



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE *Euglena gracilis* QUE INCREMENTAN SU EXPRESIÓN EN RESPUESTA A CADMIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO-BIÓLOGO

P R E S E N T A

Miguel Ángel Shingú Vázquez

MÉXICO, D. F.



Enero 2005

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

m340228



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Miguel Ángel

Shigué Vázquez

FECHA: 21 Enero 2005

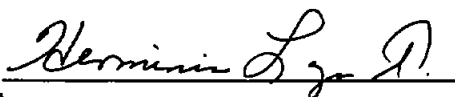
FIRMA: [Firma]

Jurado asignado:

Presidente	Profra. Marisol López López
Vocal	Profra. Herminia de Jesús Loza Tavera
Secretario	Prof. Elpidio García Ramírez
1er Suplente	Profra. Maria Elena Ibarra Rubio
2do Suplente	Prof. Euclides Ávila Chávez

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 105. Edificio "E",
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas
Facultad de Química. UNAM



Asesor:

Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera



Supervisor Técnico:

M. en C. Martín Pedro Vargas Suárez



Sustentante:

Miguel Ángel Shingú Vázquez

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue desarrollado gracias al apoyo económico del programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado Fac. de Química, UNAM, 6290-04 y al Proyecto PAPIIT IN215705, DGAPA-UNAM, otorgados a la Dra. Herminia Loza Tavera.

Al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la Facultad de Química UNAM por permitirme llevar a cabo este trabajo en sus instalaciones.

Al Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chavez" por facilitarme el uso de sus instalaciones para el cultivo de *Euglena gracilis*.

A la Dra. Herminia Loza Tavera por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, así como el tiempo dedicado a mi formación profesional. Y sobre todo por iniciarme en el camino de la investigación.

Al Dr. Rafael Moreno Sánchez por el apoyo y sugerencias a este trabajo.

A mis padres Filemón y Celia por todo el apoyo y dirección que han dado a mi vida.

A mis hermanos Carmen, Juan y Cedlía por que son la fuerza que me hace ser cada día mejor.

A Ma. Luisa Sandoval por ser lo mejor que me ha pasado y por ser mi fuente de inspiración. Gracias por existir. **ILS**

A mi tío German por todo el apoyo que me ha dado.

A los M. en C Martín Vargas Suárez y Agustín Carrillo García por la asesoría técnica y amistad brindada. Los dos un ejemplo a seguir.

A mis grandes amigos Viridiana y Alejandro por ser mi apoyo moral.

A mis compañeros de Lab. Mayra, Denia, Selene, Yola.

CONTENIDO

Abreviaturas	1
Resumen	2
Introducción	3
Metales pesados	4
Cadmio	5
Mecanismos de resistencia a Cd ²⁺	6
<i>Euglena gracilis</i>	7
AFLP	9
Respuesta transcripcional de <i>E. gracilis</i> al Cd ²⁺	12
Objetivo	13
Hipótesis	13
Materiales y métodos	14
Cultivo y cosecha de células	14
Purificación de RNA total	15
Purificación de mRNA	16
Síntesis de cDNA	16
AFLP	19
Amplificación de las bandas por PCR	20
Clonación	23
Resultados	26
AFLP	26
Amplificación de las bandas por PCR	28
Clonación	30
Discusión	35
Conclusiones	39

Apéndice 1	40
Apéndice 2	43
Apéndice 3	44
Bibliografía	45

ABREVIATURAS

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
Cys	Cisteína
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
FQs	Fitoquelatinas
GSH	Glutación
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RNA	Ácido ribonucleico

RESUMEN

La contaminación de la corteza terrestre y de los depósitos de agua continental con metales pesados, particularmente Hg, Pb, As y Cd es un problema a nivel mundial. Esto se ve reflejado en pérdidas en la agricultura, efectos dañinos en la salud de los animales, plantas y humanos.

En algunas levaduras, plantas y algas la exposición a cadmio induce la síntesis de cisteína (Cys), glutatión (GSH) y fitoquelatinas (FQs), compuestos capaces de quelar al metal. Sin embargo, en *Schizosaccharomyces pombe* la activación de la vía de síntesis de estos compuestos no es la única respuesta bioquímica-molecular que las células realizan para permitir que este organismo tolere altas concentraciones de cadmio. Por estudios proteómicos se han observado incrementos en enzimas de estrés oxidativo, de respuesta a estrés por calor y proteínas como ATPasas, NADPH deshidrogenasa, proteínas ribosomales, proteínas de respuesta de daño al DNA, que también son inducidas en respuesta a Cd^{2+} .

En nuestro laboratorio estamos interesados en identificar algunos de los genes que incrementan su transcripción en respuesta a Cd^{2+} en *Euglena gracilis*. *E. gracilis* es un protista de vida libre que resiste concentraciones elevadas de Cd^{2+} , a 100 μM de Cd^{2+} se inhibe el crecimiento en un 50%. En este organismo se ha determinado que ocurren incrementos en la síntesis de Cys, GSH y FQs, así como compartimentalización del Cd^{2+} en cloroplasto y mitocondria.

En este trabajo se analizó la expresión genética de *Euglena gracilis* en respuesta a concentraciones elevadas (170 μM) de Cd^{2+} empleando la técnica denominada AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Esta técnica es una herramienta poderosa para realizar análisis comparativo de expresión genética. Se basa en la amplificación selectiva por PCR de fragmentos de DNA ligados a cebadores específicos, con el fin de poder visualizar una gran cantidad de variaciones genéticas moleculares existentes entre poblaciones de ácidos nucleicos estrechamente relacionados. En este trabajo se probaron ocho diferentes cebadores *Eco* RI con 16 cebadores *Mse* I obteniéndose 47 bandas que aumentan su expresión en respuesta a cadmio.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha presentado un incremento en la contaminación de la atmósfera, la corteza terrestre, océanos, ríos y depósitos de agua continental con metales pesados, particularmente Hg, Pb, As, Cr y Cd (Rubinelli *et al.*, 2002; Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999) reflejándose en pérdidas en la agricultura, el deterioro de la salud de plantas y de animales (Zhang *et al.*, 2001).

La contaminación por metales pesados proviene principalmente de la actividad industrial. Entre las industrias que presentan mayores emisiones de metales pesados, según el elemento son: a) Cd: procesadoras de baterías y acumuladores, fabricación de cables eléctricos, celdas fotoeléctricas, cloruro de polivinilo, colorantes, fusibles, joyería y de soldadura y por la combustión de diesel y petróleo; b) Cr: industrias procesadoras de cemento, industrias curtidoras y metalúrgicas, fabricación de material fotográfico, colorantes, y pinturas; c) Pb: combustión de gasolina con Pb, plantas de fundición de metales y fabricación de fertilizantes fosfatados con Pb; d) Hg: minería, fabricación electrolítica de Hg, industria del papel y celulosa y fabricación de cloro-sosa; e) As: fertilizantes, pesticidas y combustión de energéticos fósiles (Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999).

Estos metales se concentran y "mueven" de forma ascendente en la cadena alimenticia. Por ejemplo, el Cd^{2+} es rápidamente tomado por las plantas y se acumula en tallos, hojas (Gardea, *et al.*, 2004) y semillas (Rubinelli *et al.*, 2002), los cuales son ingeridos por animales destinados al consumo humano, pudiendo llegar así a ser tóxicos para el hombre.

Algunos métodos para controlar la contaminación por metales pesados son la adsorción, el reciclaje y el enterrar los desechos industriales. Sin embargo, estos métodos convencionales son muy costosos y poco eficientes, por lo que una alternativa atractiva es el uso de organismos hiperacumuladores de metales pesados para realizar biorremediación *in situ* (Rubinelli *et al.*, 2002). Son pocas las especies de plantas y microorganismos que tienen la capacidad de crecer en medios contaminados con metales pesados. Algunas plantas capaces de acumular

grandes cantidades de estos metales en sus tallos y hojas se han propuesto como organismos biorremediadores, es decir, con capacidad de "limpiar" de metales pesados suelos y agua, por ejemplo, la enredadera *Convolvulus arvensis* cultivada en presencia de 20 mg/L de Cd^{2+} , Cr^{6+} y Cu^{2+} acumula más de 1500 mg de Cd^{2+} , 3800 mg de Cr^{6+} y 560 mg de Cu^{2+} por kilogramo de peso seco (Gardea *et al.*, 2004). Esta capacidad de acumular metales pesados los convierte en organismos con posible utilización en biorremediación.

Metales pesados

Los metales pesados son aquellos que tienen una densidad mayor a 5 g/mL. Se clasifican de acuerdo a su reactividad con oxígeno, nitrógeno y azufre de la siguiente manera:

- ❖ Clase A: los que tienen mayor afinidad por el oxígeno ($\text{O} > \text{N} > \text{S}$)
- ❖ Clase B: los que tienen mayor afinidad por el azufre ($\text{S} > \text{O} > \text{N}$)
- ❖ Clase C: los de afinidad intermedia al S u O (Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999)

Actualmente se conocen los efectos tóxicos a corto plazo de Hg^{2+} , Cd^{2+} y Pb^{2+} en plantas, animales y el hombre. Los tres metales se unen fuertemente a los grupos fosfato y sulfhidrilo, a los aminoácidos cisteína e histidina en las proteínas y a purinas y porfirinas. Por lo tanto, los tres elementos pueden actuar en un gran número de procesos bioquímicos: inhiben a muchas enzimas al interactuar con los grupos sulfhidrilo de los sitios activos, se unen a los ácidos nucleicos afectando su conformación e interrumpen la vía de la fosforilación oxidativa, sin embargo en cada caso el efecto depende de las propiedades de cada metal (Vallee *et al.*, 1972). Por ejemplo, el Hg^{2+} modifica reversiblemente la afinidad por 2,3-bisfosfoglicerato de la enzima fosfogliceromutasa de músculo esquelético de humanos adultos pero no afecta a las isoenzimas de riñón, hígado, cerebro y glóbulos rojos (Vallee *et al.*, 1972).

Cadmio (Cd²⁺)

El Cd²⁺, un metal de transición del grupo IIB, es un elemento relativamente raro, su concentración en la corteza terrestre es mucho menor que la de Hg²⁺ o Pb²⁺ y está presente en muy poca cantidad (0.00016-0.124 µg/ML) en mares (De Filippis and Pallaghy, 1994; Vallee *et al.*, 1972). Según la Agenda para el registro de sustancias tóxicas y enfermedades en EUA (ATSDR, por las siglas en Inglés - *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*-) es extremadamente tóxico aún a bajas concentraciones (0.02 µg/Kg/día) (ATSDR, 1999).

Ocupa el número siete en la lista de las 20 sustancias altamente nocivas según la Agencia de Protección al Ambiente en EUA (EPA, por las siglas en Inglés -*Environmental Protection Agency*-) y ha sido clasificado en el grupo 1 de carcinógenos humanos por la ATSDR. La principal ruta de exposición en humanos es por inhalación de humos emitidos al trabajar con soldadura e ingestión de alimentos que contienen este metal (Waalkes *et al.*, 1992., ATSDR, 1999). La exposición crónica tiene efectos nocivos como disfunción renal (Elinder *et al.*, 1987), osteomalacia (Nogawa and Kido, 1993), teratogénesis (Desi *et al.*, 1998) y cáncer (ATSDR, 1999). Una vez que ha penetrado en el organismo humano tiene un tiempo de vida media de 10 años (Buchet *et al.*, 1990).

Es un metal no esencial, altamente tóxico, con alta afinidad por átomos de S, O y N de biomoléculas, uniéndose firmemente a los grupos SH- del aminoácido cisteína de proteínas (Vallee *et al.*, 1972). El daño intracelular asociado a la exposición a Cd²⁺ incluye unión y desnaturalización de proteínas, peroxidación de lípidos y rompimiento de las cadenas de DNA (Liao *et al.*, 1998). La Interacción de Cd²⁺ con poltioles es fuerte y de importancia biológica ya que compite con el Zn²⁺ por los grupos sulfhidrilo. También interactúa con fosfolípidos como fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, estas interacciones llevan a los efectos tóxicos en mitocondria, túbulos renales y células nerviosas. Cuando el Cd²⁺ está presente en concentraciones de 20 ppm y pH 5 rompe al tRNA y rRNA de *E. coli* (Vallee *et al.*, 1972).

Mecanismos de resistencia a Cd²⁺

El Cd²⁺ es tóxico debido a que: 1) se une a los residuos de Cys de proteínas y enzimas modificando su estructura y de esta manera desnaturizándolas y 2) genera especies reactivas de oxígeno ocasionadas por el ciclo redox que sigue el metal, lo cual provoca alteraciones en el metabolismo de las células (Zhang *et al.*, 2001).

Plantas y levaduras resisten la toxicidad de Cd²⁺ por medio de diferentes mecanismos bioquímicos, como son:

- Quelación, con el fin de limitar la reactividad y solubilidad del Cd²⁺, éste es unido por agentes quelantes como GSH, Cys, FQs (Silver *et al.*, 1996).
- Compartimentalización, una vez que el Cd²⁺ está unido a FQs o a GSH es transportado a la vacuola donde es almacenado (Silver *et al.*, 1996, Ortiz *et al.*, 1995).
- Expulsión, se realiza por medio de transportadores miembros de la familia de Facilitadores de la Difusión de Cationes (Silver *et al.*, 1996).

Uno de los mecanismos más estudiados de resistencia a metales pesados (principalmente a Cd²⁺), en algunas plantas y en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* es la producción de fitoquelatinas (FQs). Estos compuestos son una familia de péptidos que contienen repeticiones del dipéptido γ -Glu-Cys seguido por un aminoácido Gly terminal. La estructura básica es $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, donde n toma valores de 2 a 11 unidades. Estos compuestos se sintetizan a partir de (GSH, por la actividad de la fitoquelatina sintetasa (FS), en una reacción de transpeptidación (Rausser, 1995) (Fig. 1). Las FQs tienen la capacidad de secuestrar al Cd²⁺ y compartimentarlo en la vacuola en forma de complejos FQ-Cd²⁺ (Cobbett, 2000), disminuyendo de esta manera la toxicidad del metal. Entre los diferentes metales pesados, los activadores más efectivos de la síntesis de FQ son el Cd²⁺ y el Hg²⁺ (Vatamaniuk *et al.*, 2000). La síntesis de FQs en respuesta a Cd²⁺ involucra el incremento en las actividades enzimáticas de la vía de síntesis de Cys y GSH y por ende de la vía de asimilación de azufre (Mendoza *et al.*, 2004). Para una revisión detallada de los efectos del Cd²⁺ en la vía de síntesis del GSH y las FQs revisar Mendoza *et al.*, 2004.

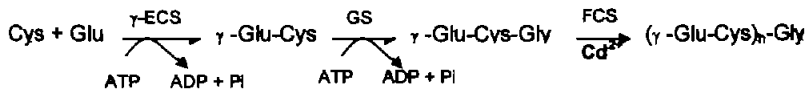


Figura 1. Síntesis de fitoquelatinas. γ -ECS, γ -glutamilcisteína sintasa; GS, Glutatión sintetasa; FS, fitoquelatina sintetasa (Modificado de Cobbett, 2000).

A pesar de que la síntesis de FQs ha sido reconocida como una respuesta de resistencia a Cd^{2+} en varios organismos, y que la respuesta de los genes involucrados en la vía de síntesis de este compuesto ha sido estudiada en plantas como frijol (*Phaseolus vulgaris*), *Brassica juncea* y *Convolvulus arvensis* (Zhang *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1999; Gardea *et al.*, 2004) y en *Arabidopsis thaliana*, en la cual el Cd^{2+} induce la expresión de enzimas como, sulfito reductasa, glutatión sintetasa, adenosina 5-fosfo-sulfato cinasa (Harada *et al.*, 2002); en estudios proteómicos en *Saccharomyces cerevisiae* se ha demostrado que la respuesta a Cd^{2+} no reside únicamente en la síntesis de FQ. Algunas proteínas relacionadas con estrés oxidativo como citocromo c peroxidasa, catalasa T, tioredoxina, tioperoxidasa; otras relacionadas con estrés térmico, por ejemplo: varias proteínas de choque térmico y proteínas como ATPasas, NADPH deshidrogenasa, proteínas ribosomales, proteínas de respuesta de daño al DNA, son también inducidas en respuesta a Cd^{2+} (Vido, *et al.*, 2001).

Euglena gracilis

Es un protista unicelular de agua dulce, no vacuolado, fotoheterótrofo, utilizado como microorganismo "biomonitor" ya que su contenido puede analizarse fácilmente para la identificación de metales en su interior y de esta manera evaluar el grado de contaminación en un área determinada. Programas de monitoreo usan a *E. gracilis* para establecer la abundancia y biodisponibilidad de metales pesados (De Filippis and Pallaghy, 1994)

E. gracilis es tolerante a metales pesados ya que ha sido encontrada en depósitos de agua contaminada con metales como mercurio, níquel, cadmio, zinc, plomo y selenio (Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999). A pesar de la tolerancia presentada, los efectos tóxicos del Cd^{2+} a concentraciones de 1 mM en *E. gracilis* incluyen inhibición del crecimiento, motilidad, fototaxis y fotosíntesis (De Fillippis and Pallaghy, 1994; Navarro *et al.*, 1997).

También se ha demostrado que *E. gracilis* cultivada en la oscuridad en medio con lactato, al ser expuesta a bajas concentraciones de Hg^{2+} (1.5 μM), durante dos meses, resemebrando una alícuota cada tres o cuatro días (aproximadamente 60 generaciones), aumenta su resistencia a Cd^{2+} (Devars, *et al.*, 1998) Después de cultivar las células pre-tratadas con mercurio por siete veces consecutivas (aproximadamente 15 generaciones) en presencia de 0.1 mM de $CdCl_2$, éstas presentaron niveles elevados de Cys, GSH y FQs, mientras que las células no pre-tratadas con mercurio morían al tercer cultivo consecutivo en presencia de Cd^{2+} . Estos resultados sugieren que el pre-tratamiento con mercurio seleccionó una población que presentaba una mayor capacidad de resistencia y acumulación a Cd^{2+} , la cual era estable por varias generaciones. Se observó además que en *E. gracilis* heterótrofa, el cadmio era almacenado en la mitocondria con consecuentes aumentos de Cys, GSH y FQs en ese organelo (Avilés *et al.*, 2003)

Por otro lado, se ha determinado que *E. gracilis* fotoheterótrofa es capaz de compartamentalizar Cd^{2+} en el cloroplasto, en donde también se observan incrementos en las cantidades de Cys, GSH y FQs correlacionados con este fenómeno. Al parecer el efecto del Cd^{2+} en el metabolismo cloroplástico es a nivel de desacoplamiento del transporte de electrones en la fotofosforilación, posiblemente porque el Cd^{2+} interacciona con el transportador de protones (Mendoza *et al.*, 2001).

Técnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Es un método de mapeo de ácidos nucleicos que permite encontrar variaciones genéticas entre ácidos nucleicos estrechamente relacionados, en forma de bandas que aparecen diferencialmente en el análisis entre el control y el tratamiento (semejante a los RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*)) (Liscum, 1998). Esta técnica posee alta sensibilidad y alta especificidad permitiendo detectar genes diferencialmente expresados y diferenciando entre genes homólogos (Reijans *et al.*, 2003).

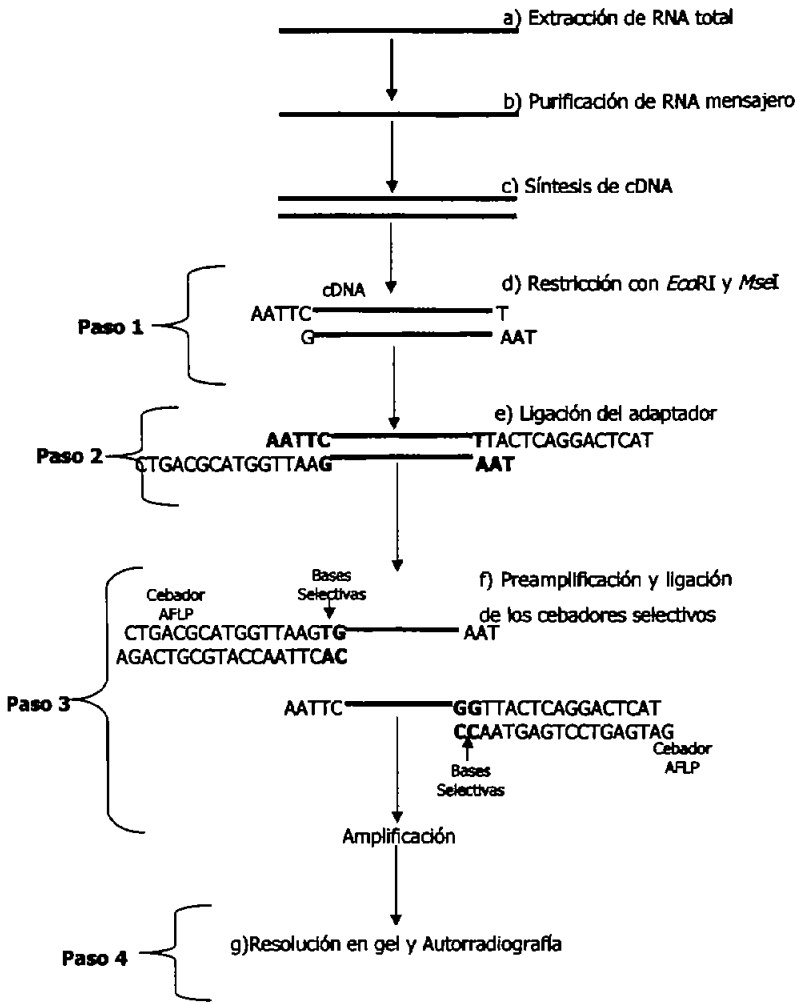
El número de marcas observadas con AFLP es de 10 a 100 veces mayor que con métodos comúnmente utilizados. Por ejemplo, al realizar una comparación cuantitativa en la expresión de *Saccharomyces cerevisiae* con las técnicas de AFLP, microarreglos y GeneChip, se observó que el AFLP genera muy pocos resultados inciertos comparados con microarreglos y GeneChip. Los genes que se sometieron a hibridación mostraron resultados idénticos en AFLP y GeneChip, con la diferencia de que para la última técnica se requiere contar con aparatos costosos. El AFLP es una buena alternativa a los microarreglos, ya que no es necesario contar con la secuencia del genoma del organismo en estudio para poderlo realizar (Reijans *et al.*, 2003). Esta técnica se ha empleado en la generación de mapas genéticos de alta resolución que pueden ser usados para clonación, así como un medio para identificar genes diferencialmente expresados (Liscum, 1998).

La técnica de AFLP se basa en la amplificación selectiva por PCR de fragmentos de restricción de una muestra de DNA genómico o DNA complementario (cDNA). La técnica involucra cuatro pasos secuenciales (Fig. 2): **1)** El cDNA de doble cadena que fue sintetizado a partir de RNA mensajero de células en condiciones contrastantes (tratamientos a comparar), es aislado y digerido con dos enzimas de restricción, de las cuales, una enzima tiene un sitio de corte poco frecuente (*EcoRI*) y la segunda enzima tiene un sitio de corte frecuente (*MseI*); **2)** ligación de adaptadores oligo-desoxiribonucleótidos de doble cadena a los extremos del DNA digerido. Se debe realizar una amplificación previa para asegurar que la cadena molde esté en cantidad suficiente para el siguiente

paso; **3)** amplificación selectiva de los fragmentos de restricción por PCR. Se utilizan cebadores que contienen una adición de una a tres pares de bases en su extremo 3' lo que permite amplificar selectivamente. Los cebadores que se unen al extremo *EcoRI* contienen el deoxiribonucleótido de adenina marcada con ³³P y **4)** análisis en gel de los fragmentos amplificados utilizando geles de acrilamida y autorradiografía (Uscum, 1998).

Esta técnica puede ser usada para DNA de cualquier origen o complejidad. Las marcas son producidas sin conocer la secuencia, usando un juego limitado de cebadores.

Figura 2. cDNA-AFLP. (Modificado de Liscum, 1998)



Sitio de corte de *EcoRI*
 5'-G|AATT C-3'
 3'-C TTAAG-5'

Sitio de corte de *MseI*
 5'-T|IA A-3'
 3'-A ATIT-5'

Genes que responden a Cd²⁺ en *E. gracilis*.

A pesar de que en *E. gracilis* la bioquímica de la respuesta a Cd²⁺ ha sido estudiada con cierta profundidad (Aviles *et al.*, 2003, Devars *et al.*, 1998, Mendoza *et al.*, 2001), no existen estudios que analicen de manera global, la respuesta genética a Cd²⁺. Por otro lado, el hecho de que estos organismos presenten una alta capacidad de resistencia al metal y que puedan acumularlo, hace estos estudios de gran importancia pues permitirán conocer los mecanismos moleculares involucrados en este proceso, lo que a largo plazo podría conducir a la manipulación genética de este organismo con propósitos de biorremediación.

En un trabajo previo (Hernández, 2003) se identificaron fragmentos de algunos genes que se expresan diferencialmente en respuesta a Cd²⁺ en *E. gracilis*. Estos genes muestran similitud con las proteínas HSP70, triosa fosfato isomerasa y un proteína de unión a poli-A. En este trabajo se continuó con el análisis diferencial de genes expresados en respuesta a Cd²⁺ en *E. gracilis* por la técnica de AFLP con otros cebadores que no habían sido analizados anteriormente.

OBJETIVO

- ❖ Realizar algunos análisis por AFLP de los mRNAs de *Euglena gracilis* que se sintetizan cuando este organismo es cultivado en presencia y en ausencia de Cadmio.
- ❖ Determinar las condiciones de elución del gel de AFLP, de las bandas expresadas diferencialmente.
- ❖ Determinar las condiciones de amplificación por PCR de las bandas eluidas del gel AFLP.
- ❖ Secuenciar los genes que se expresan diferencialmente en respuesta a cadmio.

HIPÓTESIS

En el *Euglena gracilis* existen mecanismos de resistencia a metales pesados que son atribuidos a cambios metabólicos, los cuales se deben a variaciones en la expresión genética, por lo tanto deben existir genes que aumentan su expresión o se expresan *de novo* en respuesta a la presencia de Cd^{2+} dentro de la célula.

MATERIALES Y MÉTODOS

En un trabajo previo se realizó lo siguiente (Hernández, 2003):

Cultivo y cosecha de células (Hernández, 2003)

a) Cultivo fresco

Se sembraron 0.2×10^6 células/mL en un medio de cultivo con glutamato y malato como fuente de carbono (ver apéndice 1). Se cultivaron durante 4 días (fase exponencial) con ciclos de 12 h luz ($60\text{-}70 \mu\text{mol quanta/m}^2\text{s}$) y 12 h oscuridad.

b) Cultivos utilizados para la extracción de RNA

1. Cuatro L de medio de cultivo fresco fueron sembrados y cultivados como se describió en el apartado anterior. Las células se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm, 5 min a 15°C , en un rotor de ángulo fijo empleando una centrifuga Sorvall RB-X.
2. Las células se lavaron con medio fresco, se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en aproximadamente 100 mL de medio fresco.
3. Las células se contaron haciendo una dilución 1:1000.
4. Se resembraron en 8 matraces con 1 L de medio de cultivo cada uno, a una concentración de 1.5×10^6 células/mL.
5. A 4 de los 8 L de medio de cultivo se les añadió CdCl_2 a una concentración de $170 \mu\text{M}$ a partir de un stock 50 mM.
6. Luego de 3, 6 y 9 h de haber sembrado, se recolectaron aproximadamente 1.3 L de células centrifugando en frascos limpios (no necesariamente estériles) a 5000 rpm. Se lavaron con medio KME (ver apéndice). Se pasaron a tubos de plástico de 50 mL y se volvieron a centrifugar en una centrifuga de mesa con rotor de columpio a 3000 rpm, 5 min. El paquete celular se congeló inmediatamente con N_2 líquido.

Purificación de RNA total (Chomczynski y Sacchi, 1987)

1. Se cosecharon células de *E. gracilis* como se describió previamente.
2. Se tomaron 1.5 g (peso fresco) de células y se trituraron con N₂ líquido en un mortero previamente enfriado hasta obtener un polvo fino.
3. Se prepararon 15 mL de solución D con β -mercaptoetanol (ver apéndice 1).
4. Se añadieron 5 mL sobre las células congeladas en el mortero y se mezcló bien con ayuda del pistilo.
5. La pasta que se formó, se pasó a un tubo de vidrio estéril (Corex) con tapa y se adicionó el resto de la solución D, mezclando perfectamente.
6. La mezcla se separó en dos partes iguales.
7. Se adicionó secuencialmente 1 mL de acetato de sodio 2 M, pH 4.0, 10 mL de fenol y 2 mL de cloroformo-álcohol isoamílico 49:1, mezclando perfectamente por inversión después de adicionar cada reactivo. La suspensión final se agitó vigorosamente por 10 s y fue incubada en hielo por 15 min.
8. Se centrifugó a 10,000 x g por 20 min a 4°C en un rotor de ángulo fijo en una centrífuga Sorvall RB-X.
9. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo. Se repitieron de dos a tres veces los pasos 6 y 7 cuando después de la centrifugación aún se veía una capa blanca en la interfase (proteína precipitada).
10. La fase acuosa se pasó a un nuevo tubo y se mezcló con 10 mL de isopropanol helado, se incubó a -20°C por 1 h.
11. Se centrifugó a 10,000 x g por 20 min, a 4°C.
12. La pastilla de RNA se resuspendió en 3 mL de solución D y se precipitó con un volumen de isopropanol helado incubando a -20°C por 1 h.
13. Se centrifugó a 10,000 x g por 20 min, a 4°C.
14. La pastilla se lavó dos veces con 10 mL de etanol al 75% y se centrifugó 15 min después de cada lavado.

15. La muestra se resuspendió en 1 a 2 mL de agua-DEPC y se conservó a -70°C hasta su uso.

Nota: el RNA debe resuspenderse fácilmente en agua de lo contrario es muy probable que la muestra tenga polisacáridos, lo cual dificulta su manejo posterior. Cultivos de *E. gracilis* de más de tres días tienen muchos polisacáridos.

Purificación de RNA poliA⁺

Se hizo de acuerdo a las indicaciones descritas en el kit PolyA tract de Promega. El RNA poliA⁺ recién purificado se guardó precipitado en $\frac{1}{4}$ de volumen de acetato de amonio 10 M, 2 volúmenes de etanol y 2 μL de glucógeno 2 mg/mL a -70°C . Al momento de utilizarlo, se centrifugó a 14,000 rpm, 15 min a 4°C en una microcentrífuga. Se tiró el sobrenadante y se resuspendió en 15 μL de agua estéril libre de RNasas.

Síntesis de cDNA

Primera cadena

1. Se mezclaron cantidades iguales (2 μg) de RNA poliA⁺ de células control cosechadas después de 3, 6 y 9 h de cultivo o de células tratadas con Cd durante el mismo tiempo. Se añadió 1 μL de oligonucleotido dT-(12-18) y se llevó a 12 μL con agua. Se incubó a 70°C durante 5 min y se pasó inmediatamente a hielo.
2. A la mezcla anterior se añadieron:
 - 4 μL amortiguador para la primera cadena de cDNA (Invitrogen)
 - 2 μL DTT 0.1 M
 - 1 μL dNTPs 10 mM
3. Las reacciones se incubaron a 42°C por 2 minutos, se añadió 1 μL de transcriptasa reversa (200 U/ μL , Invitrogen) y se incubó 2 h a 42°C . El volumen final de reacción fue 20 μL .

Segunda cadena

Para sintetizar la segunda cadena se utilizó DNA polimerasa I. También se añadió RNasa H, una endonucleasa que deja fragmentos de RNA que la DNA polimerasa I utiliza como cebadores para síntesis de la nueva cadena.

1. Al finalizar la síntesis de la primer cadena de cDNA, se incubó a 95°C para desnaturalizar a la enzima y se añadió:

30.0 μL amortiguador 5x para segunda cadena (ver apéndice 1)

1.0 μL dNTPs 25 mM

3.5 μL DNA polimerasa I

1.5 μL RNasa H

94.0 μL H₂O

2. Se incubó a 16°C, durante 2 h. El volumen final de reacción fue 150 μL , el cual se guardó precipitado en $\frac{1}{4}$ de volumen de acetato de amonio 10 M, 2 volúmenes de etanol y 2 μL de glucógeno 2 mg/mL a -70°C. Al momento de utilizarlo se centrifugó a 14,000 rpm, 15 min a 4°C en una microcentrífuga y se resuspendió en 15 μL de agua.

En este trabajo se partió del cDNA sintetizado, para seguir la siguiente estrategia experimental:

1) Digestión del cDNA

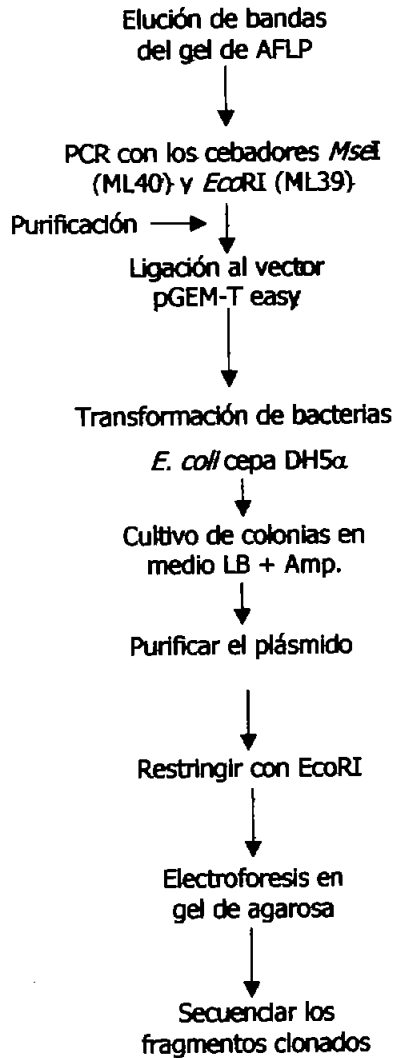


2) Comparación de las bandas de los cDNAs expresados en respuesta a Cd²⁺



3) Clonación de los fragmentos con supuesta expresión diferencial (ver esquema 1)

Esquema 1. Diagrama de trabajo para clonar los fragmentos expresados diferencialmente.



cDNA-AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism) (Liscum, 1998)

Digestión-Ligación de adaptadores

Para 40 μL de reacción se mezclaron:

- 6 μL cDNA de cadena doble (de la reacción anterior)
- 8 μL amortiguador de digestión-ligado (ver apéndice 1)
- 1 μL *Mse*I (1 U/ μL) (Invitrogen)
- 1 μL *Eco*RI (1 U/ μL) (Invitrogen)
- 24 μL H₂O

Se incubó durante 3 h a 37°C .

A la reacción anterior se añadió:

- 1 μL adaptadores *Mse*I (ML 33 y 34) (ver apéndice)
- 1 μL adaptadores *Eco*RI (ML 35 y 36)
- 4 μL amortiguador de digestión-ligado
- 2 μL ATP 10 mM
- 1 μL T4 DNA Ligasa (1U) (Invitrogen)
- 1 μL H₂O

Se dejó incubando durante 12 h a 16°C. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

Preamplificación

Para 20 μL de reacción se tomaron:

- 0.5 μL oligonucleótido *Mse*I core + adapter (ML 37)
- 0.5 μL oligonucleótido *Eco*RI core + adapter (ML 38)
- 0.8 μL dNTPs 10 mM
- 0.6 mL MgCl₂
- 2.0 μL amortiguador de reacción 10 X (Invitrogen)
- 10 μL cDNA con adaptadores
- 1.0 μL *Taq* polimerasa (1 U/ μL) (dilución 1:5 de *Taq* a 5 U/ μL , Invitrogen)
- 4.6 μL H₂O

Se hizo la siguiente reacción de PCR

Desnaturalización	2 min	94°C	1 ciclo	
Desnaturalización	30 s	95°C	} 1 min	56°C
Unión de oligonucleotidos al molde				
Alargamiento	1 min	72°C		40 ciclos
Alargamiento	5min	72°C	1 ciclo	

De los 20 μL de reacción, 10 μL se corrieron en un gel de agarosa al 1.2% para ver los productos y el resto se diluyó 1:10 para usarse en la amplificación AFLP.

1) Marcaje de oligonucleotidos

Se marcó el oligonucleotido *EcoRI* para lo cual se mezclaron

- 10 μL oligonucleotido *EcoRI* (una de las opciones ML42 a ML61, ver apéndice) *
- 5 μL Amortiguador de reacción 5 X (Gibco)
- 5 μL $\gamma\text{ATP-}^{33}\text{P}$ (10 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$)
- 1 μL T4 polinucleótido cinasa 1U/ μL (Gibco)
- 4 μL H_2O

La mezcla se incubó a 37°C durante 1h y se guardó a -20°C hasta su uso.

*Los oligonucleótidos tienen una o dos bases variables en el extremo 3', en este trabajo se utilizaron indistintamente estas opciones.

Amplificación AFLP

Se mezclaron:

- 0.15 μL Oligonucleotido *EcoRI*- ^{33}P
- 0.3 μL Oligonucleotido *MseI* (una de las 20 opciones, ver apéndice)
- 0.4 μL dNTPs 10 mM
- 0.4 μL MgCl_2 50 mM
- 1.0 μL Amortiguador de reacción 10 X (Invitrogen)
- 1.0 μL DNA (de la reacción de preamplificación)
- 0.3 μL *Taq* polimerasa (1 U/ μL) (Invitrogen)
- 6.55 μL H_2O

Mezclar bien los componentes (esto es importante para que la reacción se lleve a cabo correctamente).

El PCR se hizo en las siguientes condiciones:

Desnaturalización	2 min	95°C	
Desnaturalización	30 s	95°C	} 12 ciclos
Unión de oligonucleotidos	30 s	65°C a 57°C	
(bajando 0.7°C en cada ciclo)			
Extensión	1 min	72°C	
Desnaturalización	30 s	95°C	} 30 ciclos
Unión de oligonucleotidos	30 s	56°C	
Extensión	1 min	72°C	
Extensión	2 min	72°C	

Electroforesis para productos del PCR-AFLP

1. Se hizo un gel de poliacrilamida al 5% utilizando vidrios de 35 x 45 cm y separadores de 0.3 mm.

Para el gel se mezclaron:

60 mL Urea / Acrilamida/ Bisacrilamida previamente preparada (ver apéndice 1)

35 µL Temed

150 µL Persulfato de amonio al 20%

2. A los productos de PCR (10µL) se les añadió 8 µL de amortiguador de carga desnaturalizante 2 X (ver apéndice 1), se calentaron a 95°C, 10 min. Se cargaron en el gel y se corrieron aproximadamente 2.5 h a 60 W en una cámara modelo S2 de Life Technologies™, En amortiguador TBE 1X.
3. El gel se colocó en papel filtro Whatman, se cubrió con plástico adherente y se secó a 80°C con vacío en un secador de geles modelo 583 de Bio Rad. Se marcó con un

crayón fluorescente en las esquinas del papel filtro y se expuso en una película Kodak MS de 2 a 5 días.

Purificación de cDNAs del gel de poliacrilamida

1. Se quitó la cubierta de plástico del gel seco y éste se alineó con la película revelada.
2. Se cortaron las bandas de gel seco/papel filtro que contenían los fragmentos expresados diferencialmente y se pasaron a un tubo de microcentrífuga al que se añadió 100 μ L de agua estéril.
3. Se incubaron 10 min a temperatura ambiente y después se hirvieron a baño María durante 15 min. Se centrifugaron 30 s a 12,000 x g. Los sobrenadantes se pasaron a tubos eppendorf limpios y estériles y para precipitar se añadió:
 - $\frac{1}{4}$ volumen de acetato de amonio 10 M
 - 2 volúmenes de etanol absoluto helado
 - 2 μ L de glucógeno 2 mg/mL
4. Se incubó 12 h a -70°C y se centrifugó a 12,000 rpm, 15 min.
5. Se tiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 15 μ L de agua estéril

Amplificación de cDNAs recuperados del gel de poliacrilamida

- 1.0 μ L oligonucleótido universal *Eco*R1 (ML 39) (ver apéndice 2)
- 1.0 μ L oligonucleótido universal *Mse*I (ML 40) (ver apéndice 2)
- 1.6 μ L dNTPs 5 mM
- 1.2 μ L MgCl_2 50 mM
- 4.0 μ L amortiguador de reacción 10 X (Invitrogen)
- 0.3 μ L *Taq* polimerasa (1 U/ μ L) (Invitrogen)
- 4.0 μ L DNA recuperado
- 7.1 μ L H_2O

Se amplificó con las siguientes condiciones:

Desnaturalización	2 min	95°C	} 35 ciclos
Desnaturalización	30 s	95°C	
Unión de oligonucleotidos	1 min	60°C	
Extensión	1 min	72°C	
Extensión	1 min	72°C	

Clonación de los cDNAs recuperados

Los productos de los PCR anteriores se corrieron en un gel de agarosa al 1.2% (ver apéndice 1), se cortaron las bandas amplificadas y se purificaron con el kit "Concert Rapid Gel Extraction System" de Life Technologies™ y se clonaron en el vector pGEM-T easy de Promega (ver apéndice 3) mezclando:

*150 ng	DNA purificado
1µL	(50 ng) de pGEM T-easy
1µL	ligasa
1µL	amortiguador de ligación 2X
H ₂ O	para un volumen final de 10 µL

Se incubó a 4°C, 12 h.

* El DNA se cuantificó por densitometría utilizando el programa "Kodak Digital Science. 1D Image Analysis Software", y el marcador de peso molecular Φ X174/HaeIII de Promega como curva patrón.

Se tomaron alícuotas de 5 a 10 µL de la reacción de ligación y se emplearon para transformar células competentes de *Escherichia coli* JM109 y DH5 α .

Transformación genética

a) Generación de células competentes (Sambrook, 1989)

1. Una colonia aislada de células de *E. coli* DH5 α se sembró en 50 mL de medio LB (ver apéndice 1) y se dejó incubando con agitación durante 12 h a 37°C.
2. De este cultivo se tomó 1 mL y se resembró en 49 mL de medio LB. Se dejó incubando a 37°C con agitación hasta que alcanzó una D.O. de 0.6 (Abs 600 nm).
3. Se centrifugaron las células a 3,000 rpm en tubos estériles y se resuspendieron en 25 mL de CaCl₂ 0.05 M estéril helado. Se dejaron incubando 5 min en hielo.
4. Las células se centrifugaron a 3,000 rpm y se resuspendieron nuevamente en 1 mL de CaCl₂ 0.05 M.
5. Se hicieron alícuotas de 100 μ L y se congelaron inmediatamente con N₂ líquido. Se guardaron a -70°C hasta su uso.

b) Transformación (Sambrook, 1989)

1. A 100 μ L de células competentes de *E. coli* se añadieron de 5 a 10 μ L de la reacción de ligación y se incubó en hielo 30 min.
2. Los tubos se sacaron del hielo y se incubaron a 42°C durante 45 segundos e inmediatamente se pasaron a hielo por 1 min.
3. Se añadieron 4 volúmenes (400 μ L) de medio SOC (ver apéndice 1) a las células y se incubaron a 37°C durante 2 h.
4. Se centrifugaron a 12,000 rpm, 30 s, se tiró el sobrenadante y se añadieron 100 μ L de medio LB. Las células se resuspendieron y se sembraron en cajas con agar LB que contenían ampicilina (100 μ g/mL) para seleccionar colonias con el plásmido pGEM-T easy. También se añadió IPTG a una concentración final de 0.1 mM para inducir la transcripción del promotor del operón de lactosa y Xgal a una concentración final 80 μ g/mL que daría coloración azul al reaccionar con las colonias que expresaran a la β -galactosidasa y que muy probablemente no contendrían inserto clonado en pGEM.
5. Se incubaron a 37°C, 12 h.

Purificación de DNA plasmídico (Sambrook, 1989)

Para verificar de forma rápida la presencia del inserto en las colonias seleccionadas se utilizó el siguiente protocolo:

Se seleccionaron las colonias blancas que crecieron en la caja con ampicilina, IPTG y X-Gal, (cuando las colonias blancas eran muy pocas, también se seleccionaron algunas colonias azules) y se sembraron en 1 mL de medio líquido LB.

1. Incubar 12 h a 37°C con agitación.
2. Tomar 100 μ L del cultivo anterior y se centrifugar a 12,000 rpm 30 s.
3. Resuspender la pastilla de células en 50 μ L de agua con RNasa (20 μ g/mL).
4. Añadir 300 μ L de amortiguador TENS (ver apéndice 1) y mezclar por inversión hasta que la solución se tornó viscosa.
5. Agregar 100 μ L de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y mezclar por inversión.
6. Centrifugar 2 min a 12,000 rpm.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y añadir 0.9 mL de etanol absoluto a -20°C.
8. Centrifugar a 12,000 rpm, 2 min.
9. Eliminar el sobrenadante y enjuagar la pastilla de DNA dos veces con 0.9 mL de etanol 70%.
10. Centrifugar una tercera vez para concentrar y eliminar bien los residuos de etanol.
11. El DNA se resuspendió en 40 μ L de agua.

Resultados

Análisis de la expresión diferencial por AFLP

Se realizaron 105 reacciones de amplificación que correspondieron a combinaciones de 7 cebadores de *EcoRI*³²P con 15 cebadores de *MseI*. Se observaron 47 bandas que corresponden a genes que inician o incrementan su expresión en las células tratadas con Cd²⁺ (Tabla 1).

Tabla 1. Combinaciones de cebadores empleados en las reacciones de AFLP. Los diferentes cebadores contienen diferencias en las dos últimas bases (Ver apéndice 2)

<i>EcoRI</i> ³² P ML	<i>MseI</i> ML	Número de diferencias en el AFLP
44	66-81	10
46	66-81	6
47	66-81	15
48	66-81	9
49	66-81	4
54	66-81	3
55	66-81	0

Una autorradiografía ilustrativa de un gel de poliacrilamida-urea (AFLP) se muestra en la Figura 3. Algunas bandas con expresión diferencial de genes son indicadas con las flechas. Las flechas 1 y 2 señalan bandas que aparecen en el tratamiento con Cd²⁺ mientras que las flechas 3-7 muestran bandas que representan genes que incrementan su expresión en presencia de Cd²⁺.

Debido a que la concentración de las muestras en los geles influye en la intensidad de las bandas, se tuvo cuidado de cargar aproximadamente la misma cantidad, es decir, si no se carga la misma cantidad de DNA en los carriles que contienen muestras de células tratadas y sin tratar con Cd²⁺ uno de los carriles será más intenso que el otro (Fig. 6a) lo que dificultará la comparación y se corre el riesgo de obtener falsos positivos y/o de no identificar las bandas que presentan expresión diferencial.

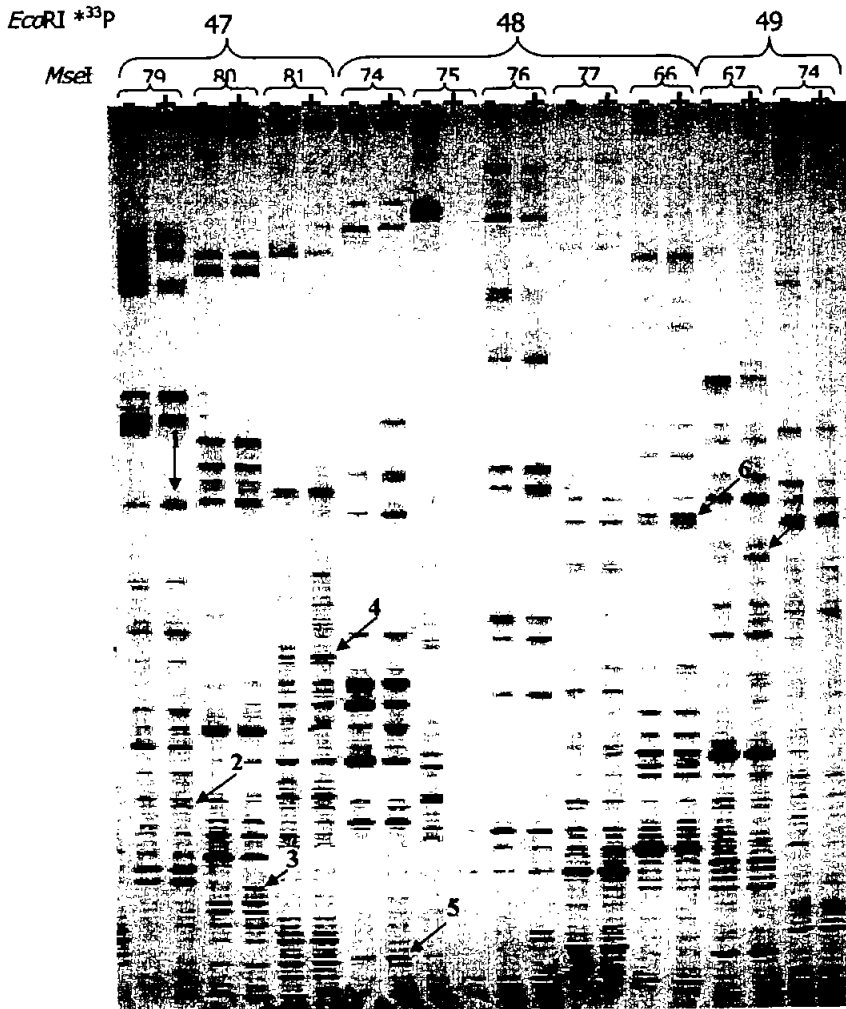


Figura 3. Autorradiografía de un gel de AFLP. Los números en la parte superior indican la combinación de cebador utilizado, el cebador *EcoRI* fue marcado radiactivamente. Los signos - y + indican el cultivo de *E. gracilis* en ausencia y presencia de Cd^{2+} , respectivamente. Las flechas 1 y 2 indican marcas que aparecen en presencia de Cd^{2+} y las flechas 3-7 indican bandas que aumentan en presencia de Cd^{2+} .

Determinación de las condiciones de amplificación de las bandas diferenciales del gel de AFLP

Después de analizar minuciosamente las autorradiografías e identificar las bandas que presentaron expresión diferencial en respuesta a Cd^{2+} (aumento o aparición), las películas se alinearon cuidadosamente con los geles correspondientes y las secciones correspondientes a las bandas diferenciales se cortaron del gel de poliacrilamida. Las bandas fueron eluidas del gel y amplificadas por PCR empleando los cebadores *EcoRI* (ML39) y *MseI* (ML40) (ver apéndice 2).

Al amplificar inicialmente por PCR los fragmentos eluidos del AFLP y correrlos en gel de agarosa no se obtuvieron resultados positivos (productos amplificados), por lo que se modificó el programa de amplificación en el termociclador de la siguiente manera:

Inicialmente se amplificó con las siguientes condiciones:

Desnaturalización	2 min	95°C	} 12 ciclos
Desnaturalización	30 s	95°C	
Unión de oligonucleotidos	30 s	65°C a 57°C	
(bajando 0.7°C en cada ciclo)			
Extensión	1 min	72°C	} 35 ciclos
Desnaturalización	30 s	95°C	
Unión de oligonucleotidos	30 s	56°C	
Extensión	1 min	72°C	
Extensión	2 min	72°C	

Por lo que se cambiaron a las siguientes condiciones (bajo estas condiciones se obtienen resultados positivos (Figura 4))

Desnaturalización	2 min	95°C
Desnaturalización	30 s	95°C

Por lo que se cambiaron a las siguientes condiciones (bajo estas condiciones se obtienen resultados positivos (Figura 4))

Desnaturalización	2 min 95°C	
Desnaturalización	30 s 95°C	
Unión de oligonucleotidos al molde		
1 min 60°C		
Extensión	1 min 72°C	} 35 ciclos
Extensión	15min 72°C	

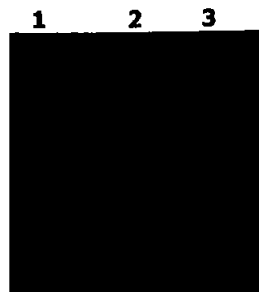


Figura 4. Gel de agarosa donde se muestran los productos de amplificación con las condiciones descritas anteriormente. En los tres carriles son diferentes bandas que no presentan expresión

También se determinó la cantidad de DNA molde que se debía adicionar a la reacción de amplificación por PCR. Como se describe en materiales y métodos la banda cortada y eluída se resuspendió en 15 μ L de agua, por lo que se realizó una reacción de PCR con diferentes cantidades de DNA molde (Figura 5)

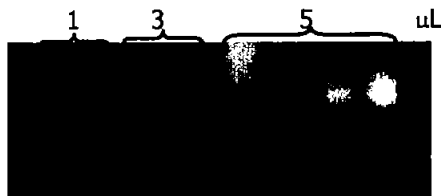


Figura 5. Gel de agarosa con los productos de la amplificación por PCR a partir de 1, 3 y 5 μ L de DNA molde, se observa que se obtiene mejor rendimiento a partir de 5 μ L del DNA eluído del AFLP. Se bandas que no presentaban expresión diferencial.

Para establecer las condiciones de amplificación por PCR y ligación al vector se tomaron dos bandas que no presentaban expresión diferencial (Fig. 6a). Estas bandas se eluyeron del gel de poliacrilamida y fueron amplificadas por PCR. Las reacciones de PCR fueron corridas en un gel de agarosa al 1.5% (Fig. 6b) para tener una idea

aproximada del tamaño y de la separación que tendrían estas bandas en este tipo de gel, así como para estandarizar el método para realizar esto con las bandas de interés.

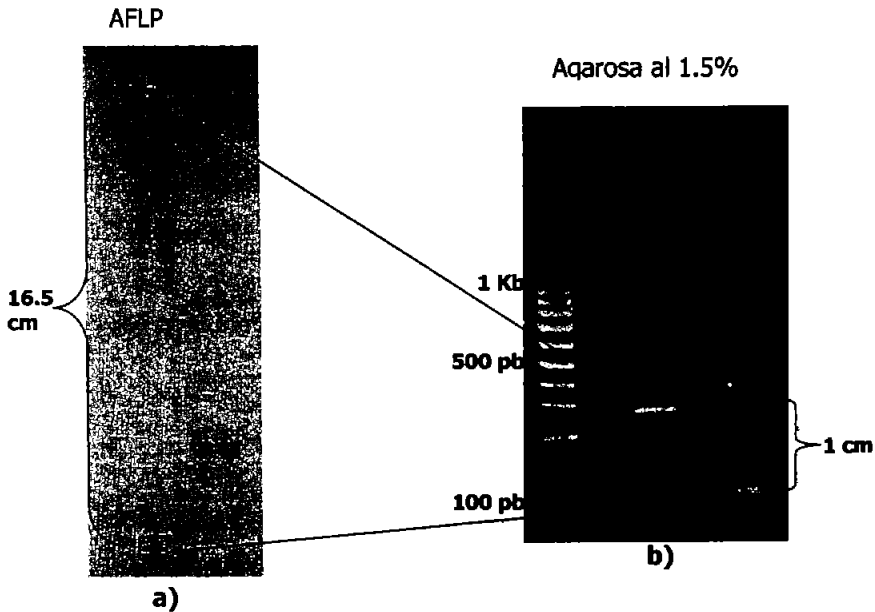


Figura 6. Purificación y reamplificación de las bandas con expresión diferencial. a) Las bandas del gel de AFLP tienen una separación de 16.5 cm. Cuando estas bandas se amplifican por PCR y se corren en un gel de agarosa b), se observa que la banda de mayor tamaño es de 300 pb (Control 300) y la de menor tamaño es de 100 pb (Control 100), tienen una separación aproximada de 1 cm.

Clonación del DNA amplificado de las bandas control

Reacción de Ilgación

La enzima *Taq* DNA Polimerasa adiciona residuos de adenina al extremo 3' sin que exista cadena molde en los productos de PCR (Knoche *et al.*, 1999). Esta propiedad es utilizada para ligar el DNA amplificado al vector pGEM-T Easy (Promega), el cual está linearizado y contiene residuos de timina en ambos extremos, en el sitio múltiple de clonación (ver Apéndice 3); esto facilita la ligación de los productos de PCR por complementariedad de bases A-T.

Con la reacción de ligación se transformaron bacterias *Escherichia coli* cepas DH5 α y JM109. Las bacterias transformadas se sembraron en medio LB con 100 μ g/mL de ampicilina, IPTG (0.1 mM) y X-Gal (80 μ g/mL).

En la mayoría de los casos se obtuvieron colonias blancas y solo unas cuantas azules.

El vector que contenía los Insertos del control 300 y control 100 se utilizó para transformar a la cepa JM109, las colonias fueron sembradas en medio LB líquido con ampicilina y posteriormente se hicieron minipreparaciones para extraer el plásmido. Sin embargo, cuando los plásmidos se digirieron con la enzima *EcoRI* no fue posible obtener insertos (Fig. 7). Los insertos deberían ser de un tamaño aproximado de 300 y 100 pares de bases.

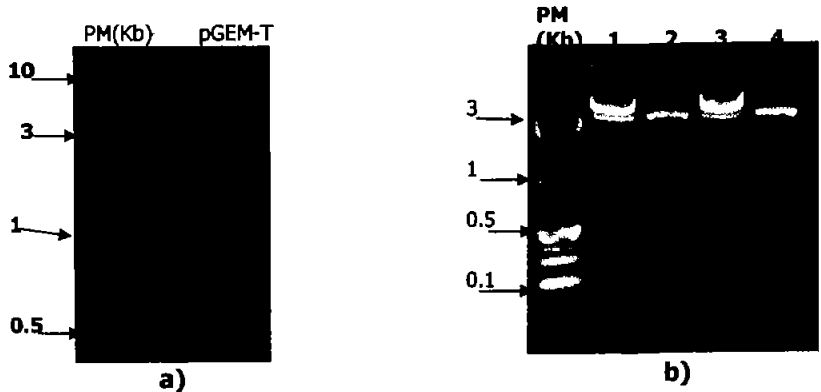


Figura 7. a) Gel de agarosa con el vector pGEM-T easy, extraído de las células cultivadas en medio líquido. **b)** Gel de agarosa, en los carriles 1 y 3 están los plásmidos con el control 300 y el control 100 respectivamente, sin digerir. En los carriles 2 y 4 están los plásmidos con el control 300 y el control 100 respectivamente, digeridos con *EcoRI*.

Se identificaron y eluyeron 32 bandas que presentaron expresión diferencial en los geles de AFLP. El DNA eluido de las bandas fue empleado como molde para las reacciones de amplificación por PCR. Los resultados de las amplificaciones fueron analizados en geles de azarosa. En las figuras 8 y 9 se muestran 20 bandas amplificadas por PCR

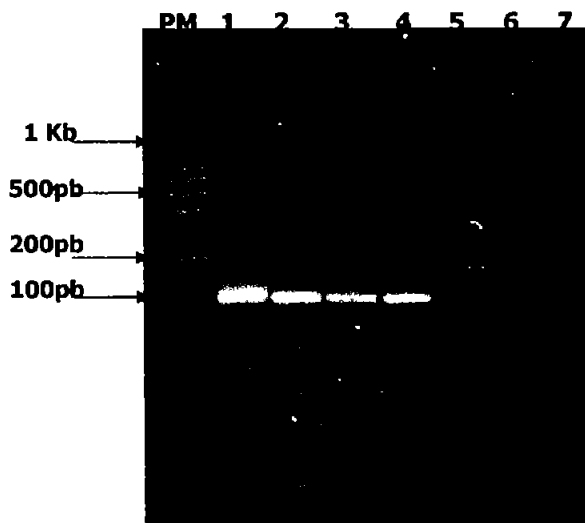


Figura 8. Amplificación de bandas extraídas del gel de poliacrilamida (amplificación de Insertos 1-7). Las bandas recortadas del gel de poliacrilamida fueron eluidas y se amplificaron por PCR. Los productos de PCR resultantes se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% en donde los carriles 1 a 7 indican amplificación de insertos extraídos del gel de AFLP. Posteriormente, estos fragmentos de DNA fueron extraídos del gel de agarosa utilizando el kit "Rapid Gel Extraction System" de Marligen. Todas las bandas fueron purificadas del gel para clonarlas en el vector pGEM-T easy de Promega.

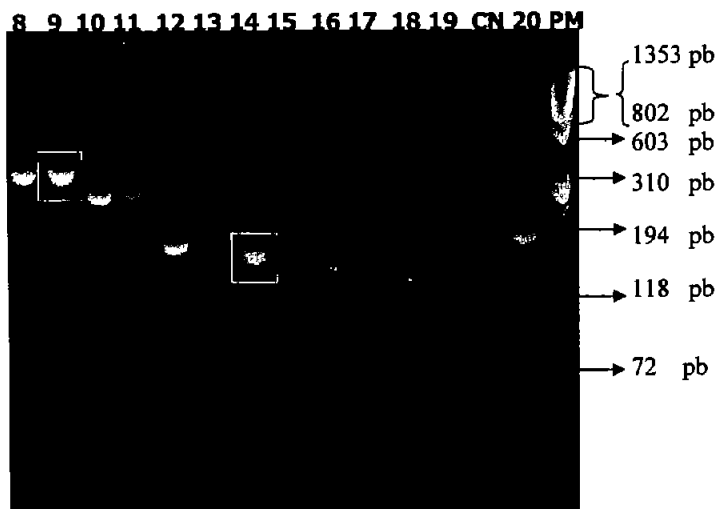
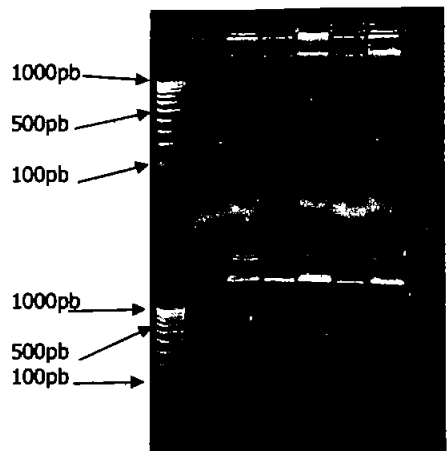


Figura 9. Amplificación de bandas extraídas del gel de poliacrilamida (amplificación de Insertos 8-20). Las bandas recortadas del gel de poliacrilamida fueron eluidas y se amplificaron por PCR. Los productos de PCR resultantes se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% en donde los carriles 8 al 20 indican amplificación de insertos extraídos del gel de AFLP. El carril CN es un control negativo (sin DNA molde). Aunque aparecen varias bandas en un solo carril solo se purificó la banda más intensa en cada caso, por ejemplo, en el carril nueve y catorce se purificó la banda que se señala dentro del cuadro.

Clonación del DNA amplificado

Con las ligaciones que contenían los insertos 1 a 7 se transformaron células competentes *E. coli* cepa JM109. Algunas colonias blancas fueron sembradas en medio LB líquido para extraer el plásmido con los Insertos. Sin embargo, cuando el plásmido se digirió con la enzima *EcoRI* no fue posible obtener el inserto (Fig. 10), lo cual indica que las ligaciones no fueron exitosas.

Figura 10. Gel de agarosa con el vector pGEM-T easy, extraído de las células cultivadas en medio líquido. En los carriles 1 y 3, está el plásmido de colonias diferentes con el Inserto 2, en el carril 5 está el plásmido con el inserto 3. En los carriles 7 y 9 está el plásmido de colonias diferentes con el inserto 4 y en el carril 11 está el plásmido con el Inserto 6, todos sin digerir. En los carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12 están los mismos plásmidos pero digeridos con *EcoRI*. Como se puede ver ningún plásmido contiene inserto.



Con las ligaciones que contenían los insertos 8 a 20 se transformaron células competentes de *E. coli* cepa JM109. Algunas colonias blancas fueron sembradas en medio LB líquido para extraer el plásmido con los insertos. Sin embargo, no hubo crecimiento de bacterias transformadas en medio LB con ampicilina, por lo que no fue posible realizar la extracción de plásmido

DISCUSIÓN

AFLP

La técnica de AFLP permite comparar diferentes DNAs genómicos o como en este caso la expresión diferencial en análisis de cDNA. Es una técnica reproducible y confiable (Liscum, 1998). Por medio de esta técnica fue posible obtener 47 bandas de expresión diferencial en las células cultivadas con Cd^{2+} , empleando 7 cebadores *EcoRI* y 17 cebadores *MseI*, con un total de 105 combinaciones. Con base en estos resultados podemos sugerir que si en el análisis se aumentara el número de combinaciones de ambos cebadores sería posible aumentar el número de bandas que presentan expresión diferencial.

Amplificación de las bandas eluidas del AFLP

En muchos de los casos, la amplificación se realizó de manera satisfactoria (Figura 8), es decir se obtuvo una banda como producto de la amplificación. Sin embargo, en algunos casos apareció más de una banda en los productos de PCR, por lo que se modificaron las condiciones de amplificación (Fig. 4 y 5) con la finalidad de hacer mas específico el alineado de los cebadores a la cadena molde y obtener, de ser posible, una sola banda como producto de amplificación.

Debido a que en los controles negativos aparecían bandas y un barrido de fondo, esto indicaba contaminación en uno de los reactivos, por lo que se cambió la enzima que se estaba empleando, el $MgCl_2$ y agua, así como el amortiguador de la enzima y el de carga. Como la contaminación no desapareció se determinó que, los dos "stock" de los cebadores *EcoRI* (ML39) y *MseI* (ML40) estaban contaminados.

Para solucionar esto se ordenó la síntesis de otro juego de cebadores (SIGMA). Con esto se logró eliminar el "barrido" de fondo y el patrón de bandas presentes en el control negativo (Fig. 9). Sin embargo, como se observa en la figura 9 en los productos de PCR siguen apareciendo más de una banda, razón por la cual se purificó la banda más intensa en el gel de agarosa, asumiendo que esta sería el producto de interés ya que se amplificaba mayoritariamente.

Clonación

Al realizar la reacción de ligación de los Insertos al vector pGEM-T Easy y posteriormente transformar colonias, el hecho de que aparecieran colonias resistentes a ampicilina y que algunas de ellas fueran colonias blancas al cultivarse en medio con X-gal e IPTG, era indicio de que el vector contenía Inserto de DNA, puesto que al no existir α -complementación, las colonias no eran capaces de producir la coloración azul característica de las colonias que si pueden metabolizar al X-gal.

Considerando estos resultados las colonias se sembraron en medio LB líquido con ampicilina para realizar la extracción del plásmido con los insertos. Una vez que se tenía el plásmido purificado éste se digirió con *EcoRI* ya que el vector pGEM-T Easy contiene dos sitios de restricción para esta enzima en ambos lados del sitio de ligación (Apéndice 3). Sin embargo, como se observa en las figuras 7 y 10 en ningún caso se encontró el inserto.

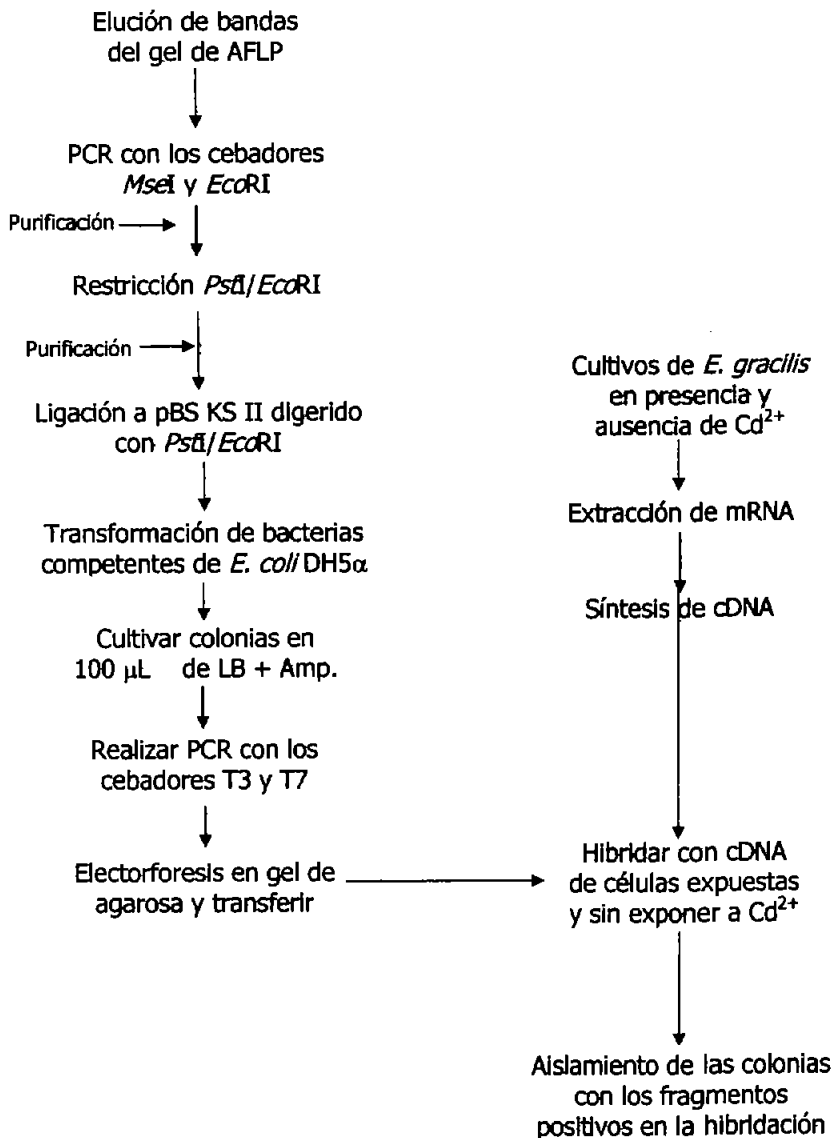
Por otro lado cuando se transformaron bacterias con el control de ligación (inserto control) proporcionado en el "kit" se obtuvo una gran cantidad de colonias (90% de eficiencia) blancas y dos colonias azules. Como control adicional se ligo una serie de insertos obtenidos en un estudio relacionado con una enzima que fosforila proteínas ribosomales, y al igual que en el control positivo se obtuvo un alto porcentaje de transformación, los insertos fueron observados en un gel de agarosa en las extracciones por minipreparación del plásmido cortado con *EcoRI*.

Considerando estos resultados se probaron diferentes condiciones de amplificación por PCR pero se puso atención en mantener los productos de PCR a 72°C por 15 min. (figura 4) con el objetivo de asegurar que la enzima *Taq* DNA polimerasa adicionara la base adenina a los productos amplificados y de esta manera poder ligar los insertos al vector pGEM-T Easy. A pesar de estos cuidados, no fue posible lograr la ligación de ninguno de los productos aislados de los geles de AFLP y amplificados por PCR.

Por lo anteriormente expuesto, y considerando que:

- a) Los cebadores MseI (ML40) y EcoRI (ML39) contiene sitios de restricción para las enzimas *Pst*I y *Eco*RI respectivamente y que el vector pBlueSscript KS II (ver apéndice 3) también tiene estos sitios lo que facilitaría la ligación.
- b) Que el Kit del vector pGEM-T Easy es muy costoso y solo contiene 20reacciones de ligación.
- c) En los productos de amplificación aparecen varias bandas lo que dificulta aislar la banda que corresponde al fragmento expresado diferencialmente

Se sugiere un cambio en la estrategia de clonación de los fragmentos amplificados extraídos de bandas con expresión diferencial de AFLPs. La estrategia que se propone es la siguiente:



Aunque esta estrategia es más laboriosa, se asegura la ligación en sitios de restricción pegajosos. Además al amplificar el inserto con los cebadores T3 y T7 se tiene la seguridad de que, si se clonó algún fragmento, la amplificación permitirá una mejor hibridación con el DNA extraído de *E. gracilis* cultivada en presencia y ausencia de Cd²⁺

expresado diferencialmente, con lo que se logrará confirmar la expresión diferencial. Con estos resultados solo se secuenciarán los fragmentos positivos con lo que se ahorrarán tiempo y dinero.

CONCLUSIONES

- La técnica de AFLP permitió obtener 47 bandas de expresión diferencial que incrementaron su expresión en respuesta a Cd^{2+} empleando 7 cebadores *EcoR1* y 17 cebadores *MseI*.
- Se establecieron las condiciones para eluir las bandas con expresión diferencial y amplificarlas por la reacción de PCR.
- Bajo las condiciones utilizadas no fue posible clonar los fragmentos amplificados en el vector pGEM-T Easy.
- Se propone un método alternativo para lograr la clonación, así como la identificación de estos genes.

expresado diferencialmente, con lo que se logrará confirmar la expresión diferencial. Con estos resultados solo se secuenciarán los fragmentos positivos con lo que se ahorrarán tiempo y dinero.

CONCLUSIONES

- La técnica de AFLP permitió obtener 47 bandas de expresión diferencial que incrementaron su expresión en respuesta a Cd^{2+} empleando 7 cebadores *EcoR1* y 17 cebadores *MseI*.
- Se establecieron las condiciones para eluir las bandas con expresión diferencial y amplificarlas por la reacción de PCR.
- Bajo las condiciones utilizadas no fue posible clonar los fragmentos amplificados en el vector pGEM-T Easy.
- Se propone un método alternativo para lograr la clonación, así como la identificación de estos genes.

APÉNDICE 1

Medio de cultivo glutamato/malato (Schiff *et al.*, 1971)

Minerales traza

M	MgSO ₄	5 g en 20 mL
N	(NH ₄) ₂ HPO ₄	2 g en 10 mL
K	KH ₂ PO ₄	2 g en 10 mL

A

ZnSO ₄ 7H ₂ O	2.2 g
MnSO ₄ 4H ₂ O	2.0 g
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.5 g
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.040 g

Disolver en HCl y aforar a 50 mL

B (1X)

CuSO ₄ 5H ₂ O	0.078 g
H ₃ BO ₃	0.057 g
NaI	0.023 g

Aforar a 100 mL

Vitaminas (100mL)

Tiamina (B1)	0.1 g
Vitamina B12	2 x 10 ⁻⁶ g (a partir de un stock 0.02%)
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.05 g

Disolver en 10 mL de agua y esterilizar por filtración, aforar a 100 mL con agua estéril.

Para 4 L de medio glutamato/malato:

glutamato	22.2 g
malato	8.8 g
CaCO ₃	0.88 g

Disolver y añadir los siguientes minerales traza:

A	8.88 mL
B(5x)	1.0 mL
M	8.88 mL
N	8.88 mL
K	17.7 mL

Ajustar pH a 3.5 y aforar a 4 L. Esterilizar 45 min a 15 lb y 121°C

Medio KME pH 7.2

KCl	120 mM
MOPS	20 mM
EGTA	2 mM

Solución D para extracción de RNA

Tiocianato de Guanidina	4 M
Citrato de sodio pH 7.0	25 mM
Sarcosyl	0.5 %
β -mercaptoetanol	0.1 M

Para preparar esta solución, pesar 250 g de Tiocianato de guanidina y disolver en 293 mL de agua con DEPC, añadir 17.6 mL de una solución stock de citrato de sodio 0.75 M y 26.4 mL de una solución stock de Sarcosyl 10%. Esta solución puede ser almacenada por tres meses a temperatura ambiente. Esterilizar en autoclave a 121°C y 15 lb durante 20 min. Antes de utilizar, añadir 0.36 mL de β -mercaptoetanol por cada 50 mL de sol. D. Una vez que se ha añadido el β -mercaptoetanol, la solución se puede guardar un mes.

Amortiguador para síntesis de segunda cadena de cDNA 5X

Tris-HCl pH 7.4	175 mM
MgCl ₂	20 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 mM
DTT	15 mM

Amortiguador para digestión-lligación de adaptadores (AFLP)

Tris acetato pH 7.5	50 mM
Acetato de Mg	50 mM
Acetato de K	250 mM

Acrilamida (5%) para geles de AFLP

	100 mL	200 mL
Acrilamida	4.75 g	9.55 g
Bis acrilamida	0.25 g	0.5 g
Urea 7.5 M	45 g	90 g
TBE 10 X	10 mL	20 mL

Amortiguador de carga desnaturizante 2X

Formamida	98 %
EDTA	100 mM
Xilen cianol	0.025 %
Azul de bromofenol	0.05 %

TBE 10X

Tris base	108 g
Acido bórico	55 g
Stock de EDTA 0.5 M pH 8	40 mL

Gel de agarosa 1.2%

Disolver 0.3 g de agarosa en 25 mL de TBE, añadir 1 μ L de una solución de bromuro de etidio y vaciar.

Medio LB

Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Disolver en 500 mL de agua y aforar a 1 L. Esterilizar a 121°C /15 lb durante 15 min. Si se requiere preparar medio sólido, al medio líquido se le añaden 15 g de agar antes de esterilizar. NO intentar disolver en frío. Agitar al sacar de la autoclave.

Medio SOC

Medio LB más glucosa esterilizada por filtración a una concentración final de 20 mM

Amortiguador TENS (Tris-EDTA-NaOH-SDS)

Tris base	108 g
Stock de EDTA 0.5 M pH 8	40 mL
NaOH	0.1 N
SDS	0.5 %

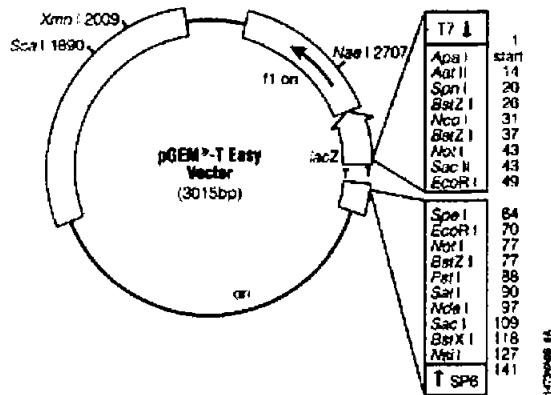
APÉNDICE 2

Oligonucleótidos disponibles para AFLP

Clave	Nombre	Secuencia
ML33	MseI adapter.1	GACGATGAGTCCTGAG
ML34	MseI adapter.2	TACTCAGGACTCAT
ML35	EcoRI adapter.1	CTCGTAGACTGCGTACC
ML36	EcoRI adapter.2	AATTGGTACGCGATC
ML37	MseI Core + adapter	GACGATGAGTCCTGAGTAA
ML38	EcoRI Core + adapter	CTCGTAGACTGCGTACCAATTC
ML39	U-EcoRI (EcoRI)	GGGAAATCCGTAGACTGCGTACCAATTC
ML40	U-Mse.1 (PstI)	GCGCTGCAGGACGATGAGTCTGAGTAA
ML41	U-Mse.2 (SacII)	GCGCCGCGGGACGATGAGTCTGAGTAA
ML42	Eco+1.1	AGACTGCGTACCAATTC A
ML43	Eco+1.2	AGACTGCGTACCAATTC T
ML44	Eco+1.3	AGACTGCGTACCAATTC G
ML45	Eco+1.4	AGACTGCGTACCAATTC C
ML46	Eco+2.1	AGACTGCGTACCAATTC A A
ML47	Eco+2.2	AGACTGCGTACCAATTC A T
ML48	Eco+2.3	AGACTGCGTACCAATTC A G
ML49	Eco+2.4	AGACTGCGTACCAATTC A C
ML50	Eco+2.5	AGACTGCGTACCAATTC T A
ML51	Eco+2.6	AGACTGCGTACCAATTC T T
ML52	Eco+2.7	AGACTGCGTACCAATTC T G
ML53	Eco+2.8	AGACTGCGTACCAATTC T C
ML54	Eco+2.9	AGACTGCGTACCAATTC G A
ML55	Eco+2.10	AGACTGCGTACCAATTC G T
ML56	Eco+2.11	AGACTGCGTACCAATTC G G
ML57	Eco+2.12	AGACTGCGTACCAATTC G C
ML58	Eco+2.13	AGACTGCGTACCAATTC C A
ML59	Eco+2.14	AGACTGCGTACCAATTC C T
ML60	Eco+2.15	AGACTGCGTACCAATTC C G
ML61	Eco+2.16	AGACTGCGTACCAATTC C C
ML62	Mse+1.1	GATGAGTCCTGAGTAAA
ML63	Mse+1.2	GATGAGTCCTGAGTAAT
ML64	Mse+1.3	GATGAGTCCTGAGTAAG
ML65	Mse+1.4	GATGAGTCCTGAGTAAC
ML66	Mse+2.1	GATGAGTCCTGAGTAAAA
ML67	Mse+2.2	GATGAGTCCTGAGTAAAT
ML68	Mse+2.3	GATGAGTCCTGAGTAAAG
ML69	Mse+2.4	GATGAGTCCTGAGTAAAC
ML70	Mse+2.5	GATGAGTCCTGAGTAATA
ML71	Mse+2.6	GATGAGTCCTGAGTAATT
ML72	Mse+2.7	GATGAGTCCTGAGTAATG
ML73	Mse+2.8	GATGAGTCCTGAGTAATC
ML74	Mse+2.9	GATGAGTCCTGAGTAAGA
ML75	Mse+2.10	GATGAGTCCTGAGTAAGT
ML76	Mse+2.11	GATGAGTCCTGAGTAAGG
ML77	Mse+2.12	GATGAGTCCTGAGTAAGC
ML78	Mse+2.13	GATGAGTCCTGAGTAACA
ML79	Mse+2.14	GATGAGTCCTGAGTAACT
ML80	Mse+2.15	GATGAGTCCTGAGTAACG
ML81	Mse+2.16	GATGAGTCCTGAGTAACC

APÉNDICE 3

Vector pGEM (Promega)



pGem-T Easy (Promega). Este vector es un plásmido lineal que contiene timinas en sus extremos en las bases 49 y 64. Este vector facilita la clonación de productos de PCR

BIBLIOGRAFÍA

1. Aviles C, Loza-Tavera H, Terry N and Moreno-Sánchez R. (2003) Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium- accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. Arch. Microbiol. 180:1-10.
2. ATSDR: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxoprofiles/to5.pdf>: Toxicological profile for cadmium.
3. Buchet JP, Lauwerys R, Roels H, Bernard A, Bruaux P, Claeys F, Ducoffre G, de Plaen P, Staessen J, Amery A, et al. (1990) Renal effects of cadmium body burden of the general population. Lancet. Sep 22;336(8717):699-702.
4. Cervantes C., Moreno R. (1999) Contaminación ambiental por metales pesados. Impacto en los seres vivos. AGT EDITOR, S. A.
5. Chomczynski P., Sacchi N., (1987) Single Step Method of RNA Isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Annal. Biochem. 162. 156-159.
6. Clemens S. (2001) Molecular mechanism of plant metal tolerance and homeostasis. Planta 212:475-486.
7. Cobbett C. (2000) Phytochelatin biosynthesis and function in heavy- metal detoxification. Current Opinion in Plant Biology. 3:211-216.
8. De Filippis LF, Pallaghy CK (1994) Heavy metals: sources and biological effects. In: Rail LC, Gaur JP, Soeder CJ (eds) Advances in Limnology Series: Algae and Water Pollution. Escheiweizerbartsche Press. Stuttgart, pp 31-77.
9. Desi I, Nagymajtenyi L, Schulz H. (1998) Behavioural and neurotoxicological changes caused by cadmium treatment of rats during development. J Appl Toxicol. Jan-Feb;18(1):63-70.
10. Devars S, Hernández R, Moreno-Sánchez R (1998) Enhanced heavy metals tolerance in two strains of photosynthetic *Euglena gracilis* by preexposure to mercury or cadmium. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 34:128-135.
11. Elinder CG, Nordberg M, Palm B, Bjork L, Jonsson L. (1987) Cadmium, zinc, and copper in rabbit kidney metallothionein--relation to kidney toxicity. Environ Res. 1987 Apr;42(2):553-62.
12. Gardea- Torresdey J, Peralta- Videa J, Montes M, de la Rosa G, Corral- Diaz B. (2004) Bioaccumulation of cadmium and copper by *Convolvulus arvensis* L.: impact on plant growth and uptake of nutritional elements. Bioresource Technology. 92:229-235.
13. Knoche K and Kephart D. (1999) Cloning Blunt-End *Pfu* DNA Polymerase-Generated PCR Fragments into pGEM@-T. Promega Notes Number 71, 1999, p. 10
14. Harada E, Yamaguchi Y, Koizumi N, Hiroshi S. (2002) Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in *Arabidopsis*. J. Plant Physiol. 159:445-448.
15. Hernández A. (2003) Expresión genética de *Euglena gracilis* en respuesta a Cd: análisis diferencial por la técnica de AFLP. Fac. de Química, UNAM. México D. F.
16. Liao Hsli-Chuan V, Freedman J. (1998) Cadmium- regulated genes from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Identification and cloning of new cadmium- responsive genes by differential display. J BIOL CHEM. 273:31962-31970.
17. Liscum E. (1998) AFLP: studies on plant development. Academic Press. 1-22.
18. Mendoza-Cózatl D, Devars S, Loza-Tavera H, Moreno-Sánchez R. (2001) Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. Physiologia Plantarum 115:276-283.
19. Mendoza-Cozatl D, Loza-Tavera H, Hernández-Navarro A, and Moreno-Sánchez R. (2004) Sulfur assimilation and glutathione metabolism under stress in yeast, protist and plants. FEMS Microbiology reviews, October
20. Navarro L, Torrez-Márquez E, González-Moreno G, Devars S, Hernández R, Moreno-Sánchez R (1997) Comparison of physiological changes in *Euglena gracilis* during exposure to heavy metals of heterotrophic and autotrophic cells. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 116C, No. 3, pp. 265-272.
21. Nogawa K, Kido T. (1993) Biological monitoring of cadmium exposure in Itai-Itai disease epidemiology. Int Arch Occup Environ Health. 65(1 Suppl):S43-6.

22. Ortiz D, Ruscitti T, McCue K, Ow D, (1995) Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission Yeast ABC-type Vacuolar Membrane Protein. J BIOL CHEM. 270:4721-4728.
23. Rauser WE. (1995) Phytochelatins and related peptides. Structure, Biosynthesis, and Function. Plant Physiol. 109:1141-1149.
24. Reijans M, Lascaris R, Oude A, Wittenberg A, Wesselink E, Van Oeveren J, de Wit E. (2003) Quantitative comparison of cDNA-AFLP, microarrays, and GeneChip expression data In *Saccharomyces cerevisiae*. Genomics. 82:606-618.
25. Rubinelli P, Sirlpomadulsil S, Gao-Rubinelli F, Sayre R. (2002) Cadmium- and Iron- stress- inducible gene expression in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: evidence for H43 protein function In iron assimilation. Planta 215:1-13.
26. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T, (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition Book 1. Cold spring harbor laboratory press.
27. Silver S. (1996) Bacterial Heavy Metal Resistance: New Surprises. Annu. Rev. Microbiol. 50:753-789.
28. Vallee B, Ulmer D. (1972) Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. Annu. Rev. Biochem. 41:91-128.
29. Vatamaniuk O, Mari S, Lu Y, Rea P. (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of Phytochelatin (PC) Synthase. J BIOL CHEM. 275:31451-31459.
30. Vldo K, Spector D, Lagniel G, Lopez S, Toledano M, Labarres J. (2001) A proteome analysis of the Cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. J BIOL CHEM. 276:8469-8474.
31. Waalkes MP, Coogan TP, Barter RA. (1992) Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. Crit Rev Toxicol. 1992;22(3-4):175-201.
32. Zhang Y, Chal T, Dong J, Zhao W, An C, Chen Z, Burkard G (2001) Cloning and expression analysis of the heavy- metal responsive gene PvSR2 from bean. Plant Science. 161:783-790.
33. Zhu Y, Pilon E, Tarun A, Weber S, Jouanin L, and Terry N. (1999) Cadmium Tolerance and Accumulation in Indian Mustard Is Enhanced by Overexpressing γ -Glutamylcysteine Synthetase. Plant Physiol. 121:1169-1177.