

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

**"SELECCIÓN DE TEJIDO PARA LA CLONACION
DEL TRANSCRITO DE MIO-INOSITOL 1-
FOSFATO SINTASA"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

EDSON EMMANUEL ESCAMILLA MARTÍNEZ



MÉXICO D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

Presidente: **ESTELA SANCHEZ QUINTANAR**

Vocal: **RAUL GENARO AGUILAR CABALLERO**

Secretario: **IRMA BERNAL LUGO**

1er Suplente: **MARICARMEN QUIRASCO BARUCH**

2do Suplente: **JORGE ARTURO ABURTO ANELL**

Sitio donde se desarrollo el tema: **Laboratorio 104 conjunto "E" UNAM. Facultad de Química.**

Asesor del tema:

Dra. Irma Bernal Lugo.

Sustentante:

Edson Emmanuel Escamilla Martínez.

INDICE.....	I
Agradecimientos.....	III
Dedicatoria.....	IV
Abreviaturas.....	V
Resumen.....	VI
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1. Estructura de las semillas.....	2
2.2. Germinación de las semillas.....	7
2.3. Papel del inositol en la germinación de las semillas.....	7
2.4. Importancia biológica.....	8
2.4.1. Vía de señalización de los fosfoinositidos.....	8
2.4.2. Almacenamiento y transporte de Auxina.....	9
2.4.3. Biosíntesis del ácido fítico.....	10
2.4.4. Biosíntesis de pared celular.....	10
2.4.5. Producción de derivados de inositol en respuesta a estrés.....	11
2.5. Producción celular de inositol.....	11
2.6. Estructura y regulación del gen MIPS.....	13
3. Justificación.....	16
4. Objetivos.....	16
4.1. Objetivo general.....	16
4.2. Objetivos específicos.....	17
5. Hipótesis.....	17
6. Materiales y Métodos.....	17
6.1. Material biológico.....	17
6.2. Métodos.....	18
6.2.1. Aislamiento de RNA total de embrión.....	18
6.2.2. Aislamiento de RNA total de Hojas.....	19
6.2.3. Cuantificación, integridad y pureza de los ácidos nucleicos.....	20
6.2.3.1. Cuantificación por espectrofotometría.....	20
6.2.3.2. Determinación de la integridad del RNA por electroforesis.....	21
6.2.4. Aislamiento de mRNA.....	23
6.2.4.1. Preparación de las soluciones stock.....	24
6.2.4.2. Lavado de partículas paramagnéticas de streptavidin.....	24
6.2.4.3. Captura y lavado de los híbridos oligo (dt)-mRNA.....	24
6.2.4.4. Elusión del mRNA.....	25
6.2.4.5. Determinación de la concentración y pureza del mRNA.....	25
6.2.5. Diseño de oligonucleotidos (Primers).....	25
6.2.6. Clonación e identificación del producto amplificado.....	26
6.2.6.1. Síntesis del cDNA.....	26
6.2.6.2. Amplificación del transcrito condiciones del programa para la PCR.....	27
6.2.6.3. Purificación del producto de PCR.....	28
6.2.6.4. Gel para DNA.....	28
6.2.6.5. Formación de células competentes.....	28
6.2.6.5.1. Medios para la selección de células transformantes.....	28
6.2.6.5.2. Medios selectivos.....	29
6.2.6.6. Ligado del inserto.....	30

6.2.6.7.	<i>Transformación de células competentes</i>	31
6.2.6.8.	<i>Purificación del plásmido</i>	32
6.2.6.8.1.	Miniprep.....	32
6.2.6.8.2.	Maxiprep.....	33
6.2.6.9.	<i>Northern Blotting</i>	35
6.2.6.9.1.	Transferencia por capilaridad.....	35
6.2.6.9.2.	Entrecruzamiento entre el RNA y la membrana.....	36
6.2.6.9.3.	Soluciones para fijar RNA total en membrana.....	37
6.2.6.10.	<i>Marcaje de sonda</i>	37
6.2.6.11.	<i>Purificación de la sonda marcada</i>	37
6.2.6.12.	<i>Bloqueo, hibridación y lavado de la membrana</i>	38
6.2.6.13.	<i>Soluciones de prehibridación (PSH)</i>	39
6.2.6.14.	<i>Soluciones de lavado</i>	39
6.2.6.15.	<i>Auto radiografía</i>	40
7.	Resultados y Discusión.....	40
7.1.	<i>Fuente y calidad del RNA</i>	40
7.2.	<i>Diseño de oligonucleotidos</i>	42
7.3.	<i>Amplificación del transcrito de MIPS</i>	45
7.4.	<i>Amplificación por RT-PCR del mRNA de Pool de embriones</i>	49
7.5.	<i>Clonación del transcrito</i>	51
7.6.	<i>Digestión del Vector</i>	53
7.7.	<i>Secuenciación</i>	54
7.8.	<i>Corroboración de la sonda</i>	56
8.	Conclusiones.....	60
9.	Bibliografía.....	61
10.	ANEXOS.....	66
10.1.	<i>ANEXO I</i>	66
10.2.	<i>ANEXO II</i>	77

Agradezco a mis padres por la oportunidad y el apoyo brindado durante los 24 años que me han soportado, también a mis hermanos, quienes me han dado soporte y apoyo cuando lo necesite.

Agradezco a la doctora Irma Bernal por su apoyo y su paciencia para sacar adelante este proyecto.

A Ana Valeria Martínez por los consejos brindados

A Vanesa Maya por el apoyo brindado

En general a todo el laboratorio 104 por las facilidades brindadas y sobre todo por la amistad otorgada.

A todos aquellos que estuvieron conmigo cuando más los necesite

Gracias a:

Diego, Ángel, Demetrio, Leo, Enrique, Luis, Israel, Lorena, Lety, Ana, Bárbara, Vanesa, Erica, Julio, Abiel, Aldo, Walter, José Enrique, Jorge, Violeta, Martín, compañeros de escuela y mas que eso amigos.

A los de toda la vida: Marco, Alejandro, Julio, Tony, etc.

Solo puedo decir gracias.

Dedico este trabajo a mis padres

Maria Dolores Martínez Álvarez

Eric Escamilla Aguilar

A mis hermanos

Eduardo Amurabi Escamilla Martínez

Erica Aguilar Martínez

Gracias por el apoyo en que me han brindado.

Como dice la canción:

Gracias a la vida,
que me ha dado tanto.

Resumen.

La importancia de la regulación génica en todos los organismos es primordial para su supervivencia, permitiendo la expresión de genes útiles durante todo el período de vida. En semillas este proceso es aún más importante, permite que durante la germinación se expresen solo los genes necesarios para que ésta se lleve a cabo en el momento en el cuál se encuentran las condiciones optimas para ésta; de lo contrario, al no existir un control de la expresión génica, se podrían expresar genes que no son de utilidad para las semillas en este período.

La regulación del gen Mio – Inositol – 1- fosfato sintasa (MIPS) es importante tanto en el proceso germinativo, como en un sin fin de procesos que son de gran utilidad para las semillas, plantas y animales.

Algunas de las vías en las que se ve involucrado este gen tienen que ver con la respuesta a señales externas tales como estrés osmótico, formación de pared celular y acumulación de fosfato inorgánico.

El objetivo es obtener una sonda específica de Mio –Inositol -1- fosfato sintasa (MIPS) por RT-PCR lo que permitiría identificar los tejidos en los cuales existe una mayor expresión de este gen y por tanto estudiar su regulación en diversas condiciones de germinación.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos muestran que la cantidad de transcrito de MIPS presente en los tejidos seleccionados es baja, ya que a partir del RNA total del tejido, no se pudo amplificar por lo que se tuvo que utilizar mRNA.

La abundancia de este transcrito en el mRNA fue mayor en el “pool” de embriones germinados que en la hoja o en la aleurona inmadura.

1. Introducción

Las semillas integran diversas señales que les permiten detectar si las condiciones ambientales son propicias o no para activar los procesos celulares que conducen a la germinación. En algunos de los mecanismos utilizados en la detección e integración de señales participan diversos productos del inositol. Este poli-alcohol al igual que sus productos también son utilizados en la síntesis de membranas y de pared celular, dos eventos metabólicos muy activos durante la germinación. Por lo anterior es de esperarse que durante el estadio de desarrollo de las semillas, la vía que conduce a la biosíntesis del mioinositol se encuentre activa y sea finamente regulada. La enzima que regula la vía de biosíntesis de este compuesto es la mioinositol-fosfato-sintetasa. En experimentos previos se identificó que durante la germinación de semillas de maíz, el transcrito de esta enzima era expresado. Para estudiar la función de este gen durante la germinación, así como su regulación, es necesario contar con una sonda específica que permita realizar tales estudios. Por lo anterior este trabajo describe los experimentos realizados para generar tal sonda.

2. Antecedentes

Las angiospermas, plantas cuyas semillas están cubiertas por un pericarpio, se dividen en monocotiledóneas (aquellas que tienen un solo cotiledón) como sucede en las gramíneas; y en dicotiledóneas (aquellas que tienen dos cotiledones) como sucede en las leguminosas. En el caso de estas últimas, los cotiledones constituyen el tejido de reserva de la semilla y se desarrollan como las primeras hojas de la plántula (i.e. frijol). En el caso de las monocotiledóneas (i.e. maíz) la reserva se encuentra distribuida tanto en el endospermo como en el cotiledón, éste también desempeña la función de tejido de absorción, por lo que en monocotiledóneas al cotiledón se le denomina escutelo. Durante la germinación, esta estructura absorbe las reservas digeridas en el endospermo y las transporta a las partes del embrión que están creciendo (47).

2.1. Estructura de las semillas

Las semillas, son óvulos maduros y fecundados, constituyen las estructuras que facilitan la dispersión de la mayoría de las espermatofitas, ya que potencialmente es una planta con las estructuras y la información necesaria para crecer y desarrollarse hasta su establecimiento autotrófico para posteriormente transformarse en planta adulta. La semilla puede mantenerse viva deshidratada, con contenidos de agua inferiores al 15 % de su peso total permaneciendo sus organelos inactivos y desorganizados, esto permite a las semillas soportar estados no favorables para el desarrollo vegetativo (47).

La semilla, consta de una cubierta o testa, material alimenticio almacenado y un embrión. La testa cubre a toda la semilla (Figura 1 B), y puede tener muy distintas texturas y apariencias (Figura 1 A). Generalmente es dura y está formada por una capa interna y una externa de cutícula y, una o más capas de tejido grueso que sirven de protección. Estas características le confieren a la testa cierto grado de impermeabilidad al agua y a los gases. Ello le permite ejercer una influencia reguladora sobre el metabolismo y crecimiento de la semilla. Frecuentemente en la testa se puede observar el micrópilo. En muchas ocasiones está asociado con una cicatriz llamada hilio, que marca el punto donde la semilla se separó del tallo (funículo) por medio del cual estaba adherido al fruto. En algunas semillas estas estructuras de la testa están ausentes pero lo que en realidad sucede es que se está observando el pericarpio de un fruto y no la testa, como por ejemplo en el caso del girasol y de la lechuga.

El endospermo tiene como función almacenar las reservas alimenticias de las semillas, aunque no siempre está presente. Entre las semillas que tienen un endospermo bien desarrollado están las gramíneas como el trigo, el maíz, la cebada y algunas dicotiledóneas como Ricino (*Ricinus communis*). En estos casos los cotiledones son relativamente pequeños. El endospermo de las gramíneas y de otras especies se caracteriza por presentar una capa externa o aleurona. Tienen paredes gruesas y en su interior se desarrollan los llamados granos de aleurona.

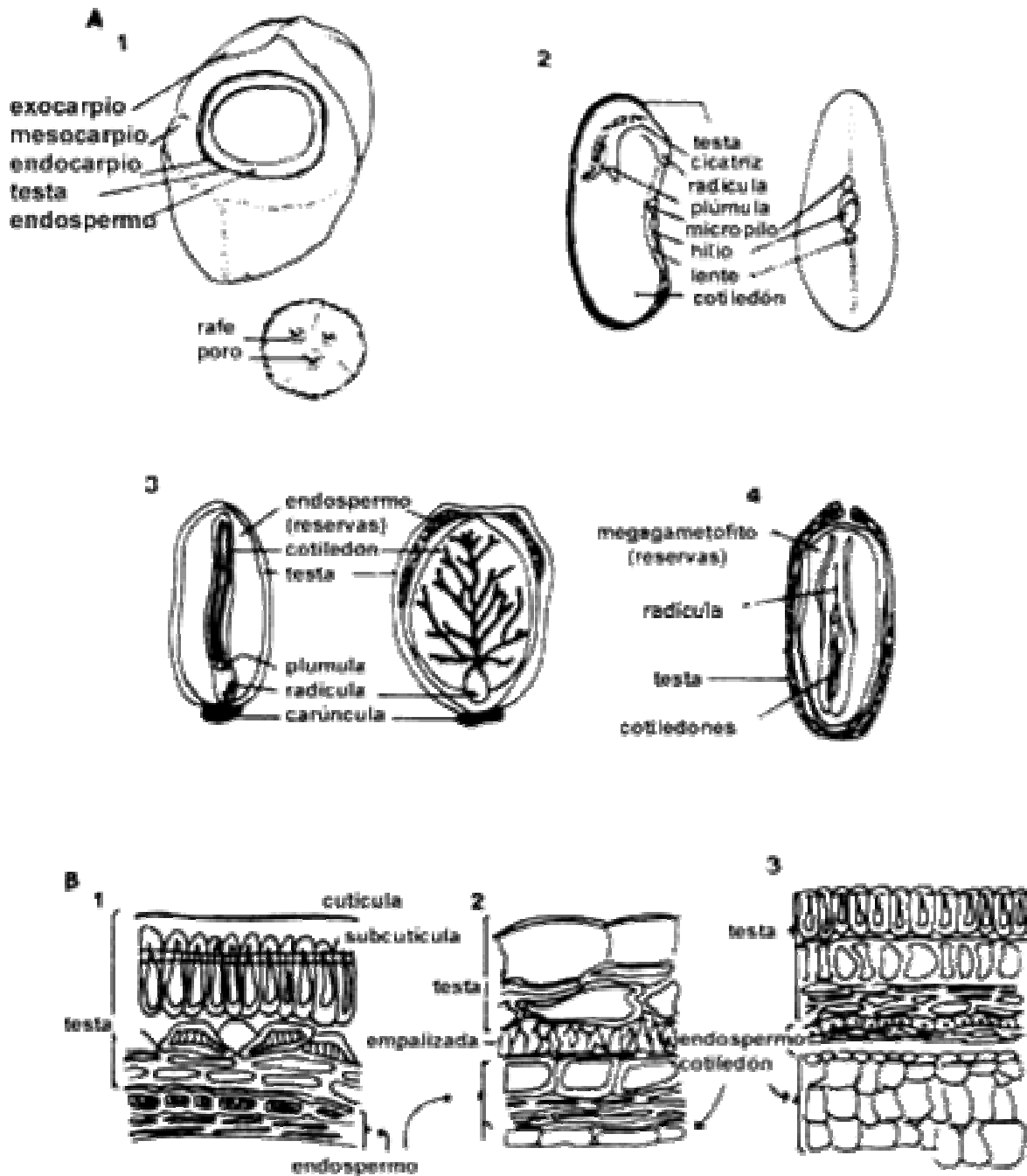


Figura 1. A) Morfología de semillas: *Cocos nucifera* (1), de frijol, *Phaseolus vulgaris* (2), ricino, *Ricinus communis* (3) y pino, *Pinus pinea* (4). B) Anatomía de la testa de tres especies (1) *Melilotus alba*, (2) *Sinapsis alba*, mostaza y (3) *Glycine max*, soya (Tomado de Hamly, 1932 y Vaughan, 1970).

Estas células permanecen vivas, a diferencia de las células del endospermo de algunos cereales, las cuales se convierten en células muertas empacadas con almidón y algo de proteínas.

El embrión presenta variadas características de desarrollo y alcanza distintos tamaños y grados de diferenciación en las angiospermas (8). El embrión es el origen de la raíz, hojas y tallo de la nueva planta, por lo que resulta de interés entender con más detalle su funcionamiento. El embrión maduro de las plantas que tienen flores consiste en un eje parecido a un tallo (eje embrionario) en cuyo extremo están uno o dos cotiledones (Figura 2). Estos cotiledones frecuentemente se conocen como las hojas de las semillas o las hojas cotiledonarias, debido a que son las primeras hojas en aparecer, aunque tienen forma y función diferentes de las hojas que aparecerán subsecuentemente durante la vida de la planta. En ambos extremos del eje embrionario hay meristemas formados por células con gran capacidad de reproducción, responsables del crecimiento. En el embrión, el meristemo apical del tallo se localiza en la parte superior del eje embrionario, justo arriba de los cotiledones, y por eso se le conoce como epicótilo. En algunos embriones el epicótilo consta solamente del meristemo apical, mientras que en otros, presenta una o más hojas jóvenes. En este último caso, el epicótilo, junto con las hojas jóvenes, se denomina plúmula. La parte del eje embrionario entre el epicótilo y el ápice de la raíz se llama hipocótilo, por encontrarse inmediatamente abajo de los cotiledones. Finalmente, en el extremo se encuentra el ápice de la raíz o radícula.

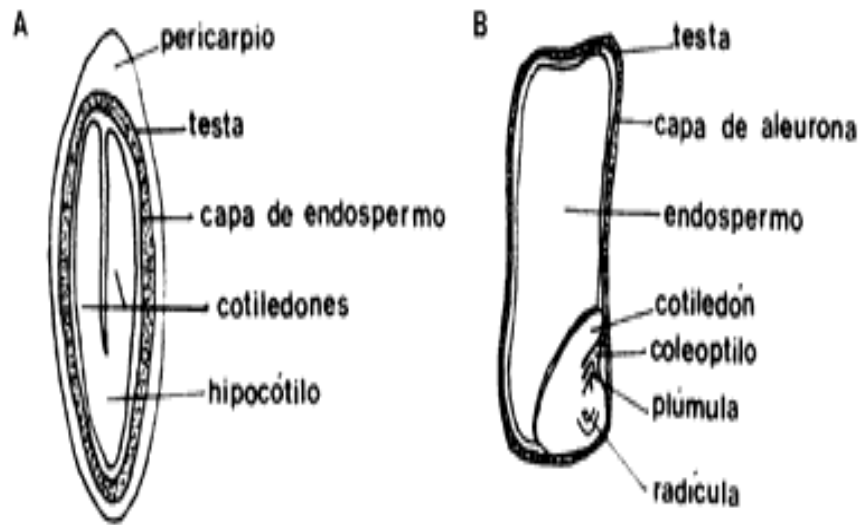


Figura 2: Esquema de una semilla monocotiledónea (B) y una dicotiledónea (A)

Estas partes son mucho más fáciles de identificar en las dicotiledóneas que en las monocotiledóneas. En las últimas, el cotiledón único se llama escutelo. La envoltura basal del cotiledón se ha elongado para formar el coleoptilo y en algunas especies el hipocótilo se ha modificado parcialmente. La coleorriza puede considerarse como la base del hipocótilo que envuelve la radícula.

Sintetizando, diríamos que el embrión está formado básicamente por un eje hipocótilo-raíz con uno o dos cotiledones (dependiendo si son mono o dicotiledóneas) y un meristemo apical en los ápices de raíz y tallo. En la figura 3 se esquematiza una semilla de maíz indicando sus diferentes estructuras anatómicas. (47)

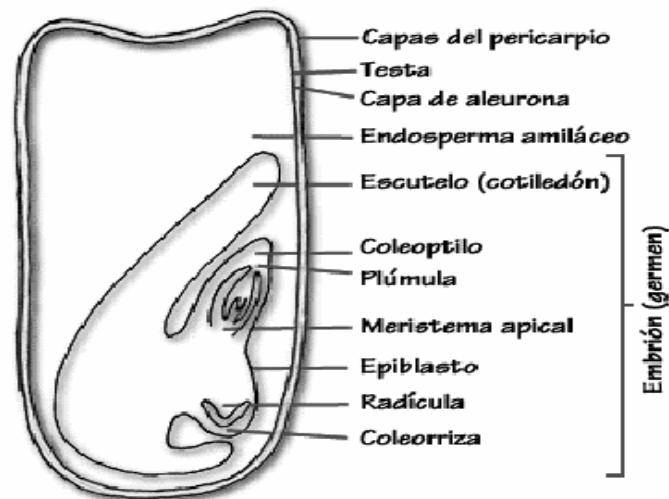


Figura 3. Esquema de una semilla de Maíz.

2.2. Germinación de las semillas

Ésta inicia con los procesos de absorción de agua y finaliza con la emergencia de la radícula o del epicotilo. Todos los eventos subsiguientes están asociados con el crecimiento de la planta. Para germinar, la semilla también requiere de un aporte de oxígeno y de una temperatura adecuados. Aun bajo estas condiciones la semilla puede no germinar, esto debido a que se encuentra en periodo de latencia o no es viable (39).

2.3. Papel del inositol en la germinación de las semillas

El fósforo en las semillas es almacenado en forma de ácido fítico (Fitato, mio inositol hexacisfosfato, InsP_6), el fitato almacenado es hidrolizado por la actividad de una enzima fitasa durante la germinación proveyendo de fosfato inorgánico y de inositol a las semillas en crecimiento. Además, el mio inositol participa en señales de transducción, protección al estrés, homeostasis hormonal y biosíntesis

de pared celular. La reacción que cataliza la Mio Inositol 1 fosfato sintasa (MIPS) y los compuestos derivados del inositol se muestran en la Figura 4 (47).

2.4. Importancia biológica

El mio inositol, que aquí nombraremos como inositol es importante para el crecimiento y desarrollo de una planta. El papel del inositol en plantas es múltiple. Participa en la vía de señalización de los fosfoinositidos (PI), en el almacenamiento y transporte de las auxinas, en la biosíntesis del ácido fítico, en la biosíntesis de la pared celular y en la de moléculas relacionadas con el estrés (24, 25).

2.4.1. Vía de señalización de los fosfoinositidos

Las plantas, al igual que los animales, requieren de capacidad para responder al ambiente, y para ello utilizan cascadas de transducción de señales. El inositol es un componente esencial de una de estas cascadas de transducción de señales llamada la vía de señalización de los fosfoinositidos (31). El inositol producido por la degradación de estos fosfoinositidos pasara a formar parte del “pool” intracelular de inositol o bien podrá ser reciclado para participar de nuevo en la vía de señalización de los fosfoinositidos. Se ha demostrado que esta vía participa en una variedad de respuestas de la planta incluyendo gravitropismo en *Zea mays* (34).

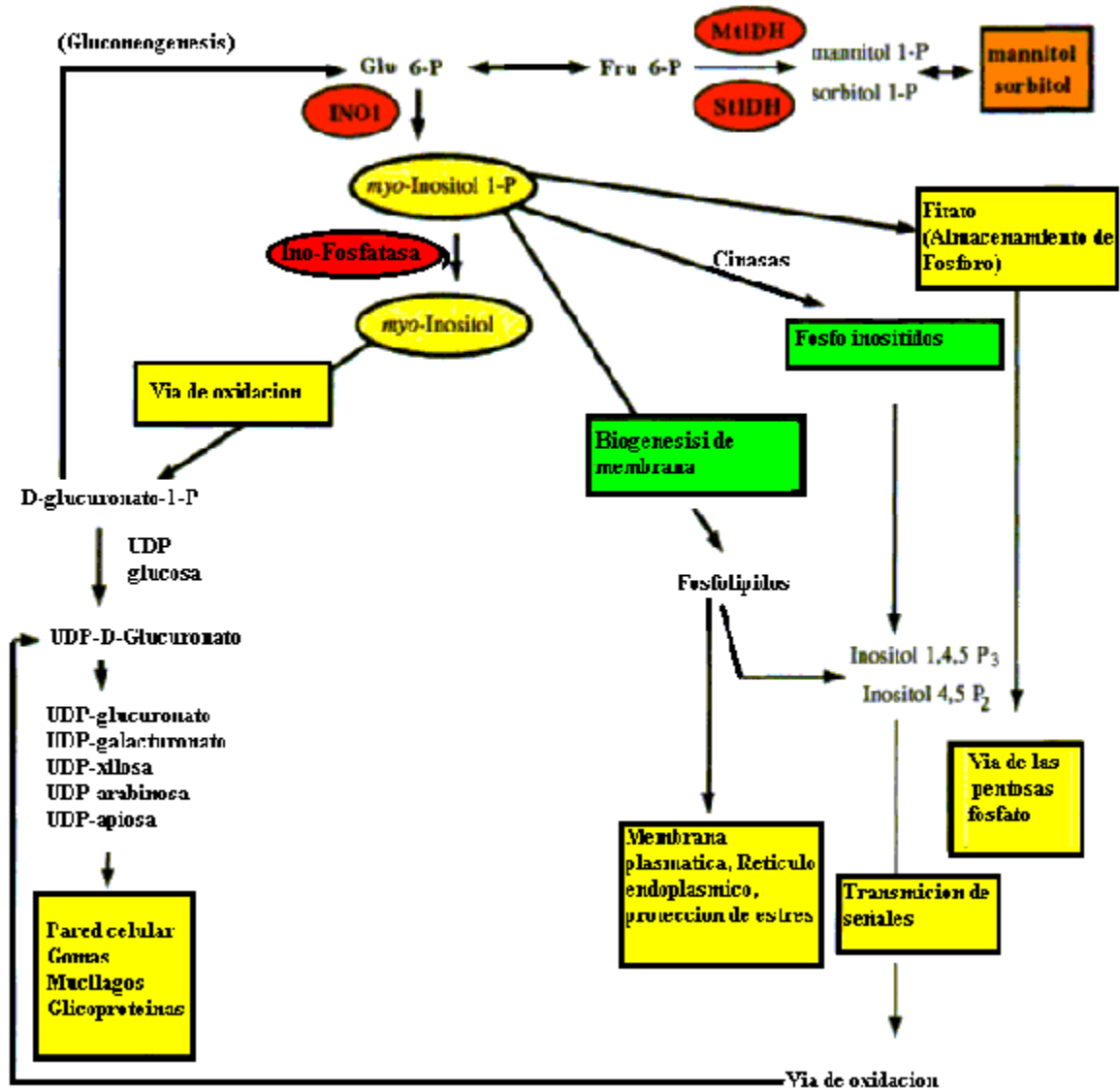


Figura 4: Vías metabólicas que sigue la glucosa 6-P después de ser transformada en Mio inositol 1 fosfato (adaptado de Bohnert et. al.).

2.4.2. Almacenamiento y transporte de Auxina

Las hormonas vegetales son potentes facilitadores del cambio fisiológico de los diversos tejidos de la planta. Por lo tanto, es importante que las plantas cuenten con un mecanismo de transporte de formas inactivas de las hormonas desde los sitios de síntesis hacia los tejidos blanco. El inositol desempeña un papel central

en el control de la actividad de auxina (9). En la actualidad, se propone que la conjugación del inositol a la auxina permite que esta fitohormona se almacene o se transporte de manera inactiva y así regular su disponibilidad hasta el momento de su acción fisiológica. En Maíz se han aislado enzimas capaces de conjugar el inositol a IAA, así como una estearasa que se puede implicar en la hidrólisis del conjugado del AIA-Inositol (21).

2.4.3. Biosíntesis del ácido fítico

Las semillas almacenan fósforo como Inositol-hexafosfato, (InsP₆;24). Las moléculas InsP₆ se depositan en las semillas, durante su desarrollo, en organelos celulares especializados llamados globoides. Durante la germinación de la semilla, InsP₆ es hidrolizado en inositol y fosfato por la enzima denominada fitasa (24) y el fosfato es utilizado en el crecimiento de la plántula.

Recientemente el InsP₆ se ha involucrado en otros eventos celulares tales como inhibición de proteínfosfatasas (40); modulación de la actividad de canal del calcio, atenuación de la endocitosis e inhibición del ensamble de caltrina. Por otro lado, York y col., (1999) sugieren que InsP₆ juega un papel en el transporte nuclear del mRNA a través del poro nuclear.

2.4.4. Biosíntesis de pared celular

El inositol es también una molécula esencial para la producción de la pared celular de plantas. Los componentes principales de la pared celular son polisacáridos, proteínas y lignina. El Inositol es oxidado para formar el ácido glucurónico. Este azúcar constituye el producto más importante producido por la vía de la oxidación de inositol ya que es un precursor para otros UDP-D-azúcares (UDP-D-

glucurónico, UDP-D-galactourónico, UDP-D-xylosa, UDP-D-apiosa UDP-D-arabinosa y UDP- L-arabinosa). Estos compuestos son donadores de azúcares para la biosíntesis de polisacárido (25).

2.4.5. Producción de derivados de inositol en respuesta a estrés.

El inositol y los esteres de inositol O-metilo, como el D-ononitol (4-O-metil) y D-pinitol (1D-O-metil-chiro-inositol), contribuyen a la protección de la planta contra el estrés salino (3, 25). La acumulación de inositol y sus derivados en respuesta a la salinidad se ha estudiado extensamente en *Mesembryanthemum Crystallinum* (planta de hielo). Se sugiere que el D-ononitol y el D-pinitol funcionan en la tolerancia a la salinidad, al menos de dos formas: 1) proteger las estructuras celulares de la especie reactiva de oxígeno tal como el peroxido de hidrógeno, y 2) controlar la presión de turgor. Al inicio del estrés, la planta de hielo se marchita por un corto período, seguido por la síntesis y acumulación de inositol, pinitol y ononitol. Una vez que estos osmolitos se acumulan, la presión de turgor se restaura y el inositol se detecta en el floema. La acumulación de sodio e inositol en las hojas, sugiere que el mecanismo para la tolerancia de la planta de hielo a la salinidad involucra controlar la dirección apropiada del transporte de sodio (Agarre et al.,1998). Bohnert (3) sugiere que una modificación en la biosíntesis de inositol y sus derivados podría incrementar la tolerancia a la salinidad de diversos cultivos.

2.5. Producción celular de inositol

Se han propuesto dos rutas para la producción de inositol intracelular: 1) la biosíntesis de novo y 2) el reciclaje de inositol fosfatos. La biosíntesis de novo de inositol involucra dos enzimas: mio-inositol-1L-fosfato sintasa (MIPS; EC 5.5.1.4) y

la mio-inositol monofosfatasa (IMP; EC 3.1.3.25; 24). Estas dos enzimas pueden interactuar una con otra formando el metaboloma de producción de inositol, enzimas que interaccionan entre sí y realizan de manera más eficiente la biosíntesis de novo de inositol para una función particular de la planta. El primer paso en la vía de la biosíntesis de inositol *de novo* es la conversión de glucosa-6-fosfato a 1D-inositol-3-fosfato por MIPS. El inositol es un inhibidor negativo de la reacción de esta conversión (29). Enseguida, IMP cataliza la defosforilación 1D-inositol-3-fosfato para producir inositol (37). Esta constituye la única vía hasta ahora descrita de la biosíntesis de novo de inositol en plantas (24). El mecanismo de la reacción catalizada por la I1-P sintasa fue sujeto de una intensa investigación durante los años 1960's y 1970's, la enzima de todas las fuentes investigadas requiere de NAD^+ para la reacción, pero, el producto neto no es NADH, el mecanismo de reacción requiere de tres pasos; el primero una oxidación sirviendo el NAD^+ como aceptor de hidrogeno, seguido por una condensación a un producto cíclico y una posterior reducción con el NADH como donador de hidrogeno regenerando el NAD^+ . La aceptación general del mecanismo de reacción incluye dos intermediarios, 5-Ceto-D-Glucosa 6-fosfato y mio-Inososa-2 1-fosfato ambos débilmente ligados a la enzima (18, 29).

En tejidos de plantas, dos formas de MIPS, citosolica y cloroplastica, han sido reportadas. Estas últimas están asociadas a las membranas tilacoidales, son reguladas por las condiciones de luz, mientras que la primera está implicada en varias reacciones metabólicas importantes (14, 16).

La otra ruta utilizada para la producción intracelular de inositol es la vía de reciclaje o de salvamento a partir de fosfatos de inositol. Estos se generan en la

vía de señalización de los fosfoinosítidos (InsP3) o por hidrólisis de la fitina (InsP6). El InsP3, generado por la vía de señalización de los fosfoinosítidos se defosforila secuencialmente hasta la obtención de 1D-inositol-1-fosfato, el cual, a su vez, es defosforilado por una reacción catalizada por IMP. Por lo tanto, IMP se requiere para la biosíntesis de novo de inositol y el reciclaje de inositol por vía de los fosfoinosítidos. En plantas el inositol también puede ser generado por la defosforilación de InsP₆. Esta reacción es catalizada por la fitasa, localizada, principalmente, en semillas.

2.6. Estructura y regulación del gen MIPS

La secuencia codificante de MIPS ha sido clonada y caracterizada a partir de un gran número de fuentes procariontes y eucariontes. El primer gen reportado fue aislado usando una estrategia de complementación genética en *Saccharomyces cerevisiae*. Una secuencia similar fue identificada en *Spirodela polyrrhiza*, una angiosperma acuática (6, 37). Un DNA complementario (cDNA) ha sido secuenciado en maíz (accesión en GeneBank AF056326.1). En Arabidopsis dos diferentes secuencias han sido identificadas (11, 20). Un cDNA fue aislado a partir de semillas en desarrollo de frijol soya (*Glicine Max*) usando RT-PCR (Gm-MIPS1). (11). Así como de semillas de Sesame (*Sesamum indicum L.*) en desarrollo (10, 26). La secuencia nucleotida de la MIPS también ha sido reportada en Citrus paradissi, Common ice plant y tabaco (15, 24,30, 46).

Traduciendo la secuencia de nucleótidos a aminoácidos se ha observado que la secuencia de MIPS es altamente conservada dentro de todos los organismos en los que se ha estudiado (14, 16, 26). A nivel de proteína, la MIPS posee cuatro

dominios altamente conservados a nivel de aminoácidos con similitudes en algunos casos superiores al 90% (tabla 1).

En algunos casos se ha reportado la estructura del gen y su regulación. En frijol soya, el gen de MIPS cuenta con 3618 pb con 10 exones y 9 intrones (GeBank accesión AF323175). Es temporal y espacialmente regulado a nivel de transcripción. En maíz han sido localizadas siete secuencias similares en diferentes cromosomas, aunque solo la secuencia localizada en el cromosoma 1S fue activa (38). La existencia de múltiples genes puede permitir una expresión diferenciada para diferentes funciones biológicas.

Tabla 1: Dominios estructurales a nivel de aminoácidos, el número indica la posición del residuo, para las fuentes el número en paréntesis indica el número de accesión en GenBank

Fuente	% Identidad (similitud)	Dominios conservados			
		Dominio 1	Dominio 2	Dominio 3	Dominio 4
Sesamo (AF284065)	100 (100)	68GWGGNNG	228LWTANTERY	280NGSPQNTFVPGL	334 SYNHLGNNDG
Tabaco (AB009881)	94 (97)	68 WGGNNG	228LWTANTERY	280NGSPQNTFVPGL	334 SYNHLGNNDG
Trigo (AF120146)	92 (94)	68 WGGNNG	228LWTANTERY	280NGSPQNTFVPGL	334 SYNHLGNNDG
Rape (U66307)	91 (95)	68 WGGNNG	228LWTANTERY	280NGSPQNTFVPGL	334 SYNHLGNNDG
Ice plant (U32511)	91 (95)	70 WGGNNG	230LWTGNTERY	282NGSPQNTFVPGL	336 SYNHLGNNDG
Haba (U38920)	90 (95)	69GLGGNNG	229LWTANTERY	281NGSPQHFTFVPGL	335 SYNHLGNNDG
Lenteja (Z11693)	89 (96)	68 WGGNNG	228LWTANTERY	280NGSPQNTFVPGL	334 SYNHLGNNDG
Citricos (Z32632)	89 (94)	68 WGGNNG	228LWTANTERY	280NGSPQNTFVPGL	334 SYNHLGNNDG
Arroz (AB012107)	89 (94)	68 WGGNNG	228LWTANTERY	280NGSPQNTFVPGL	334 SYNHLGNNDG
Cevada (AF056325)	89 (94)	68 WGGNNG	228LWTANTERY	280NGSPQNTFVPGL	334 SYNHLGNNDG
Maíz (AF056326)	88 (94)	68 WGGNNG	228LWTANTERY	280NGSPQNTFVPGL	334 SYNHLGNNDG
Mosca (AF071103)	62 (77)	68 WGGNNG	229LWTANTERF	281NGSPQNTFVPGL	335 SYNHLGNNDG
Raton (AF288525)	60 (78)	65 WGGNNG	226LWTANTERF	277NGSPQNTLVPGA	331 SYNHLGNNDG
Humano (AF220530)	60 (77)	65 WGGNNG	226LWTANTERF	277NGSPQNTLVPGA	331 SYNHLGNNDG
Leishmania (U91965)	56 (72)	63 WGGNNG	226LWTANTERF	278NGAPHNTLCPGL	332 SYNHLGNNDG
Entamoeba (Y11270)	54 (74)	61 WGGNNG	222LWTATTERY	274NGSPQNTLVPGV	328 SYNHLGNNDG
Pichia (AF078915)	53 (71)	68 LGGNNG	239LWTANTERY	291NGSPQNTFVPGC	345 SYNHLGNNDG

3. Justificación

Las semillas constituyen la base de la alimentación humana y en algunas poblaciones se utiliza para la cría de ganado. En los países pobres se pierden del 10 al 30% de los granos y semillas debido a las malas condiciones de almacenamiento que prevalecen en estas regiones del mundo. Durante este almacenamiento inadecuado, las semillas pierden vigor de germinación. Es decir, disminuyen las características de las semillas que les permiten germinar con rapidez y eficiencia aun en condiciones adversas. Por lo que sería conveniente generar nuevos genotipos que pudieran preservar el vigor de germinación aún en condiciones inadecuadas de almacenamiento. Esto podría lograrse a través de un programa de mejoramiento genético, asistido por marcadores moleculares, para lo cual se requiere de conocer los genes involucrados en el vigor de germinación de una semilla y su participación en el proceso. Estudios previos, realizados en nuestro laboratorio, han identificado una serie de genes que se expresan durante la germinación de semillas de maíz, entre los cuales se encuentra el gene que codifica para la mio-inositol-1 fosfato sintasa (MIPS, EC 5.5.1.4). Para poder estudiar la regulación de este gene y su importancia en el proceso de la germinación se requiere contar con una sonda específica para la MIPS. Por lo que la finalidad del presente trabajo fue generar una sonda para dicho gene.

4. Objetivos

4.1. *Objetivo general*

Generar una sonda para estudiar la función y regulación del gene MIPS durante la germinación de semillas de maíz.

4.2. *Objetivos específicos.*

1. Diseño de oligonucleotidos para la amplificación del transcrito de MIPS.
2. Optimización de las condiciones del PCR para la amplificación de MIPS.
3. Identificar la abundancia de MIPS en tres de los tejidos en los que, según reportes en la literatura, se expresa MIPS (hoja joven, aleurona en desarrollo, embriones germinados).
4. Amplificar el transcrito de MIPS, partiendo del tejido con mayor abundancia de transcrito.
5. Clonar el transcrito amplificado de MIPS .
6. Purificar el transcrito amplificado de MIPS y secuenciarlo.
7. Corroborar "in silico" la identidad del fragmento clonado.

5. Hipótesis

En otros sistemas vegetales, se ha logrado generar sondas específicas, utilizando la técnica de RT-PCR y clonación del fragmento amplificado. Por lo que si el gene MIPS se está expresando en el tejido vegetal seleccionado, será posible amplificar su secuencia por RT-PCR, y clonar este fragmento amplificado. Con lo cual se generaría una sonda específica para MIPS.

6. Materiales y Métodos

6.1. Material biológico

Se utilizaron semillas de Maíz (*Zea Mays*) variedad Chalqueño cosechado en el año 2004, así como aleuronas aisladas de semillas inmaduras de maíz (Var. costeño) y hojas de plántulas de maíz de siete días de germinación.

6.2. Métodos

6.2.1. Aislamiento de RNA total de embrión.

Se etiquetaron 5 tubos y en cada uno se colocaron las siguientes soluciones: Tubo1: 10 mL de buffer de extracción (Urea 7M, Tris-HCl 100 mM pH 7, EDTA 1mM pH 7, SDS1%) y se les agregaron 10 mL de PCI (Fenol:Cloroformo:Isopropanol 50:49:1) y 200 μ l de β - mercaptoetanol . Previo a la preparación del PCI, el fenol se equilibrio a pH 7, con buffer TRIS-HCl pH 8, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Antes de ser utilizada, la solución de PCI se dejo equilibrar a 4^oC por 12 horas. A los tubos 2, 3 y 4 se les agregaron 10 mL de PCI y al tubo número 5 se le agrego 1 mililitro de acetato de amonio 10 M.

Los embriones (alrededor de 140) fueron homogenizados en mortero preenfriado con Nitrógeno (N₂) líquido colocado en un contenedor de unicel. La muestra se homogenizo (procurando que no se descongelara) hasta obtención de un polvo fino, el tejido se transfirió al tubo número 1 y se agito en Vortex (Genie-2) por 2 minutos. Posteriormente fue centrifugado durante 15 minutos a 5000 rpm (centrifuga Sorvall Super T21, rotor SL-50T) a temperatura ambiente con lo que se eliminaron los restos celulares y se separaron la fase acuosa y la orgánica. La fase acuosa se transfirió al tubo número 2 y se agitó en vortex durante 2 minutos. La fase acuosa se separó por centrifugación de la manera ya descrita. La fase acuosa se transfirió al tubo número 3, se tapo y agito en vortex durante 2 minutos, las fases se separaron por centrifugación durante 10 minutos a 5000 RPM a temperatura ambiente. Se procedió de igual forma con el tubo 4, la fase acuosa del tubo 4 se transfirió al tubo 5 y se agrego isopropanol en volumen proporcional al obtenido de la fase acuosa; se agitó

por inversión, posteriormente se incubo a -20°C durante 30 min. La pastilla de ácidos nucleicos se colecto por centrifugación a 7000 RPM durante 30 min. a temperatura de 4°C . El sobrenadante se desecho y la pastilla se resuspendió en 3 ml de LiCl 8M para solubilizar DNA y 3 ml de agua tratada con dietilpirocarbonato (agua DEPC). El tubo se incubo a -20°C por 2 horas. El RNA se colecto por centrifugación a 7000 rpm durante 30 minutos a 4°C . La pastilla que contenía el RNA se resuspendió en 200 μl de agua DEPC, se le adicionaron 1/3 del volumen de Acetato de amonio 10 M y dos volúmenes de etanol, se mezclaron e incubaron por 20 minutos a -20°C . En algunos aislamientos se dejo precipitar toda la noche. El RNA purificado se colecto por centrifugación. El sobrenadante se decanto y la pastilla se resuspendió en 1 ml de agua DEPC. De esta solución se transfirieron 500 μl a otro tubo. Ambas alícuotas se centrifugaron en microfuga a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C (o en centrífuga a 8000 rpm durante 30 minutos a 4°C). El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se precipito con 1/3 de acetato de amonio y 70 % de etanol. El nucleico se recupero por centrifugación en las condiciones ya descritas se lavo con etanol al 70 % se seco y se disolvió en 200 μl de agua DEPC. De esta solución se tomaron 10 μl para visualizar integridad del RNA por electroforesis y 10 μl para cuantificar a 260 nm.

6.2.2. Aislamiento de RNA total de hojas

Las hojas de plántula de maíz se lavaron sumergiéndolas durante cinco minutos en una solución de tritón al 1% y se enjuagaron con agua bidestilada estéril, se escurrieron y se secaron.

La extracción del RNA total se realizó empleando el reactivo TRIzol (TRIzol[®] Reagent, invitrogen). Para cada muestra se pesaron aproximadamente 100 mg de tejido por duplicado. En seguida se adicionó 1 ml de trizol por cada 100 mg de muestra; se homogenizó con un triturador de tejidos politrón y se centrifugó por 10 min a 12000 rpm en una microfuga (Ependorff Centrifuge 5415C) a una temperatura de 2-8 °C.

Posteriormente, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio incubándolo por 5 min. a temperatura de 15-30 °C. Transcurrido el tiempo se adicionó 200 µl de cloroformo y se agitó por inversión. Se incubó por 3 min. a temperatura entre 15-30 °C y se centrifugó por 15 min a 12000 rpm a una temperatura de 2-8 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se le adicionó 500 µl de isopropanol y se incubó por 10 min a 15-30 °C. El tubo se centrifugó por 10 min a 12000 rpm a una temperatura de 2-8 °C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de una solución de etanol al 75%. Se mezcló en vortex. A continuación se centrifugó por 5 min a 7500 rpm a una temperatura de 2-8 °C. La pastilla se seco al vacío y se resuspendió en 50 µl de amortiguador TE (Tris - HCl 10mM, pH 8.0 y EDTA 0.1mM).

6.2.3. *Cuantificación, Integridad y pureza de los ácidos nucleicos.*

6.2.3.1. *Cuantificación por espectrofotometría.*

Material:

Espectrofotómetro UV – Visible

Celdas de cuarzo de 1cm

Pizeta

Papel Kleenex

En celdas de cuarzo de 1 cm de longitud se colocaron 10 μL de la muestra de ácidos nucleicos y se adicionaron 990 μL de agua DEPC. A esta solución se le determino su absorción a una longitud de onda 260 nm y de 280 nm; Como blanco se utilizo 1000 μl de agua DEPC. Una unidad de densidad óptica a 260 nm equivale a 40 μg de RNA o a 50 μg de DNA. Concentraciones tan bajas como 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de ácido nucleico pueden ser detectadas por este método. El cálculo de la relación A_{260} / A_{280} es una manera común para expresar la pureza del ácido nucleico. Un valor de 1.65 a 1.9, en el parámetro anterior, indica una muestra pura o con muy poca contaminación por proteínas.

6.2.3.2. *Determinación de la integridad del RNA por electroforesis.*

Reactivos:

Agarosa

MOPS 10x

MOPS 1x

Agua libre de RNAsas (Agua DEPC Dietil pirocarbonato)

Formaldehído al 37%

Bromuro de etidio

Material:

Matraz Erlenmeyer de 125ml

Probeta 150 ml

Microondas

Campana de extracción de gases

Micropipeta de 20 μl

Puntas de micropipeta estériles

MOPS 10x:

Pesar 23.12 gramos de MOPS (Ácido 3 - [N - morfolino] propanesulfónico) y disolverlo en 500 ml de agua tratada con DEPC.

MOPS 1x:

Colocar en vaso de precipitados 20 mililitros de MOPS 10x y adicionar 180 mililitros de agua tratada con DEPC.

Agua tratada con DEPC

Por cada tres litros de agua desionizada agregar 1.5 ml de dietilpirocarbonato, agitar toda la noche y esterilizar al día siguiente por una hora.

Método:

En un matraz estéril de 125 ml, colocar 0.45 gramos de agarosa, en la probeta mezclar 26 ml de agua DEPC con 3 ml de MOPS 10x y añadir al matraz la agarosa lentamente, resbalándola por la pared, poner tapón de gasa, calentar el matraz en microondas aproximadamente 10 segundos hasta disolver, llevar a la campana y esperar a que salgan los vapores tóxicos, agregar 900 μ l de formaldehído y 5 μ l de bromuro de etidio en la campana y decantar en la cámara para electroforesis Gibco BRL Horizontal gel Electrophoresis Apparatus Horizon® 58, colocar el peine y dejar enfriar el gel, una vez frío se añade MOPS 1x como Buffer de corrida.

6.2.4. *Aislamiento de mRNA*

Materiales

Baño de agua a 65° o block de calentamiento.

Tubos estériles libres de RNAsas de 1.5 ml.

Pipetas y puntas de pipetas estériles y libres de RNAsas.

Este tipo de RNA fue purificado utilizando el kit Promega, PolyAtract®mRNA Isolation Systems, diseñado para usarse con muestras mayores a 1mg de RNA total.

Metodo:

En un tubo estéril, libre de RNasa de 1.5 ml diluir 0.1 – 1.0 mg de RNA total a un volumen final de 500 µl en agua libre de RNasa.

Coloque el tubo en un baño caliente a 65°C por 10 minutos.

Agregue 3 µl del Biotinilated – Oligo (dt) Probe y 13 µl de 20X SSC (proporcionada por el fabricante) al RNA. Mezclé ligeramente e incube a temperatura ambiente hasta que este completamente claro, esto debe requerir 10 minutos o menos. Mientras que esta solución se está aclarando prepare a partir de la solución concentrada, soluciones SSC 0.5X y SSC 0.1X.

6.2.4.1. *Preparación de las soluciones stock:*

Prepare 1.2 ml de SSC 0.5X por combinación de 30 μ l de SSC 20X (proporcionado por el fabricante) con 1.17 ml de agua estéril libre de RNAsas en un tubo libre de RNAsas.

Prepare 1.4 ml de SSC 0.1X por combinación de 0.7 μ l de SSC 20X con 1.393 ml de agua estéril libre de RNAsas en un tubo libre de RNAsas.

6.2.4.2. *Lavado de partículas paramagnéticas de streptavidin*

Las partículas paramagnéticas de Streptavidin (SA-PMPs) se resuspendieron por agitación suave del tubo hasta dispersión total, después fueron colectadas colocando el tubo en el soporte magnético hasta que todas las SA-PMPs se adhirieron a la pared del tubo (aproximadamente en 30 segundos).

Cuidadosamente, el sobrenadante, utilizando una micropipeta, se descarto.

Las SA-PMPs se lavaron tres veces con SSC 0.5X (300 μ l por lavado). En cada ocasión las partículas paramagnéticas de Streptavidin (SA-PMPs) se resuspendieron por agitación suave del tubo hasta dispersar las partículas, después utilizando un soporte magnético, todas las SA-PMPs se colectaron en la pared del tubo (aproximadamente en 30 segundos). Cuidadosamente, el sobrenadante se removió. Y las SA-PMPs lavadas se resuspendieron en 100 μ l de SSC 0.5X

6.2.4.3. *Captura y lavado de los híbridos oligo (dt)-mRNA.*

El contenido de la reacción RNA-OligodT se adiciono, utilizando una micropipeta, al tubo que contenía las SA-PMPs lavadas. Esta mezcla se incubo a temperatura ambiente por 10 minutos. Mezclando por inversión cada minuto.

Las SA-PMPs son capturadas utilizando el soporte magnético, las partículas se colectan y el sobrenadante se retiro sin perturbar la pastilla de SA-PMPs.

Las partículas se lavaron cuatro veces con SSC 0.1X (300 µl por lavado) agitando gentilmente hasta que todas las partículas se resuspendieron nuevamente, después del lavado final, se eliminó tanto sobrenadante como fue posible, cuidando siempre de no tocar las partículas.

6.2.4.4. Elusión del mRNA

La pastilla final de SA-PMPs se resuspendió, por agitación ligera del tubo, en 100 µL de agua libre de RNasas.

Las SA-PMPS se colectan magnéticamente, de la forma ya descrita, y el mRNA eluído fue transferido a un tubo estéril libre de RNasas.

El paso de elusión se repitió utilizando 150 µL de agua libre de RNasas. El paso de captura fue repetido. Este eluído se colectó en el tubo del mRNA enjuagado (volumen total 250 µl).

6.2.4.5. Determinación de la concentración y pureza del mRNA

La concentración y pureza del mRNA eluído se determinó por espectroscopia. Como se describió anteriormente.

6.2.5. Diseño de oligonucleótidos (Primers).

En este trabajo los oligonucleótidos se diseñaron con el programa de diseño de oligonucleótidos proporcionado en el sitio <http://workbench.sdsc.edu/> tomado como molde la secuencia del cDNA de MIPS de hoja maíz reportado en la base de datos NCBI (AF056326). Se diseñaron dos diferentes juegos de oligonucleótidos, uno para amplificar toda la secuencia del cDNA y otro para amplificar solo el fragmento conteniendo las cuatro regiones conservadas de la MIPS (16, 29). Los parámetros termodinámicos de los oligos se analizaron en la dirección web <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>.

En la tabla 2 se muestran los oligos diseñados y en la figura 5 la secuencia del molde dónde hibrida cada uno de ellos. Teóricamente, el primer par de oligos permite la amplificación de un fragmento de 1052 pb. Desafortunadamente, con estos oligos no logramos amplificar el fragmento que esperábamos. El segundo juego de oligonucleotidos diseñado permitió la amplificación de un fragmento de 828 pb. Este fragmento, posteriormente, fue insertado en el vector de clonación pGEM-T Easy Vector T7, para su clonación.

6.2.6. *Clonación e identificación del producto amplificado.*

6.2.6.1. *Síntesis del cDNA*

La formación de una cadena sencilla de DNA por complementariedad de bases a partir del mRNA (cDNA) requiere el uso de secuencias de oligos comerciales o el uso de oligonucleotidos específicos y la transcriptasa reversa para catalizar la reacción. La amplificación del transcrito se realizó bajo las siguientes condiciones: En el caso de RNA total se tomaron 5 µg, mientras que para el caso de mRNA, debido a que este representa del 3 al 5 % de RNA total y se partió de 1 mg del mismo, se tomaron 7 µL del volumen obtenido después de purificado, más 1 µL de Oligo dT 12-18 (Invitrogen), 1 µL de dNTP's 10 µM y agua estéril libre de RNasas hasta un volumen final de 12 µL, esta mezcla se colocó en un Heat Block a 65 °C por 5 minutos, transcurrido este tiempo se agregaron 4 µL de First Strand Buffer, 2 µL de Ditioneitol y 1 µL de agua estéril libre de RNasas, se llevó la mezcla a 42 °C por espacio de 2 minutos y finalmente se le agregó 1 µL de SuperScript Reverse Transcriptase (Todos los reactivos de Invitrogen) y se llevó a 42 °C por espacio de 50 minutos para realizar la amplificación de todos los mRNA's presentes en el extracto (26).

6.2.6.2. *Amplificación del transcrito, condiciones del programa para la PCR*

Para determinar las condiciones de amplificación del transcrito se realizaron diferentes pruebas de las condiciones de amplificación, las cuales incluyen desde la modificación de las temperaturas de alineamiento, así como las concentraciones de los reactivos y la variación de la cantidad de cDNA utilizado como templado. Las distintas condiciones manejadas se pueden observar en el anexo 1.

Las condiciones ideales encontradas fueron:

Tabla 2: Condiciones de amplificación del transcrito de MIPS				
Condiciones				
	mRNA	Tiempo	Temperatura	Ciclos
CDNA	7	5 min	94	
RVS (10mM)	0.625	2 min	94	15
Fwd (10mM)	0.625	1 min	68	
MgCl ₂	1.25	2 min	72	
PCR buffer	1.25	5 min	72	
dNTP's	1	A	4	
Taq DNA Polimerasa	0.03			
Agua	13.22			

6.2.6.3. Purificación del producto de PCR.

Para la purificación del producto de PCR se prepararon 30 ml de gel de Agarosa para DNA al 1% (w/v) con TAE modificado (Gel Extraction Kit Genomics, Millipore), más 30 μ L de Bromuro de Etidio, este se dejo correr a bajo voltaje (90 Volts) por 45 min. y se observo en Transiluminador Macrovue UVis-20 Hoefer, la banda resultante (peso eperado 828 pb) fue cortada y se coloco en la columna incluida en el Kit, esta se centrifugo por espacio de 5 min en centrifuga Ependorff Centrifuge 5415C, y para corroborar se toma absorción a 260 y 280 nm, se recuperan al rededor de 50 μ L de líquido.

6.2.6.4. Gel para DNA

30 ml TAE modificado Gel Extraction Kit Genomics, Millipore

0.3 Gramos de Agarosa

30 μ L de Bromuro de etidio

Matraz Erlen Meyer de 250 ml

6.2.6.5. Formación de células competentes

6.2.6.5.1. Medios para la selección de células transformantes:

Composición del Medio LB*		
	1000ml	250 ml
Peptona**	10 g	2.5g
NaCl	5 g	1.25 g
Extracto de levadura	5 g	1.25 g
Agar (medio sólido)	15 g	3.75 g

* Disolver en agua destilada poco a poco. **Se puede sustituir por triptona o caseína. Una vez disuelto esterilizar a 15 lb/cm² por 15 min.

LB mas glucosa (SOC) 30 ml 0.02M estéril (0.108 g de glucosa por 30 ml de medio).

Para congelar las células transformadas se requiere 100 ml de medio LB mas glicerol (15% V/V) estéril, se agregan 15 ml de glicerol estéril a 85 ml de medio LB estéril.

6.2.6.5.2. Medios selectivos:

Después de esterilizar el medio líquido y ya que esté frío, adicionar ampicilina (100 mg/ml) a una dosis de 1µl por mililitro de medio, ya que la ampicilina es termo- sensible.

Para los medios sólidos adicionar, antes de agregar a las cajas de Petri, por cada 25 ml de medio 4 µl de IPTG (Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido) 100 mM y 40 µl de X-Gal (5-Bromo-4Cloro-3-Indoli-β-D-Galactosido [Galactopiranosido]) 100 mg/ml disuelta en N,N-Dimetilformamida. También cuando el medio este a temperatura ambiente pero antes de solidificar.

Medios:

Solución de CaCl₂ 60mM (200 ml)

Matraz 250 ml con 50 ml de medio LB

Matraz de 2 l con 400 ml de medio LB

En la campana de flujo laminar se inocula una colonia de *E. coli* (DH5α) en 50 ml de medio LB y se incuba durante toda la noche a 37^oC con agitación de 250 rpm.

Del matraz de 2 L se toma 1 ml de medio en la campana de flujo laminar y es utilizado como blanco de lectura, en el matraz de 2 L ml se inoculan 4 ml del cultivo del matraz de 50 ml en la campana y se lee su densidad óptica a 590 nm., se dejar crecer a 37^oC con agitación de 250 rpm hasta alcanzar una lectura de densidad óptica de 0.375, posteriormente vaciar el cultivo en 4 tubos

estériles de 250 ml y dejarlos en hielo de 5 a 10 minutos, centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C (Centrifuga Sorvall RC5C Plus, Rotor Sorvall GSA rotor) posteriormente se resuspende el botón con 20 ml de CaCl₂ frío sin pipetear, esta suspensión es centrifugada a 3000 rpm 5 minutos a 4°C, el pellet es resuspendido en 80 ml de CaCl₂ frío y se mantiene por 30 minutos en hielo y posteriormente es centrifugado en las mismas condiciones del paso anterior, la pastilla se resuspende en 5 mililitros de CaCl₂ frío, y se hacen alícuotas de 50 o 100 µl colocándolas en tubos eppendorf de 1.5ml. y se congelan con N₂ líquido finalmente se guardan a -80°C.

6.2.6.6. *Ligado del inserto Ligación de pGEM[®]-T Easy Vector*

Centrifugar brevemente el pGEM y el inserto control de DNA en los tubos para colectar el contenido en el fondo del tubo.

El set-up de la reacción de ligación se describe abajo.

	REACCIÓN ESTÁNDAR	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
Buffer de ligación	5 µl	5 µl	5 µl
PGEM	1 µl	1 µl	1 µl
Producto PCR	X µl	--	-- µl
Inserto control DNA	--	2 µl	--
T4 DNA ligasa	1 µl	1 µl	1 µl
Volumen final	10 µl	10 µl	10 µl

Agitar en Vortex, vigorosamente antes de cada uso, el amortiguador de ligación rápida 2X.

Las reacciones se mezclaron por pipeteo; incubar las reacciones por 1 hora a temperatura ambiente o dejar a 4°C toda la noche.

Las células transformantes que incluyen este vector tendrán coloración azul en el medio LB/IPTG/X-GAL/Amp sólido, si no se incluye dentro de este el rDNA,

si lo incluyen la coloración de la colonia será blanca, ya que se ve interrumpida la secuencia que codifica para la β -Galactosidasa (Gen lacZ), la coloración es debida a la degradación por parte de la β -Galactosidasa hacia el IPTG, el cual reacciona con la X-Gal para dar la coloración azul.

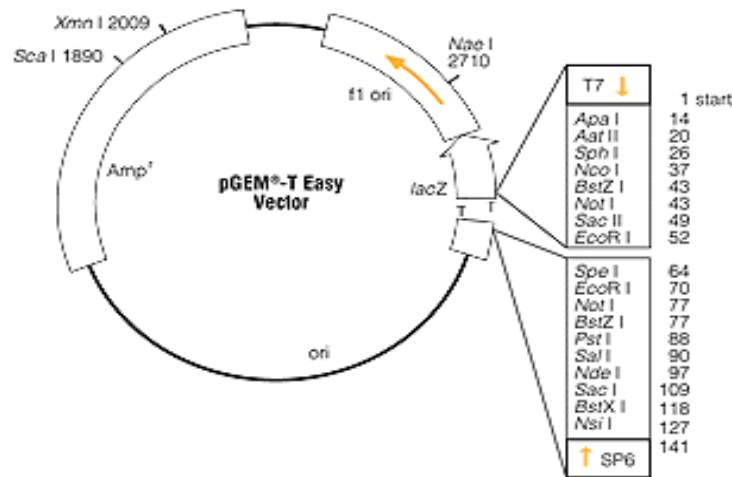


Fig. 5: Mapa y sitio de restricción del vector pGEM-T Easy vector.

6.2.6.7. Transformación de células competentes

Las células competentes se descongelan en hielo (20 a 30 minutos), en la campana de flujo laminar añadir el material genético dentro del tubo eppendorf, con 1 μ l es suficiente aunque depende de la concentración del DNA, el máximo volumen que se puede agregar 1/4 del volumen en el que están las células, el tubo se coloca en hielo por 20 a 30 minutos (0°C) transcurrido este tiempo se sacan y se colocan en el baño María a 42°C por 15 segundos, e inmediatamente se colocan en hielo por 2 minutos, se adiciona 900 μ l de medio SOC a cada tubo eppendorf y se incuban 2 horas a 37°C con agitación (150 rpm).posteriormente es Centrifugado 1 minuto a 14000 rpm (centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415C) al finalizar se eliminar el sobrenadante y se resuspende en 100 μ l de medio SOC, se siembra el volumen total en cajas de

medio LB mas Ampicilina, IPTG y X-Gal, distribuyendo todo el volúmen por la placa hasta la absorción de la mayoría del líquido, esto en la campana. Y se deja crecer a 37°C durante toda la noche.

A la mañana siguiente se seleccionan las colonias blancas de la caja, las colonias de coloración azul son colonias transformadas pero que no contienen dentro del vector de clonación el inserto de rDNA que se desea expresen. Se puede verificar la transformación de las colonias sembrándolas en cajas Petri que poseen las mismas condiciones.

6.2.6.8. Purificación del plásmido

6.2.6.8.1. Miniprep

Una colonia transformada y purificada se inocular en un tubo de ensayo conteniendo medio LB con ampicilina (100 mg/ml por cada ml de medio) y se dejó crecer toda la noche. El plásmido se aisló de estos cultivos, utilizando el protocolo Rapid Plasmid Miniprep System (Marligen Biosciences inc). El total de las células del cultivo se colectó en un tubo eppendorf, centrifugando alícuotas de 1 ml, cada alícuota fue centrifugada por 2 min a 13000 rpm (Eppendorff Centrifuge 5415C). La pastilla de células se resuspendió por pipeteo en 250 µl de solución de resuspensión, y se añadieron 250 µl de solución de lisis (soluciones proporcionadas por el fabricante). El tubo se invirtió suavemente de 5 a 6 veces y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se le añadieron 350 µl de solución de neutralización y se mezcló por inversión de 4 a 6 veces. Se centrifugó por 10 min a 12000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415). El sobrenadante se transfirió a una columna de purificación y se centrifugó por 1 min a 12000 rpm (Eppendorf

Centrifuge 5415C). El sobrenadante resultante se eliminó. Posteriormente se le adicionaron a la columna 500 μ l de solución de lavado, se incubó 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 12000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) el sobrenadante fue eliminado. Enseguida se le adicionaron 700 μ l de una solución de lavado que contenía etanol y se centrifugó por 1 min a 12000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) el sobrenadante fue eliminado. La columna se colocó en un tubo colector y se añadieron 45 μ l de solución de elusión incubándose por 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 12000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) quedando el plásmido purificado en el tubo colector que se almacenó a -20° C, al finalizar se corrió un gel de agarosa para DNA.

6.2.6.8.2. Maxiprep

La cepa transformada se creció en 3 ml de medio LB selectivo (LB más ampicilina 150 mg/ml) por 6 horas. El total de este cultivo se inoculó en un matraz de 2 L conteniendo 500 ml de medio LB con ampicilina (150 mg/ml) y se agitó toda la noche (37° C 150 rpm). El cultivo fue centrifugado a 6000 rpm 10 minutos 4° C (Centrifuga Sorvall RC5C Plus, Rotor Sorvall GSA rotor) utilizando botellas para centrifugación de 250 ml. Las pastillas se resuspendieron con 5 ml de solución 1 (GTE) y se agregaron 10 ml de solución 2 (solución de lisis alcalina). Las botellas se taparon y se agitaron suavemente hasta obtener una solución clara. El contenido de ambos tubos se transfirió a tubo de teflón (50 ml) y se añadieron 7.5 ml de solución 3. El tubo se mezcló por inversión y fue incubado en hielo por 30 minutos. Para separar los residuos celulares se centrifugó a 9000 rpm por 10 minutos a 4° C (Centrifuga Sorvall Super T 21 Rotor SL50T).

El sobrenadante fue colectado en un tubo nuevo y se le adiciono isopropanol frío hasta llenar el tubo. Se guardó a -20°C por 1 hora mínimo, aunque también se puede dejar toda la noche. Posteriormente, el tubo fue centrifugado a 10,000 rpm por 15 minutos a 4°C . El sobrenadante se descartó y la pastilla se dejó secar al aire. Una vez seca, la pastilla se disolvió en 3 ml de agua libre de DNasa y se adicionaron 3 ml de LiCl 5M (enfriado en hielo) se mezcló por inversión. Esta mezcla fue centrifugada a 9000 rpm por 10 minutos a 4°C . El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, conteniendo un volumen igual de isopropanol (aproximadamente 6 ml) se mezcló y los ácidos nucleicos fueron colectados por centrifugación a 9000 rpm por 10 minutos a 4°C . El sobrenadante se decantó cuidadosamente y el tubo fue invertido para que drenara bien. La pastilla seca fue disuelta en 0.5 ml de agua, volumen que se transfirió a un tubo eppendorf. Al cual se adicionaron 10 μl de RNasa (stock 20 mg/ml). Esta reacción se incubó a 37°C por 30 minutos. Para precipitar el DNA plásmidico libre de RNA, Se adicionaron 0.5 ml de solución de NaCl 1.6 M conteniendo PEG 8000 al 13% (w/v), se mezclaron y el plásmido se recuperó por centrifugación a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C en microfuga. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla disuelta en 0.5 ml de agua. La cual se extrajo con 0.5 ml de PCI (Fenol:Cloroformo:Isoamilico [25:24:1]), por agitación en vortex (1 minuto aproximadamente). Para separar las fases se centrifugó a máxima velocidad en la microfuga. La fase acuosa superior se recuperó en un tubo nuevo y se le añadió un tercio de volumen de Acetato de sodio 10 M y 2 volúmenes de Etanol absoluto. Esta mezcla se homogenizó por inversión y fue incubada a -20°C por espacio de 1.5 h. El plásmido se recuperó por centrifugación a 14000 rpm por espacio de 15 minutos a 4°C en centrifuga

Ependorff Centrifuge 5415C. El sobrenadante fue descartado y la pastilla lavada dos veces con etanol al 70% (1ml) frío. En cada ocasión el plásmido fue recuperado por centrifugación (de 2 a 5 minutos a máxima velocidad en microfuga). La pastilla se seco en Speed back y se resuspendió 200 µl de agua.

Soluciones:

Soluciones requeridas para la maxipreparación del plásmido recombinante

Solución 1:	Solución 2*	Solución 3:
Glucosa 50 Mm	NaOH 10 N 1 ml	NaCH ₃ COO•3H ₂ O 3M pH 5.0
EDTA-Na ₂ •H ₂ O 10 mM	SDS 10% 5ml	
Tris •HCl 25mM pH8.0	H ₂ O 44 ml	

*prepara al momento de utilizarla.

6.2.6.9. *Northern Blotting*

6.2.6.9.1. *Transferencia por capilaridad.*

La acción capilar se muestra en la figura 6. En un recipiente de plástico se colocó una base, sobre de ella se colocaron dos papeles filtro de modo que estos estuviesen en contacto con el líquido de transferencia (SSC10X). Previamente, éstos fueron humedecidos en el líquido de transferencia y al ser colocados en la base se eliminaron las burbujas, pasando un tubo de ensaye por encima de los papeles humedecidos. El gel de agarosa se colocó encima del papel húmedo, las burbujas en la superficie de contacto gel-papel húmedo, se eliminaron. El gel se cubrió con un trozo de membrana de Nylon, del mismo tamaño del gel, previamente humedecida en SSC 10X y se eliminaron las burbujas. Posteriormente se colocaron dos pedazos de papel filtro, del mismo tamaño del gel, mojado en SSC 10X y se eliminaron las burbujas. Sobre esto

se colocaron aproximadamente 7 centímetros de papel periódico seco de igual tamaño al del gel y encima se colocó un peso de 500 g extendido sobre toda la superficie del ensamble (un libro). Éste se cubre con papel plástico y se deja transfiriendo de 8 a 16 horas ó toda una noche.

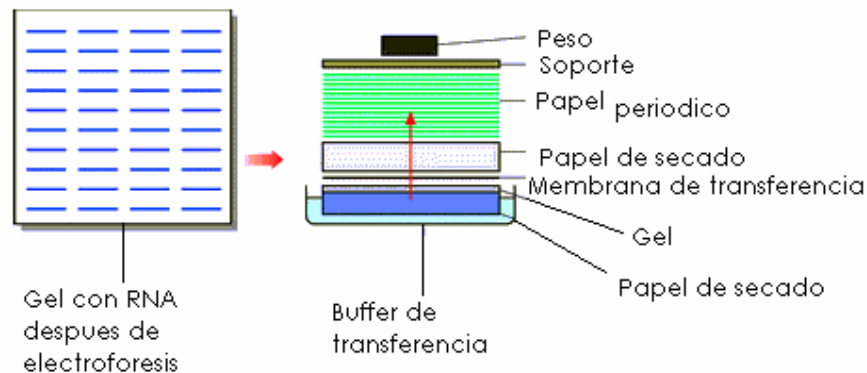


Figura 6: Esquema de transferencia capilar de gel de agarosa a membrana, primer paso para la realización de Northern Blot.

6.2.6.9.2. Entrecruzamiento entre el RNA y la membrana

Transferido el RNA a la membrana, ésta se seca por 15 min a 60 °C, y se introduce a un horno de luz UV. Durante 30 segundos., con lo que el RNA se fija al papel. Posteriormente el filtro se lava con SSC 2X por espacio de 15 minutos con agitación, al finalizar es lavada con agua desionizada 15 minutos con agitación, es teñido con azul de metileno y se agita de 2 a 5 minutos, y posteriormente fue lavada con agua desionizada para eliminar el excedente de colorante presente en la membrana.

6.2.6.9.3. Soluciones para fijar RNA total en membrana.

SSC 20X; NaCl 3M, Citrato de sodio dihidratado 0.3M pH 7.0, 1L

SSC 10 X; 10 ml de SSC 20X mas 10 ml de agua desionizada

Azul de metileno para tinción de RNA 0.03% de Azul de metileno en acetato de sodio 0.3M, pH 5.0

6.2.6.10. *Marcaje de sonda.*

El marcaje de la sonda se realizo con el Kit Nick Translation (Amersham Biosciences) de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante utilizando 1.5 mg del inserto clonado.

6.2.6.11. Purificación de la sonda marcada

A dos tubos eppendorff de 500 μ L se le realizan 3 perforaciones en la parte inferior colocando posteriormente fibra de vidrio hasta cubrir la mitad del tubo y se colocan en un tubo de 1.5 ml, se lava 3 veces con Sephadex G-25 hidratado en TSE (Tris-HCl 10 mM pH 8.3, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM pH 8.0). Adicionar 150 μ L por lavado y centrifugar a 11000 rpm (centrifuga Jouan A14) para empacar. Posteriormente se cargan los 100 μ L de la sonda marcada y se centrifuga 3 minutos a 11000 rpm Jouan A14, se recuperan del orden de 150 μ L, por el remanente de TSE que queda en la fibra de vidrio, se toman 2 μ L y se agregan en papel filtro Whatman GF/A de 2.4 cm de diámetro (cuatro replicas), se deja secar al aire. Dos de los círculos se colocan en un vaso de precipitados (50 mL) conteniendo 10 mL de TCA al 10 % y 1mM de CTP a 4°C durante 10 min. El sobrenadante se decanta y se deshecha como material radiactivo. Se adicionan 5 mL de TCA al 5 % y se dejan sumergidos durante 5 min agitando de vez en cuando. El sobrenadante se decanta como líquido radiactivo y se repite este lavado una vez más. Los discos se lavan con etanol al 70 % y luego con éter. Posteriormente se dejan secar al aire. Éstos al igual que los dos filtros secados al aire y que no fueron tratados se colocan por

separado en viales para contador de centelleo y se agregan 5 ml de líquido de centelleo. La radiactividad en cada filtro se determina en un contador de centelleo BECKMAN LS6000IC. Para determinar el porcentaje de incorporación de marca radiactiva en la sonda, se toma como 100%, la lectura promedio de los discos que no fueron tratados con TCA. El porcentaje de incorporación, se calcula con la lectura promedio de los discos que se colocan a precipitar con TCA. Ésta representa, la cantidad de marca incorporada a la sonda por lo que también se puede calcular las cuentas por minuto por μL (cpm/ μL), así como la actividad específica de la sonda. Es deseable que la radiactividad específica de la sonda sea superior a 1×10^6 cpm / μg de DNA.

6.2.6.12. Bloqueo, hibridación y lavado de la membrana

Después de transferir y entrecruzar el ácido nucleico en la membrana Nylon, el blot es prehibridado., para lo cual la membrana se coloca en una bolsa sellada con 50 ml de solución de prehibridación (PSH) eliminando las burbujas antes de sellar la bolsa, esta se pone en un recipiente con agua dentro de un Baño María a 68°C por 4 horas, este lavado permite la eliminación del azul de metileno de la membrana y el bloqueo de los sitios inespecíficos de la membrana.

6.2.6.13. Soluciones de prehibridación (PSH)

SOLUCIÓN DE PREHBRIDACIÓN E HIBRIDACIÓN	CONCENTRACIÓN STOCK	CONCENTRACIÓN FINAL PSH
BSA	10 %	1 %
EDTA	200 mM pH 8.0	1 mM
Buffer de fosfatos	0.92 M pH 7.2	0.5 M
SDS	20 %	7 %
DNA (OPCIONAL)	-----	-----
Volúmen final	-----	100ml

La sonda se calienta a ebullición por 4 h, transcurrido este tiempo se cambia la solución de prehibridación y se agrega solución fresca con la sonda caliente, la hibridación se realiza por aproximadamente 21 horas a 65°C. Para eliminar la radiactividad inespecífica, la membrana se lavo utilizando una solución SSC 6X adicionando 0.1% de SDS a 65°C, por 5 minutos, posteriormente se determino la cantidad de radiactividad presente en la membrana cuidando que esta no fuese inferior a 450 cpm para obtener bandas definidas.

6.2.6.14. Soluciones de lavado.

SSC 6X: Tomar 30 mL de SSC 20X y llevarlos a 95ml con agua des ionizada agregar 5mL de SDS al 20%.

6.2.6.15. *Auto radiografía*

La membrana hibridada y lavada se envuelve en papel autoadherible y se coloca en un cassette entre dos placas fotográficas Kodak Biomax MR scientific imaging film, esta se dejó exponer ante las dos placas fotográficas por espacio de 15 días a -80°C en un cassette.

7. Resultados y Discusión

7.1. Fuente y calidad del RNA

La amplificación por RT-PCR de un transcrito particular en una mezcla compleja de ácidos nucleicos se facilita cuando como fuente del RNA se utiliza un tejido que exprese el gene en cuestión. Además el tejido seleccionado debe tener características tales que permitan mantener la integridad de los ácidos nucleicos durante el proceso de aislamiento y purificación. Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo se utilizaron diversos tejidos de maíz: embriones germinados, aleuronas inmaduras y hojas de plántulas jóvenes. En todos estos tejidos se ha reportado que la transcripción del gene MIPS está activa (12, 27;). Además como estos tejidos son jóvenes y están en desarrollo, la abundancia de RNAsas sería menor y el tejido por no contener lignina permitiría una homogenización más rápida y sencilla. Efectivamente, estos tejidos presentaron las características antes mencionadas ya que fue posible aislar de ellos RNA de calidad.

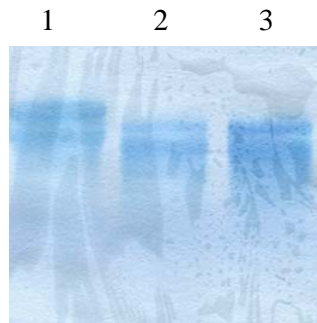


Figura 7: Transferencia de RNA total de gel de Agarosa a membrana de celulosa, el RNA fue teñido con azul de metileno. (1) Hoja de Maíz, (2) capa de Aleurona de Maíz y (3) RNA total de Pool de embriones. Se colocaron 20 microgramos de RNA total por carril. El RNA mostrado no presenta barridos, lo que indica que está íntegro.

En el patrón electroforetico de estos RNAs (Fig 7) se observaron las bandas de los RNAs ribosomales con intensidad similar y poco o ningún barrido. Lo anterior indico que el RNA aislado mantuvo su integridad a lo largo del proceso de extracción y purificación. Sin embargo la pureza y cantidad del mismo fue tejido dependiente. El rendimiento y la pureza (relación 260/280) del RNA total fueron mayores en el pool de embriones germinados que en el obtenido en tejido de hoja y en el de aleurona (Tabla 3). Lo anterior podría deberse a los diversos métodos utilizados en el aislamiento del RNA o a la cantidad del tejido empleado en cada caso. Dado que el RNA aislado de aleurona presentó mayor pureza que el de hoja y en el primer caso se utilizo mayor cantidad de tejido (1 g) que en el segundo (0.09 g) es muy probable que las diferencias en la pureza del RNA aislado de los diferentes tejidos se deba más a la cantidad de tejido utilizada que al método. Por lo que iniciamos la amplificación del transcrito de MIPS utilizando este tejido.

TEJIDO	A ₂₆₀ nm / A ₂₈₀ nm*
Embriones germinados	1.97
Capa de aleurona	1.63
Hoja joven	1.48

*> 1.8 se considera con pureza aceptable para ser utilizados en diversos ensayos *in vitro*

7.2. Diseño de oligonucleotidos

Recientemente en nuestro laboratorio se identifico un fragmento de un transcrito que se expresa durante la germinación de embriones de maíz, cAFLP17 y cuya secuencia se muestra en la Tabla 4.

GGTGATAGGAGGCGACGACTTCAAGAGTGGGCAGACCAAGATGAAGTC T 51 GTGTTGGTTCGATTCCTCGTCGGCGCTGGGA

Utilizando el programa blast, la secuencia del cAFLP17 se comparó con la base de datos EST (expressed sequenced tags) del banco de maíz, (<http://www.maizegdb.org/>), se encontraron las secuencias mostradas en la tabla 5.

	Pares de bases	de identidad	Error (E value)	Tejido
CF029697	465	96 (%)	2e ⁻¹⁷	3 ^a hoja adulta
CD438045	883	94 (%)	6e ⁻¹⁵	Endospermo
CD436583	908	94 (%)	6e ⁻¹⁵	Endospermo

Cada una de las secuencias de EST en la tabla 5 se tradujeron a proteína utilizando el programa de NCBI ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y se compararon mediante el programa proteína-protein blast con el banco de proteínas del NCBI. En todos los casos se encontró que a nivel de

aminoácidos había identidad con MIPS. Una vez asignada la identidad de cAFLP17 se busco un cDNA para está proteína en el banco de nucleótidos del NCBI. Encontrándose la accesión AF056326 (Tabla1) que contiene la secuencia de la proteína que codifica para la MIPS de hoja de maíz. En esta accesión, también están contenidas las secuencias de EST de la Figura 8. Utilizando el programa primer-3 de la pagina de SDSC Biology Workbench (<http://workbench.sdsc.edu/>) y la secuencia AF056326 se diseñaron los dos pares de oligos. El programa produjo varios pares de oligos, de los cuales se escogieron los que amplificaran la secuencia de mayor longitud, no formaran dímeros, ni estructuras secundarias a la temperatura de alineación y que ésta fuese mayor a 55°C (Tabla 6). De acuerdo al programa, en la Tabla 6 se muestra el par de oligos que se diseñaron y mandaron sintetizar así como el sitio dónde alinean en la secuencia AF056326 (Fig 8).

Tabla 6: Secuencias de los oligonucleotidos utilizados para la amplificación por RT-PCR del fragmento de MIPS.

Nombre	Secuencia	Pb	%GC	Tm ^c
FWD MIPS 1 ^a	CAT TCG AAA AGA GGG GAG GA	20	50	61
RVS MIPS 1	GAG GTG GGC TTT ATT CCA GC	20	55	61
FWD MIPS 2 ^b	GGG TGG GGA GGC AAC AAC GGG	21	71	74
RVS MIPS 2	GCC ATC GTT GTT TCC CAA GTG GTT GTA GCT	30	50	74

^aamplifican un fragmento de 1052 pb; ^bamplifican un fragmento de 828 pb; ^cgrados Celsius

A S F L L S L S L A L P R Y L A S H S I
 2 gcctccttctcctcctcactctcgctcgctcgctcgctcgctacctcgcttcgcatto **catt** 61
 R K E G R K G K M F I E S F R V E S P H
 62 **cgaaaagaggggagga**aaggcaagatgttcatcgagagcttccgctcgagagccccac 121
 V R Y G P M E I E S E Y R Y D T T E L V
 122 gtgcggtacggcccgatggagatcgagtcggagtagcgggtacgacacgacggagctggta 181
 H E G K D G A S R W V V R P K S V K Y N
 182 cacgagggcaaggacgggcctcacgctgggtcgtccgcccccaagtccgtcaagtacaac 241
 F R T R T A V P K L G V M L V G W G G N
 242 ttccggaccagaaccgctcccaagctcggggtgatgcttgg **gggtggggagggcaac** 301
 N G S T L T A G V I A N R E G I S W A T
 302 **aacggg**tcacgctgacggctggggtcattgccaacagggaggggatctcatgggagcc 361
 K D K V Q Q A N Y Y G S L T Q A S T I R
 362 aaggacaagggtgcagcaagccaactactacggctcctcaccaggcctccaccatcaga 421
 V G S Y N G E E I Y A P F K S L L P M V
 422 gtcggcagctacaacggggagagatctatgcccgttcaagagcctccttcccatggg 481
 N P D D I V F G G W D I S N M N L A D S
 482 aaccagacgacattgtgttcggaggctgggacattagcaacatgaacctggccgactcc 541
M T R A K V L D I D L Q K Q L R P Y M E
 542 atgaccagggccaaggtgctggatattgacctgagaagcagctcaggccctacatggag 601
 S M V P L P G I Y D P D F I A A N Q G S
 602 tccatggtgcccacttcccggtatctatgaccttcacgcggttaaccagggctct 661
 R A N S V I K G T K K E Q V E Q I I K D
 662 cgcgccaacagtgatcaagggcaccagaagaacaggtggagcagatcatcaaggat 721
 I R E F K E K N K V D K I V V L W T A N
 722 atcagggagttaaggagaagaacaagtggaagatagttgtgtgtggactgcaaac 781
 T E R Y S N V C A A G L N D T M E N L L A
 782 actgaaaggtatagcaatgtgtgctgctcaacgacacgatggagaatctactggca 841
 S V D K N E A E V S P S T L Y A I A C V
 842 tctgtggacaagaacgagggcgaggtatcaccatcaacactatagccattgctgtgtc 901
M E G V P F I N G S P Q N T F V P G L I
 902 atggaggggtgcccgttcatcaatgggagccccagaacaccttggctgggctgatt 961
 D L A I K N N C L I G G D D F K S G Q T
 962 gatcttgctataaaaaaactgcttgattgggtgggacgacttcaagagtgacagacc 1021
 K M K S V L V D F L V G A G I K P T S I
 1022 aagatgaaatctgtcttggtcgatttcttgggt **gctggaataaagcccacc**tcaatc 1081
 V S Y N H L G N N D G M N L S A P Q A F
 1082 **gtgagctacaaccacttgggaacaacgatggc**atgaacctgtctgcccctcaagcattc 1141
 R S K E I S K S N V V D D M V S S N A I
 1142 aggtccaaggagatctccaagagcaactgggtggatgacatgggtctcgagcaatgccatc 1201
 L Y E P G E H P D H V V V I K Y V P Y V
 1202 ctctatgagcccgagcagcatcccgatcatgctgtgtcatcaagtatgtgcccgtacgtg 1261
 G D S K R A M D E Y T S E I F M G G K N
 1262 ggagacagcaagagggctatggacgagtacacctcagagatcttcatgggaggcaagaac 1321
 T I V L H N T C E D S L L A A P I I L D
 1322 accatcgtgctgcaaacacctgtgaggactcgtcctcgcgcacctatcatccttgat 1381
 L V L L A E L S T R I Q L K A E G E D K
 1382 ctgggtgctcctgggtgagctcagcaccaggatccagctgaaagctgagggagaggacaaa 1441
 F H S F H P V A T I L S Y L T K A P L V
 1442 ttccactcctccaccgggtggccaccatcctgagctacctcaccaaggcaccctgggt 1501
 P P G T P V V N A L A K Q R A M L E N I
 1502 ccccctggcacaccgggtgggtaacgctctggccaagcagagggcgatgctggagaacatc 1561
M R A C V G L A P E N N M I L E Y K * A
 1562 atgagggcctgctgggtgggctggccccagagaacaacatgatcctggagtagaagtgagcc 1621
 K W R A L Q R E V S C W K G
 1622 aagtgccgtgcctgcagcgcgaggttagctgctggaagggaac 1665

Figura 8: Alineamiento de la secuencia del gen con la secuencia reportada de proteína, los sitios de hibridación de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del fragmento de 828pb de la MIPS que incluyen los dominios 1 a 4 están señalados en color azul, (6,9). El sitio marcado con rojo corresponde a los oligonucleótidos de 1052 pb, el FWD 1 esta incluido en la región UTR de la secuencia de MIPS. La secuencia marcada en gris indica los aminoácidos de la proteína, el asterisco indica el sitio donde finaliza la traducción a proteína.

7.3. Amplificación del transcrito de MIPS

El RT-PCR se realizó en dos pasos. Primero se sintetizó la cadena sencilla de cDNA y luego, ésta se utilizó como templado para el PCR. En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos. Las bandas obtenidas fueron bien definidas y de diversos pesos moleculares. Aunque ninguna de 1052 pb que es el tamaño del fragmento esperado. El hecho de que se obtuvieran bandas definidas significaba que hubo amplificación, pero no de manera específica, ya que como antes se mencionó la banda de 1052 pb no se detectó. Resultados de este tipo, en otros trabajos se han intentado resolver variando la concentración de cada uno de los componentes de la reacción o modificando las condiciones del programa para correr el PCR (2). Con la finalidad de optimizar las condiciones para amplificar el transcrito de MIPS, en este trabajo se realizaron diversas modificaciones tanto de reactivos como del programa del termociclador, las cuales se describen en el anexo I. Desafortunadamente, ninguna de las modificaciones realizadas mejoró el resultado. En maíz se han reportado siete loci con secuencias homologas a MIPS (21) aunque no se sabe cuántos de éstos están activos. Sin embargo, la existencia de múltiples genes de MIPS permitiría la expresión diferencial de MIPS para las diferentes funciones fisiológicas (11). Lo anterior sugiere la posibilidad de que en embriones en germinación no exista una secuencia de MIPS que contenga los fragmentos 5' y 3' sobre los cuales se diseñaron los oligonucleótidos ya que la secuencia AF056326 fue aislada de la tercera hoja de planta adulta. Por otro lado, la banda de alto PM observada en la figura 9 podría deberse a que en la muestra de RNA existiera escasa abundancia de dicho transcrito. De forma tal

que el exceso de ciclos de la PCR permitiera el alineamiento de los extremos 3'-OH terminales de los oligonucleotidos (2).

RT-PCR realizado a pool de embriones

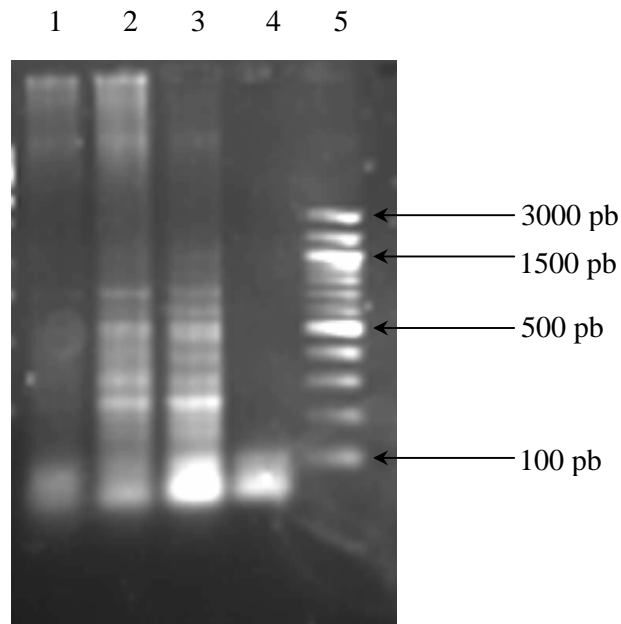


Figura 9: PCR realizado a Pool de embriones con los oligos F1 y R1 (carriles 2 y 3), la especificidad mostrada es poca, se pueden observar fragmentos de diferentes pesos moleculares. Carriles 1, 4 blanco de agua; carriles 2 y 3 productos amplificados con F1 y R1; carril 5 marcador de peso molecular de 100 a 3000 pb. La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: 1 μ L de cDNA, 0.25mM de cada oligo, 2 μ L de Buffer de PCR, 5mM de $MgCl_2$ (Todos de Invitrogen); las condiciones del termociclador fueron: 5 min. 94°C; y 30 ciclos de las siguientes condiciones: 2 min. 94°C (en este momento se agrega la enzima Taq DNA pol) , 2 min. 58°C, 1 min. 72°C; y finalmente 5 min. 72°C y 10 min. a 4°C.

Tomando en cuenta lo anterior y la evidencia de que el gene de la MIPS podría ser tejido y estadio de desarrollo específico (14, 15) se decidió diseñar la segunda pareja de oligos, para amplificar solo las secuencias consenso de la MIPS (Tabla 6). Esta estrategia tendría la ventaja de generar una sonda complementaria a cualquiera de los genes que se expresara en cualquiera de los tejidos. Además los dominios conservados de MIPS comprenden del orden de 800 pb, por lo que la longitud de la sonda aún sería adecuada. En la Tabla 7 se muestra el alineamiento de la MIPS en diferentes organismos, mientras que

el alineamiento de los dominios conservados en la secuencia AF056326 se muestra en la Tabla 1. Utilizando estos oligonucleotidos se corrió un RT-PCR con RNA total de los diversos tejidos, ya mencionados. Se probaron diferentes ciclos de amplificación para evitar la posible generación y amplificación de templados quimera. En la Figura 10 A y 10 B se muestran estos resultados.

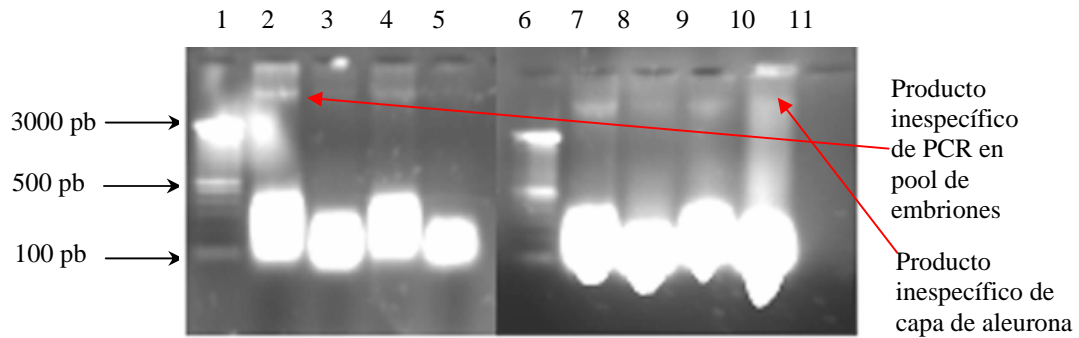


Figura 10: A; Cinética de PCR para pool de embriones y capa de aleurona en desarrollo. 1 y 6 Marcadores de peso molecular, pool de embriones 2, 4, 7 y 9; aleuronas en desarrollo 3, 5, 8 y 10; 10 ciclos de PCR 2 y 3; 20 ciclos de PCR 4 y 5; 30 ciclos de PCR 7 y 8, 40 ciclos de PCR 9 y 10. Los productos obtenidos son inespecíficos, esto se puede deber a un número excesivo de ciclos de PCR, los productos mayoritarios varían en peso de 100 pb a 500 pb, sobresale el producto mayoritario de mas de 3000 pb.

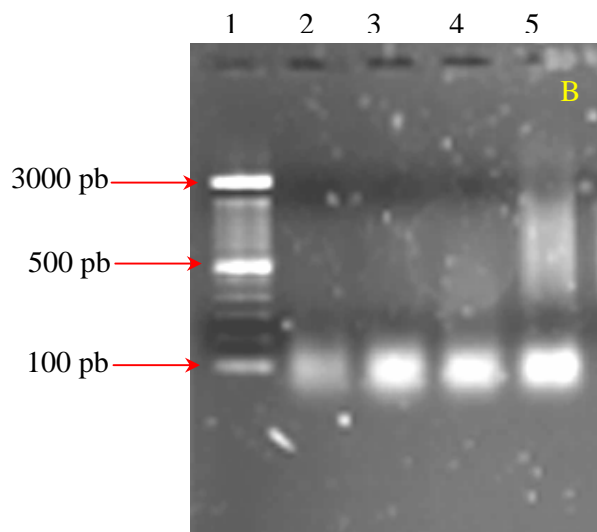


Figura 10: B; Cinética de PCR para RNA total de hojas jóvenes de Maíz; 1, Marcador de peso molecular; 2 a 5 ciclos 10, 20, 30, 40, carriles 4 y 5, barrido debido a un numero excesivo de ciclos de PCR. Las condiciones de PCR para ambos experimentos fueron: 94°C por 5 min.; 40 ciclos de 94°C 1 min.; 68°C 30 seg.; 72°C por 30 seg.; al finalizar los ciclos se dejo a 72°C 2 min.; 4°C por tiempo indefinido. La reacción contenía 3 μ L de cDNA, 1.5 μ L de Buffer de reacción 50X (Invitrogen), 2.5 mM de MgCl₂, 400 μ M de dNTP's, 250 μ M de cada uno de los oligos y 0.15 unidades de Taq DNA polimerasa, (Invitrogen).

Al concluir los primeros 10 ciclos del PCR, en el “pool” de embriones, se observó la formación de una banda que está muy por encima del peso esperado para el fragmento amplificado. Este resultado sugiere que antes de los primeros 10 ciclos, la amplificación del transcrito ya concluyó. Los ciclos posteriores permiten la formación de templados quimera y su amplificación, por esto las bandas de alto peso molecular. Además, se está llevando a cabo una amplificación inespecífica, dado el barrido de DNA observado entre 100-500 pb. En capa de aleuronas el producto de alto peso molecular se inició a partir de los 30 ciclos. En este caso, al igual que en hoja se detectó producto amplificado de entre 100-500 pb. En todos los casos el producto de 100-500 pb indica que hay amplificación inespecífica. El hecho de que en los tejidos, con excepción de hoja se haya formado DNA de alto peso molecular indica que la

cantidad del transcrito en el RNA total es poco abundante. Aunque su abundancia fue mayor en aleurona que en “pool” de embriones y este a su vez que en hoja. Esto último no es sorprendente puesto que en hoja además del RNA citoplásmico se aísla también el RNA del cloroplasto. Con la finalidad de demostrar que la interpretación de que el producto de RT-PCR de alto peso molecular contenía varias copias del fragmento de 800 pb se mandó secuenciar. Desafortunadamente, la secuenciación no pudo realizarse por problemas técnicos.

7.4. Amplificación por RT-PCR del mRNA de Pool de embriones

En base a estos resultados y con la finalidad de incrementar la abundancia del transcrito de MIPS en la fuente de RNA para la realización del RT-PCR se aisló mRNA del “pool” de embriones. Este tejido se utilizó como fuente del mRNA y no la aleurona porque en el primero se obtuvo un mayor rendimiento y calidad de RNA total (Tabla 3). Para evitar la asociación inespecífica de los oligos con el cDNA, los oligos y la taq polimerasa se adicionaron a 94 °C. En la Fig 11 se muestra el resultado de la primer cinética de amplificación por RT-PCR realizada con mRNA del pool de embriones. La corroboración de esta cinética se realizó con una segunda amplificación de una cinética, los resultados se muestran en la figura número 12

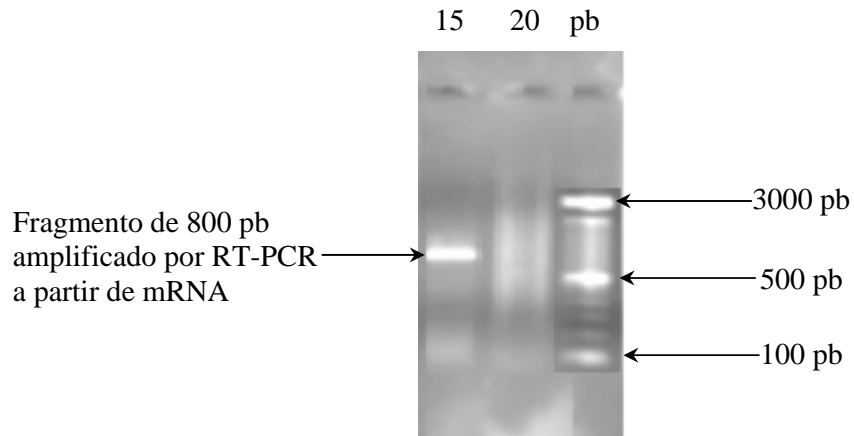


Fig. 11: Cinética de amplificación del transcrito de MIPS, se observa la aparición del fragmento a los 15 ciclos de la cinética, una posterior prueba se realizó bajo las mismas condiciones.

Se obtuvo una banda del tamaño esperado a los 15 ciclos de amplificación, la prueba se realizó por triplicado, cada una de las reacciones contenía la misma cantidad de cada uno de los reactivos.

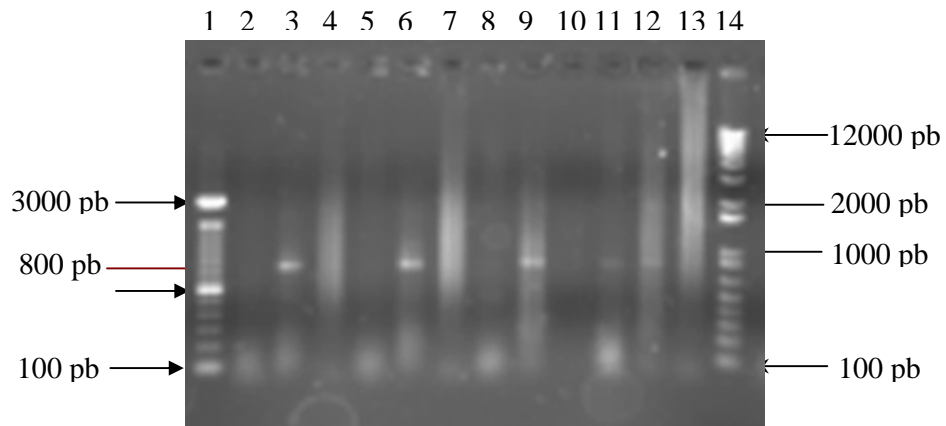
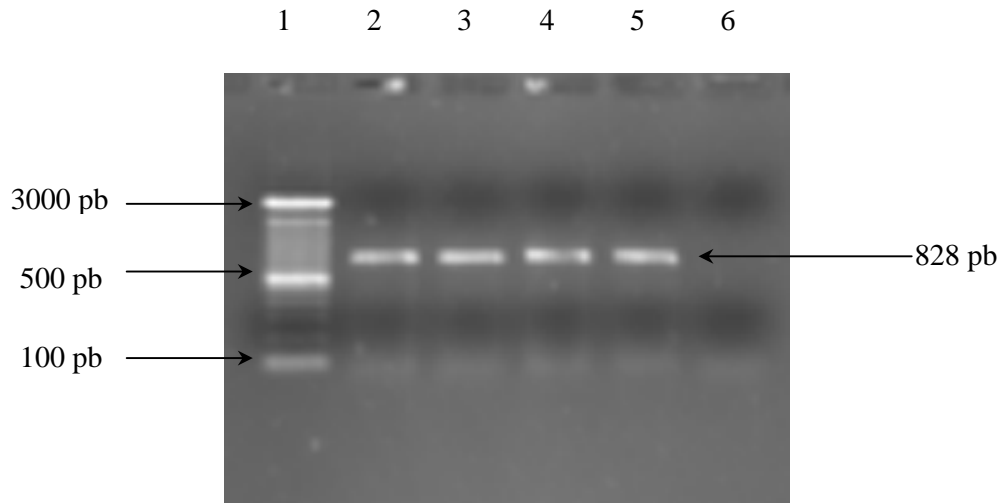


Figura 12: Cinética de amplificación del fragmento de 800 pb. El carril número 1 corresponde a la escalera de marcadores de 100 pb el último carril corresponde al marcador de 1 Kb, se observa que el fragmento esperado se amplifica a los 15 ciclos de PCR. Carriles número 2, 5, 8, 10 corresponden a 5 ciclos, carriles 3, 6, 9 y 11 corresponden a 15 ciclos de PCR y los carriles 4, 7, 10 y 13 corresponden a 25 ciclos de PCR.

Después de determinar el número de ciclos a los cuales se obtiene una buena amplificación del transcrito se realizó una amplificación de este pero solo con 15 ciclos obteniendo en cuatro ocasiones el mismo resultado, lo que nos indicó que se encontraron las condiciones óptimas para la amplificación del transcrito



(Fig. 13)

Fig. 13: Amplificación por PCR del fragmento de 800 pb. Carril número 1 marcador de peso molecular, los demás carriles corresponden a la amplificación del fragmento, el carril número 6 corresponde a un control de agua, las condiciones de amplificación son las mismas que las de la figura anterior.

7.5. Clonación del transcrito.

Después de haber obtenido las condiciones ideales para la amplificación del fragmento este se insertó en el vector de clonación pGemT-Easy vector y posteriormente fue incorporado en células competentes para su clonación, de acuerdo al protocolo ya descrito, de las células transformantes se seleccionaron 15 colonias de coloración blanca. Las cuales pasaron por dos ciclos de selección en cajas Petri a 37°C. De estas, en el segundo ciclo de selección, nueve de las colonias seleccionadas se tornaron azules, indicando la pérdida del plásmido recombinante.

Tabla 7: Resultado de la resiembra de las colonias seleccionadas.

TUBO	A/B	TUBO	A/B
1	B	9	A
2*	A/B	10	B
3	A	11	A
4	A	12	A
5	B	13	B
6	A	14	A
7	B	15	A
8	B		

A: significa coloración Azul, B: es coloración blanca. *Comenzo con coloración blanca, posteriormente se torno de azul.

Las colonias que mostraron coloración blanca y no cambiaron posteriormente de color se transfirieron a medio LB más Glicerol y se congelaron en Nitrógeno líquido manteniéndolas posteriormente a -80°C para su conservación.

De éstas se selecciono una de las colonias (la colonia numero 7) para determinar la presencia del inserto en el vector de clonación. De un cultivo fresco (ver material y métodos) se purifico el plásmido mediante el kit de purificación Rapid Plasmid Miniprep System (Marligen Biosciences inc.) Como se puede observar en la figura 14 el fragmento de 800 pb incrementa el peso del vector a más de 3000 pb.

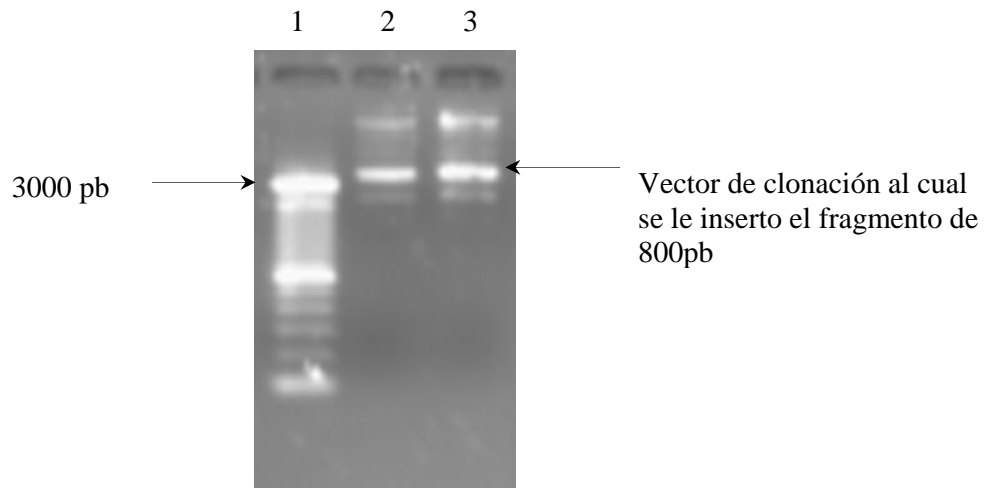


Figura 14: Purificación del vector pGemT-Easy vector mas el inserto de 800pb. Carril 1, Marcador de peso molecular ; carril 2: 3 µl del producto purificado; carril 3: 5 µl del mismo.

7.6. Digestión del Vector

Para corroborar la presencia del fragmento en el vector se realizó una Maxipreparacion de la cepa número 7 y una posterior digestión del vector con la enzima de restricción Eco RI, obteniéndose el vector y el fragmento esperado (Figura 15).

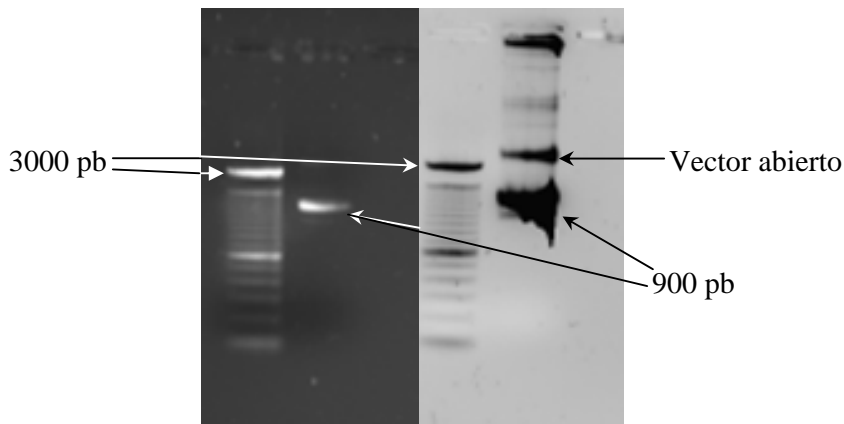


Fig. 15: Digestión del vector de clonación pGem T-easy vector, se observan dos fragmentos. Fragmento de 900 pb Fragmento de MIPS que ha sido liberado del vector de clonación, el fragmento de la parte superior corresponde al vector abierto.

7.7. Secuenciación.

El plásmido recombinante se purificó del gel y se mandó secuenciar (instituto de fisiología celular de la UNAM), utilizando el oligo del promotor T7, para iniciar la síntesis de la secuencia de interés. La secuencia obtenida se observa en la figura 16. Llama la atención que a partir de la base 141 abundan las bases no identificadas. Esto podría deberse a que se utilizó una gran cantidad de nucleico para la secuenciación. Esto se evita si se utiliza una menor cantidad de nucleico en la secuenciación (dilución del templado 2 o 3 veces)

(50)

```
GGCCNGGGAGGNAAGAACGAGGTCCACGCTGANGGNTGGGGTCATTGCCAACATTTAGGGGACCTCATGG
GCGACCAAGGACAAGGGTGAGGCATGCCAACTACTACGGNTCCCTCACCCANGCTTCACCATCAGAGTAG
GCAGNTACAANNNGGAGGAGATNTATGCGCCCGTTNAAAGAGNCTCCTTACCCATGGNGAACCCANTANTN
ANNTCGTGTNANGANGCNTGTTTANATCTNTTNGCNGTATCCTGGANAGATGTNATTNACCNTTTTTTTT
NTAGAGACTNTGACGTTCTATCCTGTCAANAANATAGANNCTGGNANNANTANNANTGTNAATCTNA
```

Fig. 16: Secuencia obtenida del proceso de secuenciación automático realizado en el instituto de Fisiología celular de la UNAM, la letra N indica que no se pudieron definir correctamente estos nucleótidos.

Mediante un Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), esta secuencia se alineo con la reportada para hoja de Maíz (numero de accesoión AF056326.1; Figura 17), así como con el transcrito reportado para MIPS en otras especies (Tabla 7). La similitud entre ellas es alta ($E > 10^{-50}$), lo que sugiere que se trata de un fragmento del transcrito de MIPS que contiene los dominios conservados de esta proteína.

Tabla 8: Alineación múltiple del fragmento secuenciado con otras fuentes vegetales y animales, el número del exponente indica la similitud, a menor espectancia es mayor el parecido.

ORGANISMO	GEN	SIMILITUD ESPECTANCIA	NÚMERO DE ACCESIÓN GENBANK
<i>Zea mays</i>	Myo- inositol-1-phosphate synthase mRNA	3 e-103	AF056326.1
<i>Xerophyta viscosa</i>	Myo-inositol-1-phosphate synthase INO1 mRNA	3 e-63	AY323824.1
<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>	RINO1 mRNA for myo-inositol phosphate synthase	3e-63	AB012107.1
<i>Porteresia coarctata,</i>	inositol 1-phosphate synthase (PINO1) gene	6e-61	AF412340.1
<i>Zea mays</i>	Myo-inositol 1-phosphate synthase gene, complete cds	1e-59	AF412340.1
<i>Zea mays</i>	Myo-inositol 1-phosphate synthase gene	1e-59	AF323175.1
<i>Lolium perenne</i>	myo-inositol phosphate synthase mRNA	1e-59	AY154382.1
<i>Hordeum vulgare</i>	myo-inositol 1-phosphate synthase mRNA	4e-56	AF056325.1

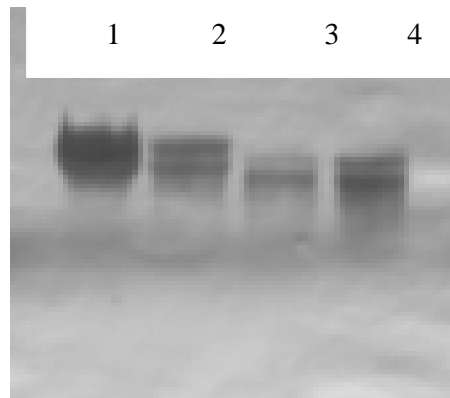
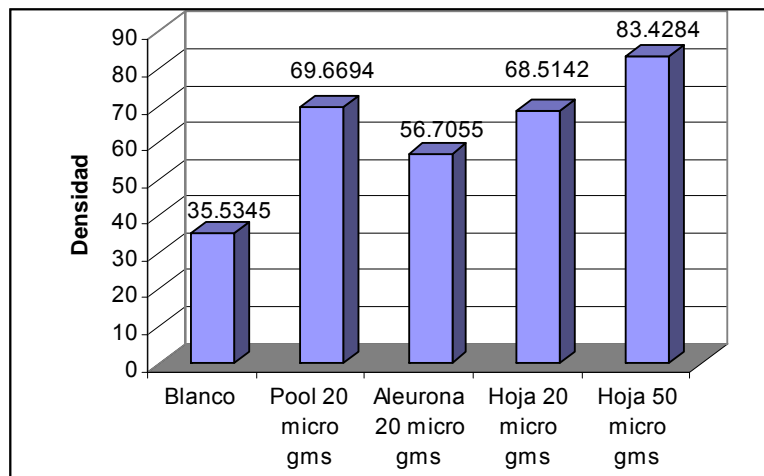


Figura 18: RNA total transferido a membrana de Nylon: carril 1 50 g RNA total de Hoja; Carril 2, 20 g de RNA total de Hoja, Carril 3, 20 g RNA total de capa de Aleurona; Carril 4, 20 g de RNA total de Pool de embriones.

Lo anterior fue verificado, cuantificando la intensidad de ambas bandas con el programa Quantity one, se obtuvo una coincidencia entre los dos métodos (grafica 1).



Grafica 1; Análisis densitométrico realizado a la membrana de Nylon con el RNA total transferido, se observa que las cantidades de RNA total de pool de embriones capa de aleurona y hoja (20 g) son similares.

En la segunda etapa se marcó la sonda con $\alpha[P^{32}]$ dCTP. La actividad específica ($>10^7$ cpm / μ g de DNA) indicó que la sonda se marcó de manera adecuada para ser utilizada como sonda (48).

La tercera etapa consistió en la hibridación de la sonda y el RNA unido al filtro de Nylon. Las condiciones para esta hibridación fueron estrictas ya que la hibridación se realizó a 65 °C y el lavado fue con baja fuerza iónica y 55 °C.

En la Fig. 19 se muestra el resultado. La señal más intensa se observó en el carril conteniendo 50 µg de RNA aislado de hoja y en menor proporción en el "pool" de embriones. El no detectar señal en el carril donde se cargó el RNA aislado de aleurona no resulta sorprendente (carril 2 fig. 19), pues estaba degradado (ver fig 18), pero si llama la atención el no detectar señal en el carril con 20 µg de RNA de hoja (carril 3, fig 19). Los resultados anteriores sugieren que la abundancia del transcrito de MIPS fue mayor en RNA aislado de "pool" de embriones que en RNA aislado de hojas (Fig 19; carril 1, 20 µg de RNA; carril 4, 50 µg de RNA). En cuanto a la falta de señal con menor cantidad de RNA de hoja (Fig 19; carril 3 vs. 4), podría deberse a que no hubo transferencia adecuada del RNA de este carril (burbuja) ya que el filtro de nylon utilizado para cuantificar el RNA (datos no mostrados) fue diferente del utilizado para la hibridación (Fig 19), aunque la muestra para tomar las alícuotas fue la misma.



Fig. 19: Auto radiografía de las muestras de RNA total de los tejido seleccionados, carriles; 1, RNA pool de embriones; 2, RNA de capa de aleuronas, 3 y 4, RNA hojas jóvenes; en los carriles 1 a 3 se colocaron 20 g de RNA total, en el carril 4 se colocaron 50 g de RNA total.

8. Conclusiones

1. La abundancia del transcrito para MIPS es mayor en el “pool” de embriones que en hoja o capa de aleurona en desarrollo, por lo cual es el tejido más viable para la extracción del material genético y la posterior clonación del transcrito.
2. El fragmento clonado de MIPS fue diseñado a partir de los dominios estructurales de las enzimas reportadas.
3. De un “pool” de embriones de maíz se clonó un fragmento del transcrito que codifica para la MIPS. Este fragmento puede ser utilizado como sonda.

Bibliografia

1. Berridge MJ, Irvine RF (1998) **Inositol phosphates and cell signalling.** Nature, 341: 197-204.
2. Bell DA, DeMarini D (1991) **Excessive cycling converts PCR products to random length higher molecular weight fragments.** Nucleic Acids Research, 19: 5079
3. Bohnert HJ, Nelson DE, Jensenay RG (1995) **Adaptations to environmental stresses.** The Plant Cell, 7: 1099-1111
4. Chauvin R, Theodore G, Michael D (2004) **Characterization of the expression and regulation of genes necessary for myo-Inositol biosynthesis and transport in the seminiferum epithelium.** Biology of reproduction, 70 : 744-751
5. Chomczynski P (1992) **One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA.** *Analytical Biochemistry*, 201: 134–139
6. Cultberson MR, Donahue TF, Henry SA, (1976) **Control of inositol biosynthesis in *Saccaromyces cerevisiae*. Properties of a repressible enzyme system in extracts of wild type (Ino⁺) cells.** Journal of Bacteriology, 126: 232-242
7. Dieffenbach CW, Lowe MJT, Dveksler SG (1995) **General Concepts for PCR Primer Design.** En Dieffenbach CW, Dveksler SG (eds) PCR primer, a laboratory manual. pp 133-142; Cold Spring Harbor , laboratory press.
8. Epstein E, Cohen JD, Bandurski RS (1980) **Concentration and metabolic turnover of indoles in germinating kernels of Zea.** Plant Physiology, 65: 415-421
9. Gross W, Boss WF, (1993) **Insoitol phospholipids and signal transduccion.** En: DPS Verma (ed), Control Plant Gene Expression. CRC Press, Boca Raton, FI, pp 17-32
10. Hamly DH (1932) **Softening of the seeds of Melilotus alba.** *Bot. Gaz.*, 93: 345-375
11. Hegeman CE, Good LL, Grabau EA (2001) **Expression of D-myo-inositol-3-phosphate synthase in soybean. Implications for phytic acid biosynthesis.** Plant physiology, 125: 1941-1948

12. Hitz DW, Carlson JT, Kerr PS, Sebastian SA (2002) **Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds.** *Plant Physiology*, 128: 650-660
13. Hoffman-Ostenhof O, Pittner F (1982) **The biosynthesis of myo-inositol and its isomers.** *Canadian Journal of Chemistry*, 60:1863-1871.
14. Ishitani M, Majumder AL, Bornhouser A, Michalowski CB, Jensen RG, Bohnert HJ (1996) **Coordinate transcriptional induction of myo-inositol metabolism during environmental stress.** *Plant Journal*, 9: 537-548.
15. Jae-An C, Un-Ho J, Jin-Woo L (2003) **Isolation and characterization of a myo-inositol 1-phosphate synthase cDNA from developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds: functional and differential expression, and salt-induced transcription during germination.** *Planta*, 216: 874-880
16. Johnson MD (1994) **The *Arabidopsis thaliana* myo-Inositol Phosphate Synthase (E.C. 5.5.1.4).** *Plant Physiology*, 105: 1023-1024
17. Johnson MD, Wang X (1996) **Differentially expressed forms of 1L-myoinositol-1-phosphate synthase (E.C. 5.5.1.4) in *Phaseolus vulgaris*.** *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 17215-17218
18. Johnson MD, Henry SA (1998) **Biosynthesis of inositol in yeast: primary structure of myo inositol 1-phosphate synthase (E.C. 5.5.1.4) and functional analysis of its structural gene, the INO1 locus.** *The Journal of Biological Chemistry*, 264: 1274-1283
19. Johnson MD, Sussex IM (1995), **1L-Myo-inositol 1-phosphate synthase from *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Physiology*, 107: 613-619
20. Kowalczyk S, Bandurski RS (1991) **Enzymic synthesis of 1-O-(indol-3-ylacetyl)-f-D-glucose purification of the enzyme from *Zea mays*, and preparation of antibodies to the enzyme.** *The Biochemical Journal*, 279: 509-514
21. Larson SR, Raboy VK (1999) **Linkage mapping of maize and barley myo-inositol 1-phosphate synthase DNA sequence: correspondence with a low-phytic acid mutation.** *Theoretical Applied Genetics*, 99: 27-36
22. Lehle L, Tanner W, (1973) **The function of myo-inositol in the biosynthesis of raffinose.** *European Journal of Biochemistry*, 38: 103-110

23. Loewus FA, Loewus MW, (1983) **Myo-inositol: its biosynthesis and metabolism**. Plant Physiology, 34: 137-161
24. Loewus FA, Murthy PPN (2000) **Myo-inositol metabolism in plants**. Plant Science, 150: 1-19
25. Luque J, Herráez AI (2001) **Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética**. En: Ediciones Harcourt, España.
26. Martínez-Silva AV (2006) **Clonación de genes inducidos durante la germinación del maíz**. Tesis de Maestría, UNAM
27. Majumder AL. Anirban C. Krishnarup GD. Manoj M (2003) **Diversification and evolution of L-myo-inositol 1-phosphate synthase**. FEBS Letters, 553: 3-10
28. Majumder A. Johnson MD. Henry AS (1997) **1L- myo-inositol-1-phosphate synthase**. Biochimica et Biophysica Acta, 1348: 245-256
29. Mizobuchi-Fukuoka R, Yoshida KT, Naito S, Takeda C, (1996) **Cloning of a gene that is specifically expressed during somatic and zygotic embryogenesis in rice**. Breed Science, 46: 35-38.
30. Munnik T, Irvine RF, Musgrave A (1998) **Phospholipid signalling in plants**. Biochimica et Biophysica Acta, 1389: 222-272
31. Nelson DE, Rammesmayer GJ, Bohnert H (1998) **Regulation of cell-specific inositol metabolism and transport in plant salinity tolerance**. The Plant Cell, 10: 753-764
32. Ortega ME (1988) **Inmunodetección de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en ejes embrionarios de maíz en germinación**. Tesis de licenciatura, UNAM
33. Perera IY, Heilmann I, Boss WF (1999) **Transient and sustained increases in inositol 1,4,5-trisphosphate precede the differential growth response in gravistimulated maize pulvini**. Plant Biology, 96: 5838–5843
34. Parthasarathy L, Vadnal RE, Parthasarathy R, Devi CS (1994) **Biochemical and molecular properties of lithium-sensitive myo-inositol monophosphatase**. Life science, 54: 1127-42
35. Raven PH, Evert RF (1989) **Biology of Plants**. En: G. B. Johnson (ed.) Worth Publishers, Nueva York, PP 685
36. RayChanduri A, Hait NC, DasGupta S, Bhaduri TJ, Deb R, Majumder AL (1997) **L-myo-inositol 1-phosphate synthase from plant sources**. Plant Physiology, 115: 727-736

37. Shukla S, VanToai TT, Pratt RC (2004) **Expression and nucleotide sequence of INS (3) P₁ synthase gene associated with Low-phytate kernels in maize.** *Agricultural and food chemistry*, 52: 4565-4570.
38. Simon EW (1984). **Seed Physiology.** Academic Press. Vol. 2, pp568
39. Shears SB (1996) **Inositol pentakis- and hexakisphosphate metabolism adds versatility to the actions of inositol polyphosphates. Novel effects on ion channels and protein traffic.** *Subcell Biochemistry*, 26: 187-226
40. Smart CC, Fleming AJ (1993) **A plant gene with homology to D- myo-inositol-3-phosphate synthase is rapidly and spatially upregulated during an abscisic acid induced morphogenic response in *Spirodela polyhriza*.** *Plant Journal*, 4: 279-293
41. Smith MR, Devine CS, Cohn SM, Leiberman MW (1984) **Quantitative electrophoretic transfer of DNA from polyacrylamide or agarose gels to nitrocellulose.** *Analytical Biochemistry*, 137: 120–124
42. Vaughan JG (1970) **Structure and Utilization of Oilseeds.** Chapman and Hall LTD. Londres, Great Britain
43. Wang X, Johnson MD (1996) **An isoform of *L-myo-inositol 1-phosphate synthase (E.C. 5.5.1.4)* from *Phaseolus vulgaris* (accession no U38920) (PGR 95-121).** *Plant Physiology*, 110: 336
44. Yoshida KT, Naito S, Sakata M, Takeda G (1994b) **cDNA cloning of regeneration-specific genes in rice by differential screening of randomly amplified cDNA's using RAPD primers.** *Plant Cell Physiology*, 35: 1003-1009
45. Yoshida KT, Wada T, Koyama H, Mizobuchi-Fukuoka R, Naito S (1999) **Temporal and spatial patterns of accumulation of the transcript of myo-inositol-1-phosphate synthase and phytin containing particles during seed development in Rice.** *Plant Physiology*, 119: 65-72
46. http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/146/htm/sec_5.htm. consultada 18/ene/05.
47. http://els.wiley.com/els/subscriber/article/article_main.asp?sessionid=51f344ccd6954a92&aid=A0000997#A0000997C014. consultada 20/jun/06
48. Promega, Technical Manual PolyAtract®mRNA Isolation Systems
49. ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / & 2002 Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group / www.els.net

9. ANEXOS

9.1. ANEXO I

Con la finalidad de evitar la degradación del RNA, se decidió sintetizar cDNA del RNA total utilizando oligo-dt como iniciador específico de la transcriptasa reversa para copiar al mRNA. Esto es posible porque los transcritos de MIPS, al igual que los mRNA de eucariotes, contienen hacia el extremo 3' un fragmento de 200 a 300 adeninas. El cDNA obtenido es tan poco que no se cuantificó ni se le determinó pureza.

En la PCR inicial se utilizaron las condiciones descritas en la tesis de maestría de Martínez (2006; Tabla 1A).

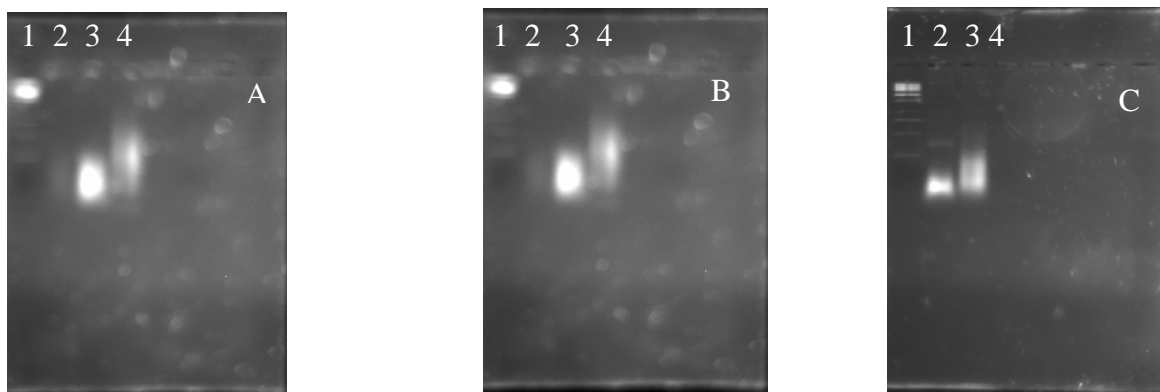
Componente de reacción	Volumen M (µL)	Condiciones del termociclador		
		Tiempo ^a	Temperatura ^b	Ciclos
cDNA (µL)	0.25 - 2	2	94	
M Rvs 5 mM	0.25 - 0.5	0.5	94	30
M Fwd 5 mM	0.25 - 0.5	1	58	
dNTP's 5 mM	0.8	1	72	
MgCl ₂ 50 mM	0.6	2	72	
PCR Buffer 10X	2			
Taq DNA pol 5 U/ µL	0.1			
Agua	----			
Volumen final µL	20			

La temperatura de la fase de alineamiento se fijó cinco grados por debajo de la temperatura de desnaturalización de los oligos específicos par-1 (Tabla 5). Estas condiciones no permitieron obtener la banda de 1052 pb que se esperaba, en su lugar se observó una señal continua de entre 100 a 500 pb (Fig. 1A y B). Por lo que se decidió optimizar las condiciones para la PCR. Primero se varió la cantidad

de cDNA y la de dNTP's (tabla A-2), y dado que el fragmento esperado era de alto peso molecular se extendió el tiempo inicial y durante los ciclos de desnaturalización del DNA, de 45 s a 5 min. y de 30 s a 2 min, respectivamente (Tabla A-2).

TABLA A-2 CONDICIONES EXPLORADAS PARA LA AMPLIFICACION DEL TRANSCRITO DE 1056 pb

Componente de reacción	Volumen			Condiciones del termociclador			
	A (µL)	B (µL)	C (µL)	Tiempo ^a	Temperatura ^b	Ciclos	
CDNA (µL)	7	10	0.5	2	94	30	
M Rvs 8.11 mM	0.3	0.3	0.3	0.5	94		
M Fwd 7.98 mM	0.3	0.3	0.3	1	58		
dNTP's 5mM	1.6	1.6	0.8	1	72		
MgCl ₂ 50 mM	0.6	0.6	0.6	2	72		
PCR Buffer 10X	2	2	2	α	4		
Taq DNA pol 5 U/ µL	0.1	0.1	0.1	^a En minutos; ^b En grados Celsius			
Agua	8.25	0	10.575				
Volumen final µL	20	15	20				



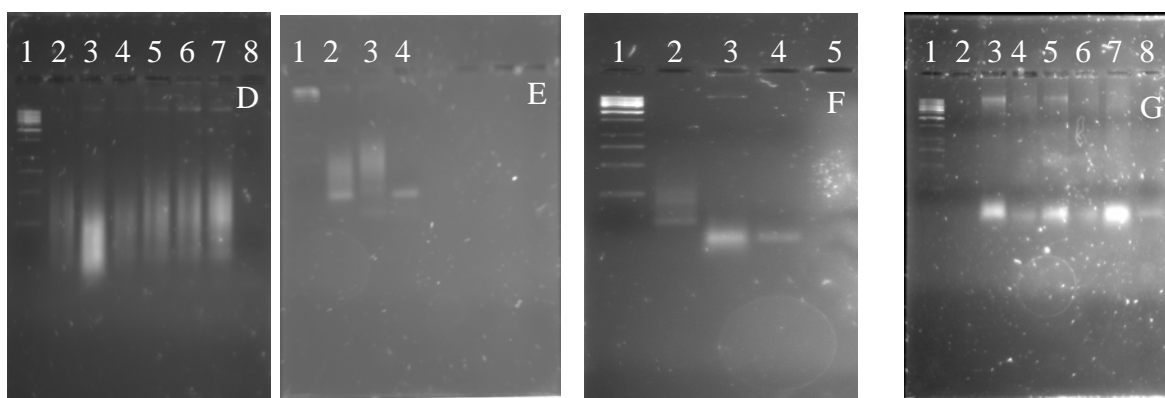
En las figura A, B y C se muestra el resultado de la extensión realizada al transcrito de MIPS con RNA total de Pool de embriones de maíz. En todos los casos el carril 1 corresponde al marcador de peso molecular de 100 a 3000 pb. Figuras A y B, carril 2: 5 µL del control; carril 3: 5 µL; Carril 4: 10 µL; en la figura C se colocaron en el carril 2: 5 µL y en el 3: 10µL; carril 4: 5 µL del PCR control. Las condiciones del termociclador fueron las mismas para los tres casos.

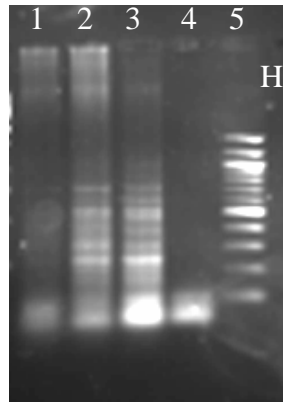
Dado que en la Figura C, solo se observan unas bandas definidas de muy baja intensidad, mayores de 500 pb, se decidió modificar todas las condiciones de reacción utilizadas en la generación de los productos. En este segundo conjunto de experimentos se varió la concentración de todos los componentes y de las condiciones del termociclador (tabla A-3).

TABLA A-3 DIVERSAS CONCENTRACIONES DE COMPONENTES EN LAS REACCIONES DE PCR PARA LA OBTENCIÓN DEL FRAGMENTO DE 1052 pb.

Componente de reacción	Volumen					Condiciones del termociclador		
	*D (μL)	E (μL)	F (μL)	G (μL)	H (μL)	Tiempo ^a	Temperatura ^b	Ciclos
cDNA (μL)	14.6	10	5	2.5	1	5	94	
M Rvs 16 mM	0.625	1.25	1.25	0.5	0.5	2	94	30
M Fwd 16 mM	1.25	1.25	1.25	0.5	0.5	1	58	
dNTP's 10 mM	0.8	0.8	0.8	0.5	1	2	72	
MgCl ₂ 50 mM	0.6	0.6	1	2	2	5	72	
PCR Buffer 10X	2	2	4	2	2	α	4	
Taq DNA pol 5 U/ μL	0.1	0.1	0.6	0.1	0.1	^a En minutos; ^b En grados Celsius		
Agua	0	4	6.1	11.99	12.99			
Volumen final μL	20	20	20	20	20			

* El cDNA se realizo utilizando M Rvs como templado de la primer cadena





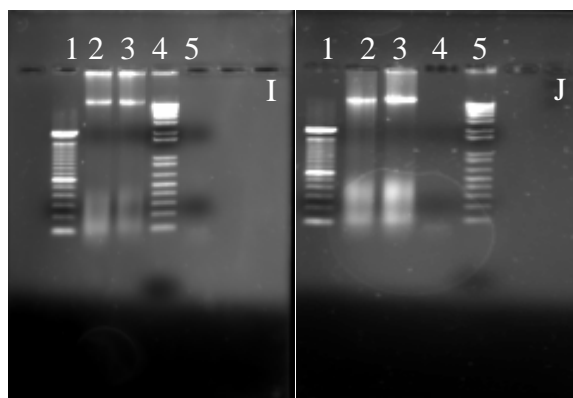
En las figuras D-H, el último carril es un blanco de agua. Con excepción de las figuras G y H, si no se adiciono cDNA a la reacción, no se observo amplificación. Cabe destacar que a partir de la figura F, la enzima polimerasa fue agregada a la reacción en el momento en que ésta se encontraba a una temperatura de 94 °C. Aparentemente, la señal en los blancos de agua de las reacciones G y H se deben a una amplificación de los oligo-nucleótidos debido a que se utilizo el doble de concentración de magnesio de la empleada en la reacción F y 3.2 veces más que en las figuras D y E. Por otro lado, las diferencias en intensidad de esta señal podría deberse a que en la reacción H se utilizo mayor concentración de nucleótidos y por tanto mayor intensidad de la banda que en G. Resulta paradójico que estas condiciones que aparentemente permiten la amplificación de los oligo-nucleótidos, también sean condiciones apropiadas para amplificar, aunque de manera inespecífica, el cDNA. Esto se observa principalmente en la Figura H, dónde se detectan bandas bien definidas de pesos moleculares diversos, desde 500 pb hasta mayores de 3000 pb. Aparentemente, las condiciones de esta reacción H son adecuadas para amplificar productos de peso molecular definido

pero inespecíficos, aunque la reacción se inicio a temperaturas que no permiten la asociación inespecífica de oligonucleotidos y templados. Discutiendo estos datos con compañeros del departamento con experiencia en la PCR nos aconsejaron diseñar otro par de oligos, porque en la PCR aún hay misterios sin resolver.

Si bien es cierto que los resultados podían ser explicados por razones inherentes a la PCR, también está la posibilidad de que la amplificación específica no fuese posible, porque el mRNA de MIPS en embriones germinados no tuviese secuencias complementarias a los oligos diseñado, ya que el diseño se realizó utilizando el transcrito presente en la tercera hoja de la planta de maíz. Para evitar esta última posibilidad se diseño una pareja de oligos que amplificara los dominios conservados y reportados de las MIPS en diversas especies. Con la finalidad de que el cDNA tuviese solo productos de mRNA, éste se purifico y se utilizo como templado de la transcriptaza reversa. Con esta nueva pareja de oligo-nucleótidos el fragmento a amplificar era de 828 pb, por lo que se juzgo conveniente disminuir el tiempo de desnaturalización de los ciclos de la PCR (Tabla A-4). En esta ocasión solo se probaron dos condiciones. La reacción J fue 2.5 veces mayor en volumen que la reacción I. Los resultados indicaron que en ambas reacciones hay amplificación. Se observaron bandas muy definidas pero de peso molecular mayor que lo esperado. Aparentemente, este tipo de resultados son consecuencia de un número excesivo de ciclos de la PCR. La explicación encontrada en la literatura indica que los extremos 3' de los productos específicos amplificados interaccionan entre si constituyendo un templado quimérico y como el resto de los componentes de la reacción está en exceso, la amplificación de este nuevo templado se puede

realizar, formando estos productos de alto peso molecular, es probable que una explicación de este tipo sea aplicable a los resultados de los geles F, G y H.

Componente de reacción	Volumen		Condiciones del termociclador		
	I (µL)	J (µL)	Tiempo ^a	Temperatura ^b	Ciclos
cDNA (µL)	2	5	5	94	
M Rvs 10 mM	0.5	1.25	2	94	35
M Fwd 10 mM	0.5	1.25	1	68	
dNTP's 10 mM	0.5	1.25	2	72	
MgCl ₂ 50 mM	2	5	5	72	
PCR Buffer 10X	2	5	A	4	
Taq DNA pol 5 U/ µL	0.1	0.3	^a En minutos; ^b En grados Celsius		
Agua	12.49	31.22			
Volumen final µL	20	50			



Las condiciones del termociclador para las figuras anteriores fueron similares, ambas figuras muestran una banda superior a las tres mil pares de bases, con lo que se puede determinar que se esta dando un numero excesivo de ciclos de amplificación, los volúmenes colocados son 3 y 5 µL (carriles 2 y 3 respectivamente), se utilizaron marcadores de peso molecular de 100 a 3 mil pb (carriles 1) y 100 pb a 1 Kb (carriles 4 y 5 respectivamente).

Con la finalidad de evitar lo anterior lo que se hizo fue incrementar la cantidad de cDNA, y disminuir la concentración de oligos. La hipótesis fue que si los oligos eran limitantes, la amplificación de los templados quiméricos no se podría realizar. Además la concentración de magnesio fue ligeramente mayor que la de dNTP's, para evitar que el Mg favoreciera la formación de templados quiméricos. En ambas reacciones se produjo una banda específica y del peso molecular esperado, 828 pb (Figura K). La intensidad de la señal fue ligeramente mayor cuando se utilizaron 7 μ L de cDNA que cuando se utilizaron 2 μ L. La amplificación de una dilución 1:10 de estas reacciones resulta en la amplificación de productos inespecíficos de alto peso molecular (fig L).

Componente de reacción	Volumen		Condiciones del termociclador			
	K (μ L)	L (μ L)	Tiempo ^a	Temperatura ^b	Ciclos	
cDNA (μ L)	7	2	5	94	20	
M Rvs 10 mM	0.625	0.625	2	94		
M Fwd 10 mM	0.625	0.625	1	68		
dNTP's 10 mM	1	1	2	72		
MgCl ₂ 50 mM	1.25	1.25	5	72		
PCR Buffer 10X	1.25	1.25	A	4		
Taq DNA pol 5 U/ μ L	0.03	0.03	^a En minutos; ^b En grados Celsius			
Agua	13.22	18.22				
Volumen final μ L	25	25				

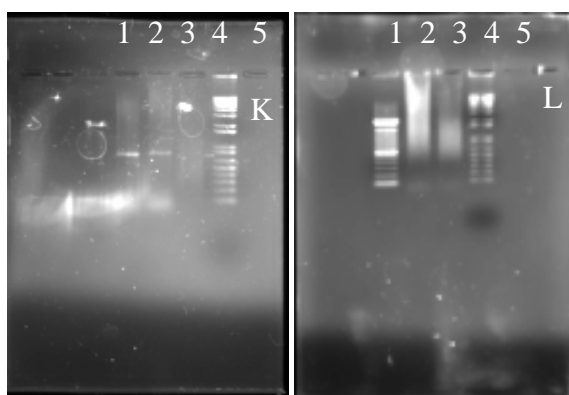


Figura K: se puede observar la presencia de una banda con el peso esperado de 828 pb, se uso un marcador de 1 Kb. Carril 1: 5 μ L de producto de PCR; carril 2: 5 μ L de producto de PCR; carril 3 blanco de agua.

Figura L: Amplificación de una dilución 1 a 10 de una de las bandas obtenidas se flanqueo por los marcadores de 3000 pb (Carril 1) y de 1 Kb (carril 4), las condiciones de reamplificación fueron semejantes a las de la primer amplificación.

Carril 2: 3 μ L; Carril 3: 5 μ L.

Con la finalidad de definir si la cantidad de componentes de la reacción K eran limitantes respecto de la cantidad de cDNA utilizado, la reacción se repitió con dos modificaciones, el número de ciclos y la concentración de los demás componentes se duplico (Fig M). Las muestras se tomaron colocando pausa en el termociclador al finalizar el numero de ciclos deseado y cuando el equipo alcanzaba la temperatura de 94 °C.

Componente de reacción	Volumen		Condiciones del termociclador			
	M (μ L)	N (μ L)	Tiempo ^a	Temperatura ^b	Ciclos	
cDNA (μ L)	7	3	5	94	M	N
M Rvs 10 mM	1.25	0.625	2	94		
M Fwd 10 mM	1.25	0.625	1	68	5- 25	15- 35
dNTP's 10 mM	2	1	2	72		
MgCl ₂ 50 mM	2.5	1.25	5	72		
PCR Buffer 10X	2.5	1.25	A	4		
Taq DNA pol 5 U/ μ L	0.06	0.03	^a En minutos; ^b En grados Celsius			
Agua	33.44	17.22				
Volumen final μ L	50	25				

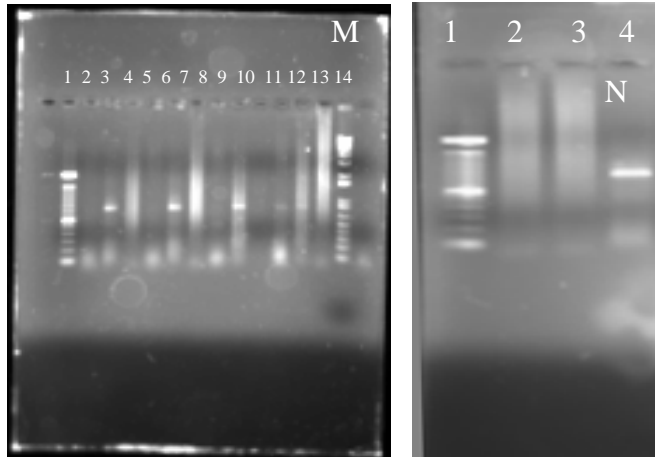


Figura M: Cinética de amplificación del transcrito, se tomaron 5, 15 y 25 ciclos por triplicado, cada uno de los carriles, el carril numero 1 corresponde al marcador de 3 mil pb y el 14 corresponde al de 1 Kb. El carril numero 1 corresponde a la escalera de marcadores de 100 pb el carril 14 corresponde al marcador de 1 Kb. Carriles numero 2, 5, 8, 10 corresponden a 5 ciclos, carriles 3, 6, 9 y 11 corresponden a 15 ciclos de PCR y los carriles 4, 7, 10 y 13 corresponden a 25 ciclos de PCR.

En la figura M se observa que con 15 ciclos la reacción fue específica y se obtuvo la banda del peso molecular esperado (828 pb). Mayor número de ciclo, incremento la amplificación inespecífica.

Figura N: Reamplificación del producto de PCR. se tomo una dilución de 1 a 100 y se reamplifico; carril 2: 35 ciclos; carril 3: 25 ciclos; carril 4: 15 ciclos, el marcador de peso fue el de 3000 pb.

Finalmente la reacción se repitió en las mismas condiciones de la tabla A-4 , por cuadruplicado, en un volumen de 25 μ L (Figura O; Tabla A-7). En estas condiciones la PCR amplificó solo un transcrito de manera específica, indicado por la única banda en el gel con un peso molecular ligeramente mayor que las 828 pb. Lo anterior se interpretó como que las condiciones descritas en la tabla son las óptimas para amplificar el transcrito de MIPS presente en el mRNA de embriones germinados de maíz.

TABLA A-7 CONDICIONES DE AMPLIFICACION DE TRANSCRITO CON OLIGOS DE 828pb

Componente de reacción	Volumen M (μ L)	Condiciones del termociclador		
		Tiempo ^a	Temperatura ^b	Ciclos
cDNA (μ L)	4.00	5	94	15
M Rvs 10 mM	0.75	2	94	
M Fwd 10 mM	0.75	1	68	
dNTP's 10 mM	1.20	2	72	
MgCl ₂ 50 mM	1.50	5	72	
PCR Buffer 10X	1.50	α	4	
Taq DNA pol 5 U/ μ L	0.30	^a En minutos; ^b En grados Celsius		
Agua	15.00			
Volumen final μ L	25.00			

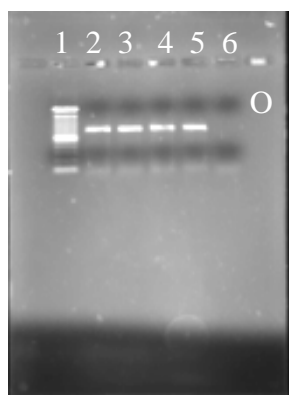


Figura O. Amplificación del transcrito de MIPS, las condiciones utilizadas fueron las mismas de la figura M, con excepción del número de ciclos, en este caso se realizó una amplificación con solo 15 ciclos.

Una vez optimizada la reacción de PCR con el cDNA proveniente de embriones germinados, se procedió a utilizar el cDNA de Hoja y aleurona en desarrollo. En ninguno de los dos casos se obtuvieron resultados positivos.

9.2. ANEXO II

La información que a continuación se describe constituye una introducción a los fundamentos de los métodos utilizados en el desarrollo de este trabajo

Determinación de ácidos nucleicos por espectrofotometría

Debido a que las bases que conforman a los ácidos nucleicos absorben en la región ultravioleta del espectro, es común realizar por espectroscopia la cuantificación de DNA y de RNA. La máxima absorción de las bases púricas y pirimidicas se observa a 260nm y la mitad de este valor a 280nm. A esta última también absorben los grupos aromáticos de las proteínas. Es por esto que para cuantificar y evaluar la pureza de los ácidos nucleicos se determina la absorbencia a 260nm y 280nm de una alícuota del nucleico en celdas de cuarzo. Una unidad de absorbencia a 260 nm equivale a 40 μg de RNA o a 50 μg de DNA. Concentraciones tan bajas como 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido nucleico pueden ser detectadas por este método. Un cociente de $A_{260\text{nm}} / 280\text{nm}$ entre 1.8 a 2.0, significa que la muestra tiene poca contaminación con proteína y la preparación en general es útil para los experimentos de biología molecular.

El fenol es otro de los contaminantes comunes en estas preparaciones y muestra una absorción máxima a 230nm. Por lo que también se debe cuantificar la absorbencia a 230nm. Una preparación libre de fenol, en promedio, absorbe a esta longitud de onda la mitad de lo absorbido a 260 nm. Las preparaciones que contienen residuos de proteína y fenol pueden dar lecturas artificialmente altas a A_{260} , por lo que la concentración de RNA será sobrestimada.

Determinación de la integridad del material genético por electroforesis.

La electroforesis es la técnica por la cual mezclas complejas de macromoléculas como proteínas, DNA o RNA se separan en un campo eléctrico de acuerdo al tamaño y a su carga eléctrica. La corriente eléctrica empuja las moléculas a través de los poros de un gel, que es una sustancia firme como la gelatina. El gel puede hacerse de manera que sus poros tengan distintas dimensiones para separar las moléculas según un rango específico de tamaños y formas. Las moléculas más pequeñas migran más rápido que las más grandes.

La electroforesis en geles de agarosa se realiza en cámaras apropiadas, generalmente horizontales, y requiere dos elementos indispensables: la fase móvil y la fase estacionaria. La fase móvil es el medio amortiguado que permite la movilidad de las moléculas cargadas hacia los electrodos correspondientes cuando se genera un campo eléctrico. El polímero utilizado para el análisis electroforético de ácidos nucleicos de gran tamaño (100pb - 10kb) es la agarosa.

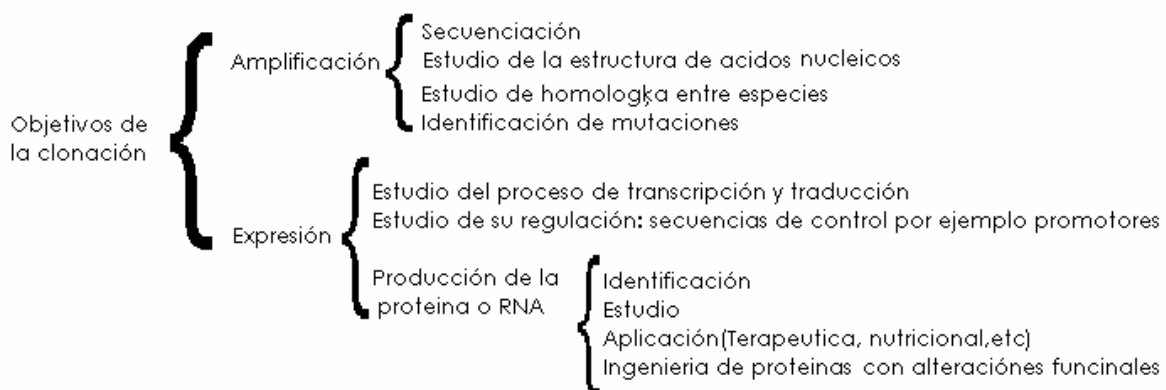
La migración de los fragmentos de ácidos nucleicos (DNA o RNA) en un gel de agarosa sometido a un campo eléctrico depende tanto del voltaje del campo, como del tamaño de poro del gel de agarosa. La separación efectiva de los fragmentos de DNA o RNA (resolución) depende tanto de la masa como de la carga de los distintos fragmentos. Transcurrida la electroforesis, la localización relativa de los fragmentos se determina mediante distintos métodos de detección. La tinción con bromuro de etidio, una sonda fluorescente trans-iluminación con luz UV, es un método generalizado de detección de fragmentos de DNA y RNA, ya que la sonda se intercala entre las bases de las cadenas de DNA y de RNA emitiendo luz.

Clonación del transcrito.

El proceso de clonación consiste en la obtención de elementos genéticamente idénticos entre si, y a su precursor. Estos elementos pueden ser moléculas, células, tejidos u organismos pluricelulares completos, cada componente posee la misma información genética (el mismo genotipo) que el elemento de partida, por ello se puede considerar que la clonación supone una amplificación genética.

El objetivo general de la clonación es obtener un gran número de copias de una región de DNA (fragmentos o genes) o de DNA complementario (cDNA). Existen dos tipos; el acelular (PCR) y el celular mediante una célula hospedera (25).

La clonación puede tener varios objetivos:



RT- PCR

El nombre de RT-PCR implica que se trata de una amplificación de RNA a través de la síntesis de un DNA complementario (cDNA) que posteriormente es amplificado por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. De los métodos disponibles, éste es el de mayor capacidad para la detección de la expresión génica *in Vitro* (25), ya que es una técnica para la detección y cuantificación de mRNA, tan sensible como el análisis por Northern blot o por el análisis de la

protección de la RNAsa. Además, el RT-PCR se puede utilizar para cuantificar niveles del mRNA de muestras pequeñas. De hecho, esta técnica es tan sensible que permite la cuantificación del RNA de una célula.

Formación de DNA complementario (cDNA), reacción de la enzima transcriptasa reversa.

La formación de una cadena sencilla de DNA por complementariedad de bases a partir del mRNA requiere el uso de secuencias de oligos comerciales o el uso de oligonucleotidos específicos y la transcriptasa reversa para catalizar la reacción. Teóricamente basta con una molécula de RNA intacta entre los distintos sitios de unión a los oligos para conseguir la amplificación. Esta cadena sencilla de DNA, llamado cDNA, es mas estables que el RNA y permite tener un mejor rendimiento en el proceso de amplificación de la secuencia por PCR (25).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es una técnica elegante pero simple para la amplificación *in Vitro* del DNA o cDNA. No es una técnica analítica *per se*, es un proceso cíclico que favorece la separación de la doble cadena de DNA, por la aplicación de calor, una hibridación específica de la hebra sencilla de DNA con un oligo, que se realiza disminuyendo la temperatura para permitir la asociación de la hebra con el oligo (annealing en ingles); y la replicación de la secuencia por una polimerasa a partir del Oligonucleotido. El PCR genera exponencialmente hasta mil millones de las copias de la región de interés en apenas unas horas (25).

Formación de células competentes

Con frecuencia las células anfitrionas son procarióticas, principalmente células de *Escherichia coli*, por ser fáciles de obtener, manipular, multiplicar y conocerse su genética. Al proceso de incorporación de DNA recombinante (rDNA) plasmidico a la célula se le conoce como transformación (25).

Existen varios métodos de introducción de DNA recombinante (rDNA) en las células, pero todos ellos se dividen en dos grandes grupos: pasivos (alteración transitoria de la membrana plasmática) y activos (introducción directa del rDNA). El tratamiento pasivo más frecuente es de tipo físico-químico y se dice que la célula se hace competente, se inicia con una incubación en presencia de CaCl_2 a 0°C , seguida de un cambio brusco a $37-43^\circ\text{C}$, que induce a las bacterias a aceptar moléculas de DNA. La incorporación pasiva de DNA se favorece cuando sus moléculas se han agregado o coprecipitado por interacción con cationes, típicamente fosfato de calcio y DAE-dextrano (dietanolaminoetil- dextrano, un polímero policatiónico). Otros agentes químicos, en especial el Polietilenglicol (PEG), aumentan la permeabilidad de la membrana celular, con lo que se incorpora más fácilmente el rDNA, también de forma pasiva.

El DNA se puede incorporar en liposomas, que luego con facilidad se fusionan con la membrana celular y liberan su contenido al interior (incluyendo el DNA, que en realidad, parece asociarse a la superficie exterior hidrofílica del liposoma).

Un método con gran eficacia es el empleo de vectores de tipo vírico, que por su vía natural de infección introducen en la célula anfitriona su DNA, en este caso

recombinante. Para este tipo de incorporación se ha acuñado el término de "Transfección".

Mediante la aplicación de pequeñas cargas eléctricas en forma de pulsos breves de alto voltaje, se puede abrir poros transitorios en la membrana por los cuales puede pasar el rDNA, es muy utilizado en células eucarióticas con resultados muy variables (25).

Ligado del inserto

Vector de clonación

Un vector de clonación es una molécula de DNA de tamaño pequeño, fácil de aislar y caracterizar, con secuencia y mapa de restricción conocidos, de fácil introducción en la célula anfitriona y una vez allí con capacidad de replicación autónoma, es decir independiente de la replicación del genoma de la célula anfitriona. El vector de clonación debe de poseer un sitio múltiple de restricción y que incluya al menos un gen marcador (un gen de resistencia a antibiótico) que permita identificar y seleccionar las células que llevan el rDNA. El vector debe ligarse al Inserto para facilitar su entrada a la célula anfitriona y su replicación.

La formación de la molécula de rDNA consiste en la unión covalente, *in vitro*, del inserto en el vector de clonación mediante una ligasa, la especificidad de la unión depende de los extremos resultantes del vector y del inserto.

Pueden ocurrir diversos tipos de asociación entre fragmentos de restricción con extremos compatibles, todas ellas catalizadas por la ligasa, siempre puede darse la asociación intramolecular, es decir entre los dos extremos circularizando la molécula (vector o inserto), en segundo lugar se puede dar la intermolecular tanto

la que conduce al rDNA (vector más inserto) como las que conducen a productos no deseados (vector + vector, inserto + inserto, unión de más de dos moléculas, etc), estas son más probables cuando se tienen concentraciones altas de DNA. Para evitar la formación de estos productos, que disminuyen el rendimiento de la clonación, se recurre a estrategias experimentales, tales como la escisión con dos enzimas diferentes, o la desfosforilación con fosfatasa alcalina, permitiendo que se una el inserto al vector por puentes de hidrogeno y el enlace fosfodiester se realiza una vez que el vector entra en la célula por los mismos mecanismos de reparación de DNA propios de la célula hospedera (25).

Northern Blotting

Es una técnica simple y fácil la cual combina la separación electroforética del RNA con su transferencia a un soporte sólido o filtro (nylon o nitrocelulosa) para su hibridación.

La técnica se emplea principalmente para obtener información sobre el tamaño de los RNA's y sobre el modelo de expresión de genes específicos. Estos, una vez clonados, pueden ser utilizados como sondas para hibridar muestras de RNA aisladas de una variedad de tejidos diferentes, y así conocer los tipos celulares en los que se expresa el gen, la abundancia relativa y tamaño de los transcritos, y diversos detalles de su procesamiento posterior.

Fijación de RNA total a la membrana.

La transferencia del RNA del gel de electroforesis a la membrana o soporte sólido es usualmente dada por el ascenso o descenso capilar (7) o el secado al vacío (41). La más utilizada es el primer método.

Selección de la membrana de entrecruzamiento.

Existen tres tipos de membranas viables para el Northern Blotting: Nitrocelulosa, Nylon o cargadas químicamente. La nitrocelulosa une eficientemente el RNA aunque fragmentos menores a 500 nucleótidos se unen pobremente (47).

Las membranas de Nylon presentan una mayor eficiencia de unión al RNA que la mostrada por Nitrocelulosa. Además, unen especies pequeñas de RNA. Adicionalmente, las membranas de Nylon son flexibles y pueden ser usadas varias veces. Ambas, la nitrocelulosa y las membranas de Nylon requieren entrecruzarse con el RNA transferido a la membrana. Este entrecruzamiento se puede realizar por horneado (secado al vacío a 80°C), tratamiento químico, o entrecruzamiento con luz UV. Las membranas cargadas químicamente tienen menor capacidad de unión al RNA, en comparación con las membranas de Nitrocelulosa o de Nylon. En estas últimas, los RNA's se unen covalentemente a las membranas por radiación UV. Para confirmar que la transferencia y unión del RNA a la membrana ha sido exitosa lo que se hace es lavar la membrana y teñirla con azul de metileno. Este tratamiento también permite evaluar la cantidad de las diferentes muestras transferida a la membrana.