

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

“SUBCLONACIÓN EN UN VECTOR DE EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN A TRES PROTEÍNAS DE UNIÓN A mRNA (RNP's) DE *Arabidopsis thaliana*”.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A:
ROMANA ALEJANDRA BARRIOS PÉREZ



2001

MÉXICO, D.F.

2001





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

JURADO ASIGNADO

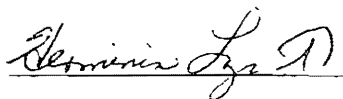
PRESIDENTE	Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera
VOCAL	M. en C. Ismael Bustos Jaimes
SECRETARIO	Prof. Luciano Hernández Gómez
1er SUPLENTE	Dr. Francisco Ruiz Terán
2º SUPLENTE	Prof. Alberto Gómez Gutierrez

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Ciudad Universitaria, Facultad de Química, Conjunto E
Departamento de Bioquímica, Laboratorio 105

asesor DEL TEMA:

Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera



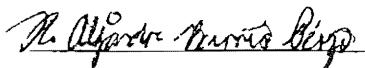
SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Martín Pedro Vargas Suárez.



SUSTENTANTE:

Tomana Alejandra Barrios Pérez.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente.

Al CONACYT (proyecto 25199N), la Dirección General de asuntos de Personal Académico (DGAPA, proyecto IN205697) y la Pew Foundation por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

Al Departamento de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química UNAM por permitirme llevar a cabo este trabajo en sus instalaciones y en donde me forme profesionalmente.

A la Dra. Herminia Loza Tavera por haber creído en mí, por dedicarme tanto tiempo y esfuerzo, sobre todo por ser un pilar esencial tanto en mi formación académica como en mi vida personal. Gracias de todo corazón

Al M en C. Martín Pedro Vargas por la asesoría técnica, amistad y valiosas contribuciones durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Edmundo Chávez Cossio, al Dr. Rafael Moreno y a los miembros del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez por su apoyo para la conclusión de este trabajo.

A los miembros del jurado pues también tomaron parte en mi formación académica.

A mis compañeros del Lab. 105, Omar, Gaby, Edith, especialmente a Andrea y Sandra por todos los momentos de trabajo y amistad que compartimos.

A Dios por regalarme lo más hermoso: la vida y colmarme de bellos obsequios

A mis dos ángeles: mi abuelita y el Güero, sé que siempre estarán conmigo

A mi madre **Marcia** por todo el esfuerzo, sacrificio y amor que dio para que yo llegara hasta aquí

A mi padre Enrique por todo el amor que siempre me ha dado.

A mis tíos Arturo, Flor, Paty y Beto quienes siempre se preocuparon por mí y han sido un ejemplo a seguir.

A mi hermana Paty y mis primos por toda una vida compartida

A mis amigos Martha y Rogelio por su incondicionalidad

A todos mis amigos de la Facultad, especialmente a Nelly y Carlos.

Y a las dos personas más importantes de mi vida con quienes comparto todo: mis dos hombres: Gabriel y nuestro hijo Luis Enrique a quienes amo profundamente y de quienes he aprendido cómo es el verdadero amor. Gracias por ser para mí.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES	6
1 - Las proteínas de unión a RNA (RNPs)	6
1.1.- RNPs de cloroplasto	6
1.2.- Las RNPs de cloroplasto de <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
2 - Producción de proteínas recombinantes en <i>Escherichia coli</i>	13
3.- El sistema de expresión de proteína recombinante del vector pQE	14
3.1 - El plásmido pQE	15
3.2.- Regulación de la expresión	16
3.3.- Cepas de <i>Escherichia coli</i> empleadas	17
3.4.- El sistema de purificación	18
4 - Reacción en cadena de la polimerasa	19
OBJETIVO	22
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
MATERIALES Y MÉTODOS	25
1.- Materiales biológicos	25
2 - Enzimas y reactivos	28
3.- Métodos	28
3.1.- Diseño de oligonucleótidos	28
3.2.- Secado de oligonucleótidos	28
3.3.- Cálculo de la concentración de oligonucleótidos	29
3.4.- Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	30
3.5.- Transformación genética (Técnica de CaCl ₂)	31
3.6.- Almacenado de células en glicerol	32
3.7.- Extracción de DNA plasmídico (Minipreparaciones)	33
3.8.- Extracción rápida de DNA plasmídico (Método Qiaprep)	33
3.9.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa	34

3.10.- Extracción de DNA de geles (Método QIAEX)	36
3.11.- Reacción en cadena de la polimerasa	38
3.12 - Reacciones de restricción	39
3.13 - Reacciones de ligación	39
3.14.- Inducción de producción de proteínas recombinantes	41
3.15.- Electroforesis desnaturizante en poliacrilamida (SDS-PAGE)	41
3.16.- Detección inmunológica	43
II. RESULTADOS	45
1 - Amplificación de los genes	45
2.- Reacciones de ligación	47
3.- Selección de colonias positivas	48
4.- Expresión de las proteínas recombinantes	50
5.- Expresión de la CP29	52
6.- Detección inmunológica	54
III DISCUSIÓN	55
1.- Estrategia de clonación	55
2.- Producción de proteínas recombinantes	56
X. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	58
X BIBLIOGRAFÍA	69

REVIATURAS

	Aminoácido
	Ampicilina
	Persulfato de amonio
<i>thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	Albúmina de suero bovina.
	Ácido desoxirribonucleico
A	Etilendiamintetrasodio
<i>coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
H	Etanol
	Gramo
	Hora
G	Isopropil β -D-tiogalactósido
	Kanamicina
	Kilobases
	Kilodaltos
	Litro
	Medio Luria-Bertoni
	Molaridad
	Miligramos
	Mililitros
	Milimolar
	Minutos
IA	Ácido ribonucleico mensajero.
	Normalidad
	Nanómetros
	Pares de bases
	Reacción en cadena de la polimerasa
	Ácido ribonucleico
sa	Ribonucleasa

RNP	Proteína de unión a mRNA
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAE	Amortiguador de Tris, acetatos y EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina
Tet	Tetraciclina
UV	Ultravioleta
V	Voltios
µg	Microgramos
µL	Microlitros
°C	Grado Celsius

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue obtener tres clonas bacterianas capaces de sobreexpresar las pequeñas proteínas de unión a RNAm de cloroplasto (RNPs) de *Arabidopsis thaliana*, CP29, CP31, CP33 en su forma madura (sin péptido de tránsito) y con una etiqueta de seis histidinas que permitiera purificarlas, para su posterior caracterización.

Para subclonar los tres genes de *A. thaliana* se eligió la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se diseñaron oligos que permitieran insertar un sitio de restricción en el extremo 5' de las secuencias (oligo forward). El oligo "reverse" fue el correspondiente al plásmido en el que se encontraban clonados los genes.

Una vez obtenidos los fragmentos amplificados, se restringieron con las enzimas *Hind*III y *Pst*I. Tanto el vector como los fragmentos amplificados se purificaron y se ligaron. Obtenidos los tres nuevos plásmidos, se transformaron en células competentes *E. coli* DH5α, que poseían una baja expresión basal de las proteínas recombinantes. Se seleccionaron las colonias positivas por resistencia a Ampicilina y se purificaron los plásmidos. Estos plásmidos se emplearon para transformar células M-15, las cuales poseen un sistema súper-reprimido de expresión basal por lo que la proteína de interés se produce sólo hasta que se adicione al medio un inductor específico (IPTG).

Después de inducir la producción de las proteínas recombinantes CP29, CP31, CP33, los extractos proteicos fueron separados en un gel de poliacrilamida. En los tres casos después de la inducción, las bacterias transformadas produjeron proteínas de los tamaños esperados, lo que puede considerarse un indicio de que la clonación fue correcta. Un análisis inmunológico de estas proteínas recombinantes empleando un anticuerpo en contra de una RNP de espinaca confirmó la correcta expresión de las proteínas.

II. INTRODUCCIÓN

En el cloroplasto se llevan a cabo una gran variedad de procesos metabólicos necesarios para el desarrollo de la planta. Los cloroplastos se originan de proplastidios que se pueden diferenciar también en etioplastos, cromoplastos y amiloplastos. Los cloroplastos se diferencian en condiciones en las que la luz juega un papel preponderante (Mohr y Schopfer 1995) ya que activa la expresión de genes importantes para el desarrollo completo del cloroplasto. Dichos genes no sólo son nucleares sino también cloroplásticos, es decir del genoma del organelo y se regulan de manera coordinada (Mullet 1993). En experimentos que se han llevado a cabo en plantas de tabaco, espinaca y cebada se demostró que durante el desarrollo de este organelo inducido por luz, la transcripción relativa de algunos genes se mantiene casi constante, mientras que la abundancia de algunos mRNAs se ve alterada significativamente (Deng y Gruissem, 1987, Deng *et al.*, 1987). Esta observación sugiere que la regulación de la expresión genética del cloroplasto se puede llevar a cabo de manera post-transcripcional, ya sea estabilizando o procesando los mRNAs (Gruissem *et al.*, 1988; Deng *et al.*, 1988). En espinaca se han identificado algunos factores que participan en este proceso. Estos factores son proteínas de unión a mRNA como la 28RNP (Schuster y Gruissem, 1991) y la 24RNP cuyas funciones no se han elucidado completamente (Toledo, 1998). Estas proteínas también se han encontrado en plantas como tabaco (Li y Sugiura, 1990, Ye *et al.*, 1991), maíz (MA16) (Ludevid *et al.*, 1992) (NBP) (Cook y Walker, 1992) y *Arabidopsis thaliana* (cp29, cp31 y cp33) (Ohta *et al.*, 1995).

Debido a la complejidad de los sistemas biológicos es muy difícil llevar a cabo estudios *in vivo*, por lo que la gran mayoría de ensayos de caracterización de RNPs de cloroplasto se han llevado a cabo *in vitro*, siendo necesarias herramientas bioquímicas específicas. Tal es el caso de la 24RNP y la 28RNP de espinaca en donde el empleo de anticuerpos específicos y proteína recombinante han sido herramientas muy útiles para su caracterización (Schuster y Gruissem, 1991, Lisitsky *et al.* 1995; Toledo, 1998).

Como un primer paso en la contribución a la aplicación de este enfoque al estudio de la función de las RNP's, el presente trabajo tuvo como objetivo subclonar los genes de las RNP's CP29 (*athcp 29*), CP31 (*athcp 31*) y CP33 (*athcp 33*), de

Arabidopsis thaliana en un vector de expresión para su posterior producción masiva. Esta proteína podrá ser empleada en la producción de anticuerpos específicos y ensayos de caracterización de la función de las mismas

III. ANTECEDENTES

1.-Las proteínas de unión a RNA (RNP).

Las RNPs son proteínas que se han encontrado en un sin número de organismos y con diversas funciones, se encuentran en algas, plantas superiores *Drosophila* e incluso en mamíferos como el ratón y el humano (Fukami *et al.*, 1993) (Tabla 1).

Estas proteínas poseen la característica de unirse a mRNA gracias a regiones consenso altamente conservadas, estas regiones conocidas como CS-RBD (regiones consenso de unión a RNA por sus siglas en inglés) consisten en aproximadamente 80 aminoácidos (Lisitsky *et al.*, 1994; Fukami *et al.*, 1993). Hay evidencias cristalográficas y de resonancia magnética nuclear que sugieren que los dominios de unión de las proteínas snRNP y hnRNP forman una estructura globular (Fukami *et al.*, 1993).

El CS-RBD incluye una secuencia consenso octamérica altamente conservada (RGFGVXW) que se le denomina RNP1 y una hexamérica menos conservada que se denomina RNP2 (LFVGNL) (Ni *et al.*, 2000) Gran parte de los aminoácidos conservados son hidrofóbicos constituyendo un centro hidrofóbico en el dominio de unión a RNA (Fukami *et al.*, 1993; Shamoo *et al.*, 1994) En la mayoría de los dominios RNP las dos cadenas aromáticas del RNP1 y una del RNP2 forman una plataforma idónea para las interacciones con las bases del RNA blanco, asimismo la cadena proteica vecina forma varios puentes de hidrógeno con las bases enlazadas en la zona aromática (Nagai *et al.*, 1995)

1.1 Las RNP's de cloroplasto.

En plantas se han logrado identificar una gran variedad de estas proteínas, aunque no se ha elucidado la función de la mayoría de ellas (Ni *et al.*, 2000). Las proteínas que más se conoce son aquellas que se unen al mRNA de cloroplasto específicamente a los extremos 3' no traducibles (3' UTR) (Stern y Gruijsem, 1989). Las RNP's de cloroplasto se caracterizan porque poseen dos dominios de unión a RNA y algunos motivos auxiliares entre los que destacan un dominio ácido hacia la región amino terminal (Fukami *et al.*, 1993, Ohta *et al.*, 1995) y otros dominios con zonas ricas

glicina (Ludevid *et al.*, 1992; Ni *et al.*, 2000, Ohta *et al.*, 1995) o serina (Ohta *et al.*, 1995). Las RNP's de cloroplasto son sintetizadas en el núcleo y transportadas al cloroplasto por lo que poseen un péptido de tránsito. Este péptido es removido de la proteína al entrar al cloroplasto generando la proteína madura (Smeekens *et al.*, 1990). Entre estas se encuentran la proteína de unión a ácidos nucleicos (NBP) de maíz (Cook Walker, 1992), las 24 y 28RNPs de espinaca (Lisitsky *et al.*, 1995) y las cp29, 31 y 33 *Arabidopsis thaliana* (Ohta *et al.*, 1995) (Ver tabla 2).

Tabla 1. Clasificación de las proteínas de unión a mRNA (Fukami *et al.* 1993)

PROTEÍNAS	FUNCIÓN QUE SE LES ATRIBUYE	ORGANISMOS EN QUE SE ENCUENTRAN
NPBP Poly A binding proteins	Se unen a regiones de polí (A)	<i>Drosophila</i> , <i>Xenopus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> , humano
FACTORES DE SPLICING	Controlan el splicing	<i>Drosophila</i> , humano, ratón, gallina
RNP's DE CLOROPLASTO	Se unen al mRNA de cloroplasto. Participan en procesamiento post-transcripcional	Tabaco, espinaca, sorgo, maíz y <i>A. thaliana</i>
MRNP's heteronuclear monucleoproteins		Humano, rata, bovinos, <i>Drosophila</i> .
MRNP's small nuclear monucleoproteins		Humano, ratón, <i>Drosophila</i> .
NUCLEOLINAS		Ratón, hámster, rata.

Experimentos llevados a cabo con los dos dominios RNP de la 28RNP de espinaca demostraron que cada uno de los dominios posee diferente afinidad para unirse al RNA, mientras que el dominio ácido tiene un efecto positivo en la unión de la proteína completa con el RNA (Lisitsky *et al.*, 1995)

De las RNP's de cloroplasto que existen, la más estudiada es la 28RNP de espinaca cuya expresión es regulada por el desarrollo de la planta, es específica del cloroplasto y su expresión es inducible por luz roja (Lisitsky *et al.*, 1995). Algunos ensayos de inmunosustracción sugieren que esta proteína puede estar involucrada en el procesamiento de los extremos 3' de mRNAs cloroplásticos (Schuster y Gruissem, 1991). Asimismo esta proteína requiere ser fosforilada para ser activa (Lisitsky *et al.*, 1995)

Otra RNP de cloroplasto de espinaca es la 24RNP cuya estructura es muy semejante a la 28RNP. La 24RNP parece estar relacionada con la estabilidad de los mRNAs cloroplásticos definiendo el sitio de corte (Toledo, 1998)., esta proteína se encuentra en mayor abundancia en hojas jóvenes, mientras que la 28RNP en hojas maduras

Tabla 2. RNP's identificadas en cloroplastos de plantas superiores (Suguita y Sugiura, 1996).

ROTEINA	ESPECIE	CARACTERISTICA Y FUNCIÓN PROPUESTA.
CP28, CP29A, CP29B, CP31, CP33.	<i>Nicotiana sylvestris</i>	Unión preferencial a poli(G), poli(U), proteínas de unión generalizada a RNAs presentes como complejos de 20-30s.
CP-RNP30, CP-RNP31	<i>N. plumbaginifolia</i>	Corresponden a las cp29A y cp29B de <i>Nicotiana sylvestris</i> .
CP29, CP31, CP33	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Homólogas a las de <i>Nicotiana sylvestris</i>
CP-RNP-T	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
CP-RBP31, 33	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
CP-RBP	<i>M. crystallinum</i>	
CP-RNP	<i>Spinacea oleracea</i>	Procesamiento de extremos 3'UTR de mRNA.
CP-RNP	<i>Spinacea oleracea</i>	Desconocida
CP-RBP	<i>Zea mays</i>	Aislada como proteína de unión a DNA
CP-RNP1 de frijol	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Proteína de unión a AG-1; unión específica a secuencias de cadena sencilla ricas en T.

1.2. Las RNPs de cloroplasto de *Arabidopsis thaliana*.

Arabidopsis thaliana es una pequeña planta que se emplea ampliamente como modelo genético. Es miembro de la familia *Brassicaceae*, que incluye especies de interés comercial como la col y el rábano. *Arabidopsis* no es de significación agronómica, mas bien ofrece importantes ventajas para la investigación básica en genética de plantas y biología molecular. Dichas ventajas son:

- ♦ Presenta un ciclo de vida corto, aproximadamente seis semanas desde la germinación.
- ♦ Se cultiva fácilmente en poco espacio y produce muchas semillas
- ♦ Posee un genoma pequeño (114.5 Mb/125 Mb en total) secuenciado completamente en diciembre de 2000.
- ♦ Existen una gran cantidad de líneas mutantes y otros recursos genéticos.
- ♦ Posee una eficiente transformación mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*
- ♦ Se conoce bien el mapa físico y genético de sus cinco cromosomas.
- ♦ Existe una amplia cantidad de recursos accesibles a través de Internet.

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado tres proteínas de la familia de las RNP's cuyas características son similares a las de *N. plumbaginifolia*. Sus genes fueron aislados de una biblioteca genómica de *A. thaliana* empleando como sondas cDNA de tabaco que codifican las respectivas cp29, cp31 y cp33. Los tres genes que se aislaron son nucleares, unicopia y se componen de cuatro exones y tres intrones. Se aislaron los cDNAs y se clonaron en un vector denominado TMV, derivado del vector Bluescript y cuya construcción se muestra en la Figura 6. Las proteínas que codifican estos genes fueron denominadas CPs lográndose determinar que son transportadas al cloroplasto. Sus características son que las tres poseen péptido de tránsito, un dominio ácido en el extremo amino terminal y dos dominios de unión a mRNA (Ver Figura 1). (Ohta *et al.*, 1995)

CP29

Es un polipéptido de 334 aminoácidos, cuyos primeros 66 son ricos en serina y prolina, confiriéndole una carga neta positiva característica a los péptidos de tránsito (Heekens *et al.*, 1990). La proteína madura posee 268 a.a y un peso molecular de 26.3 kDa. Los primeros 32 a.a de la proteína madura son ricos en ácidos glutámico y aspártico (dominio ácido). Posee también dos dominios consenso de unión a RNA (CS-D I y II) y entre estas secuencias una zona espaciadora rica en glicina y serina (Ohta *et al.*, 1995).

CP31

Posee 314 aminoácidos, de los cuales 76 corresponden al péptido de tránsito, constituyendo la proteína madura en 238 a.a. con un peso molecular aproximado de 26.3 kDa. La secuencia del péptido maduro posee un 62% de identidad con la proteína cp31 de tabaco; el dominio ácido es similar al de la proteína 28RNP de espinaca. Posee dos dominios de unión a RNA y una zona espaciadora pequeña no rica en algún tipo de aminoácido específico (Ohta *et al.*, 1995).

CP33

El polipéptido tiene 321 aminoácidos con un péptido de tránsito de 73 aminoácidos, por lo que la proteína madura consiste en 256 aminoácidos con un peso molecular de 27.8 kDa, la región espaciadora de esta proteína es similar a la de la cp31 (Ohta *et al.*, 1995).

CP 29

1 SAFNPKSLPL CVSRPASVSV LPPSLSFKLH SDHLVSIFAS SALKCSSPAE YPSRFVRNVA
61 VSSDFEVEED DMFADGDDSA PVERN\$FSPD LKLFVGNLSF NVDSAQLAQL FESAGNVEMV
121 EVIYDKVTGR SRGFGFVIMS TAAEVEAAAQ QFNGYEFEGR PLRVNAGPPP PKREESFSRG
181 PRSGGYGSER GGGYGSERGG GYGSERGGY GSQRSGGGY GSQRSSYSG SGSGSGSGSG
241 NRLYVGNLSW GVDDMALENL FNEQGKVEA RVIYDRDSEGR SKGFGFVITLS SSQEVQKAIN
301 SLNGADLDGR QIRVSEAEAR PPRGQF

CP31

1 KPLAMADSSS STIFSHPSIS STISSESRIRS SSVSLTGRI NLPLSFRVS LSLKTKTHLK
61 KSPFVSEVAQ TSDWAEEGGE GSVAVEETEN SLESQDVSEG DESEGDVSEG AVSERAEPPE
121 PSEPAKLFVG NLAYDVNSQA LAMLFEQAGT VEIAEVIYNR ETDQSRGFGF VTMSVDEAE
181 TAVEKENRYD LNCRLTLVNK AAPRGSRPER APRVYEPAFR VYVGNLPWDV DNGRLEQLFS
241 EHGKVVEARV VYDRETGRSR GFGFVTMSDV DELNEAISAL DGQNLGRAI RVNVAERPP
301 RRGY

CP33

1 AVAVSAAATA SSAATENPLL SSHSNSQLFY RFTPKSPKLV ANCPNELIHL SNIRKRRFFC
61 AAETEASSAD DEIQASVEED EEVEEEDGEG EEEVEEEKQT TQASGEEWRL YVGNLPYTTT
121 SSELSQIFGE AGTVVDVQIV YDKVTDERSG FGFVTMGSIE EAKEAMQMFN SSQIGGRIVK
181 VNFPEVPRGG ENEMRTKLR DNNRSYVDSF HKVYAGNLGW NLTSQGLKDA FGDQPGVLGA
241 KVIYERNTGR SRGFGFISFE SAENVQSALA TMNGVEVEGR ALRLNLASER EKPTVSPSPV
301 EEGETEEASL ESNEVLSNVS A

Figura 1. Secuencia de aminoácidos de las proteínas de unión a RNA de cloroplasto de *Arabidopsis thaliana*. Tomado de Ohta *et al.*, 1995. En **negritas** se representan las regiones consenso de unión a mRNA en **negrita v subrayado** los dominios de unión a mRNA y en subrayado el dominio ácido.

-Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*

La necesidad de obtener proteínas en grandes cantidades para diferentes tipos de estudios bioquímicos o estructurales ha conducido al desarrollo de técnicas de DNA recombinante para lograr este objetivo. En un principio estos métodos consistían en realizar manipulaciones genéticas para seleccionar *in vivo* eventos de recombinación genética que insertaban el gen deseado en bacteriófagos. Posteriormente, con el adelanto de las técnicas de DNA recombinante fue posible la manipulación *in vitro* de genes y plásmidos que podían ser creados a deseo, cumpliendo las necesidades de los investigadores de producir grandes cantidades tanto de los genes clonados, como de las proteínas de interés (Brent, 1994). Uno de los sistemas para producir proteínas recombinantes que se ha empleado con más éxito es *Escherichia coli*.

En este sistema, un gen ajeno a esta bacteria es insertado en un vector de expresión, generalmente un plásmido. El plásmido debe poseer los siguientes elementos:

Un gen de selección es decir, un marcador que permita mantener el plásmido en la célula (resistencia a antibióticos o auxotrofia).

Una región "polilinker" o sitio de clonación múltiple, en la cual se puede insertar el gen en la orientación correcta para su transcripción y traducción. Esta secuencia contiene varios sitios de corte para diversas enzimas de restricción, permitiendo clonar acorde a la secuencia del gen de interés y a las necesidades de cada caso.

Un promotor de la transcripción que sea controlable por inducción de modo que pueda producir grandes cantidades del mRNA del gen clonado. Generalmente los plásmidos están bajo los promotores *lac*, *trp* o *tac*.

Secuencias de control de la traducción que favorecen el posicionamiento adecuado de los ribosomas para iniciar la síntesis de la proteína, debe contar con el codón iniciador de la traducción, ATG.

Actualmente es muy frecuente el uso de vectores que permitan obtener proteínas sueltas o fusionadas con alguna otra proteína, ya sea para facilitar la purificación de la proteína recombinante o para conferir a la proteína de interés características específicas que permitan identificarla. Entre las fusiones más importantes se

encuentran aquellas en las que se emplean las proteínas lacZ (β -galactosidasa), trpE, glutatión-S-transferasa, proteína de unión a maltosa o una etiqueta de seis histidinas.

El uso de este sistema es muy amplio pues el empleo de este hospedero tiene dos ventajas, la primera es la facilidad con la que se puede manipular y la segunda, la rapidez con que crece en medios relativamente económicos

Una desventaja significativa en el empleo de este sistema para expresar proteínas eucarióticas es el no saber si el plegamiento de la proteína recombinante es idéntico al de la proteína nativa de interés. Por otro lado, los sistemas procariones no cuentan con la maquinaria necesaria para llevar a cabo modificaciones postraduccionales como fosforilaciones y glicositaciones, que se presentan en sistemas eucariotes. Por lo tanto, si se desea expresar proteína recombinante de un sistema eucarionte siempre se debe tener en consideración la posibilidad de un plegamiento erróneo y una posible alteración en su función. Así también si el interés es elucidar estructuras se debe tener en cuenta estas consideraciones. A pesar de estos posibles inconvenientes, el sistema de expresión en bacteria es muy empleado con resultados muy favorables (Brent, 1994)

3.-El sistema de expresión de proteína recombinante del vector pQE.

El sistema pQE es un producto comercial de la casa QIAGEN INC. que facilita subclonar un gen de interés en un plásmido cuyas características permiten etiquetar la proteína recombinante para su fácil expresión y purificación. Asimismo se pueden obtener proteínas recombinantes fusionadas a fragmentos de otras proteínas con el fin de evitar su posible degradación.

El sistema pQE se compone de varios vectores que proveen altos niveles de expresión en *E. coli* de proteínas o péptidos con diversas características como son:

- Una etiqueta de 6 Histidinas (6xHis), que permite purificar la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad empleando una resina metalquelante. Esta etiqueta puede estar situada hacia el extremo amino o carboxilo de la proteína.

- Si se desea expresar polipéptidos pequeños, se recomienda emplear el vector que contiene un fragmento de la proteína Dehidrofolato Reductasa (DHFR), con el fin de aumentar el tamaño del péptido y con eso conferirle mayor estabilidad. Este fragmento DHFR además de estabilizar el polipéptido aumenta su antigenicidad, favoreciendo con esto la posterior obtención de anticuerpos Anti-6XHisDHFR-proteína.

Este sistema de vectores es muy completo y abarca una gran cantidad de necesidades específicas tanto en la construcción, como en la expresión, purificación y selección de la proteína recombinante

1. El plásmido pQE.

El plásmido pQE es una derivación de otros plásmidos que pertenecen a la familia pDS. Las características básicas del plásmido son las siguientes:

- Posee un elemento Promotor/Operador regulable. El promotor es del bacteriófago T5 de *E. coli* y dos secuencias operadoras *lac*.
- Un sitio de unión a ribosoma diseñado para un óptimo reconocimiento y unión del mRNA.
- Una secuencia codificante de la etiqueta 6xHis.
- Un sitio de clonación múltiple
- Codón de terminación de la traducción en todos los plásmidos y sus respectivas variantes de marco de lectura
- Región terminadora de la transcripción "t_o" proveniente del fago λ .
- Una región de replicación y el gen de la β -lactamasa del plásmido pBR322 (resistencia a ampicilina).

Para las construcciones que llevan la etiqueta 6xHis en la región amino terminal, se emplea la variante pQE30 que a su vez posee tres derivaciones para corregir el marco de lectura y asegurar la expresión de la proteína en fase. Se emplean estos vectores ya que con ellos no es necesario llevar a cabo modificaciones adicionales, basta con ligar el plásmido linealizado con el gen digerido con las enzimas de restricción acordes al sitio de clonación elegido de acuerdo al marco de lectura del gen. Es recomendable

emplear un clonación dirigida (restringiendo con dos enzimas) o bien desfosforilar los extremos para prevenir religaciones. En estas construcciones no es necesario incluir el codón de inicio, ni las regiones de control hacia el 5' del gen puesto que el plásmido posee las necesarias. Sin embargo, el codón de término del gen sí se puede incluir, aunque tampoco es necesario pues el plásmido posee uno en el extremo 3', que asegura la terminación de la traducción (Figura 2) (QIAGEN, 1992).

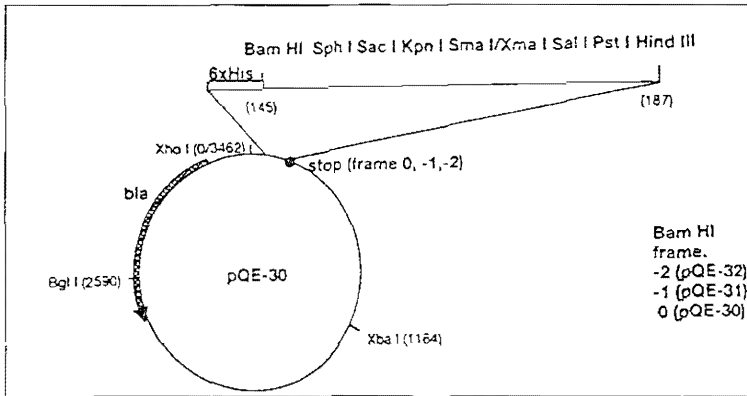


Figura 2. Mapa del vector pQE30 y sus variantes pQE31 y pQE32. (The QIAexpressionist, QIAGEN, 1992).

3.2. Regulación de la expresión

La regulación de la expresión de un gen se puede dar a dos niveles: transcripcional o traduccional. Sin embargo, en procariontes lo más común es en el inicio de la transcripción mediante genes reguladores.

Un gen regulador es aquel que codifica proteínas involucradas en la regulación de la expresión de otros genes y generalmente se encuentra en la vecindad de dichos genes. Para llevar a cabo la regulación completa se requiere de secuencias unidas físicamente al gen que va a ser regulado, estas secuencias son el promotor y el operador. El promotor sirve para iniciar la transcripción, mientras que el operador es la secuencia específica a la que se une el represor, cuando esto sucede la RNA polimerasa no inicia la transcripción y la expresión del gen se encuentra "apagada".

La regulación de la expresión en el sistema pQE se lleva a cabo gracias a la participación de un segundo plásmido denominado pREP4 que codifica el represor *lac* y este se encuentra contenido en las cepas de *E. coli* en las que se lleva a cabo la expresión de la proteína (cepa M15). Debido a que la expresión de genes que se encuentran bajo el promotor/operador *lac* es muy fuerte, debe existir una alta cantidad del represor *lac*, por lo que las cepas contienen múltiples copias del pREP4

Para inducir la síntesis de la proteína recombinante basta con adicionar al medio de crecimiento Isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG), un reactivo que funciona como inductor gratuito. EL IPTG provoca que no se sintetice el represor, con lo que se deja libre al promotor, se lleva a cabo la síntesis de la proteína de interés y no interfiere en los pasos siguientes de la expresión y purificación. Este sistema de regulación con un segundo plásmido y las dos regiones operadoras del plásmido pQE favorecen un alto control de la expresión de la proteína recombinante.

3. Cepas de *Escherichia coli* empleadas.

Las cepas de *E. coli* empleadas para la propagación del plásmido y la expresión de la proteína deben contar con algunas características básicas para funcionar adecuadamente. El sistema recomienda el empleo de dos cepas distintas, una para transformar con el plásmido recombinante, propagarlo y conservar la construcción y otra para llevar a cabo la expresión de la proteína

- ♦ ***E. coli* JM-109** Esta cepa se considera la idónea para propagar y almacenar el plásmido. Posee el gen *lac^f* mutado en el promotor lo que lleva a un aumento de hasta diez veces de la expresión del represor *lac*. Esta cepa no posee el plásmido pREP4, pero la mutación es suficiente para regular la expresión de la proteína en niveles bastante aceptables, aunque en algunos casos se lleva a cabo un "goteo" de la expresión de la proteína y si ésta resulta tóxica para la bacteria, puede limitar la propagación del plásmido. La selección de las colonias positivas se lleva a cabo adicionando al medio de crecimiento 100 μ g/mL de ampicilina.

- ♦ ***E. coli* M-15.** Esta cepa posee múltiples copias del plásmido pREP4, responsable de una regulación más fuerte, comparada contra la cepa JM-109. Sin embargo, en esta cepa no se puede llevar a cabo la propagación del plásmido pQE puesto que al extraer el DNA plasmídico se extraen tanto el pREP4 como el plásmido con el gen de interés. Debido a la presencia del plásmido pREP4, cuyo marcador de selección es la resistencia a kanamicina, la cepa transformada con ambos plásmidos se debe cultivar en medio suplementado con 100 µg/mL de amp. y 25 µg/mL de kan.

3.4. El sistema de purificación.

El sistema de purificación de la proteína recombinante es por medio de cromatografía de afinidad en la que el adsorbente es una resina que posee un metal unido por enlaces coordinados (ya sea Ni^{2+} o Co^{2+}), el cual aún posee pares de electrones libres para unirse a los nitrógenos de las histidinas presentes en la etiqueta 6xHis. Este sistema es sencillo y permite obtener proteína recombinante con muy alto grado de pureza en un solo paso de purificación.

La resina que se emplea se denomina Ni-NTA, en donde el ligando Ácido Nitrilo-tri acético (NTA), posee cuatro sitios quelantes que pueden interactuar con el metal, dejando libres dos sitios libres en la esfera de coordinación del Níquel, mismos que pueden ser ocupados por los sitios de unión de la etiqueta 6xHis (Figura 3). Las proteínas con etiqueta 6xHis se unen a la resina con una afinidad muy alta, la $K_d = 10^{-13}$ a pH 8.0, por lo que otras proteínas que se unen con menos especificidad pueden ser lavadas de la resina en condiciones relativamente fuertes, sin afectar la afinidad de la proteína recombinante por la resina. La resina se encuentra compuesta por una alta concentración de NTA enlazada a una superficie de sefarosa CL-6B.

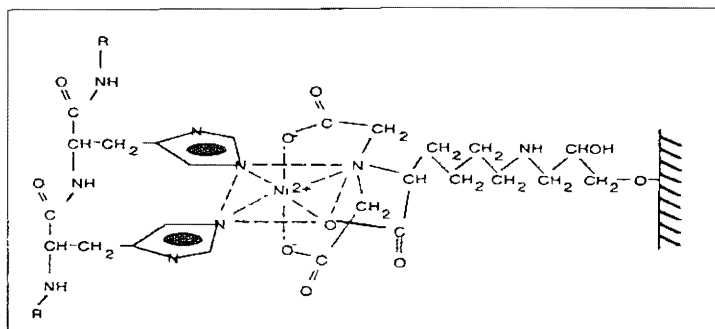


Figura 3. Interacción entre la etiqueta 6xHis y la resina Ni-NTA en la que se basa la purificación de las proteínas recombinantes (“The QIAexpressionist”, QIAGEN, 1992).

Para llevar a cabo la purificación de la proteína es necesario eluirla de la resina. Esto puede ser llevado a cabo por diversos medios. Uno de ellos es reduciendo el pH, provocando que las histidinas se protonen y se disocian de la resina. Los monómeros (proteínas que no se asocian entre sí) eluyen a un pH aproximado de 5.9, mientras que los oligómeros y proteínas con más de una etiqueta de histidinas lo hacen alrededor de pH 4.5. Otro método muy efectivo es por competencia con imidazol que es capaz de unirse a la resina y desplazar a la proteína etiquetada. La competencia se lleva a cabo por la similitud de la estructura entre el imidazol y la histidina.

4.- Reacción en cadena de la polimerasa.

Es una reacción *in vitro* desarrollada por científicos de Cetus Corporation (Mullis *et al.*, 1986) a mediados de los años 80's, para la síntesis enzimática de DNA específico. La reacción se basa en la alineación y extensión de dos oligonucleótidos (oligonucleótidos) que flanquean la región blanco de la doble hebra, después de la desnaturalización llevada a cabo mediante calentamiento. Cada oligo híbrida a una de las hebras de DNA molde separada y la extensión se lleva a cabo a partir del 3'OH libre de cada uno de los extremos de los oligos. Los oligonucleótidos alineados son

extendidos por acción de la DNA polimerasa. Estos pasos son un solo ciclo (Ver Figura 4).

Las nuevas hebras junto con los oligos sirven para un nuevo ciclo. Como consecuencia, con la repetición de los ciclos, la cantidad de DNA sintetizado aumenta exponencialmente; así cada ciclo dobla la cantidad de DNA de interés. El tamaño de los productos es igual a la suma de los dos oligos más la distancia entre ellos.

La síntesis del DNA se llevaba a cabo inicialmente con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* pero actualmente se emplean polimerasas termoestables como la *Taq* DNA polimerasa, que fue aislada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*. El empleo de esta enzima transformó completamente la técnica pues con el uso de un termociclador es posible llevar a cabo la reacción en un solo tubo con todos los componentes necesarios. El uso de polimerasas termoestables no sólo simplificó el procedimiento sino que también lo hizo más específico y con mayor rendimiento.

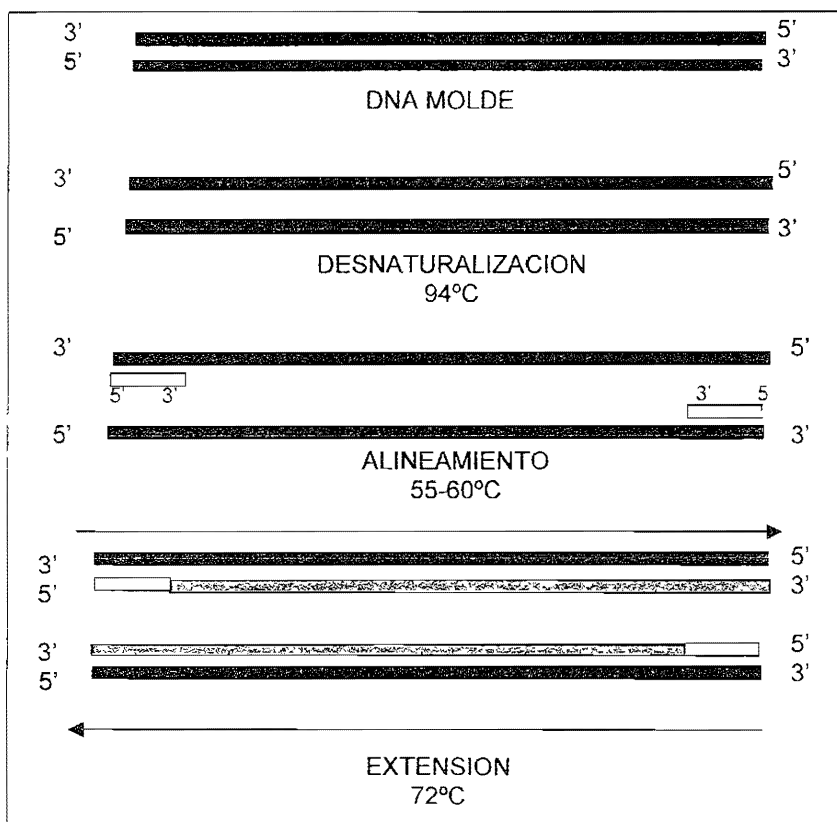


Figura 4. La reacción en cadena de la polimerasa. Esquema de la amplificación de las hebras de DNA. Se representa un solo ciclo, al repetirse sucesivamente, aumenta exponencialmente la cantidad de DNA.

IV. OBJETIVO

Subclonar los genes de las pequeñas proteínas de unión a RNA de cloroplasto (*athcp's* 29, 31, 33), en un vector de expresión bacteriano (pQE), con el objeto de sobre-expresar las correspondientes proteínas recombinantes en *Escherichia coli*.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Las RNPs son sintetizadas en el citoplasma con un péptido de tránsito que las dirige hacia el cloroplasto el cual es removido para generar las proteínas maduras. Por lo tanto, las proteínas recombinantes tampoco lo deben poseer. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificará únicamente la secuencia de los genes que abarca del dominio ácido de las proteínas hasta el carboxilo terminal (Figura 7).

Para subclonar los tres genes de *A. thaliana* mediante la estrategia de PCR, fue necesario propagar los plásmidos originales que contienen estos genes los cuales fueron los moldes en la reacción. Se diseñaron oligos específicos para cada uno de ellos que permitieran insertar un sitio de restricción BamHI en la región 5', ya que en esa zona no poseen ningún sitio compatible para clonarlos en el plásmido pQE. Para la región 3' se empleó el oligo M-13 que anilla con ese sitio presente en el plásmido pBS en el cual se encuentran clonados los genes (Ver Figura 7).

Los fragmentos amplificados fueron digeridos con dos enzimas de restricción diferentes (BamHI en 5' y PstI en 3') para darle direccionalidad a la clonación y evitar posibles religaciones del plásmido.

El plásmido elegido para llevar a cabo la clonación es el pQE31, el cual posee una secuencia que codifica una etiqueta de seis histidinas en el amino terminal y adiciona nucleótidos para corregir el marco de lectura de acuerdo a las secuencias de los tres genes.

Los plásmidos recombinantes después de la ligación, fueron transformados en células competentes de *E. coli* JM-109, que poseen una baja expresión basal de la proteína. De las colonias que se obtienen, se seleccionaron algunas en las que se verificó que contuvieran los plásmidos con los insertos correspondientes a los genes clonados.

IV. OBJETIVO

Subclonar los genes de las pequeñas proteínas de unión a RNA de cloroplasto (*athcp's* 29, 31, 33), en un vector de expresión bacteriano (pQE), con el objeto de sobre-expresar las correspondientes proteínas recombinantes en *Eschenchia coli*.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Las RNPs son sintetizadas en el citoplasma con un péptido de tránsito que las dirige hacia el cloroplasto el cual es removido para generar las proteínas maduras. Por lo tanto, las proteínas recombinantes tampoco lo deben poseer. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificará únicamente la secuencia de los genes que abarca del dominio ácido de las proteínas hasta el carboxilo terminal (Figura 7)

Para subclonar los tres genes de *A. thaliana* mediante la estrategia de PCR, fue necesario propagar los plásmidos originales que contienen estos genes los cuales fueron los moldes en la reacción. Se diseñaron oligos específicos para cada uno de ellos que permitieran insertar un sitio de restricción BamHI en la región 5', ya que en esa zona no poseen ningún sitio compatible para clonarlos en el plásmido pQE. Para la región 3' se empleó el oligo M-13 que anilla con ese sitio presente en el plásmido pBS en el cual se encuentran clonados los genes (Ver Figura 7)

Los fragmentos amplificados fueron digeridos con dos enzimas de restricción diferentes (BamHI en 5' y PstI en 3') para darle direccionalidad a la clonación y evitar posibles religaciones del plásmido

El plásmido elegido para llevar a cabo la clonación es el pQE31, el cual posee una secuencia que codifica una etiqueta de seis histidinas en el amino terminal y adiciona nucleótidos para corregir el marco de lectura de acuerdo a las secuencias de los tres genes.

Los plásmidos recombinantes después de la ligación, fueron transformados en células competentes de *E. coli* JM-109, que poseen una baja expresión basal de la proteína. De las colonias que se obtienen, se seleccionaron algunas en las que se verificó que contuvieran los plásmidos con los insertos correspondientes a los genes clonados.

Células competentes de *E. coli* M-15 Se transformaron con los plásmidos con los genes de interés. Estas células poseen un sistema súper-reprimido de expresión basal por lo que las proteínas de interés no se producen hasta que no se les adicione al medio un inductor específico.

Al inducir la producción de las tres proteínas y analizarlas mediante un gel de poliacrilamida se comprobó por su tamaño que se trata de las proteínas de interés. Para confirmar la identidad de las proteínas se empleó un anticuerpo en contra de la 24RNP de espinaca, la cual tiene una alta similitud con las proteínas de interés, para realizar un Western blot

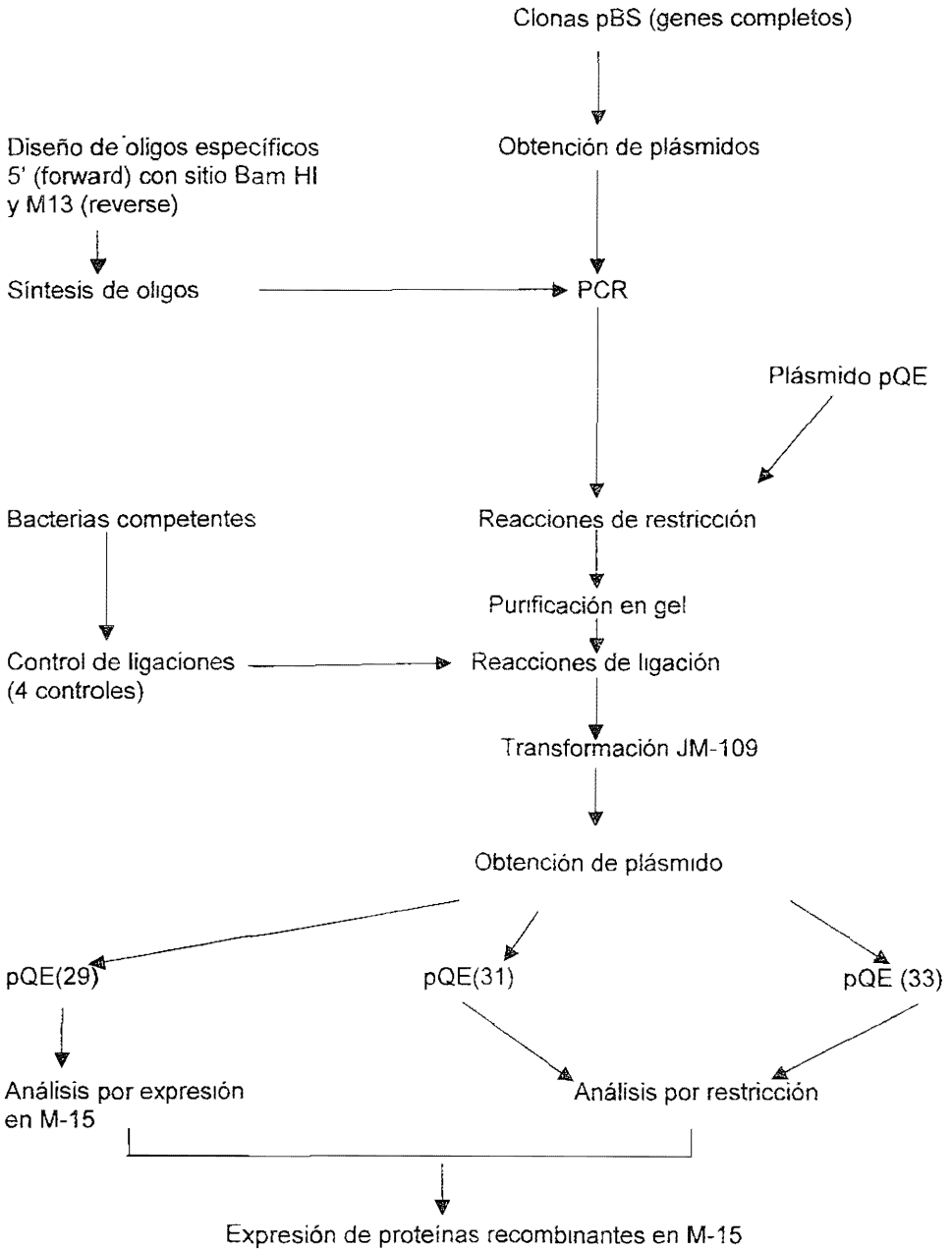


Figura 5. Diagrama de la estrategia elegida para cumplir el objetivo.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1.-Materiales biológicos

Para el desarrollo del trabajo experimental se utilizaron células de las cepas de *E. coli*: XL1-Blue y JM-109 las cuales se emplearon para la propagación de los plásmidos. La cepa M-15 fue usada para la expresión de las proteínas recombinantes

Se contó también con stocks de los plásmidos en los que estaban clonados los genes *athcp29*, *athcp31* y *athcp33* de las RNPs 29, 31 y 33 respectivamente de *A. thaliana* donados amablemente por el Dr Masagiro Sugiura del Center for Gene Research en Nagoya Japón. Estos genes se encuentran en el plásmido Bluescript (pBS-KS) (ver Figura 6). Estos plásmidos fueron obtenidos a partir de un escrutinio de una biblioteca de cDNA λ ZAP, por lo que únicamente se encuentran clonadas las secuencias codificadoras. Los tamaños de los cDNAs son. 1051pb para *athcp29*, 1035 pb para *athcp31* y 1066 pb para *athcp33* Estas secuencias codifican péptidos completos es decir incluyen el péptido de tránsito. Los genes se encuentran entre los sitios NcoI y EcoRI en pBS (Ohta, *et al.*.1995) (ver Figura 7)

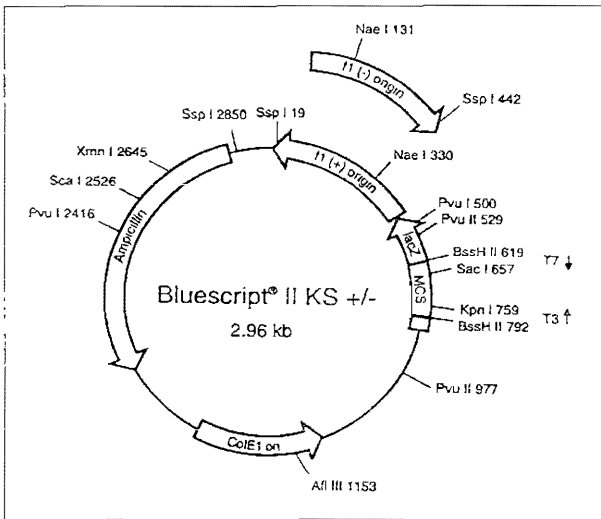


Figura 6. Mapa del vector **Bluescript**. En este vector se encuentran clonados los genes completos de las tres RNP's de *A. thaliana*. Este vector tiene un peso molecular de 2.96 Kb y con los genes clonados el peso se incrementa hasta un poco más de 4 Kb.

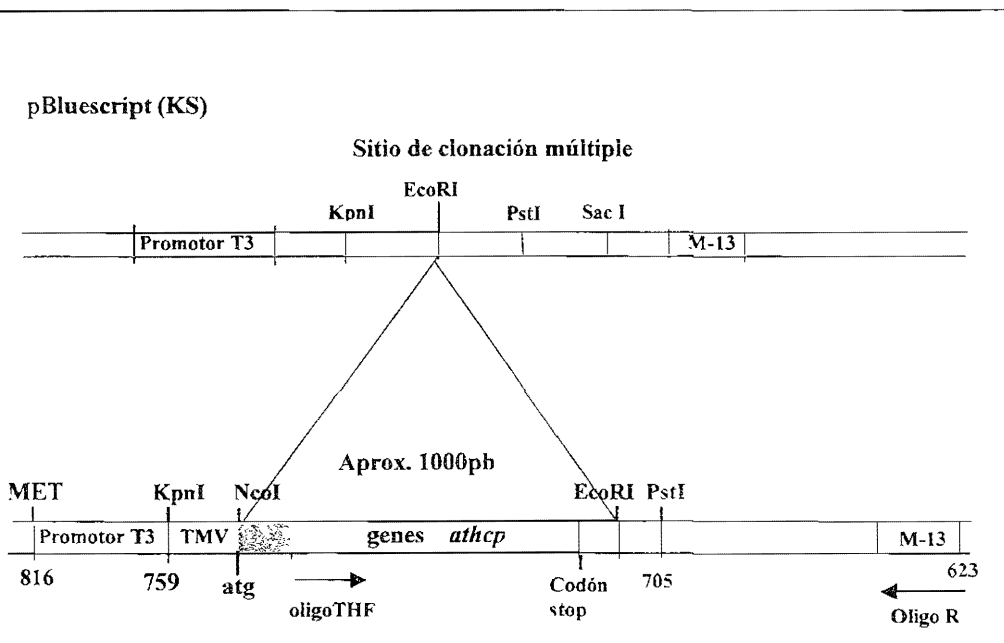


Figura 7. Construcción de los genes *athcp*'s clonados en pBS. Los genes *athcp*'s se encontraban clonados en el sitio Eco RI de un pBluescript modificado al que se le había adicionado una secuencia líder TMV que posea un sitio de corte NcoI (Ohta *et al.*, 1995). Estos plásmidos se utilizaron como moldes para las reacciones de amplificación empleando como oligos F secuencias de la región amino terminal de la proteína madura con un sitio BamHI (oligo THF) y como oligo R la secuencia de M-13. ~~-----~~ Péptido de tránsito. Los números indican el número de pares de bases del vector.

2.-Enzimas y reactivos

Para llevar a cabo la manipulación del material genético se emplearon diversas enzimas comerciales entre las que se encuentran Taq polimerasa (Fisher Scientific), enzimas de restricción BamHI y PstI (Promega y GIBCO). Se emplearon también desoxinucleótidos (dNTPs) (Promega). Kits para purificación de plásmidos y para purificación de DNA de geles de agarosa (QIAGEN), así como los reactivos grado analítico para la preparación de amortiguadores y soluciones (Research Organics, GIBCO, Baker y Sigma)

3.-Métodos

3.1. Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos para los extremos 5' de los genes a amplificar. Los del 3' no se diseñaron pues se empleó el oligo universal M-13. Estos oligonucleótidos, además de la secuencia complementaria al extremo 5' correspondiente a la secuencia de a a. de la proteína madura contenían una secuencia de un sitio de restricción, con lo que se facilitaría su clonación en el vector de expresión. Este sitio de restricción correspondía a una secuencia no presente en el gen que se iba a subclonar y que existiera en el sitio múltiple de clonación del vector. Para determinar que sitios de restricción presentes en los genes se utilizó el Programa PC GENE. Con base en este análisis se decidió que los oligonucleótidos debían contener un sitio BamHI

Una vez que se contó con esa información, se plantearon diversas secuencias, y se eligió la más adecuada de acuerdo a las temperaturas de fusión y de apareamiento. Esto se realizó mediante otro programa denominado Oligonet

Los oligonucleótidos se sintetizaron automáticamente en la "DNA Facility" de la Universidad de California en Berkeley, USA.

3.2. Secado de oligonucleótidos (Sambrook *et al.*, 1989)

1.- Los oligonucleótidos se almacenan a -20°C . Una alícuota de $100\ \mu\text{L}$ se coloca en un tubo eppendorf de 1.5 mL.

2.- Los tubos se colocan en el Speed-Vac y se centrifugan a temperatura ambiente al vacío durante 15-20 min para concentrar.

3.- Se resuspenden en 100 μL de agua estéril y se repite la operación una vez más. Se obtiene una pastilla opalescente que se resuspende en 100 μL de agua desionizada estéril. La muestra está lista para que se le determine su concentración.

3.3. Cálculo de la concentración de oligonucleótidos

1.- Para cuantificar la concentración de oligonucleótidos se toma 1 μL de la solución y se lleva a un volumen final de 100 μL en agua estéril. Se prepara un blanco de agua estéril también de 100 μL .

2.- Ambas muestras se leen en un espectrofotómetro a 260 nm, empleando celdas de cuarzo. el blanco se emplea para calibrar a cero de absorbancia.

3.- La concentración se calcula de acuerdo a la ley de Lambert y Beer. Para esto se debe calcular el coeficiente de extinción molar de cada uno de los oligonucleótidos con base en la siguiente fórmula:

$$\epsilon = (8400 \times T) + (15200 \times A) + (12010 \times G) + (7050 \times C)$$

4.- Se toman en cuenta las secuencias de las moléculas y ya con los cálculos de los coeficientes se procede al cálculo de la concentración.

$$C = \frac{A \times l}{\epsilon}$$

En donde A es el valor de absorbancia de la muestra que es adimensional. l es el paso de la celda que es igual a 1cm y ϵ es el coeficiente de extinción molar expresado en cm^2/M . Así el resultado de la concentración se expresa en molaridad.

3.4. Cultivo de *E.coli* (Sambrook *et al.*, 1989)

En estudios de biología molecular es muy importante partir de colonias aisladas de la cepa de interés para asegurar que se trabaja con bacterias cuyas características genéticas son las deseadas y que se han conservado libres de mutaciones. Los cultivos líquidos y sólidos se llevan a cabo en medio LB (Luria-Bertoni) sencillo o con algún antibiótico que permita seleccionar a las bacterias.

1.- El medio LB se prepara de la siguiente forma.

COMPONENTE	MEDIO LB LÍQUIDO	MEDIO LB SÓLIDO
Peptona de caseína	1 g	1 g
Extracto de levadura	0.5 g	0.75 g
Cloruro de sodio	1 g	0.75 g
Agar	--	1.5 g
Agua desionizada	A 100 mL	A 100 mL

2 - Colocar en un frasco esterilizable, cuidando que el volumen sea adecuado para evitar posibles derrames.

3 - Esterilizar en una autoclave a 115 lb de presión, 120 °C durante 15 min.

4 - Una vez que sale de la autoclave agitar perfectamente el frasco y dejar enfriar.

5.- Adicionar el antibiótico necesario según las cepas a utilizar. Por lo general los antibióticos se emplean en las siguientes concentraciones:

ANTIBIÓTICO	SOLUCIÓN STOCK	USO EN EL MEDIO
AMPICILINA (Amp)	100 mg/mL en H ₂ O	100 µg/mL
TETRACICLINA (Tet)	5 mg/mL en EtOH	10-50 µg/mL
KANAMICINA (Kan)	10 mg/mL en H ₂ O	25 µg/mL

Las cepas con las que se trabajó presentan las siguientes características silvestres y una vez que se transforman con los plásmidos de interés permiten seleccionarias en el medio con el antibiótico adecuado:

CEPA	RESISTENCIA	TRANSFORMADA
JM-109	--	Amp 100 µg/mL
DH5α	--	Amp 100 µg/mL
XL1-BLUE	Tet ^r	Amp 100 µg/mL Tet 5 µg/mL
M-15	Kan ^r	Amp 100 µg/mL- Kan 25 µg/mL

6 - Una vez que se tiene el medio listo se vacía en cajas petri en el caso del sólido. cuyo rendimiento aproximado es de 4-5 cajas por cada 100 g de agar preparado o en su defecto se reparte el volumen necesario en caso del medio líquido

7.- Todo el material con el que se trabaja debe ser limpio y estéril. Se debe trabajar en una zona estéril, empleando preferentemente un mechero Fisher cuya flama es más grande y logra temperaturas más elevadas además de que el área estéril es mucho más grande, evitando con esto posibles contaminaciones de los medios de cultivo

8.- El medio que no se utilice se puede conservar en el frasco perfectamente cerrado a temperatura ambiente si el medio no contiene antibiótico o en refrigeración a 4 °C si posee algún antibiótico (estos últimos por no más de un mes).

9.- La colonia seleccionada se puede sembrar por asada en el medio líquido o por estriado en las cajas petri con el fin de obtener colonias aisladas.

10.- Las cajas sembradas se incuban en una estufa a 37 °C durante toda la noche y los tubos o matraces con cultivos líquidos en una incubadora con agitación constante a 250 rpm a 37 °C durante toda la noche.

11.- Al día siguiente se retiran los cultivos de la incubadora. Las cajas petri se pueden conservar en refrigeración a 4 °C y si se sellan con Parafilm® pueden durar hasta por 4 semanas en perfectas condiciones.

3.5. Transformación genética (técnica de CaCl₂) (Hanahan, 1983)

1 - A partir de una colonia aislada de *E. coli* de la cepa de interés, se inoculan 5 mL de medio LB y se incuban a 37 °C con agitación constante durante toda la noche

- 2.- Del cultivo anterior se prepara un nuevo cultivo con medio fresco en una dilución 1:50. Incubar a 37 °C con agitación constante
- 3.- Cuando el cultivo tiene una Absorbancia de 0.55-0.6 a 600 nm se cosechan las células centrifugando a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C.
- 4 - Se obtiene una pastilla que se resuspende en 1/2 del volumen inicial en una solución de CaCl₂ 50 mM enfriado en hielo.
- 5.- Incubar en hielo durante 5 minutos. Centrifugar de nuevo a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C.
- 6 - La pastilla se vuelve a resuspender, esta vez en 1/15 del volumen original en la misma solución de CaCl₂ 50 mM enfriado en hielo.
- 7.- Las células se reparten en alícuotas de 50 µL en tubos eppendorf, se almacenan en glicerol al 15% de concentración final y se congelan a -70 °C.
- 8.- Cuando las células se van a utilizar se descongelan en hielo durante 1 h.
- 9.- El DNA con el que se desea transformar se añade a las células en 1/4 de volumen (máximo).
- 10.- Se deja en hielo durante 30 min.
- 11.- Se coloca el tubo en un baño a 42 °C durante 3 min e inmediatamente se da un cambio térmico colocándolo en hielo por 1 min.
- 12.- Añadir 4 volúmenes de medio "A" (Tryptona 2%, Extracto de levadura 0.5%, MgSO₄ 0.4%, KCl 10 mM pH 7.6 (con KOH)) a cada tubo eppendorf e incubar a 37°C durante 1 o 2 h.
- 13.- Después de la incubación, sembrar en medio sólido selectivo, por el método de plaqueo.

3.6. Almacenado de células en glicerol (Sambrook *et al.*, 1989)

- 1.- Las células que se quieren conservar por mucho tiempo, deben estar en medio líquido y ser de un cultivo fresco.
- 2.- Se añade glicerol estéril a una concentración final del 15% y se mezcla suavemente.
- 3.- Se prepararan alícuotas de 50 µL en cada tubo y se rotulan perfectamente.
- 4.- Sumergir los tubos en N₂ líquido para congelarlas rápido.

5.- Los tubos se conservan en congelación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

3.7. Extracción de DNA plasmídico (mini preparaciones) (Sambrook *et al* , 1989)

1.- Una colonia aislada de la cepa de interés se incuba en 1.5 mL de medio LB durante toda la noche (máximo 12 horas), con agitación constante y a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.- El cultivo anterior se coloca en tubos eppendorf y es centrifugado durante 30 s a 13000 rpm en una micro centrífuga, colectando todo el cultivo en un solo tubo

3.- Posteriormente la pastilla se resuspende con agitación con un vórtex, empleando de 30 a 100 μL de amortiguador de lisis (10 mM Tris HCl (pH 8), 1mM EDTA, 15% sacarosa, 2 mg/mL lisozima, 0.1 mg/mL BSA).

4.- Se incuba durante 5-10 min a temperatura ambiente

5.- Después se hierven los tubos durante 60 s para después incubarlos en hielo durante 60 s.

6.- Se vuelven a centrifugar los tubos durante 2 min a velocidad máxima en micro centrífuga. Se recupera el sobrenadante y se agregan 3 μL de RNAsa A a una concentración de 0.2 mg/mL. Incubar 10 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

7 - Una alícuota del sobrenadante es cargada en un gel de agarosa y corrida en electroforesis horizontal para confirmar la presencia del DNA plasmídico.

3.8. Extracción rápida de DNA plasmídico (método QIAPREP) (QIAGEN INC , 1995).

1.- Seleccionar una colonia aislada de la cepa de interés y cultivar en 5 mL de medio LB durante toda la noche en condiciones normales ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, agitación constante) Este cultivo puede tener máximo 16-18 horas de crecimiento.

2.- Colectar las células por centrifugación a 13000 rpm en una micro centrífuga. Se conserva la pastilla y se desecha el sobrenadante Resuspender la pastilla en 250 μL de amortiguador P1, cuidando que no queden acumulaciones de bacterias en el resuspendido.

3.- Posteriormente adicionar 250 μ L de amortiguador P2 e invertir el tubo 4-6 veces para mezclar. La solución debe verse ligeramente clara y viscosa. No dejar pasar más de 5 minutos en esta solución.

4.- Adicionar 350 μ L de amortiguador N3 e invertir el tubo suavemente 4-6 veces. Evitar la precipitación localizada, en este punto la solución se vuelve oscura y muy viscosa, se pueden llegar a formar grumos.

5.- Centrifugar el tubo durante 10 min a 14000 rpm a 4 °C, al final se obtiene una pastilla blanca. Mientras se lleva a cabo la centrifugación una columna Qiaprep™ se coloca en un tubo de colecta de 2 mL

6.- El sobrenadante del paso anterior se aplica a las columnas y se centrifuga a 14000 rpm durante 60 s. Descartar el eluato.

7.- Lavar la columna por adición de 500 μ L de amortiguador PB. Centrifugar nuevamente durante 60 s. Descartar de nuevo el sobrenadante. Este paso se repite una vez más a fin de obtener un plásmido más limpio.

8.- Lavar nuevamente la columna esta vez con 750 μ L de amortiguador PE y repetir la centrifugación 60 s. El volumen de elución se descarta, la columna se centrifuga por 1 min adicional a fin de retirar el exceso de amortiguador.

9.- La columna se coloca dentro de un tubo eppendorf limpio y estéril de 1.5 mL. Para eluir el DNA se adicionan 50 μ L de H₂O desionizada estéril al centro de la columna permitiendo que permanezca durante 1 min. Se centrifuga finalmente 1 min más para recolectar el DNA en el tubo limpio. Este se etiqueta y se conserva a -20 °C el tiempo que sea necesario.

3.9. Electroforesis de DNA en geles de agarosa (Sambrook *et al.*, 1989).

1.- Montar el sistema para la preparación del gel de agarosa, cuidando que esté perfectamente nivelado. Se debe seleccionar el peine adecuado de acuerdo al número de muestras a correr y el volumen de las mismas.

2.- Se prepara el gel al 1% de agarosa en un volumen de 25 mL de amortiguador TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA). La solución stock que es 50 X (para 1 L: 242 g

Tris-base, 57.1 mL de ácido acético glacial y 100 mL de una solución 0.5 M de EDTA, pH 8.0).

3.- La agarosa se coloca en un matraz con tapón de algodón y se le agrega el amortiguador. El matraz se calienta en un horno de microondas en potencia media durante 60 s.

4.- Una vez que toda la agarosa se disolvió, con mucho cuidado se vacía en el dispositivo montado en el paso 1

5.- Inmediatamente después se colocan el peine seleccionado y se espera a que la agarosa gelifique completamente.

6 - Se emplea una cámara para minigeles submarina que previamente ha sido refrigerada a 4 °C

7 - Ya que se tiene el gel listo se deben preparar las muestras que se van a correr, bajo el siguiente esquema:

- ♦ Si la muestra está muy concentrada o es una mini preparación de Qiaprep™, basta cargar 1 µL de DNA con 7 µL de agua desionizada y adicionar 2 µL de amortiguador de carga (0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de FF xilencianol y 30% de glicerol en agua).
- ♦ Si la muestra está diluida se debe preparar con 8 µL de DNA y sólo 2 µL de amortiguador de carga
- ♦ El marcador de peso molecular se elige acorde al tamaño de la muestra de interés. Se prepara adicionando 2 µL de agua desionizada estéril, 2 µL de amortiguador de carga y la cantidad necesaria del marcador de peso molecular del cual se conoce su concentración y ha sido revisado previamente en un gel.

Las muestras se preparan en pequeños tubos eppendorf o en Parafilm®, cuidando el orden en que se van a cargar.

8.- La cámara se coloca cerca de la fuente de poder y en el centro de ella se coloca el gel. Se llena con amortiguador TAE 1X, de preferencia frío para evitar que el voltaje se eleve demasiado

9.- Cuando ya se seleccionó el orden de cargado se procede a cargar las muestras cuidando de no perforar la base del gel con la punta de la micro pipeta.

- 10.- Se tapa la cámara y los cables se conectan a la fuente de poder.
- 11.- El gel se corre ajustando la fuente de poder a 80-100 V por 45 min a 1 h.
- 12.- Una vez que el frente ha migrado lo suficiente, se apaga la fuente de poder y el gel se coloca en un recipiente apropiado al que se le agrega una solución de bromuro de etidio (150 μ L de una solución 0.5 mg/mL en 50 mL de agua). Todo el material con el que se manipula el bromuro de etidio debe ser desechado adecuadamente, ya que es un reactivo muy peligroso. Se debe manejar con guantes y evitar el contacto directo.
- 13.- El gel se tiñe por 2 minutos, se lava con un poco de agua para dar contraste y se ve en un transiluminador de luz UV

3.10. Extracción de DNA de geles de agarosa (método QIAEX) (QIAGEN INC , 1995)

- 1.- Se debe correr un gel con las muestras que se deseen purificar de acuerdo a la técnica anterior. Se debe conocer perfectamente el orden de cargado para evitar confusión.
- 2.- El material que se va a emplear debe ser estéril y de preferencia nuevo.
- 3.- Se deben pesar tubos eppendorf dependiendo el número de bandas a purificar, el peso se registra perfectamente para cada tubo por separado.
- 4.- El gel se tiñe con la menor cantidad de bromuro de etidio posible y se revela con una lámpara de luz UV de longitud de onda de 280 nm, de preferencia en un cuarto oscuro. Una vez seleccionada la banda de interés, es cortada con una navaja. Es preferible hacerlo con un poco más de agarosa para recuperar lo máximo posible, siempre y cuando no haya otra banda presente que contamine la muestra de interés
- 5.- La banda cortada se coloca en el tubo que le corresponda y se pesa todo junto (tubo y banda). Al valor resultante se le resta al peso inicial del tubo, este valor corresponde al peso del fragmento de agarosa con DNA
- 6.- Se adiciona la cantidad correspondiente de amortiguador QX1 para cada tubo de acuerdo al siguiente parámetro:
 - ♦ 300 μ L de buffer por cada 100 mg de gel (3 volúmenes de amortiguador por uno de gel)

- ♦ A fragmentos de DNA < 100 pb adicionar 6 volúmenes de amortiguador QX1
- ♦ A fragmentos de DNA > 4 Kb adicionar 3 volúmenes de amortiguador QX1 mas 2 volúmenes de agua.

7 - Resuspender la resina QIAEX II empleando un vórtex durante 30 s.

8.- Adicionar QIAEX II de acuerdo a la siguiente información y mezclar

- ♦ $\leq 2 \mu\text{g}$ DNA agregar 10 μL de resina
- ♦ 2-10 μg DNA agregar 30 μL de resina

9.- Incubar a 50 °C durante 10 min. Se mezcla todo durante 2 min para mantener la resina en suspensión y que actúe bien.

10.- Se debe revisar el pH, la resina es más eficiente a $\text{pH} \leq 7.5$. por lo que si el pH de la disolución es > 7.5 se debe agregar 10 μL de acetato de sodio 3 M pH 5 y revisar el pH de nuevo. Si se tuvo que equilibrar el pH se debe incubar por 10 min más a temperatura ambiente

11 - La muestra se centrifuga 30 s a máxima velocidad y se remueve cuidadosamente el sobrenadante con una punta de micro pipeta.

12.- La pastilla que se obtiene se lava con 500 μL de amortiguador QX1 se resuspende con un vórtex y se centrifuga por 30 s. Se remueve el sobrenadante con un micro pipeta.

13.- La pastilla se lava dos veces con amortiguador PE De nuevo se resuspende la pastilla con agitación con un vórtex, se centrifuga 30 s y se remueve el sobrenadante

14 - El tubo abierto se deja cerca del mechero para que se seque al aire, esto lleva 10-15 min o hasta que la pastilla se vuelve blanca

15.- Para eluir el DNA se agregan 20 μL de Tris HCl pH 8.5 o agua desionizada estéril. La pastilla se resuspende empleando un vórtex y se incuba acorde a lo siguiente:

- ♦ Para fragmentos DNA ≤ 4 Kb, a temperatura ambiente durante 5 min.
- ♦ Para fragmentos DNA 4-10 Kb, a 50 °C durante 5 min.
- ♦ Para fragmentos DNA >10 Kb, a 50 °C durante 10 min.

16.- El tubo se centrifuga durante 30 s. El sobrenadante que contiene el DNA puro se transfiere a un segundo tubo limpio y estéril y se rotula perfectamente.

3.11. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis *et al.*, 1986)

1.- Descongelar todas las soluciones en hielo antes de empezar el proceso, a excepción de la enzima que siempre se debe conservar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

En un tubo eppendorf de 200 μL de pared delgada nuevo y estéril agregar en el orden siguiente:

- ♦ agua estéril, lo necesario para completar 30 μL
- ♦ 3 μL de amortiguador de la enzima 10X
- ♦ 4 μL de MgCl_2 50 mM (opcional, algunos amortiguadores ya incluyen una concentración estándar)
- ♦ 1 μL de una mezcla 100 μM de desoxinucleótidos trifosfato
- ♦ 200 ng (en 2 μL de agua) de oligo forward
- ♦ 200 ng (en 2 μL de agua) de oligo "reverse"
- ♦ 1 ng de DNA Molde
- ♦ 1 unidad de Taq DNA polimerasa.

Preparar un control negativo en el que no se agrega DNA. Es recomendable que se prepare una mezcla con el doble de volúmenes de todo excepto el molde. Repartirla en dos tubos y en uno de ellos agregar molde. Tener cuidado de rotular todos los tubos para no confundir cual es el control y cual la muestra.

Después de agregar todos los reactivos adicionar una gota o 40 μL de aceite mineral para evitar que se evapore la mezcla y cambie la concentración de los reactivos debido a los cambios de temperatura.

2.- Incubar la muestra en un termociclador bajo el siguiente esquema

- ♦ Desnaturalización de las hebras de DNA: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 min
- ♦ Apareamiento de oligos y molde: entre 55 y $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ según los oligos, 1 min.
- ♦ Extensión: $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 120 s
- ♦ Repetir estos tres pasos alternativamente de 25 a 30 veces.
- ♦ Extensión final: $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 min.
- ♦ Mantener a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

- 3.- Retirar la mezcla de reacción tomando un poco menos del volumen de reacción total, para evitar que la muestra esté muy contaminada de aceite mineral y afecte su manipulación posterior. Tomar 10 μL de la reacción, agregar 2 μL de amortiguador de carga para DNA
- 4.- Revisar los productos de amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 1% comparando con marcadores de peso molecular apropiados.

3.12. Reacciones de restricción (Sambrook *et al.*, 1989)

- 1.- Para llevar a cabo la restricción de DNA se debe partir de una muestra pura.
- 2.- Se determina el volumen total de la reacción tomando en cuenta el volumen de DNA que se requiere restringir, así como el volumen de enzima, que no debe exceder el 10% del volumen total y el necesario para que el amortiguador quede 1 X. si es necesario se agrega agua desionizada estéril.
- 3 - Las enzimas de restricción y sus amortiguadores son muy delicados por lo que se deben usar rápidamente. El amortiguador se debe descongelar en hielo y la enzima debe estar todo el tiempo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para conservar su actividad intacta.
- 4.- En un tubo eppendorf limpio y estéril se agrega el DNA con una micro pipeta.
- 5.- Se adiciona el volumen necesario de amortiguador para que su concentración final sea de 1 X.
- 6.- Se agrega el volumen de agua necesario para ajustar la reacción
- 7.- La enzima se agrega al final, casi siempre se utiliza 1 μL de enzima (10 U/ μL). Ésta se toma con una punta nueva y estéril para evitar contaminación.
- 8.- Se incuba por 4 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a la temperatura óptima de la enzima en uso. Es necesario contar con la información del fabricante para diseñar una buena reacción de restricción

3.13. Reacciones de ligación (Sambrook *et al.*, 1989)

- 1.- Para la ligación de fragmentos de DNA se emplea la enzima T4 ligasa, que es capaz de unir fragmentos cohesivos y romos, por lo general se emplea 0.5-1 μL (5-10 Unidades de actividad).

2 - Los fragmentos que se deseen ligar deben estar restringidos con la misma enzima o con enzimas que generen sitios compatibles, para el caso de ligaciones con extremos cohesivos.

3.- Se debe comparar la concentración tanto de inserto como de vector para agregarlos en una proporción adecuada. Por lo general se agregan en proporción inserto-vector de 3:1 a 5:1

4.- Es importante diseñar controles de ligación para asegurar que el sistema completo trabaja adecuadamente.

- ♦ Control A. Eficiencia de las células competentes. Se emplea el plásmido sin cortar, se incuba igual que todas las reacciones y se transforma la cepa de interés
- ♦ Control B. Plásmido restringido o eficiencia de restricción. Se trabaja con el plásmido de interés restringido y la reacción se monta sin ligasa. Si la enzima de restricción cortó eficientemente no se deben obtener colonias después de transformar
- ♦ Control C. Control de la ligasa. Al plásmido de interés restringido (Control B), se le adiciona ligasa y se procede como en los anteriores.
- ♦ Control D. Control del plásmido doblemente restringido. Se adiciona el plásmido con la doble restricción, se adiciona ligasa y se transforman las células. No se deben obtener colonias transformantes

Es importante llevar a cabo todas las reacciones y transformaciones control al mismo tiempo y emplear la misma cantidad de DNA. Al plaquear diferentes diluciones se pueden obtener datos aproximados de cuantas colonias se obtendrían en las reacciones de ligación de interés

5.- Cuando ya se sabe cuanto plásmido e inserto se van a agregar se diseña la reacción tomando en cuenta que el amortiguador de la enzima está a 10 X. Si hace falta se adiciona agua desionizada y estéril

6.- El orden de agregar los componentes es. plásmido e inserto, amortiguador, agua y enzima.

7.- Los tubos se incuban durante 12 h en un baño a 14 °C.

8 - Al día siguiente la reacción completa se usa para transformar células competentes y sembrarlas en el medio sólido selectivo para cada cepa (ver método 3.5).

3.14. Inducción de proteínas recombinantes (QIAGEN INC , 1992).

1.- Se inoculan 3 mL de medio LB previa adición de amp y kan (100 µg/mL y 25 µg/mL respectivamente) con una colonia M-15 transformada con la construcción deseada y se deja crecer toda la noche a 37 °C con agitación. Con 200 µL del cultivo anterior se inoculan 3 mL de medio LB fresco con la misma concentración de los antibióticos. Como controles se utilizan bacterias no transformadas y transformadas con el plásmido pQE sin inserto

2.- Se cultivan las bacterias con agitación hasta que alcanzan una Absorbancia de 0.7 a una longitud de onda de 600 nm (aproximadamente 3 horas)

3.- Se realiza la inducción de la expresión adicionando 1 mM de IPTG y las bacterias se dejan crecer por 4 h más a 37 °C.

4.- Se colectan las células del cultivo anterior por medio de una centrifugación a 15000 rpm por 2 min.

5.- Se resuspende la pastilla en 200 µL del amortiguador B (8 M de urea, 0.1 M (Na)₃PO₄, 0.01 M Tris HCl pH 8.0) por cada pastilla de bacterias obtenidas. Se resuspenden las bacterias por agitación en un vórtex.

6.- El lisado bacteriano se congela con N₂ líquido y se guarda a -70 °C para su posterior utilización.

7.- Se descongela el lisado en un baño de hielo y se deja en agitación por una hora a temperatura ambiente.

8.- Después de la agitación se corren 45 µL de las muestras obtenidas en un SDS-PAGE para verificar que se llevó a cabo la inducción de la proteína recombinante.

3.15. Electroforesis desnaturizante en poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

1.- Se preparan geles de acrilamida al 15 %. Los geles se corren en el sistema Mini Protean II (Bio Rad).

♦ Gel de separación

1 mL de agua desionizada

2 mL de solución de acrilamida-bisacrilamida (acrilamida 30 g, bis-acrilamida 0.8 g en 100 mL de agua).

1 mL de amortiguador de separación (25 X, 1.5 M Tris base, pH 8.8 con HCl 12 N, SDS al 20% 2 mL, llevar a 100 mL con agua.)

25 μ L APS 20%

2.5 μ L TEMED

♦ Gel de concentración

1 mL Agua desionizada

444 μ L Solución apladora (25 X, 0.5 M Tris base, SDS al 20% 2 mL, pH 6.8 con HCl 12 N, llevar a 100 mL)

300 μ L Solución de acrilamida-bisacrilamida

20 μ L APS 20%

5 μ L TEMED

2.- Se preparan los vidrios que servirán de molde para vaciar los geles

3.- En un vaso de precipitados o en un tubo falcon de 15 mL se mezclan perfectamente los componentes para el gel de separación y se vacían en los moldes de vidrio.

4 - Se vierte sobre el gel un poco de etanol absoluto para ayudar a la polimerización del mismo.

5.- Se mezclan los componentes del gel de concentración y después de retirar el etanol absoluto se vacían sobre el gel de separación e inmediatamente después se colocan los peines para la formación de los pozos para cargar las muestras

Se preparan las muestras llevándolas todas a un volumen semejante, incluyendo la solución para cargar (para 10 mL 5 X, 1 M Tris base, Glicerol 5.0 mL, SDS 0.5 g, azul de bromofenol 0.2 mL, β -mercaptoetanol 4 μ L por cada 20 μ L de la solución que se vaya a emplear), que debe quedar al final a una concentración 1 X. Para ajustar los volúmenes se utiliza la solución amortiguadora en la que se encuentran las muestras.

6.- Se hierven las muestras en un baño de agua a ebullición por 10 min y se transfieren a un baño de hielo.

7.- Se montan los geles en el soporte del equipo y se vacía la solución amortiguadora para corrida (para 100 mL 10 X, Tris base 3 g, Glicina 14.4 g, SDS 1g).

8 - Se cargan las muestras y el marcador de peso molecular y se corre el gel a 100 V durante 1.5 horas aproximadamente.

9 - Se desmonta el aparato y se tiñe el gel con la solución de Coomasie (para 100 mL, Azul brillante Coomasie 0.025 g, metanol grado técnico 45.4 mL, agua destilada 45.4 mL, ácido acético glacial 9.2 mL) durante 20 min y posteriormente se destiñe con la solución fijadora y desteñidora (para 250 mL, ácido acético glacial 18.75 mL, metanol grado técnico 50 mL, aforar con agua bidestilada).

3.16. Western blot (Towbin et al., 1979)

1.- Se debe correr previamente un gel de SDS-PAGE, desmontar el equipo y se deja el gel sin teñir 15 minutos en el amortiguador de transferencia (25 mM de Tris base, 192 mM de Glicina y 20% v/v de Metanol) para pre-equilibrar el gel.

2.- Cortar una membrana de nitrocelulosa de 6 x 8.5 cm y mojar con el amortiguador de transferencia por 5 minutos.

3 - Cortar 6 rectángulos de papel 3MM de 6.5 x 9 cm y humedecer ligeramente en la misma disolución anterior

4 - Ensamblar el cassette de transferencia de acuerdo a las especificaciones del fabricante (BIO RAD), e instalar el aparato.

5 - Correr la electrotransferencia a 100 V por 1 hora.

6.- Desmontar el aparato y teñir la membrana con Ponceau S (0.04 g de Ponceau S disueltos en 5 mL de agua desionizada, 2 mL de ácido acético glacial, aforar a 40 mL) por 10 minutos. Retirar la membrana y lavarla con agua desionizada hasta que las bandas sean visibles

7.- La membrana se incuba en solución bloqueadora de leche descremada al 5% en TBS (2.4 g de Tris base, 8 g de NaCl, se disuelven en 600 mL de agua desionizada, se ajusta a pH 7.6 y se afora a 1000mL), durante 1 hora.

8 - Incubar la membrana con el anticuerpo en una dilución 1:2000 en TBS con leche al 5% por 1 hora a 37 °C

- 9.- Lavar dos veces con TBS-T (200 mL de TBS y se adiciona 2 μ L de Tween-20) durante 15 minutos cada uno
- 10.- La membrana se incubaba con el segundo anticuerpo (el cual está dirigido contra las IgGs de conejo y está conjugado a una enzima peroxidasa) en una dilución 1:2000 por 1 h en TBS con leche al 5% a temperatura ambiente.
- 11.- Lavar la membrana dos veces más con TBS-T por 15 minutos.
- 12.- Revelar de acuerdo al protocolo de ECL (Amersham Pharmacia Biotech)

VII. RESULTADOS.

1.- Amplificación de los genes

Los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes de interés se presentan en la Tabla 3.

TABLA 3. Secuencias de los oligonucleótidos. Las letras en negritas corresponden al sitio de restricción BamHI

NOMBRE	SECUENCIA (5' → 3')	Num bases	Tm (°C)	%G+C
29THF	CC GGATCC AGTTGCTGTATCT TCG	24	59.0	54.2
31THF	CC GGATCC ATTTCGTTGCCAGACTTC	26	62.6	57.7
33THF	AT GGATCCT GCTAGTTCCGCCGATG	25	60.9	56.0
M-13	GTAAAACGGCAGCAAAATG	19	63.5	42.1

Los oligonucleótidos THF se emplearon para iniciar la síntesis de DNA a partir del extremo 5', el oligo M-13 se empleó para iniciar la síntesis de DNA a partir del extremo 3'. Estos oligos permiten amplificar el gen de interés a partir del primer aminoácido de la proteína madura insertando a su vez un sitio de corte BamHI que facilita la clonación del producto que se obtenga en el vector pQE.

Las Tm's para los oligos THF se calcularon considerando solamente la región de apareamiento con el molde sin considerar la secuencia para el sitio de restricción.

La amplificación de los genes se llevó a cabo mediante reacciones de PCR, en las que se emplearon los oligos antes mencionados. Las reacciones de prueba se diseñaron para 30 µL de volumen, mientras que las reacciones definitivas se escalaron a 60 µL. Para llevar a cabo los cambios térmicos se empleó un termociclador automático (HYBAID Omn-E). Después de varias pruebas y considerando que las condiciones de amplificación proporcionaban el rendimiento más alto y la amplificación de un sólo producto del tamaño esperado, se eligieron las temperaturas de alineamiento presentadas en la Tabla 4.

TABLA 4. Condiciones de amplificación de los genes.

DNA molde			
ETAPA	<i>athcp29</i>	<i>athcp31</i>	<i>athcp33</i>
DESNATURALIZACIÓN	95 °C 1 min		
APAREAMIENTO	55 °C 1 min.	56 °C 1 min.	56 °C 1 min.
EXTENSIÓN	72 °C 2 min.		
CICLOS	30 CICLOS		
EXTENSIÓN FINAL	72 °C 7 min.		

Los productos obtenidos después de la amplificación por PCR son presentados en la Figura 8.

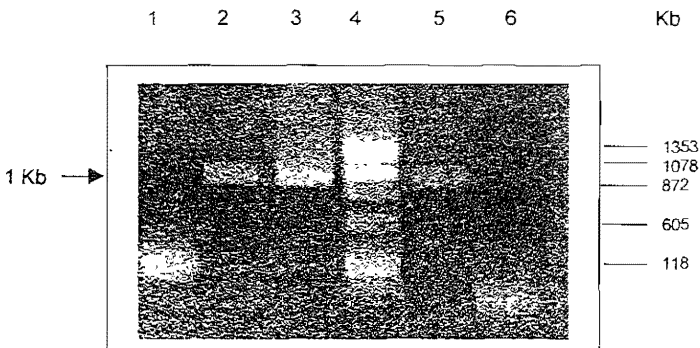


FIGURA 8. Productos de PCR. Amplificación de los genes deseados en donde se obtiene una sola banda de aproximadamente 1 Kb. Gel de agarosa al 1% en buffer TAE teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz ultravioleta. Carril 1) control sin DNA. 2) producto 29; 3) producto 31; 4) marcadores de peso molecular Φ X174 cortado con HaeIII; 5) producto 33 y carril 6) control sin DNA. Se cargaron 5 μ L de muestra de un total de mezcla de reacción de 60 μ L. Las reacciones se realizaron según las condiciones presentadas en la Tabla 4. Los controles de reacción se someten al mismo tratamiento pero sin agregarles DNA molde. Las zonas que se observan en la parte inferior del gel son los oligonucleótidos.

Una vez obtenidos los tres productos amplificados se sometieron a restricciones dobles con las enzimas PstI y BamHI en ese orden. El orden de las restricciones se decidió con base en que la restricción con BamHI debe hacerse a alta concentración de sales. Posteriormente los productos restringidos se corrieron en un gel y se purificaron de él por el método QIAEX. Esto se hizo con el fin de retirar los pequeños fragmentos resultantes de la restricción y con esto evitar que interfirieran en la ligación.

2.- Reacción de ligación

El plásmido pQE31 fue restringido con PstI y BamHI y posteriormente purificado de un gel de agarosa por el método QIAEX. Se corrió un gel para determinar las concentraciones de insertos y vector purificados y con eso se montó la reacción de ligación empleando una proporción 3:1 de inserto-vector. También se montaron los controles de la reacción de ligación para asegurar que el sistema funcionaba adecuadamente. En la Tabla 5 se presentan los resultados de los controles.

TABLA 5. Resultados de las ligaciones control.

CONTROL	NÚMERO DE COLONIAS	% DE EFICIENCIA
A) Eficiencia de transformación de las células competentes	560	100
B) Eficiencia de la restricción de BamHI	164	70
C) Control de la ligasa	294	23
D) Ligación del plásmido con doble restricción	69	12

De estos resultados se concluyó que del 100% de las colonias competentes, un 12% era muy probable que fueran falsas positivas; esto debido a la baja eficiencia de corte de la enzima BamHI, demostrado en los controles B y D en los que el resultado

esperado era de 0 colonias. Al fallar la enzima quedaban moléculas de plásmido sin restringir, mismas que conferirían a las células capacidad de crecer en medio con amp. Este resultado desfavorable alertaba de los resultados finales, pues evidentemente el sistema no funcionaba al 100% y se podía esperar resultados erróneos, aun a pesar de esto se decidió seguir con el siguiente paso.

Posteriormente se procedió a montar las reacciones de ligación (para cada una): 1 μ L de buffer de la enzima, 7 μ L de DNA cada uno de los productos amplificados, 1 μ L de plásmido pQE31 y 1 μ L de enzima T4 ligasa. Se incubó la reacción en un baño a 14 °C en el cuarto frío durante toda la noche. Una vez transcurrido el tiempo de la ligación se procedió a transformar células JM-109 competentes con el fin de poder seleccionar las transformantes positivas.

3.- Selección de colonias positivas

La transformación se llevó a cabo como se explicó en Materiales y Métodos. Las bacterias transformantes se plaquearon en medio LB sólido adicionado con 100 μ g/ μ L de amp y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. El conteo de colonias se realizó al día siguiente. En la Tabla 6 se presenta los resultados obtenidos. Los plásmidos resultantes de las ligaciones con los insertos de los genes *athcp* 29, 31 y 33 se denominaron pQE(29), pQE(31) y pQE(33) respectivamente.

TABLA 6. Colonias transformantes

CLONA	COLONIAS TOTALES	POSIBLES COLONIAS POSITIVAS*	POSITIVAS/TOTALES
pQE(29)	280	211	0.75
pQE(31)	255	186	0.75
pQE(33)	157	88	0.56

* Las colonias positivas se calcularon restando a las colonias totales esperadas de cada clonación, las colonias de fondo real obtenidas en el control D.

De acuerdo a estos resultados se esperaba que de 10 colonias seleccionadas se obtuvieran 7 colonias positivas para la 29 y la 31 y 5 colonias positivas para la clona 33

Se seleccionaron 10 colonias de cada ligación y se sembraron independientemente en medio LB líquido y sólido con amp. Los cultivos líquidos se incubaron 37° C en agitación constante durante toda la noche. Para determinar que las células transformadas contenían al plásmido con el gen de interés clonado en él, se compararon los tamaños de los plásmidos extraídos de células transformadas con las ligaciones, contra el tamaño de plásmido sin inserto linearizados. Con este propósito se extrajo plásmido de cada uno de los cultivos y del plásmido pQE sin inserto y se restringieron con la enzima BamHI. En la figura 9 se muestran los ensayos de restricción de plásmido obtenido de algunas transformantes. Se revisaron 10 transformantes de la 31 y 10 de la 33 de las cuales al menos tres plásmidos de cada una eran de un tamaño mayor, en aproximadamente 1 Kb, al tamaño del plásmido pQE sin inserto. Esto indicaba que en esos plásmidos si se llevaron a cabo las ligaciones correspondientes.

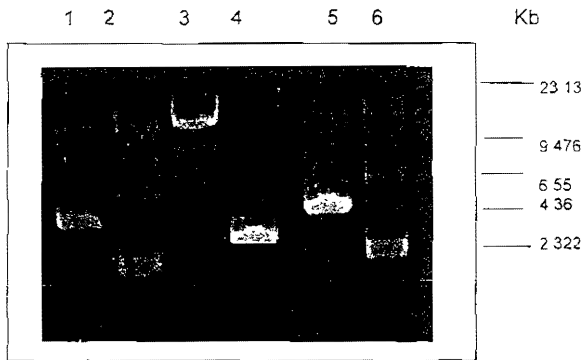


Figura 9. Análisis de los ensayos de restricción de las transformantes 31 y 33. En un gel de agarosa al 1% en TAE se corrieron los productos de restricción. Carril 1) pQE(31) cortado; 2) pQE(31) sin cortar; 3) λ cortado con HindIII; 4) pQE (sin inserto) cortado; 5) pQE(33) cortado; 6) pQE(33) sin cortar. Todas las restricciones se llevaron a cabo con BamHI y una diferencia de peso molecular de aproximadamente 1 Kb con el plásmido sin inserto indica que el plásmido restringido posee inserto.

Algunas de las colonias transformadas con la ligación 29, no crecieron a la densidad celular promedio en incubaciones de 24 h. Por otro lado, los cultivos que sí tenían una buena densidad celular no contenían plásmido con inserto. De estos resultados se dedujo que la expresión basal de la proteína 29 en las células JM-109 podría ser tóxica, provocando bajo crecimiento del cultivo. Por lo tanto, se decidió incrementar el volumen de cultivo para tratar de extraer algo de plásmido. Aún con esto, la cantidad de plásmido obtenida no fue suficiente para ser observada en un gel, por lo que no se pudo comprobar por restricción si realmente estas colonias eran positivas o no. Debido a estos resultados fue necesario emplear otra estrategia para identificar colonias transformadas con el gen de la CP29. Esta estrategia se describirá en el punto 5 de esta sección.

4.- Expresión de las proteínas

Los plásmidos que resultaron positivos de las ligaciones 31 y 33 se transformaron en células M-15 y se procedió a la inducción en pequeña escala de las transformantes. Las inducciones se llevaron a cabo con 1 mM de IPTG, a 37°C durante 4 h. En la Figura 10 se muestran los resultados de esta inducción. Se incluye como control positivo la inducción de la 24RNP recombinante de espinaca la cual es muy semejante a las RNPs de *Arabidopsis thaliana*.

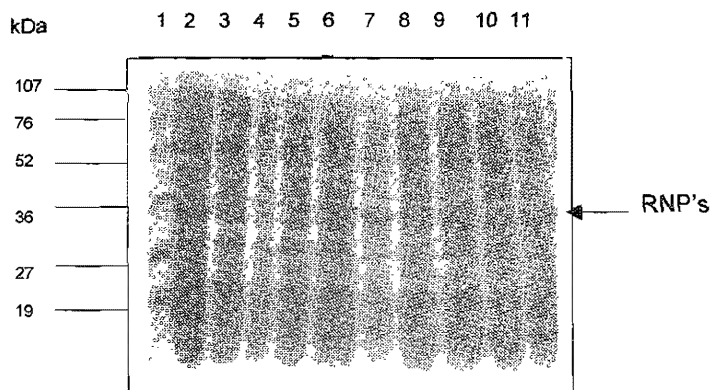


Figura 10. Inducción de la expresión de la 31 y la 33RNP recombinantes de *A.thaliana* en *E.coli*. Gel de SDS-PAGE al 15% de acrilamida teñido con azul Coomassie. Se cargaron 30 μ L de extracto bacteriano total de células M-15 transformadas (200 μ L). Las inducciones se llevaron a cabo con 1 mM de IPTG a 37 $^{\circ}$ C, durante 4 h. Carril 1) Marcador de Peso molecular Low-Range de Bio-Rad; 2) extracto de bacterias sin plásmido sin inducir; 3) bacterias sin plásmido (inducidas); 4) bacterias transformadas con pQE sin inserto sin inducir; 5) bacterias transformadas con pQE sin inserto inducidas; 6) bacterias transformadas con pQE(24RNP) sin inducir; carril 7) bacterias transformadas con pQE(24RNP) inducidas; 8) bacterias transformadas con pQE(31) sin inducir; 9) bacterias transformadas con pQE(31) inducidas; 10) bacterias transformadas con pQE(33) sin inducir; 11) bacterias transformadas con pQE(33) inducidas.

Como se puede ver en la Figura 10 las dos clonas obtenidas finalmente (31 y 33) son capaces de sobre-expresar las respectivas proteínas en buena cantidad, teniendo como punto de comparación la clona que produce la 24RNP de espinaca recombinante, que ya se tenía en el mismo vector de expresión. Las dos proteínas obtenidas son del tamaño esperado, aproximadamente 33 kDa, lo que es un indicio de que la clonación fue exitosa.

5.- Expresión de la CP29.

Los resultados obtenidos con la CP29 y descritos en el punto 4 de esta sección sugerían que las células JM-109 transformadas con la ligación pQE(29) podrían no estar creciendo porque los niveles de expresión de esta proteína, aunque bajos en estas cepas, podrían ser tóxicos. Por lo tanto se supuso que los cultivos transformados con la ligación pQE(29) que crecían a baja densidad, podrían contener el plásmido con el inserto del gen de la 29RNP. Con este criterio se extrajo plásmido de 15 mL de cultivo de dos cultivos transformados con la ligación pQE(29) y que presentaran bajo crecimiento y se emplearon para transformar células M-15 cuyo sistema de expresión del promotor *lac* está reprimido más fuertemente. Esto permitiría que solo bajo la presencia del inductor se produjera la proteína recombinante y las células pudieran crecer.

Se seleccionaron dos colonias de M-15 transformadas y para comprobar que realmente eran positivas, se procedió a una inducción en pequeña escala. En la Figura 11 se presentan los resultados del análisis de las proteínas producidas después de la inducción con IPTG.

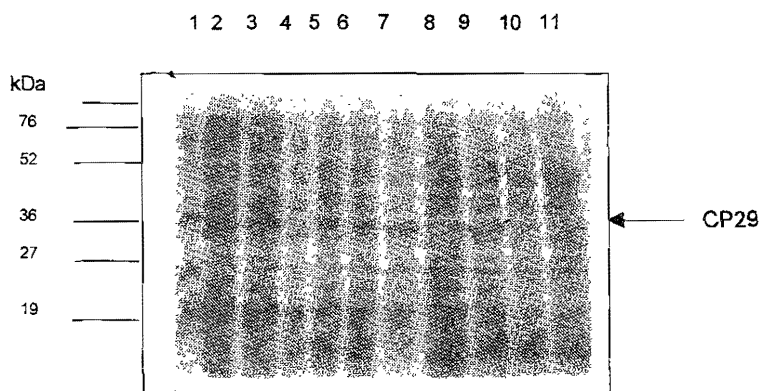


Figura 11. Niveles de expresión de la proteína CP29. Gel de SDS-PAGE al 15% de acrilamida teñido con azul Coomassie. Se cargaron 30 μ L del extracto bacteriano total (200 μ L) de todas las muestras, las inducciones se llevaron a cabo con 1 mM de IPTG a 37 $^{\circ}$ C, durante 4 horas. Carril 1) marcador de peso molecular Low-Range de Bio-Rad; 2) extracto de bacterias sin plásmido, sin inducir; 3) bacterias sin plásmido inducidas; 4) bacterias transformadas con pQE sin inserto sin inducir; 5) bacterias transformadas con pQE sin inserto inducidas; 6) bacterias transformadas con pQE(24RNP) sin inducir; 7) bacterias transformadas con pQE(24RNP) inducidas; 8) bacterias transformadas con pQE(29.2) sin inducir; 9) bacterias transformadas con pQE(29.2) inducidas; 10) bacterias transformadas con pQE(29.5) sin inducir; 11) bacterias transformadas con pQE(29.5) inducidas

Como se puede ver en la Figura 11, sólo la bacteria transformada denominada 29.2 es capaz de sobre-expresar la proteína recombinante. La colonia 29.5, aún cuando es capaz de crecer perfectamente en medios con amp y Kan, no posee el gen de la CP29. Con este resultado se comprobó que la ligación pQE(29) si funcionó, pues la bacteria sobre-expresa, después de la inducción, una proteína del peso molecular esperado (aproximadamente 33 kDa).

6.- Detección inmunológica

Para comprobar la identidad de las proteínas que expresan las clonas obtenidas se realizó un Western-blot empleando anticuerpos contra la 24RNP recombinante de espinaca la cual es similar a las de *A. thaliana* (Robles 2000). Los resultados se muestran en la Figura 12

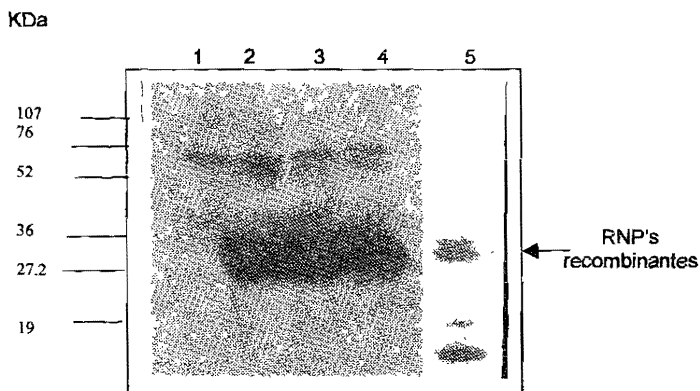


Figura 12. Reconocimiento de las proteínas recombinantes por el anticuerpo anti-24-RNP recombinante de espinaca. Western blot con anticuerpo anti-24RNP recombinante de espinaca 1:2000. Revelado por ECL. Se cargaron en el gel 60 μ L del extracto bacteriano total (200 μ L). Carril 1) extracto de bacterias con plásmido sin inserto inducidas; 2) bacterias transformadas con pQE(29) inducidas; 3) bacterias transformadas con pQE(31) inducidas; 4) bacterias transformadas con pQE(33) inducidas; 5) 20 μ g de proteína total de extracto de hoja joven de espinaca.

Como se puede observar las tres proteínas son identificadas por el anticuerpo empleado, esto significa que los genes fueron clonados en fase y las proteínas se expresan correctamente. Las bandas que se observan en la parte alta de la membrana en todas las preparaciones son proteínas bacterianas que el anticuerpo logra reconocer.

VIII. DISCUSIÓN

1. ESTRATEGIA DE CLONACIÓN.

El sistema de expresión elegido para llevar a cabo la clonación y expresión de proteínas recombinantes pQE (QIAGEN) presenta muchas ventajas, sobre todo al momento de la expresión de las proteínas recombinantes. Las construcciones que se obtuvieron poseen la etiqueta de seis histidinas en la región amino terminal de las proteínas maduras, lo que les permite ser purificadas mediante una columna de afinidad. La etiqueta en la zona del amino terminal de las proteínas es una forma fácil de etiquetarlas sin que estos aminoácidos interactúen con la secuencia normal de las proteínas, evitando así posibles cambios conformacionales en las proteínas recombinantes, que pudiesen alterar su funcionalidad (Slawomir, 1999).

Se requería que las proteínas recombinantes obtenidas no tuvieran el péptido de tránsito que poseen en su forma inmadura puesto que al actuar en el cloroplasto, esta secuencia no se encuentra. Los ensayos de funcionalidad *in vitro* se deben llevar a cabo con las proteínas maduras, por lo que es importante que la secuencia de aminoácidos sea partir del dominio ácido y se mantengan intactos los dominios de unión a RNA, pues es ahí donde radica la funcionalidad de estas tres proteínas.

La estrategia de clonación llevada a cabo consistió en emplear la reacción en cadena de la polimerasa logrando dos objetivos el primero generar secuencias que poseyeran un sitio de corte BamHI para facilitar su clonación, y la segunda amplificar sólo la secuencia de interés, eliminando la secuencia del péptido de tránsito de las proteínas recombinantes, obteniendo así proteínas maduras

Se eligió una clonación dirigida, es decir cortando con dos diferentes enzimas de restricción con el fin de insertar los genes en su orientación correcta. El sitio BamHI fue introducido a las secuencias de los genes a clonar, por el uso de un oligo que contenía esta secuencia en la región 5' de los genes, mediante la reacción de PCR. La segunda enzima elegida fue PstI debido a que este sitio de corte lo poseían los tres plásmidos donde los genes estaban clonados y no lo presentaban las secuencias de los genes en

sí. Al emplear el oligo M-13 como oligo reverso se lograba amplificar las secuencias manteniendo este sitio en los productos amplificados para posteriormente restringirlos

Las tres secuencias obtenidas fueron clonadas en fase es decir en un marco de lectura apropiado debido a la elección del plásmido pQE31, que al poseer un nucleótido menos antes del codón de inicio respecto al plásmido pQE30, permite que las secuencias insertadas completen los codones necesarios para que el mensaje se lea en fase y no se obtenga un error en el marco de lectura y/o terminación temprana de la lectura.

Los tres plásmidos recombinantes fueron transformados en células *E. coli* JM-109 con el fin de propagar el plásmido y seleccionar las colonias positivas. Este paso se complicó ya que la proteína CP29 recombinante resultó ser tóxica y provocó la muerte celular, probablemente por un "goteo" en la producción de la proteína lo que posiblemente afectó el metabolismo de la bacteria. Este resultado no es extraño pues se ha observado que otras proteínas similares como la SSB de *E. coli*, la cual se une a cadenas sencillas de DNA, inhibe el crecimiento en cepas con poca represión. Sin embargo, en bacterias con represión elevada sintetizan la proteína sin ningún problema (Slawomir, 1999). A pesar de este inconveniente se logró identificar a las colonias positivas gracias al sistema de represión elevado de células M-15 en las que se llevó a cabo la expresión de la proteína recombinante a pequeña escala, que es una de las pruebas que recomienda QIAGEN INC para confirmar el éxito de la clonación

2. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.

Una vez que se transformaron los tres plásmidos recombinantes en la cepa M-15 se llevó a cabo la inducción en pequeña escala para comprobar la sobre-expresión de las proteínas y con esto el éxito de la clonación. Las tres proteínas se produjeron con un nivel adecuado. Será necesario probar las condiciones de cultivo adecuadas para incrementar los niveles de expresión y obtener la mayor cantidad de proteína recombinante soluble. (Slawomir, 1999; Toledo, 1998). Por lo tanto, el siguiente paso será obtener curvas de crecimiento de las tres clonas y optimizar la sobreproducción de las proteínas.

El tamaño de las proteínas recombinantes observado en los geles es cercano al esperado. El hecho de que estas proteínas no migren en los geles de SDS-PAGE de acuerdo al peso molecular calculado no significa que se trate de proteínas diferentes ya que se ha demostrado que debido a la carga neta del dominio ácido de las RNPs el patrón de migración de las proteínas se altera incrementándose hasta en 7 KDa (Lisitsky *et al.*, 1994)

La identificación de las tres proteínas recombinantes mediante un anticuerpo policlonal contra la 24RNP recombinante de espinaca permitió concluir que los productos obtenidos son los esperados. Esto fue posible debido a que las secuencias de las tres proteínas son similares a las de la 24RNP de espinaca

IX. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las colonias que se obtuvieron fueron capaces de producir las tres proteínas de interés. De los resultados obtenidos de los geles SDS -PAGE podemos decir que la estrategia de clonación elegida fue exitosa y que las proteínas que se producen son las de interés.

Al momento de terminar los trabajos experimentales de esta tesis, ya se había comenzado a trabajar con la inducción de la proteína CP29 recombinante a gran escala a partir de la clona positiva obtenida, con la intención de emplearla en la producción de anticuerpos policlonales en gallina contra ella.

Las clonas positivas de la 31 y 33RNPs no han sido empleadas en la producción a gran escala de las proteínas, pero sí en la inducción en pequeña escala para comparar contra otras proteínas y emplearlas como control. Es probable que en un futuro también se desarrollen anticuerpos contra estas proteínas.

Las proteínas recombinantes son una herramienta muy útil para elucidar problemas de función y estructura en sistemas muy complejos como los de las plantas, lo ideal sería poder trabajar con proteínas puras obtenidas a partir de las mismas, pero debido a que las proteínas que actúan a niveles de regulación se encuentran en pocas cantidades es más fácil emplear las proteínas recombinantes. Un estudio que se puede llevar cabo con las proteínas obtenidas en el presente trabajo podría ser la determinación de su función lo cual está estrechamente ligada a la estructura las mismas. También pueden ser empleadas en ensayos de unión a mRNA de cloroplasto.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Brent R. (1994).** Protein Expression *in* Current Protocols in Molecular Biology. Chap. 16
John Wiley & Sons, Inc
- Cook WB, Walker JC. (1992)** Identification of a maize nucleic acid-binding protein (NBP) belonging to a family of nuclear-encoded chloroplast proteins. *Nucleic Acid Research*. 29(2):359-364
- Deng XW, Stern DB, Tonkyn JC, Gruissem W. (1987)** Plastid run-on transcription: application to determine the transcriptional regulation of spinach plastid genes. *J. Biol. Chem*. 262:9641-9648
- Deng XW, Gruissem W. (1987)** Control of plastid gene expression during development in non-photosynthetic plastids of higher plants. *EMBO J*. 7:3301-3308.
- Deng XW, Gruissem W. (1988)** Constitutive transcription and regulation of gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation. *Cell* 49:379-387
- Fukami KK, Tomoda S, Go M. (1993)** Evolutionary clustering and functional similarity of RNA-binding proteins *FEBS Lett*. 335:289-293
- Gruissem W, Barkan A, Deng XW, Stern D. (1988)** Transcriptional and post-transcriptional control of plastid mRNA levels in higher plants. *TIG* 4(9), 258-263.
- Hanahan D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 166(4) 557-80
- Hsu-Ching C, Stern D. (1991)** Specific ribonuclease activities in spinach chloroplasts promote mRNA maturation and degradation. *J. Biol. Chem* 266:1-7.
- Laemmli UK. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227 680-685
- Li Y, Sugiura M. (1990)** Three distinct ribonucleoproteins from tobacco chloroplast: each contains a unique amino terminal acidic domain and two ribonucleoprotein consensus motifs. *EMBO J*. 9 3059-3066
- Lisitsky I, Liveanu V. (1994)** RNA-binding activities of the different domains of a spinach chloroplast ribonucleoprotein. *Nucl. Acids Res*. 22:4719-4724.

- Lisitsky I, Liveanu V, Schuster G. (1995)** RNA-binding characteristics of a ribonucleoprotein from spinach chloroplast. *Plant Physiol* 107: 933-941.
- Ludevid MD, Freire MA, Gómez J, Burd CG, Albericio F, Gíralt E, Dreyfuss G, Pagès M. (1992)** RNA binding characteristics of a 16 kDa glycine-rich protein from maize. *Plant J.* 2(6), 999-1003.
- Memon A, Meng B, Mullet J. (1996)** RNA-binding proteins of 37/38 kDa bind specifically to the barley chloroplast *psbA* 3'-end untranslated RNA. *Plant Mol Biol* 30 1195-1205.
- Mohr H, Schopfer P. (1995)** Plant Physiology. Ed. Springer-Verlag, Germany. pp 141, 375-382
- Mullet JE. (1993)** Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Phys.* 103 309-313.
- Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986)** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol* 51 Pt 1 263-273.
- Nagai K, Oubridge C, Ito N, Avis J, Evans P. (1995)** The RNP domain: a sequence-specific RNA-binding domain involved in processing and transport of RNA. *TIBS* 20:235-240
- Ni Z, Sun Q, Liu Z, Wu L, Wang X. (2000)** Identification of a hybrid-specific expressed gene encoding novel RNA-binding protein in wheat seedlings using differential display of mRNA. *Mol. Gen Genet* 263:934-938.
- Ohta M, Sugita M, Sugiura M (1995)** Three types of nuclear genes encoding chloroplast RNA-binding proteins (cp29, cp31 and cp33) are present in *Arabidopsis thaliana*: presence of cp31 in chloroplast and its homologue in nuclei/cytoplasm. *Plant Mol. Biol.* 27:529-539
- Robles HS. (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.
- QIAGEN Inc. (1992).** "The QIAexpressionist" second Edition QIAGEN Inc. CA USA
- QIAGEN Inc. (1995).** "The QIAEX II Handbook" QIAGEN Inc. CA. USA
- QIAGEN Inc. (1995).** "The Qiaprep Plasmid Handbook" QIAGEN Inc. CA. USA.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989)** Molecular Cloning. A laboratory manual. Second Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schuster G, Gruissem W. (1991)** Chloroplast mRNA 3' end processing requires a nuclear-encoded RNA-binding protein. *EMBO J* 10:1493-1502.
- Shamoo Y, Manan A, Patten AM, Crawford JK, Pellegrini MC, Williams KR. (1994)** Both RNA-binding domains in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 contribute toward single-stranded-RNA binding. *Biochemistry* 33:8272-8281.
- Slawomir D, Józef K. (1999)** Cloning, over expression and purification of the recombinant His-tagged SSB protein of *Escherichia coli* and use in polymerase chain reaction amplification. *Protein Expression and Purification* 16:96-102.
- Smeekens S, Weisbeek, Robinson C. (1990)** Protein transport into and within chloroplasts. *TIBS* 15:73-76.
- Stern DB, Gruissem W. (1989)** Chloroplast mRNA 3' end maturation is biochemically distinct from prokaryotic mRNA processing. *Plant Mol. Biol.* 13.615-625.
- Sugita M, and Sugiura M. (1996)** Regulation of gene expression in chloroplast of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 32:315-326
- Toledo G. (1998)** Estudio de la función de la proteína de 24 kDa que se une a RNA (24RNP) durante el procesamiento y estabilización de los mRNAs de cloroplasto. Tesis de Maestría en C. Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM.
- Towbin M, Staehelin T, and Gordon J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354.
- Ye L, Li Y, Fukami KK, Go M, Konishi T, Watanabe A, Sugiura M. (1991)** Diversity of a ribonucleoprotein family in tobacco chloroplasts: two new chloroplast ribonucleoproteins and phylogenetic tree of ten chloroplast RNA-binding domains. *Nucl. Acids Res.* 19.6485-6490