usada para IP de la proteína recombinante desnaturalizada, 3) Elución de MI usada para la IP de la proteína recombinante desnaturalizada, 4) Elución de MP usada para la IP de la proteína recombinante nativa 5) Elución de MI usada para la IP de la proteína recombinante nativa 6) 250 ng de 24RNP recombinante nativa 7) Elución de MP sin incubar con proteína recombinante 8) Elución de MI sin incubar con proteína recombinante

El hecho de que el suero preinmune estuviera precipitando a la 24RNP era algo inesperado, sin embargo, al indagar sobre el origen de ese suero preinmune, se supo que había sido tomado de un conejo que tenía una semana de haber sido inmunizado con la 24RNP, por lo tanto, esa podía ser la razón por la que estaba reconociendo a la proteína.

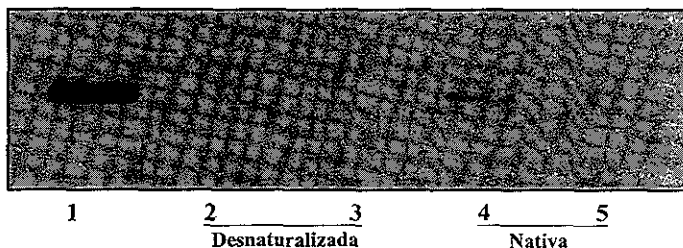
### C. Tercera aproximación para llevar a cabo la inmunosustracción de la 24RNP del extracto de procesamiento: matriz-anti-24RNP concentrado

#### C.1 Inmunoprecipitación de la 24RNP recombinante nativa y desnaturalizada con matriz-anticuerpo concentrado

Al ver que el anticuerpo crudo unido a proteína A-sefarosa no daba los resultados deseados aún cuando el anti-24RNP se usaba muy diluido (1:15000) para

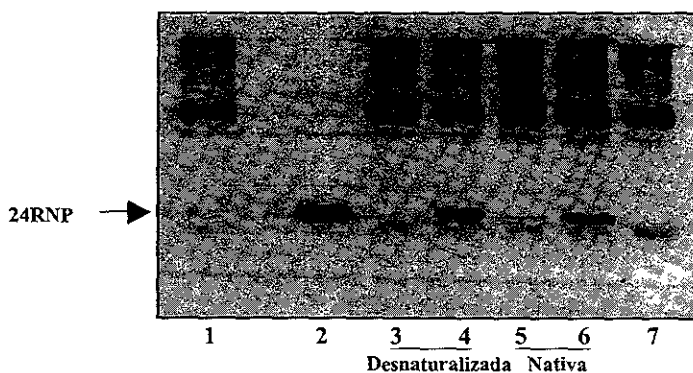
ensayos de Western blot, se pensó en usar una fracción de IgGs concentrada (fracción precipitada con 30-40% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ).

Se hicieron nuevas matrices de anticuerpo concentrado-proteína A-sefarosa. Asimismo se utilizó otro suero preinmune (SP2), el cual previamente se comprobó que no reconocía a la 24RNP (Fig 1). Con estas nuevas matrices se repitió la IP de las proteínas recombinantes nativa y desnaturalizada. Se volvieron a utilizar tres lotes de 12  $\mu\text{L}$  cada uno y 12 h de incubación a 4°C en cada caso. Se inmunoprecipitaron la proteína recombinante nativa y desnaturalizada tanto con el suero inmune como con el preinmune (Fig. 11).



**Figura 11. Análisis de sobrenadantes después de la inmunoprecipitación de la 24RNP recombinante.** 1) 250 ng de 24RNP recombinante, 2) y 4) IP de 24 RNP recombinante con MP, 3) y 5) IP de 24RNP recombinante con MI

Al analizar las eluciones de las matrices, con el fin de determinar si la 24RNP había sido unida, se observó que esta proteína podía ser eluida de la MI pero no de la MP. La explicación a ésto puede ser que la proteína que se inmunoprecipitó fue lavada de la matriz antes de la elución, lo que puede indicar que la unión entre la MP y la 24RNP era una unión de baja afinidad probablemente dada por el tiempo de incubación tan largo (Fig 12).



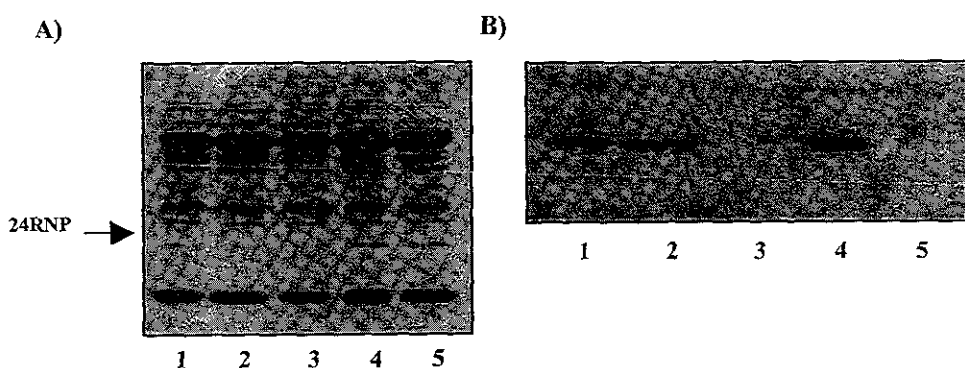
**Figura 12. Recuperación de la 24RNP recombinante de la matriz inmune después de la IP.** Western blot que muestra la elución de las matrices después de la IP. 1) Elución de la MP sin incubar con 24RNP, 2) 250  $\mu$ L de 24RNP recombinante 3) y 5) Elución de la MP incubada con 24RNP recombinante 4) y 6) MI incubada con 24RNP recombinante 7) Elución de la MI sin incubar con 24RNP.

### C.2 Inmunosubstracción del EP

Una vez que se comprobó que estas nuevas matrices estaban funcionando adecuadamente, se continuó con la inmunosubstracción del EP. Se emplearon las mismas condiciones que para la inmunosubstracción de la proteína recombinante: tres lotes de matriz de 12  $\mu$ L cada uno, incubando un día a 4°C cada lote. Además se corrió un experimento paralelo empleando condiciones desnaturalizantes (0.1% SDS) para descartar la posibilidad de que la proteína no se estuviera inmunoprecipitando por estar unida al complejo proteico o a alguna otra proteína.

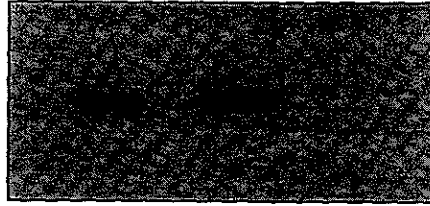
Finalmente, con el uso de matrices nuevas y tiempos prolongados de incubación (3 días), se logró inmunosubstraer a la 24RNP del EP tanto en condiciones nativas como en condiciones desnaturalizantes. En la figura 13 se muestra el análisis de los extractos inmunosubstraídos y sus controles. Se preparó un gel con las mismas cantidades de EP o EIS por carril (32  $\mu$ g). La transferencia de las muestras se corroboró con la tinción de la membrana con rojo de Ponceau (Fig. 13A). Después de llevar a cabo el Western blot revelando la membrana con anti-

24RNP, se observa que se logró quitar a esta proteína. Asimismo se observa que no existe diferencia entre la IS llevada a cabo en condiciones desnaturalizantes y el tratamiento normal (Fig. 13B), lo que podría sugerir que la concentración de IgGs había sido limitante, más que el hecho de que la 24RNP pudiera estar interaccionando con otras proteínas de forma tal que se dificultara su IS.



**Figura 13. Inmunosustracción de la 24RNP del EP empleando al anticuerpo concentrado unido a proteína A sefarosa.** A) Membrana teñida con rojo de Ponceau utilizada para el Western blot de la figura B. B) Western blot de A), que muestra 1) EP sin tratar, 2) EP tratado con MP + 0.1% SDS, 3) EIS con MI + 0.1% SDS, 4) EP tratado con MP, 5) EIS con MI

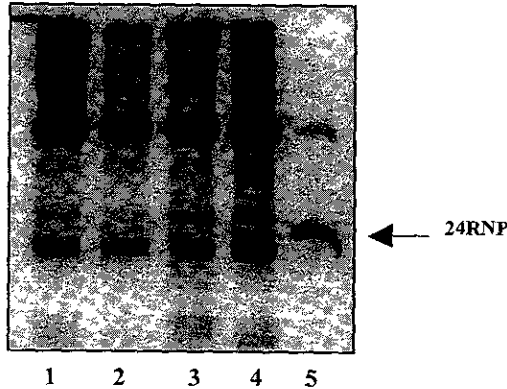
La IS se realizó por tres días, tiempo establecido a partir de los experimentos anteriores. Sin embargo, existía la posibilidad de que con las nuevas matrices se pudiera disminuir el tiempo de incubación. Se intentó una IS de un día a 4°C con un lote de matriz de 12  $\mu$ L y otra incubando con tres lotes de matriz de 12  $\mu$ L cada uno a lo largo de un día (incubaciones de 8 h). En el primer caso la IS no se llevó a cabo, pero para la segunda condición, la IS sí fue efectiva (datos no mostrados). Posteriormente se repitió la IS utilizando tres lotes de 12  $\mu$ L de matriz e incubaciones de 2 h para cada lote. Con este tratamiento con menor tiempo de incubación, también se logró la IS completa de la 24RNP del EP (Fig. 14).



1                      2                      3

**Figura 14. Inmunosubstracción de la 24RNP del EP en tiempos cortos.** Western blot que muestra una IP llevada a cabo con 6 h de incubación con el anticuerpo anti-24RNP 1) EP sin tratar, 2) EP tratado con MP 3) EIS

Con el fin de corroborar que la 24RNP fue eliminada de forma específica por la matriz de anti-24RNP-proteína A-sefarosa, se hizo la elución de ésta y se observó que la 24RNP sí se encontraba en las matrices inmunes (Fig. 15, carril 4).

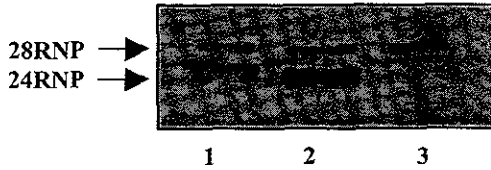


1                      2                      3                      4                      5

**Figura 15. Elución de la 24RNP de la MI.** Western blot con la elución de la resina empleada para la IS. 1) Elución de la MP sin incubar con EP, 2) Elución de la MP incubada con el EP, 3) Elución de la MI sin incubar con EP 4) Elución de la MI incubada con EP 5) 200 ng de 24RNP recombinante

Dada la semejanza entre la 24RNP y la 28RNP, se verificó que la 28RNP no se inmunoprecipitara realizando un Western blot del extracto de procesamiento inmunoprecipitado revelado con el anticuerpo anti-24RNP/28RNP (Fig 16). Como

se esperaba, la 28RNP permanece en el extracto tratado y solamente la 24RNP es inmunosubstraída..

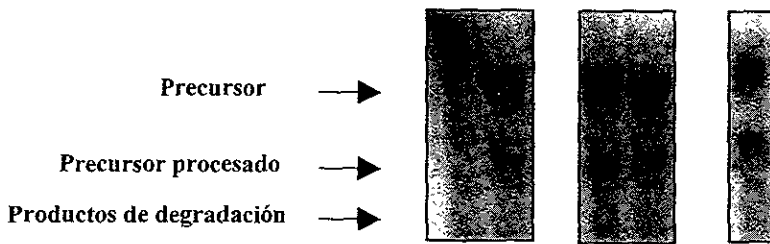


**Figura 16. Inmunosubstracción específica de la 24RNP.** Western blot de la IS de la 24RNP empleando al anticuerpo anti-24RNP/28RNP para revelar. 1) EP sin tratar, 2) EP tratado con MP, 3) EIS

### 5. Funcionalidad del extracto sin la 24RNP.

Hasta este punto se contaba con un extracto libre de la 24RNP, sin embargo, como ya se ha mencionado, aún faltaba ver si tras el tratamiento con anticuerpo, el EP todavía era funcional. Se hizo un ensayo de procesamiento del extremo 3' UTR del gen *petD* marcado con  $^{32}\text{P}$  sintetizado por transcripción *in vitro*. En este ensayo se probó el EP sin tratar, tratado con la matriz inmune y con la matriz preinmune, además se hizo la reconstitución del extracto con diferentes cantidades de proteína recombinante (Fig.17). La cantidad de 24RNP recombinante con que se reconstituyó el extracto, fue 25, 50 100 y 200 veces la cantidad encontrada al hacer la cuantificación de la proteína en el EP. En la autorradiografía se observa que el EP sí es funcional, es decir, aún el extracto tratado con anticuerpos es capaz de procesar al extremo 3' UTR de *petD*.





**Figura 17. El extracto de procesamiento es funcional.** Autorradiografía que muestra el procesamiento del extremo 3' del gen *petD* sintetizado por transcripción *in vitro* y marcado con  $^{32}\text{P}$ . 1) *petD* sin procesar 2) *petD* procesado con EP sin tratar 3) *petD* procesado con EIS 4) *petD* procesado con EIS y reconstituido con 24RNP recombinante 5) *petD* procesado con EP tratado con MP

purificación ha mostrado ser eficiente en la precipitación de IgGs (Harlow y Lane, 1988). Los resultados obtenidos sugieren que no se estaba saturando la matriz con el anticuerpo crudo ya que utilizando la misma relación de anticuerpo y proteína-A-sefarosa, la matriz preparada con el anticuerpo purificado dió mejores resultados.

Como una forma de corroborar que la matriz de anti-24RNP-proteína A-sefarosa efectivamente estaba substrayendo a la 24RNP del EP, se hicieron lavados de esta matriz, observándose que solo de la matriz inmune se lograba remover la banda correspondiente a la proteína en estudio.

Una vez lograda la IS se buscó optimizar los tiempos de incubación del extracto con la matriz, buscando que fueran lo más cortos posibles para evitar que el EP perdiera su función. Se pudo hacer una disminución que fue de tres incubaciones en tres días, a tres incubaciones en 6 horas, lográndose los mismos resultados. En la literatura se emplean tiempos de incubación que van de 2 h a 1 día (Harlow, 1988, Lisitsky 1998).

### **El anticuerpo no inmunosubstrae a la 28RNP**

Un objetivo muy importante de este trabajo era que la IS se hiciera exclusivamente de la 24RNP, pues como ya se ha mencionado, no había sido posible realizar una IS limpia porque no se contaba con un anticuerpo que reconociera únicamente a la proteína en estudio. Con los últimos experimentos realizados, en los que se hicieron ensayos de Western blot con el anticuerpo anti-24RNP/28RNP, se pudo observar la especificidad deseada en la substracción. El resultado obtenido con el uso del anticuerpo anti-24RNP/28RNP es importante porque queda claro que con las condiciones de este trabajo y el anticuerpo precipitado, no se inmunosubstrae a la 28RNP .

## VII. Discusión

### **Especificidad del anticuerpo anti-24RNP**

En el laboratorio se generaron dos anticuerpos, uno anti-24RNP y otro anti-24RNP/28RNP (Robles, 2000), en la figura 1 se observa que el anticuerpo anti-24RNP empleado para la IS es específico contra su antígeno a pesar de las semejanzas en secuencia con la 28RNP, lo que permitió su uso en los experimentos subsecuentes.

### **Expresión de la 24RNP en diferentes etapas de desarrollo**

La 24RNP se expresó en todas las edades de hoja analizadas. Sin embargo se observa que su expresión es mayor en las etapas 1, 2 y 3 respecto a las etapas 4 a 7 (figura 2), por ello se seleccionaron hojas de hasta 7 cm de longitud para hacer el EP con el que se trabajó en esta tesis.

### **Inmunosustracción por adición de suero inmune crudo al EP**

Con la IS por este método no se obtuvieron buenos resultados. A pesar de que en el primer experimento en el que se utilizaron diferentes concentraciones de anticuerpo aparentemente sí había disminuido la 24RNP del EP tratado respecto al EP no tratado, no se había considerado que el extracto se diluyó al añadir el anticuerpo (Fig.3). Al analizar por Western blot los experimentos en donde se ajustaron las cantidades de proteína tanto del anti-24RNP como del suero preinmune para llevar a cabo la IS, se observó que la 24RNP se encontraba presente en el extracto tratado con el anti-24RNP, lo que indica que la IS no funcionó. Además la presencia de grandes cantidades de anticuerpo aún después del tratamiento con proteína A sefarosa (Fig. 4) impediría su uso en los experimentos subsecuentes. En esta aproximación podría pensarse en la conveniencia de aumentar la cantidad de proteína A-sefarosa para eliminar al resto del anticuerpo. Sin embargo, agregar una mayor cantidad de proteína A-sefarosa no daría los resultados deseados ya que otras

proteínas presentes en el suero tales como inmunoglobulinas, albúmina, restos de hemoglobina aún seguirían presentes (De Mey, 1986, Roitt, 1994).

Esta forma de hacer IS es la más común y se sabe que funciona (Huang D. *et al* 1998, Yoon G.M., *et al* 1999), por esto, inicialmente nos inclinamos a trabajar con ella. Sin embargo, no se había considerado que en la generalidad de los trabajos de este tipo no es tan importante si queda anticuerpo libre en el extracto del que se inmunosubstra la proteína de interés, generalmente lo que se busca es obtener a la proteína inmunosubstraída para luego eluirla de la matriz a la que se pega. Por esta razón se optó por la segunda aproximación, utilizar una matriz de proteína A-seferosa con el anticuerpo unido covalentemente (Harlow y Lane, 1988) para así obtener datos más limpios en los que no se dejara proteína extraña en el extracto en el que se debe probar una función.

### **Cuantificación de la 24RNP y de la 28RNP presentes en el EP**

Debido a que no se logró la IS con la matriz anti-24RNP, se llegó a pensar que el anti-24RNP desarrollado en contra de proteína desnaturalizada podría no estar reconociendo a la 24RNP nativa (van Regenmortel, 1994). Con el fin de descartar lo anterior, se llevó a cabo la inmunoprecipitación de la 24RNP recombinante nativa y desnaturalizada.

Antes de llevar a cabo este experimento, se cuantificó la 24RNP presente en el EP, de esta forma se aseguraba que la cantidad de proteína recombinante que se iba a probar era semejante a la que se encontraba en el EP. Por otra parte, esta cuantificación también resultó importante para los estudios de reconstitución del EIS.

Pensando en que tal vez llegaría a hacerse el estudio de la 24RNP en ausencia de la 28RNP y a que se cuenta con el anticuerpo que reconoce a ambas, también se hizo la cuantificación de la 28RNP en el extracto de procesamiento. En este trabajo determinamos que había 2.9 ng de 28RNP por  $\mu\text{g}$  de proteína del EP. Lisitsky *et al*,

(1995), reportaron 3.5 ng de 28RNP por  $\mu\text{g}$  de proteína del EP. Las diferencias no son muy grandes y pueden deberse a variaciones experimentales.

### **Inmunoprecipitación de 24RNP recombinante nativa y desnaturalizada**

Una vez que se estableció la cantidad de 24RNP recombinante a utilizar en la IP, se llevó a cabo la IP de ésta. Sí fue posible inmunoprecipitar a la 24RNP recombinante tanto nativa como desnaturalizada. Sin embargo, los experimentos con SP (Fig 9), en donde se observó que éste también inmunoprecipita a las proteínas recombinantes, introdujeron dudas acerca de su confiabilidad como control negativo de la IS. Por lo tanto fue necesario cambiarlo, no sin antes corroborar, por medio de un Western blot, que este nuevo suero no reconocía a alguna proteína que por su peso molecular pudiera interferir con la localización de la 24RNP. El nuevo suero preinmune, no reconoció proteínas de tamaño semejante a la 24RNP por lo que pudo emplearse en los experimentos subsecuentes (Fig. 1).

A pesar del cambio, el SP2 inmunoprecipitó a la 24RNP recombinante, probablemente porque la incubación con la matriz se llevó a cabo en un medio donde sólo existía la proteína recombinante y además fue por un tiempo prolongado (3 días), provocando que hubiera interacciones no específicas. Esta suposición fue confirmada al tratar el EP con SP2 y confirmar que la 24RNP permanecía en el extracto (Fig. 13).

### **Inmunosubstracción de la 24RNP del EP. Uso de anti-24RNP unido covalentemente a proteína A-sefarosa**

Aún con el uso del anti-24RNP unido a la proteína A-sefarosa, éste no inmunosubstrajo a la 24RNP del EP en los primeros intentos. Dado que se estaba utilizando un anticuerpo no concentrado y un dato teórico de contenido de IgGs en el suero (Harlow y Lane, 1988) se pensó que probablemente en éste no existía la suficiente cantidad de IgGs para saturar a la matriz, por lo que se decidió utilizar una fracción de anticuerpo precipitada con sulfato de amonio. El uso de este paso de

### **El EP inmunosubstraído es funcional**

Como ya se ha mencionado, se buscaba que además de que la IS fuera únicamente de la 24RNP, el EP fuera funcional. Si bien no es el fin de este trabajo conocer la función de la 24RNP, sí lo es el obtener un extracto que permita llevar a cabo esos estudios. Por ello se llevó a cabo el análisis del procesamiento del extremo 3' de un mRNA cloroplástico (*petD*) *in vitro* empleando el ES, lográndose observar que el extracto sí es funcional, aún después del tratamiento con anticuerpos, conserva la capacidad de procesar al mRNA. Más aún, los resultados obtenidos en este experimento confirman los resultados de Toledo (1998). En el trabajo citado se encontró que el EP-IS de la 24RNP y la 28RNP degradaba el RNA usado en el ensayo como precursor. Cuando la 24RNP recombinante se empleaba para reconstituir el sistema, el precursor no se degradaba pero tampoco se procesaba. Al agregar la 28RNP recombinante al extracto inmunosubstraído, se recuperaba la actividad correcta de procesamiento, independientemente de la presencia de la 24RNP. Esto implica que en el EIS la presencia de la 28RNP permitiría que se llevara a cabo el procesamiento correcto del RNA precursor, aún sin la 24RNP presente en el extracto (Fig. 17 carril 3).

El haber establecido las condiciones efectivas para la IS de la 24RNP del extracto de procesamiento permitirá la realización de experimentos más limpios cuyos resultados serán más confiables y reproducibles, lo cual permitirá avanzar en el conocimiento de cuál es la función de esta proteína en la estabilización/degradación/procesamiento de los mRNAs de cloroplasto.

## VIII. Conclusiones

1. La 24RNP se presenta en todas las etapas de desarrollo de las hojas de espinaca, observándose una mayor cantidad en hojas jóvenes.
2. Se lograron determinar las condiciones experimentales adecuadas en las que la 24RNP fue eliminada de un extracto de procesamiento de RNA de cloroplasto y éste mantuvo su actividad de procesamiento.
3. La 28RNP, muy semejante a la 24RNP, no fue substraída del extracto.

## IX. Apéndice

### 1. Extracción de proteínas de tejidos vegetales

#### Soluciones stock de inhibidores de proteasas

Pefablock	100 mg/ml
Pepstatina	1 mg/ml
Leupeptina	1 mg/ml
Bestatina	5 mg/ml

#### Buffer de extracción 1X

Tris base pH 7.5	100 mM
EDTA	5.0 mM
Sacarosa	0.3 mM
EGTA	5.0 mM
MgCl <sub>2</sub>	5.0 mM
β-mercaptoetanol	40 mM
Pefablock	0.5 mg/ml
Pepstatina	1.0 μg/ml
Leupeptina	0.5 μg/ml
Bestatina	40 μg/ml

Preparar la solución 2X con todos los componentes hasta el MgCl<sub>2</sub>. Esterilizar a 15 lb durante 15 min y guardar en refrigeración.

Antes de iniciar la extracción diluir el buffer a una concentración 1X y añadir los inhibidores de proteasas tomados a partir de una solución stock y finalmente agregar β mercaptoetanol.



Para 1 mL de buffer de extracción añadir:

Pefablock	5.0 $\mu$ L
Pepstatina	1.0 $\mu$ L
Leupeptina	0.5 $\mu$ L
Bestatina	8.0 $\mu$ L
$\beta$ -mercaptoetanol	2.8 $\mu$ L

## 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (PAGE-SDS)

### Acrilamida 30% (100 mL)

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0.8 g

### Buffer separador 25X (100 mL)

Tris base 1.5M	18.17 g
SDS al 20%	2.0 mL

### Buffer apilador 25X (100 mL)

Tris base 1.5 M	18.17 g
SDS al 20%	2.0 mL

### Buffer de carga 5X (10 mL)

Tris 1M pH 6.8	3.125 mL
Glicerol	5.0 mL
SDS (1% final)	0.5 g
Azul de bromofenol 10%	0.2 mL

$\beta$ -mercaptoetanol                      4  $\mu$ L por 20  $\mu$ L de buffer (añadir al momento de usar el buffer)

Buffer de corrida 10X (1 L)

Tris base                                      30 g  
Glicina                                         144 g  
SDS                                              10 g

Utilizar el buffer a una concentración 1X

Persulfato de amonio al 20%

Colorante Coomassie para teñir geles (100 mL)

Coomassie brilliant blue R250    0.25 g  
Metanol grado técnico                45.4 mL  
Agua                                            45.4 mL  
Ácido acético glacial                  9.2 mL

Solución fijadora y desteñidora (100 mL)

Metanol 20%                                20 mL  
Ácido acético 7.5%                        7.5 mL

**3. Western blot**

Buffer de transferencia (1L)

Tris pH 8.3 25 mM                        3.03 g  
Glicina 192 mM                              14.4 g  
Metanol 20% v/v                            200 mL

El metanol se agrega inmediatamente antes de realizar la transferencia.

TBS

NaCl	50 mM
Tris pH 7.4	50 mM

TBS-T (0.1%)

TBS + 0.1% tween 20

**4. Elaboración de un extracto de cloroplastos de espinaca con capacidad de procesamiento de RNA**

**a) Soluciones para aislamiento de cloroplastos**

GR 5X (1 L)

Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ·10 H <sub>2</sub> O 5 mM	2.225 g (Disolver en 40 mL de agua hirviendo)
HEPES 250 mM	59.58 g
Sorbitol 1.65 M	300.6 g
EDTA 10 mM	3.72 g
MgCl <sub>2</sub> 5mM	1.1016g
MnCl <sub>2</sub> 5mM	0.99 g
H <sub>2</sub> O	700 mL (Ajustar pH a 6.8 con NaOH 6N)

DTT 1M

Para 20 mL	3.08g
Para 5 mL	0.77g

Prepararlo con agua estéril tratada con DEPC

Glicerol estéril 100%

GR 1X

GR 5X	100 mL
Agua estéril sin DEPC	400 mL o 395 mL

DTT (10mM) 770 mg o 5 mL de DTT 1M

PCBF

Percoll 100 mL  
PEG 6000 u 8000 3.0 g  
BSA 1.0 g  
Ficoll 1.0 g

Gradientes

Cantidades para 4 tubos de plástico transparente de 50 mL, con 25 mL del gradiente de 40% de PCBF y 12.5 mL del gradiente de 80% de PCBF. Considerando que solo se pueden cargar entre 6 y 8 mL (quizá puedan cargarse 10, pero se corre el riesgo de que no se separen bien las bandas de cloroplastos rotos e intactos, se podría probar correr dos muestras con 10 mL y observar que pasa) de solución de cloroplastos por tubo

Reactivo	Gradientes	
	40% (100 mL)	80% (50 mL)
GR5X	20 mL	10 mL
Glutación	6 mg	3 mg
PCBF	40 mL	40 mL
H <sub>2</sub> O estéril	40 mL	
DTT 1M	1 mL	0.5 mL

Estos gradientes se preparan agregando primero 25 mL de la mezcla de 40% de Percoll empleando una jeringa con aguja y después, con una pipeta Pasteur o con una jeringa con manguerita de HPLC y colocando la punta hasta el fondo, se agrega la fracción de 80%, muy lentamente para evitar que se mezclen las soluciones o que se formen burbujas. Se debe observar la formación de una interfase.

**b) Soluciones para preparación del extracto de procesamiento de RNA de cloroplastos**

Buffer A (250 mL)

Tris pH 7.9 10 mM	2.5 mL de 1 M
EDTA 1mM	1.25 mL de 0.2 M
DTT 5 mM	1.25 mL de 1M (agregar después de esterilizar)
H <sub>2</sub> O	245 mL

Buffer B (250 mL)

Tris pH 7.9 50 mM	12.5 mL de 1M
MgCl <sub>2</sub> 10 mM	2.5 mL de 1M
DTT 2 mM	0.5 mL de 1M (agregar después de esterilizar)
Sacarosa 25%	62.5 g
glicerol 50% v/v	125 mL
H <sub>2</sub> O	47 mL

Solución C

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> saturado	250 mL
----------------------------------------------------------	--------

Buffer D de cromatografía DE-52

Buffer A	100 mL
Buffer B	100 mL
H <sub>2</sub> O	10 mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> saturado	30 mL
DTT 1M	0.7 mL

## ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

### Buffer E (2 L)

HEPES 20mM pH 7.9	40 mL de 1 M
KCl 60 mM	60 mL de 2 M
MgCl <sub>2</sub> 12.5 mM	25 mL de 1 M
EDTA 0.1 mM	1 mL de 0.2 M
DTT 2 mM	4 mL de 1M (agregar después de esterilizar)
glicerol 5%	100 mL del 100%
H <sub>2</sub> O	1770 mL

El Buffer GR 1X puede prepararse con agua deionizada estéril, los buffers A, B, D y E y la solución C deben prepararse con agua desionizada tratada con DEPC y posteriormente esterilizarse por autoclave por 15 min a 15 libras. Así mismo, el material de cristalería debe ser lavado con ácido sulfúrico, enjuagado profusamente con agua de la llave, luego destilada y desionizada, secado y esterilizado en autoclave.

### **5. Inducción y purificación de 24RNP recombinante**

#### Medio Luria-Bretoni (1 L)

Extracto de Levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	10 g

Disolver todos los componentes en 500 mL de agua destilada y desionizada, aforar a un litro. Esterilizar en autoclave a 121°C y 15 lb de presión.

#### IPTG 1M

IPTG	0.236 g
------	---------

Disolver el reactivo en 500 µL de agua destilada y desionizada, aforar a 1 mL y esterilizar por filtración.

### Antibióticos

ampicilina o kanamicina 100 mg

Disolver la ampicilina o la kanamicina en 500  $\mu$ L de agua destilada y desionizada, aforar a 1 mL y esterilizar por filtración. Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de 50  $\mu$ L.

### **a) Soluciones para la obtención de 24RNP recombinante desnaturalizada**

#### Buffer de lisis

Tris-HCl pH 8.0	20 mM
NaCl	100 mM
Urea	8 M

#### Buffer de elución

Tris-HCl pH 8.0	20 mM <sub>4</sub>
NaCl	100 mM
Imidazol	50, 100 y 150 mM
Urea	8M

### **b) Soluciones para la obtención de 24RNP recombinante nativa**

#### Buffer de sonicación

Tris-HCl pH 8.0	20 mM
NaCl	100 mM

#### Buffer de elución

Tris-HCl pH 8.0	20 mM
NaCl	100 mM
Imidazol	50, 100 y 150 mM

## 6. Construcción de una matriz de anticuerpo-proteína A-sefarosa

Borato de Na	0.2 M pH 9.0
Etanolamina (Sigma A7177)	0.2 M pH 8.0
PBS con azida de Na	0.01%
Dimetilpimelimidato (DMP) (Sigma D8388)	
Proteína A-sefarosa 4B (Zymed 10-1141, capacidad 23 mg IgG/mL)	

## 7. Elución de la 24RNP de la matriz de anticuerpo-proteína A-sefarosa

### Buffer A

Tris pH 7.4	50 mM
EDTA	5 mM
NaCl	0.15 M
SDS	0.02 %

### Buffer B

Tris pH 7.4	50 mM
EDTA	5 mM
NaCl	0.15 M

### Buffer de elución

Tris 1M pH 6.8	3.125 mL
Glicerol	5.0 mL
SDS (1% final)	0.5 g

## 8. Transcripción *in vitro*

Todas las soluciones que son usadas durante las incubaciones de RNA deben prepararse con DEPC (dietilpirocarbonato) y esterilizarse por autoclave.



DTT	40 mM
<u>rNTPs 10X</u>	
rG, rC, rA,	5 mM
rU	0.25 mM
Acetato de amonio	5 M
Acetato de sodio	3 M [pH 5.5]
EDTA	0.25 M
SDS	20%

Los buffers 5X para RNA polimerasas son proporcionados con la enzima y usualmente contienen:

SP6: 200mM Tris-Cl, pH 7.9, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM espermidina-(HCl)<sub>3</sub>

T3/T7: 200mM Tris-Cl, pH 7.9, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM espermidina-(HCl)<sub>3</sub>, 125 mM NaCl.

## 9. **Procesamiento de RNA *in vitro***

Todas las soluciones que son usadas durante las incubaciones de RNA deben prepararse con DEPC (dietilpirocarbonato) y esterilizarse por autoclave.

### Buffer IVT 20X (10 mL)

MgCl <sub>2</sub> 75 mM	0.75 mL del stock 1 M
DTT 40 mM	0.4 mL del stock 1 M
KCl 200 mM	1 mL del stock 2 M

### Buffer E

Mismo que para la preparación del EP

### Solución para parar la reacción

Urea 6 M

SDS 1%

Acido aurin tricarboxilico 4.5 mM

Acetato de sodio 3 M, pH 5.5

tRNA de *Sacharomyces cerevisiae* 10 mg/mL

## IX. Bibliografía

- Audersik, T., Audersik, G. (1997)** *Biología*, 4a edición, Prentice Hall, México. 947 p.
- De May J. and Moeremans M. (1986)** Raising and testing polyclonal antibodies por immunochemistry. *In: Immunocytochemistry. Modern methods and application.* Eds. Van Noorden S., Polak J. 2<sup>nd</sup> edition, John Wright and Sons. England. p 3-11
- Deng, XW., Stern, D.B., Tonkyn, J.C., and Gruissem, W. (1987)** Plastid run-on transcription: application to determine the transcriptional regulation of spinach plastid genes. *J. Biol. Chem.* 262:9641-9648.
- Goldschmidt-Clermont M. (1998)** Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells. *Int. Rev. of Citol.* 177:117-163. Academic Press.
- Gruissem, W., Greenberg B.M., Zurawski G. and Hallick R. (1986)** Chloroplast gene expression and promoter identification in chloroplast extracts. *Metho. Enzymol.* 118:253-271.
- Gruissem, W., Barkan, A., Deng, X. and Stern, D. (1988)** Transcriptional and post-transcriptional control of plastid mRNA level in higher plants. *Trends Genet.* 4:9:258-263
- Hayes, R., Kudla, J., Schuster, G., Gabay, L., Maliga, P., and Gruissem, W., (1996)** Chloroplast mRNA 3'-end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins. *EMBO J.* 15:1132-1141.
- Harlow, D. and Lane, D. (Eds.) (1989)** *Antibodies, a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Lab. 584 pp.
- Huang, D.Y. and Wang A.Y, (1998)** Purification and characterization of sucrose synthase isozyme from etiolated rice seedlings. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46:107-113.

- Lisitsky, I., Liveanu, V. and Schuster, G. (1994)** RNA-binding activities of the different domains of a spinach chloroplast ribonucleoprotein. *Nucleic Acids Res.* 22: 4719-4724.
- Lisitsky, I., Liveanu V. and Schuster, G. (1995)** RNA-binding characteristics of a ribonucleoprotein from spinach chloroplast. *Plant Physiol.* 107:933-941
- Mullet, J.E. (1988)** Chloroplast development and gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:475-502.
- Robles Hernández S. (2000)** Expresión en bacteria de la proteína de 24kDa de espinaca que se une a RNA de cloroplasto (24RNP), producción de anticuerpos y su caracterización. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Roitt, I. (1994)** Inmunología. Fundamentos, 7ª edición, editorial Médica Panamericana. Madrid. 327p.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989)** Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Harbor. USA.
- Schuster, G. and Grussem, W. (1991)** Chloroplast mRNA 3' end processing requires a nuclear-encoded RNA-binding protein. *EMBO J.* 10:1493-1502
- Stern, D.B., and Grussem, W. (1987)** Control of plastid gene expression: 3' inverted repeats act as mRNA processing and stabilization elements but do not terminate transcription. *Cell*, 51.1145-1157.
- Stern, D.B., and Grussem, W. (1989)** Chloroplast mRNA 3' end maturation is biochemically distinct from procaryotic mRNA processing. *Plant Mol. Biol.* 13: 615-625
- Toledo Ortiz G. (1998)** Estudio de la función de la proteína de 24 kDa que se una a RNA (24RNP) durante el procesamiento y estabilización de los mRNAs de cloroplasto. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química UNAM. México D.F.
- Taylor W.C: (1989)** Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:211-233.

**Van Regenmortel M.H. (1994)** The recognition of proteins and peptides by antibodies. *In*: Immunochemistry. Eds. Van Oss C.J and Van Regenmortel M.H. Marcel Dekker Inc. USA. p 227-291.

**Yoon, G.M., Cho, H.S., Ha, H.J., Liu, J.R. and Lee, H.S. (1999)** Characterization of NtCDPK1, a calcium dependent protein kinase gene in *Nicotiana tabacum*, and the activity of its encoded protein. *Plant Mol. Biol.* 39:991