

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

UN NUEVO VECTOR DE CLONACION
PARA PRODUCIR PROTEINAS
HIBRIDAS EN Escherichia coli

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
NOEMI FLORES MEJIA



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 está 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.

INDICE.	
RESUMEN.....	3
INTRODUCCION	4
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	10
MATERIALES.....	14
1) Reactivos.....	14
2) Cepas.....	15
3) Medios de cultivo.....	15
4) Enzimas.....	15
MÉTODOS.....	20
1) Transformación de una cepa de <u>Escherichia coli</u>	20
2) Purificación de ADN de plásmido.....	21
3) Microensayo de ADN de plásmido.....	22
4) Electroforesis de ADN en geles de agarosa o acrilamida.....	22
5) Electroelución de fragmentos de ADN de un gel.....	23
6) Columnas de BND celulosa.....	23
7) Minicélulas.....	24
8) Extracción de ADN con fenol:cloroformo	27
9) Síntesis química de ADN.....	27
10) Preservación de cepas bacterianas.....	28
11) Purificación de proteínas precipitables.....	28
RESULTADOS.....	30
CONSTRUCCION DEL pNF21.....	30
CONSTRUCCION DEL pNF217.....	36
ANÁLISIS DE MINICELULAS.....	40
DISCUSION.....	47
CONCLUSIONES.....	50

PERSPECTIVAS.....51

REFERENCIAS.....52

RESUMEN.

Uno de los problemas que se ha podido resolver, en gran medida, por medio de las técnicas de "ingeniería genética" es la producción rápida y económica de proteínas que normalmente solo se producían en pequeñas cantidades por distintos organismos. Algunos ejemplos son: la insulina humana, el interferón, hormona de crecimiento y somatostatina.

El microorganismo más utilizado con estos propósitos en la actualidad es Escherichia coli. Para lograr una sobreproducción de ciertas proteínas, ha sido necesario formar genes híbridos que codifiquen para la formación de proteínas híbridas.

Este trabajo consistió en la construcción de un plásmido o vehículo molecular que permitiera la construcción de proteínas híbridas con la región N-terminal del represor CI del colifago lambda y con la porción C-terminal del péptido deseado. En este caso se hizo una construcción con la cadena B de insulina humana en el C-terminal para comprobar que el sistema cumple con los requerimientos indispensables para sobreproducir una proteína de interés.

INTRODUCCION.

Las técnicas experimentales denominadas "ingeniería genética" o "recombinación in vitro del ADN" son actualmente una de las herramientas más importantes de la investigación en biología, pues permite la manipulación de fragmentos específicos de este material genético en el laboratorio. Con lo cual se han podido aislar numerosos genes tanto de procariontes como de eucariontes, resolver su estructura, organización y regulación. También al lograr sobreexpresar algunos de estos genes se ha podido purificar y caracterizar una gran variedad de enzimas y productos protéicos.

La técnica se basa en la unión por recombinación de dos o más fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) "in vitro", mediante una amplia variedad de enzimas (1,2,3). Uno de estos fragmentos, llamado vector o vehículo molecular, es capaz de duplicarse en una célula huésped, y el otro(s) pueden ser duplicados pasivamente por el vehículo que los contiene. El microorganismo que con mayor frecuencia ha sido usado para estos fines es la bacteria Escherichia coli y como vehículo molecular se usan plásmidos tales como el pBR322 (32) y una gran variedad de derivados de éste, así como algunos otros de origen o modo de duplicación distinto tales como: pACY177, RSF2124, etc. Así, hoy es posible aislar fragmentos de ADN de cualquier organismo e introducirlos, o clonarlos, por la técnica de recombinación "in vitro" en la bacteria E. coli. Más aún, la ingeniería genética ha permitido la "expresión" en E. coli de genes sintéticos, es decir, hechos por el hombre por medio de las técnicas denominadas "síntesis química de ácidos nucleicos". De este modo se puede tener una cepa bacteriana

programada genéticamente para que produzca una proteína determinada. Tal es el caso de hormonas como la somatostatina, hormona de crecimiento y de la insulina humana (4,5,6).

Cuando se desea hacer con éxito este tipo de manipulaciones en E. coli, existen varios factores que se deben tener en cuenta, algunos de los cuales se enumeran a continuación:

1) Si el fragmento de ADN que se desea clonar no tiene las señales reguladoras propias de la bacteria, deberá anteponerse a este, un fragmento que las contenga con el fin de permitir su expresión adecuada.

2) Si el segmento clonado da lugar a un producto protéico pequeño o fácilmente degradable por la bacteria, es deseable que se produzca como una proteína híbrida con alguna otra proteína de la célula huésped de tal modo que no sea degradada fácilmente al ser reconocida como propia (1,2,3).

3) En muchos casos es necesario que el gene que codifica para la proteína que se desea expresar se encuentre regulado; esto es, que se permita su represión total o casi total y su expresión en las condiciones óptimas para tener un mejor rendimiento.

4) Si se desea clonar un fragmento de ADN sintético, debe tomarse en cuenta el uso preferente de codones de la cepa bacteriana también con el fin de asegurar una mejor expresión (7,8).

5) Cuando se intente formar una proteína híbrida se debe tener en cuenta que ambos fragmentos deben quedar en fase para ser traducidos como una sola proteína.

Algunos ejemplos de los puntos anteriores son: la producción de la hormona somatostatina, de cuyo péptido se conocía la secuencia de aminoácidos y por lo tanto la nucleotídica, la cual se sintetizó químicamente y se clonó de tal modo que formó una proteína de fusión con la β -galactosidasa; la producción de insulina humana por el mismo sistema; y la hormona de crecimiento (4,5,6). Así como estas, hay muchas otras proteínas y péptidos de interés médico, social o económico tales como el interferón, los neuropéptidos, etc. que se necesitan producir en gran escala tanto para su estudio como para su aplicación o venta.

Este último punto es interesante, ya que al involucrarse intereses comerciales en la producción de macromoléculas por ingeniería genética, han surgido problemas de patentes, de secreto, informaciones erróneas o incompletas etc. Por lo que casi cada laboratorio, institución o compañía, ha tenido que generar sus propios sistemas de producción. Para realizar esto es evidente que hay que tomar en consideración diversos factores, algunos de los cuales son:

1) La estabilidad de la proteína. Esto es importante, sobre todo cuando la proteína es extraña o anormal para la bacteria que la produce, de ser ese el caso, ésta la degrada. Esto puede ocasionar un bajo rendimiento en la producción de la proteína deseada.

2) Los niveles de expresión con respecto a la proteína total. Esto por el hecho de que si se expresa en niveles bajos y es muy poco el porcentaje con respecto a la proteína total, al momento de purificar la proteína deseada, el rendimiento será muy bajo y se tendrá que aumentar el volumen de células y complicar la purificación y/o elevar los costos.

3) Facilidad de purificación de la proteína. Este es un punto clave ya que si la purificación es sencilla, se podrá obtener en poco tiempo y con costos bajos, que a nivel industrial es muy deseable.

Al pensar en estos puntos y principalmente en éste último, fue que se planteó este trabajo, el cual tuvo como objetivo el hacer un sistema que permita la purificación fácil y económica de proteínas codificadas por genes clonados en plásmidos bacterianos.

Para esto se tomaron en cuenta diversos datos ya reportados en la literatura, de genes conocidos cuyos productos se purifican fácilmente, y que son: el represor del operón de lactosa (*lacI*); y el represor *ci* del colifago lambda (9,10).

Estas dos proteínas tienen varias características en común: tienen afinidad inespecífica por el ADN. Las proteínas *lacI* y *ci* tienen dos dominios en su cadena polipeptídica (22), el dominio N-terminal es el que determina la afinidad inespecífica por el ADN y el dominio C-terminal permite la formación de dímeros de represor, lo cual le da más especificidad. También tienen estructuras tridimensionales similares y una cierta homología de aminoácidos (11,12,13,15,19,20,21). Presentan en la región N-terminal una secuencia de aminoácidos que adquiere una estructura secundaria de plegamiento β laminar seguida de tres alfa hélices y otra región beta a continuación. Esta organización se muestra en la figura 1.

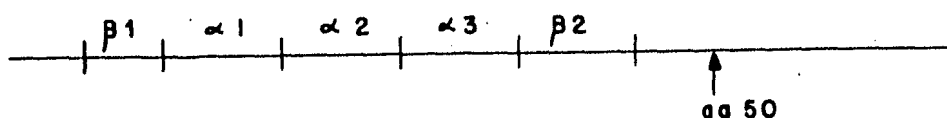


Fig. 1 Estructura secundaria de la región N-terminal de algunos represores en E.coli.

Se piensa que una de estas regiones, la alfa 3, reconoce el zurco mayor de la doble cadena de ADN y le permite reconocer la secuencia del operador. Esta región N-terminal se ha conservado en gran medida, si no en su secuencia sí en su estructura tridimensional, en varias proteínas reguladoras (11,14,18) como se muestra en la figura 2.

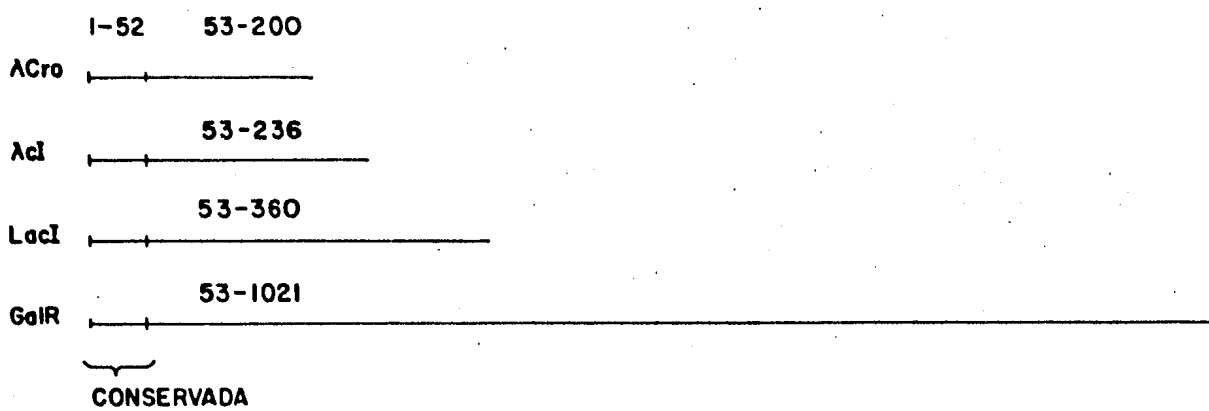


Fig. 2 Comparación de las regiones N y C-terminal de varios represores. La porción N-terminal (1-52) es muy conservada en todos y la región que les sigue varía en cada una tanto en secuencia como en tamaño.

Se dice que la importancia de esta región radica en que es precisamente la que reconoce al ADN y que puede haber evolucionado a partir de un ancestro común (13). Como se puede ver, la región C-terminal es la que ha variado mucho y es la que las hace diferentes sobre todo en su especificidad. Esta característica de unirse al ADN las hace particularmente interesantes ya que sólo del 1 al 6% de las proteínas solubles de E. coli, es decir las que tienen afinidad por cargas negativas, se pegan a la resina fosfocelulosa de intercambio iónico. Entre las proteínas que se pegan al ADN están la ARN polimerasa, la ADN polimerasa, las enzimas de restricción, etc. Debido a esta particularidad estas proteínas pueden purificarse fácilmente (9).

El represor cI es una proteína clave en la ruta que puede seguir el bacteriofago lambda cuando infecta a una bacteria. Esto es, que produzca lisis o lisogenia en la bacteria huésped, puesto que es una proteína represora que, como tal, modula todos aquellos genes que al expresarse permiten la proliferación de virus que terminan por destruir a la célula; o bien, impide la lisis de la célula huésped e induce al estado de lisogenia (16).

Por otro lado se sabe que esta proteína es muy estable pues no se degrada fácilmente dentro de la bacteria (17).

Estas características la hacen de particular interés para la construcción de proteínas híbridas, pues se puede fusionar a la región C-terminal la proteína o péptido de interés sin cambiar teóricamente la estabilidad ni las propiedades de la región N-terminal, las cuales se pueden aprovechar para la purificación de la proteína deseada. Así, decidimos comprobar esto, construyendo un vehículo que contuviera la región de ADN que codifica para el N-terminal de cI , delante de la cual se pueda clonar el gene de la proteína o péptido que se desee purificar.

Con dicha construcción se esperaba que la proteína híbrida fuera estable dentro de la bacteria y que tuviera afinidad por fosfoceulosa. Como sistema modelo se decidió fusionar al fragmento de ADN que codifica para los primeros 159 aminoácidos del represor cI , el fragmento de ADN sintético que codifica para la formación de la cadena B de la insulina humana, pues se sabe que este péptido al ser producido por las bacterias, es rápidamente degradado.

DISEÑO EXPERIMENTAL

El objetivo del presente trabajo fue el de construir un vehículo de expresión que tuviera las cualidades necesarias para permitir la clonación y expresión elevada de genes que codifican para proteínas que por su estabilidad es necesario producir como proteínas híbridas. Para esto se diseñó una estrategia que permitiera la formación de una proteína híbrida, con el CI en el N-terminal y la proteína de interés en el C-terminal. Al pensar que la proteína híbrida después se va a separar en sus dos componentes originales, por el método de ruptura con bromuro de cianógeno, este vehículo sólo se podrá utilizar en casos donde la proteína o péptido que se desee purificar no tenga metioninas en su parte estructural. La proteína híbrida, así formada, se supuso que debería conservar las características fisicoquímicas pertenecientes al N-terminal de CI como afinidad por cargas negativas y estabilidad, y por tanto sería capaz de ser purificada por métodos similares (10).

Para construir este vehículo, se requirió clonar el gene de CI en un plásmido o vector, que en este caso fue el pBR712 (33), el cual es casi igual al pBR322 sin el promotor del gene de resistencia a tetraciclina y que además lleva el promotor sintético de triptofano en su lugar, con un sitio único para la enzima de restricción EcoRI, donde se puede clonar el gene que se desea expresar.

El gene de CI se aisló a partir del plásmido pKB252 (23), al digerir con las enzimas EcoRI y HindIII y se clonó en los mismos sitios del pBR712. Al plásmido resultante se le denominó pNF21.

//

Para probar el sistema se decidió utilizar el gene que codifica para la cadena B de insulina humana. Para obtenerlo, se utilizó el plásmido pBR271 (34) que es un pBR322 con el gene de la cadena B clonado en los sitios de EcoRI a BamHI, el cual se digirió con estas enzimas y se purificó el fragmento de 104 pares de bases (pb) por la técnica de electroelusión del gel.

A fin de que tanto el gene de CI como el de la cadena B de insulina quedaran en fase, se sintetizó un fragmento de ADN con la siguiente secuencia:

SECUENCIA ADAPTADORA DE INSULINA.

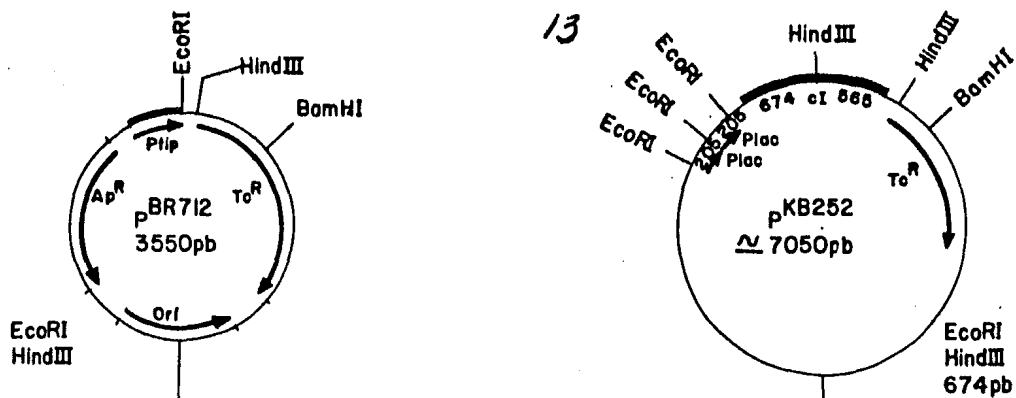
5 'AGCTCTGGTCGTCGTC
GACCAGCAGCAGTTAA 5'

El extremo izquierdo complementa para el sitio de restricción de HindIII y el extremo derecho complementa para el sitio de EcoRI pero en ninguno de los casos regeneran el sitio, es decir, que se puede unir a los extremos del ADN para los que complementa, pero ya no se puede volver a digerir con estas enzimas en estos sitios. Esto se hizo porque el fragmento del gene de la cadena B de insulina se obtiene por la digestión con EcoRI y BamHI y además tiene un sitio interno para la enzima HindIII.

La construcción del plásmido con el híbrido se realizó de la siguiente manera. El pNF21 se digirió con las enzimas HindIII y BamHI y se obtuvo el fragmento correspondiente al vehículo. A este se le ligó el segmento adaptador y a esto se le ligó el fragmento de la cadena B. El plásmido así obtenido se transformó en la cepa HB101 y se seleccionó en ampicilina (Ap) y se verificó que las colonias obtenidas fueran resistentes a Ap y totalmente sensibles a tetraciclina (Tc), es

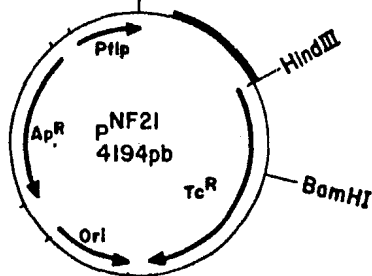
decir que no crecieran en presencia de este antibiótico. A continuación se verificaron los patrones de restricción y por último se comprobó que se produjeran las proteínas por el método denominado de "minicélulas".

El diseño experimental de este trabajo se muestra en la siguiente figura. (fig. 3).



LIGASA

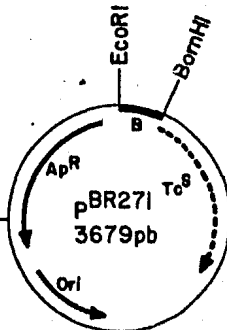
EcoRI



BamHI
HindIII

ADAPTADOR
DE INSULINA

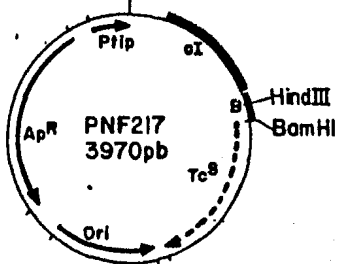
LIGASA



EcoRI-*BamHI*
CADENA B

LIGASA

EcoRI



MATERIALES.**1) Reactivos.**

Las casas proveedoras y los reactivos utilizados fueron los siguientes:

Bayer de México: ampicilina (Binotal).

Bethesda Research Laboratory, USA: endonucleasas de restricción.

Bio-rad Laboratories, USA: agarosa, azul de Coomassie, β -mercaptoetanol, persulfato de amonio, poli(acrilamida-bis), resina Dowex 50X-X8, dodecil sulfato de sodio (SDS), y TEMED (tetrametiletilendiamida).

Difco, USA: agar bacteriológico, peptona de caseína (caseína), peptona de caseína purificada (triptona), medio de ensayo para auxotrofia de metionina (HAM).

Calbiochem Laboratories, USA: Ioduro de propidio.

Merck de México: aminoácidos purificados, extracto de levadura, Tris (hidroximetilaminometano), urea.

New England Nuclear, USA: (32 P) ATP, (35 S) metionina.

Sigma de México: aceite mineral, bromuro de etidio, cloruro de cesio, ARNasa A, lisozima.

PL Biochemicals, USA: fosfatasa alcalina.

J.T. Baker de México: todos los demás reactivos.

2) Cepas bacterianas.

E. coli K12 HB101 (F-, hsdS20(r-, m-), recA13, ara-14, proA2, lacY1, gal K2, rpsL20, (Sm^r), xyl-5, mtl-1, supE44, lambda-).

E. coli K12 P678-54 (trco-, leu-, BI-). Cepa productora de minicélulas.

3) Medios de cultivo.

Luria.

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
NaOH 2.5 N	1 ml
agua destilada	1 litro

Cuando se utiliza medio Luria sólido para cajas petri, agregar 20 g de agar. Esterilizar todo junto a 20 lb de presión durante 20 min.

Medio M9. (por litro)

Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1 g

Ajustar el pH a 7.4, esterilizar y entonces agregar:

NgSO ₄ 1 M	2 ml
Glucosa 20 %	10 ml
CaCl ₂ 0.1 M	1 ml estériles todos estos.

Medio N9 CA.

Idéntico al N9 excepto que lleva 2 g/l de caseína.

Medio N9 para Minicélulas.

Idéntico al N9 CA pero con treonina y leucina (1 ml/100 ml de medio de una solución al 1 %).

Medio NAM para marcar minicélulas.

NAM	2.625 g
Glucosa 20 %	2.5 ml
Sales N9 10X	10.0 ml

Aforar a 100 ml con agua destilada. Filtrar para esterilizar.

Antibióticos.

	Medio líquido	Medio sólido
Ampicilina	100 µg/ml	200 µg/ml
Tetraciclina	15 µg/ml	30 µg/ml

4) Enzimas.

Endonucleasas de restricción.

Las condiciones de reacción de las enzimas de restricción, se han

estandarizado para usar sólo tres buffers diferentes en lugar de uno distinto para cada enzima y son los siguientes:

	NaCl	Tris pH 7.4	HgSO ₄	BTT
Buffer alto.	100 mM	50 mM	10 mM	0
Buffer medio.	50 mM	10 mM	10 mM	1 mM
Buffer bajo.	0	10 mM	10 mM	1 mM

Las reacciones se llevan a cabo a 37°C.

Enzima	b. alto	b.medio	b. bajo
EcoRI	+		
HindIII		+	
BamHI	+		
HaeIII			+

En algunos casos, se pueden hacer digestiones dobles en el mismo buffer aunque se pierde un poco la actividad de la enzima que no está en su buffer correspondiente, de tal modo que HaeIII se puede usar hasta en buffer alto y pierde la mitad de su actividad que es todavía suficiente, HindIII se puede usar en buffer alto también pero EcoRI y BamHI no se pueden usar en buffer de menor concentración de sales.

Ligasa de T4.

Esta enzima se purificó en nuestro laboratorio y sus condiciones de reacción son las siguientes:

Tris 20 mM, pH 7.6

BTT 10 mM

HgCl₂ 10 mM

ATP 5 mM en Tris 0.1 N pH 7.6

Incubar a 4°C cuando los extremos a ligar son rasurados y a 12°C cuando son cohesivos, ambos durante 12 hrs.

Fosfatasa alcalina.

Las condiciones son: incubar en 100 µl de agua estéril que contiene 1 µl de Tris 1 N pH 8.0, 1 µl de enzima y el ADN. Se incuba a 60°C durante 1 hr.

T4 polinucleótido kinasa.

ADN defosforilado en 5'	1 a 50 pmolas
buffer kinasa 10X	1 a 5 µl
(³² P ATP)	1 µl
kinasa	10 a 20 unidades
agua	10 a 50 µl

buffer kinasa 10X

Tris 0.5 N pH 7.6

HgCl₂ 0.1 N

BTT 50 mM

espermidina 1 mM

BHTA 1 mM

Incubar a 37°C/30 min. Agregar 1 µl de ATP frío 5 mM e incubar 15 min más.

ARNasa A.

10 mg/ml en acetato de sodio 0.1 N y EDTA 0.033 mM, pH 5.0
incubar a cualquier temperatura (4, 12 o 37 hasta 65°C).

Lisozima.

5 mg/ml en Tris 25 mM pH 8.0 e incubar a 20°C.

MÉTODOS.**1) Transformación de una cepa de Escherichia coli.**

Inocular 3 ml de medio Luria con la cepa deseada e incubar toda la noche a 37°C, a menos que la cepa requiera otra temperatura, con agitación constante. Al día siguiente inocular un matríz de 150 ml con 30 ml de medio Luria e incubar con agitación hasta que llegue a una densidad de 0.4 a 595 nm. Centrifugar a 10,000 rpm (10 K) durante 5 min en un tubo estéril, el sobrenadante se decanta en esterilidad. El precipitado se resuspende con 15 ml de NaCl 10 mM frío.

Centrifugar igual que el anterior y resuspender el precipitado suavemente en CaCl₂ 30 mM. Dejar en hielo durante 20 min y centrifugar de nuevo durante 10 min a 5 K. Resuspender en 3 ml de CaCl₂ 30 mM.

Tomar 0.2 ml y pasar a un tubo estéril, agregar 0.1 µg de ADN en 0.1 ml de CaCl₂ 30 mM. Incubar en hielo 1 hr.

Hacer un pulso a 42°C durante 70 seg y pasar a hielo 5 min.

Agregar 3 ml de medio Luria e incubar con agitación a 37°C durante 1 hora.

Platear 0.2 ml en cajas petri con medio sólido con el antibiótico necesario para la selección de las células transformantes.

Incubar la caja a 37°C durante al menos 16 hr (25).

2) Purificación de ADN de plásmido.

El método utilizado es el que se denomina "lisis alcalina" (26) y que brevemente consiste en:

Se hace crecer en un litro de cultivo la cepa que contiene el plásmido que se desea purificar, hasta una densidad de 0.4 a una 8.0. de 595 nm y entonces agregar cloramfenicol 170 µg/ml e incubar, con agitación durante 16 hr. Colectar las células por centrifugación y agregar 10 ml de solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris HCl pH 8.0 y 10 mM EDTA) para resuspender. A esto se le añade 5 mg/ml de lisozima y se le agrega posteriormente 20 ml de solución II (0.2 N NaOH y 1% SBS) y se incuba en hielo 10 min. Se agrega 15 ml de solución III (60 ml de acetato de potasio 5 N, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua). Se centrifuga a 20 K/20 min y se colecta el sobrenadante claro del cual se precipita solo el ADN con isopropanol y se lava con etanol al 70 %. Se resuspende y se le agrega 10 mg/ml de ARNasa . Se extrae y precipita de nuevo y se resuspende en 2 ml para colocar en un gradiente de cloruro de cesio. Se colectan por separado las dos bandas que se obtienen de la centrifugación y que corresponden al plásmido roto y al superenrollado y que se pueden notar debido al yoduro de propidio que contiene la solución de CsCl. Estas se pasan por una columna de Bouex para quitar el yoduro de propidio y después se dializan contra buffer TE (Tris 10 mM pH 8.0 y EDTA 1 mM) por lo menos con 2 cambios de 1,000 veces el volumen del plásmido. Por último precipitar con etanol y centrifugar. El ADN así obtenido se resuspende en el mínimo volumen de buffer TE.

3) Microensayo de ADN de plásmido.

El método es similar al anterior a excepción de que se crecen solo 3 ml de células. Los pasos son idénticos al anterior hasta obtener el sobrenadante claro que en este caso se extrae (fenol-cloroformo) y se precipita con etanol. Se resuspende en 10 μ l y está listo para ser digerido con la enzima de restricción deseada (26).

4) Electroforesis de ADN en geles de agarosa o poliacrilamida.

La electroforesis se llevó a cabo en placa conforme a las siguientes condiciones:

Agarosa 1 % disuelta por calentamiento en Tris-boratos-EBTA (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM y EBTA 2.5 mM pH 8.2) con lo cual se llenan las placas y se hace el gel. Las muestras de ADN que se desea analizar se preparan con cantidad suficiente de ADN para que sean visibles (desde 0.2 a 1 μ g) y se les agregan 5 μ l de SN (para 10 ml: 6 g de urea, 1 ml de azul de bromofenol al 0.5 % en agua, 1 ml de xilencianol al 0.5 % en agua) y se aplican en los carriles del gel. Se corren a 150 V durante 1 hr en buffer Tris-boratos-EBTA (TBE). Los geles de acrilamida al 7.5 y 15 % se preparan de la siguiente manera:

	7.5 %	15 %
Acrilamida-bis	7.5 ml	15.0 ml
TBE 10 X	3.0 ml	3.0 ml
agua destilada	19.4 ml	11.9 ml
Persulfato de amonio 10mg/ml	0.15 ml	0.15 ml
TANBB	0.015 ml	0.015 ml

Se corren a 200 V por 1 hr en buffer TBE.

El ADN se revela por tinción con una solución de bromuro de etidio 0.1 mg/ 100 ml y se observa con una lámpara de luz ultravioleta (27).

5) Electroelusión de fragmentos de ADN a partir de un gel.

El gel se tinte con bromuro de etidio levemente, casi se saca inmediatamente después de haberlo metido al colorante, se corta la banda deseada con una navaja y se coloca en una cámara de electroelusión que se llena con buffer TE hasta cubrir el puente. En el recipiente del buffer se añade buffer TEA (Tris 24.2 g, acetato de sodio anhidro 8.2 g, EDTA 3.7 g/l) y se corre 90 min/4°C/100 V. Se invierten entonces los polos durante un minuto y se toma todo el contenido de la camarita y se pasa por una columna de BNB, se precipita y resuspende en el volumen deseado.

6) Columnas de BNB celulosa.

La resina se hidrata en buffer de lavado (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 y NaCl 10 mM) y se guarda en refrigeración hasta su uso.

Se monta una columna de 0.5 cm de diámetro y 0.5 cm de alto.

Se lava la columna con de 7.5 a 10 ml de buffer de lavado.

Se pasa la muestra por la columna, sin diluir. El ADN debe estar resuspendido en buffer TE.

Se lava la columna con buffer de lavado, con al menos un volumen igual al de la columna completa.

Para eluir el ADN pegado a la resina, se pasan 500 μ l de buffer de elusión (Tris-HCl 1 mM, pH 8.0, NaCl 1 N, etanol 15 %).

Se agregan dos volúmenes de etanol a -20°C para precipitar el ADN.

Se centrifuga, se seca y se resuspende en agua estéril y filtrada.

La resina una vez utilizada, se desecha.

7) Minicélulas.

Han sido aisladas, las cepas productoras de minicélulas de varias especies de bacterias. De estas, especialmente las de E. coli han resultado de mucha utilidad para el estudio de varios procesos biológicos, pero principalmente para analizar los productos de genes clonados en plásmidos. Las productoras de minicélulas son cepas mutantes que al momento de la división celular normal, sufren una especie de gemación debido a un mal funcionamiento en la formación del centro de partición normal de la célula, de tal modo que la célula en lugar de dividirse a la mitad, se divide de una forma que parece gema. En estas pequeñas yemas o minicélulas, como se les conoce, no se encuentra nunca ADN perteneciente al cromosoma pero si contiene plásmidos y todo lo suficiente para transcribir y traducir la información codificada en ellos, de tal modo que si se ponen estas minicélulas a traducir en presencia de un aminoácido radioactivo como $(35)\text{S}$ metionina, se puede detectar el producto de los genes que contenga el plásmido. Para separar las minicélulas de las células viables de E. coli, normalmente se usa un método que se basa en una centrifugación diferencial seguida de varias centrifugaciones en

gradientes de densidad de sacarosa (3 veces). Después del tercer gradiente, se resuspende en el volumen suficiente para ajustar a una densidad de 0.2 a 620 nm de medio MAN que contiene todos los aminoácidos excepto metionina. A 2 ml se les agrega 100 μ Ci de (35) S metionina y se incuba por un período corto, de tal forma que sólo puedan ser traducidas pocas moléculas y no se haga inespecífica la traducción de los mensajeros. Se colectan las células y se congelan para correr un gel de proteínas (24).

Para hacer los gradientes continuos de sacarosa, se usa la siguiente solución la cual se congela en tubos Corex (27 ml/tubo) y se descongela lentamente. Esto genera un gradiente de densidad continuo.

Sacarosa 20 %.

Tris 50 mM

NaCl 100 mM

EDTA 0.1 mM

Buffer 098 para lavar.

NaCl 0.85 %

KH_2PO_4 0.03 %

Na_2HPO_4 0.06 %

gelatina 100 μ g/ml

Aforar a 1 l con agua destilada.

Mezcla lítica 2X para aplicar las muestras al gel.

Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8

SBS 4.6 %

 β -mercaptoetanol 10 %

glicerol 20 %

Gel para proteínas.Gel inferior

	Acrilamida al	
	11 %	15 %
Acrilamida-bis (29.2 % - 0.8 %)	8.25 ml	11.25 ml
Tris-base 2 M pH 8.0	4.50 ml	4.50 ml
SBS 10 %	0.11 ml	0.11 ml
agua destilada	8.93 ml	5.93 ml
Persulfato de amonio al 10 %	0.15 ml	0.15 ml
TAMBB puro	0.015 ml	0.015 ml

Gel superior

Acrilamida-bis (29.2 % - 0.8 %)	1.75 ml
Tris-base 2 M pH 6.8	0.325 ml
SBS 10 %	0.05 ml
agua destilada	5.75 ml
Persulfato de amonio 10 %	0.1 ml
TAMBB puro	0.005 ml

Se corre la electroforésis en presencia de buffer Tris-glicina (Tris 12 g y glicina 57.6 g/l = 5X) a 10 mA hasta que el colorante llega al gel inferior, entonces se cambia a 20 mA hasta que termine.

Se tinen con azul de Coomassie a 65°C durante 15 min (ácido acético glacial: metanol: agua en una proporción 1:3:6 con azul de Coomassie al 0.06 %) y se destina a la misma temperatura con ácido acético al 10 %. Se seca y se expone con una película de autorradiografía durante al menos dos horas.

8) Extracción de ABN con fenol:cloroformo.

Agregar un volumen de fenol y agitar con vortex. Agregar un volumen de cloroformo y agitar. Centrifugar 2 min, tomar la fase superior (acuosa) y pasarla a otro tubo. Agregar un volumen de cloroformo, agitar y volver a centrifugar 1 min. Tomar la fase acuosa y agregar 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 N, agitar y agregar 2 volúmenes de etanol a -20°C. Agitar por inversión y congelar en hielo seco. Centrifugar 5 min en frío y tirar el sobrenadante. Secar con vacío y resuspender en agua estéril y filtrada o TE.

9) Síntesis química de ABN.

La síntesis química de ABN en fase sólida (30), tiene como soporte del oligonucleótido que se desea sintetizar, una resina de poliestireno que tiene pegado un grupo bencilamino más un nucleótido protegido en el extremo 5' pero no en el 3' de donde está unido al bencilamino. El extremo protegido se debe desproteger (destritilar) para poder hacerlo reactivo. Todos los nucleótidos solos, dímeros y trímeros están siempre protegidos tanto en el extremos 5' como en el 3'. Así, antes de poner a reaccionar el nucleótido con la resina, hay que desbloquear el extremo 3' y entonces hacer la reacción de unión o acoplamiento. Después de hacer el acoplamiento, se lava la resina y se

hace una reacción que inactiva todos los grupos que no reaccionaron con el fin de que no se tenga al final todo un grupo de oligonucleótidos de los cuales no se sepa su secuencia, pues algunas veces se une el nucleótido siguiente y otras no. Esta reacción es irreversible. A continuación se desbloquea el extremo 5' del nucleótido unido y se le agrega el siguiente nucleótido desbloqueado en el extremo 3' y se repite el ciclo de reacciones hasta tener el oligonucleótido deseado. Como puede notarse, la extensión de la cadena se hace a partir del extremo 3'. El último nucleótido ya no se desbloquea en su extremo 5' sino que se pasa por una columna de HPLC (cromatografía líquida de alta presión) para separarlo de los demás oligonucleótidos incompletos.

10) Preservación de cepas bacterianas.

Crece 1 ml de la cepa de la cual se desea hacer una preparación en glicerol toda la noche y al día siguiente agregarlo a un vial que contenga 1ml de glicerol estéril. Agitar en vortex y meter inmediatamente a un congelador de -20°C . Se mantienen en congelación por un año o más. Se puede tomar una asada para volver a inocular un tubo, y cuando ya está viejo, es recomendable usar una mayor cantidad de inóculo.

11) Purificación de proteínas precipitables.

Las minicélulas producidas con el método antes mencionado, se resuspenden en 200 μl de buffer Tris 50 mM, pH 7.0, EDTA 50 mM, sacarosa 20 % y lisozima 0.2 mg/ml.

Incubar 60 min a 4°C . Centrifugar a 12,000 g/5 min y precipitar el sobrenadante con TCA 80 %. Lavar con acetona, secar y resuspender

en mezcla de lisis para proteínas. Esta es la muestra correspondiente a las proteínas exportadas al espacio periplásmico.

El precipitado se resuspende en 100 µl de agua fría y se congela y descongela dos veces.

Resuspender el precipitado en mezcla de lisis, esta es la muestra correspondiente a las proteínas precipitables.

El sobrenadante se precipita con TCA al 80 %, se lava con acetona, se seca y se resuspende en mezcla de lisis. Esta es la muestra correspondiente a las proteínas de membrana y solubles en citoplasma (31,32).

RESULTADOS.**CONSTRUCCION DEL pNF21.**

Para construir este vehículo se partió del plásmido pKB252 (23) el cual contiene el gene completo que codifica para la proteína *ci* y se encuentra bajo control del promotor *Plac* que está repetido dos veces, en la misma dirección y delimitado por sitios de *EcoRI*. El fragmento de ADN que codifica para el represor *ci* se encuentra clonado como un inserto de *EcoRI* a *HindIII* y con otro sitio para *HindIII* dentro del gene *ci*. El plásmido pKB252 posee aproximadamente 7,050 pb y tiene el gene que codifica para resistencia a Tc inmediatamente después del segmento clonado. El fragmento de interés fue aquel que contenía la región que codifica el N-terminal de *ci* y que se puede sacar como un fragmento *EcoRI-HindIII* de un tamaño de 674 pb. Con esta digestión doble también se tienen otros tres fragmentos: el que lleva la porción que codifica para el C-terminal y una porción más perteneciente al fragmento insertado (563 pb), dos fragmentos del mismo tamaño (205 pb) que están delimitados por sitios de *EcoRI* y que contienen el promotor *Plac*, y un fragmento de aproximadamente 5,400 pb que contiene el vehículo, pMB9 que tiene como extremos *EcoRI* y *HindIII*. El fragmento de 674 pb se electroeluyó y se ligó al vehículo de clonación (ver fig. 3).

El vehículo de clonación que se utilizó fue el pBR712 (33), el cual es un derivado del pBR327 denominado pJRI1 y que solo se diferencia del pBR327 en que éste se digirió con *HindIII* y se le hizo *Bal 31* para quitar el promotor de Tc, y después se le pusieron

adaptadores sintéticos, es decir, pequeños fragmentos de ADN con el sitio de restricción deseado, en este caso el sitio fue para la enzima HindIII. Al ponerle estos adaptadores, quedaron unidos dos de ellos dando lugar a dos sitios de restricción y un sitio adicional para la enzima HaeIII, que se forma por la unión de dos adaptadores.

El pBR712 también contiene antes del sitio de HindIII el promotor sintético de P_{trp} con un sitio para la enzima EcoRI inmediatamente después del promotor. Este promotor es el que permite que se pueda transcribir el gene de resistencia a Tc. Para poder insertar el fragmento de 674 pb, se digirió al pBR712 con EcoRI-HindIII y se electroeluyó el vehículo para impedir que se volviera a unir al fragmento de 10 pb que contiene en medio el sitio para HaeIII y así obtener un solo sitio de HindIII. Además, para asegurar un mejor resultado se defosforiló el vehículo, es decir que se le quitó el grupo fosfato del extremo 5', lo cual evita que la enzima ADN ligasa una dos vehículos entre sí. Esto permite que el vehículo sólo se ligue con moléculas de ADN que sí contengan este grupo y que en este caso fue el fragmento de 674 pb. Una vez que se tuvieron ambos fragmentos se procedió a ligarlos uno con otro en una proporción 1:5 donde la mayor proporción correspondía al fragmento que se desea clonar, para que haya mayor posibilidad de que encuentre al vehículo. Se dejó ligando a 12°C durante 12 hr y antes de transformar se incubó a 37°C durante 30 min para que terminaran de ligarse aquellos fragmentos que estaban muy cercanos, pero que todavía no se habían terminado de unir.

Se transformó la cepa HB101 como se mencionó en la metodología y se distribuyeron las células transformantes en cajas de medio Luria

con Ap. Al día siguiente, se picaron las colonias obtenidas en una cantidad de aproximadamente 100 colonias tanto en medio con Ap como en medio con Tc. En el caso de este plásmido, las células fueron resistentes a Ap y poco resistentes a Tc. El poco resistentes quiere decir que las colonias son más pequeñas cuando se crecen en presencia de Tc que cuando se crecen en Ap.

A continuación se comprobaron los patrones de digestión del plásmido por medio de microensayo de ADN de plásmido y digiriendo primeramente con la enzima HaeIII que es una de las enzimas que da más detalle pues como reconoce secuencias de 4 bases, los sitios de corte se encuentran con bastante frecuencia en el ADN. En este caso, el inserto no tiene ningún sitio para esta enzima, de tal modo que se debería perder una banda o fragmento del plásmido original para convertirse en una de 674 pb más, pero como en el pBR712 hay dos bandas de 140 y 345 pb en lugar de una de 475 pb debido al doble inserto del adaptador de HindIII con un HaeIII en medio y quitamos este segmento en la construcción del pNF21, desaparecen las bandas de 140 y 345 pb y aparece una de 1,121 pb, lo cual ocurre en el caso del pNF21. A continuación se muestra un esquema que contiene la porción del mapa original y de las modificaciones que presenta al clonar el fragmento, con los sitios de restricción más importantes y un cuadro que indica cuales fueron los fragmentos que se pierden en cada digestión y cuales aparecen como nuevos. También se incluye una foto que muestra los resultados de las digestiones realizadas (fig. 4 y 5).

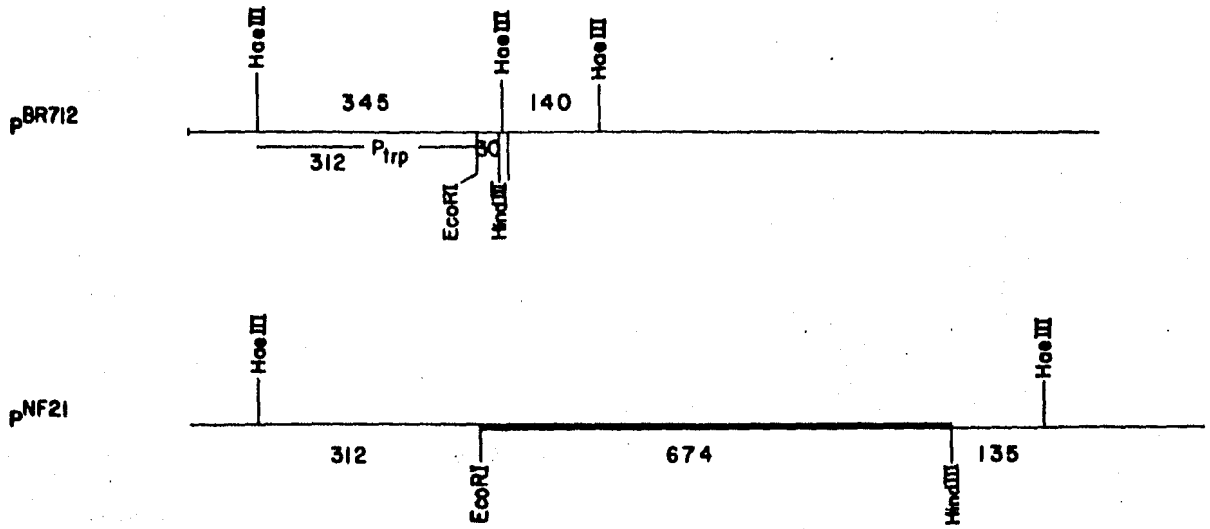
Una vez identificada la colonia portadora del plásmido deseado, se hizo una preparación en glicerol de esta cepa y se purificó el

plásmido por la técnica mencionada en METODOS.

Una característica importante de los antibióticos es que la ampicilina es degradada en 30 min por la enzima β -lactamasa, la cual es codificada por el gene de resistencia a Ap, en cambio, la tetraciclina es modificada solamente por la enzima, pero no se degrada de tal modo que si se agrega tetraciclina a un cultivo que es resistente a ella, es suficiente con que se le agregue una sola vez para que se mantenga la selección del plásmido. En cambio, si se agrega ampicilina a un cultivo que es resistente a ella, ésta se agota a los 30 min y si el plásmido no es muy estable, como ya no tiene presión selectiva, se va perdiendo conforme pasan las generaciones.

En este caso, cuando se intentó la primera vez purificar el plásmido, se le agregó tetraciclina y se obtuvieron al final 150 μ g/l de ADN, cuando que normalmente se obtiene 1 mg/l de cultivo (26). Al pensar en la posibilidad de que el plásmido fuera inestable y fuera necesario ejercer una presión de selección, para estabilizarlo, se repitió la purificación del plásmido pero ahora agregando cada 3 hrs la misma cantidad de ampicilina para mantener la presión selectiva. Se obtuvieron al final de la purificación 4 mg de ADN por litro, cantidad que supera en mucho lo obtenido normalmente.

Una vez purificado el pNF21, se procedió a verificar que estuvieran todos los patrones de restricción mas importantes para determinar que el plásmido estuviera bien y que no hubiera perdido ninguno de los sitios más importantes para otras clonaciones, para lo cual se hicieron las siguientes digestiones: EcoRI, HindIII, BamHI, HaeIII, HaeIII-EcoRI, HaeIII-BamHI, HaeIII-HindIII, EcoRI-HindIII, EcoRI-BamHI y HindIII-BamHI (ver fig.5).



ENZIMA	DESAPARECE EN pBR712	DESAPARECE EN pNF21/HaeIII	APARECE
HaeIII	345 y 140pb		1121pb
HaeIII-EcoRI		1121pb	312 y 809pb
HaeIII-BomHI		104pb	80 y 24pb
HaeIII-HindIII		1121pb	986 y 135pb
EcoRI-HindIII	30pb		674pb y VEHICULO
EcoRI-BomHI	375pb		1019pb y VEHICULO

Fig. 4 Mapa de restricción del pBR712 y del pNF21 y patrón de bandas producidas por la digestión sencilla o doble con las enzimas indicadas.

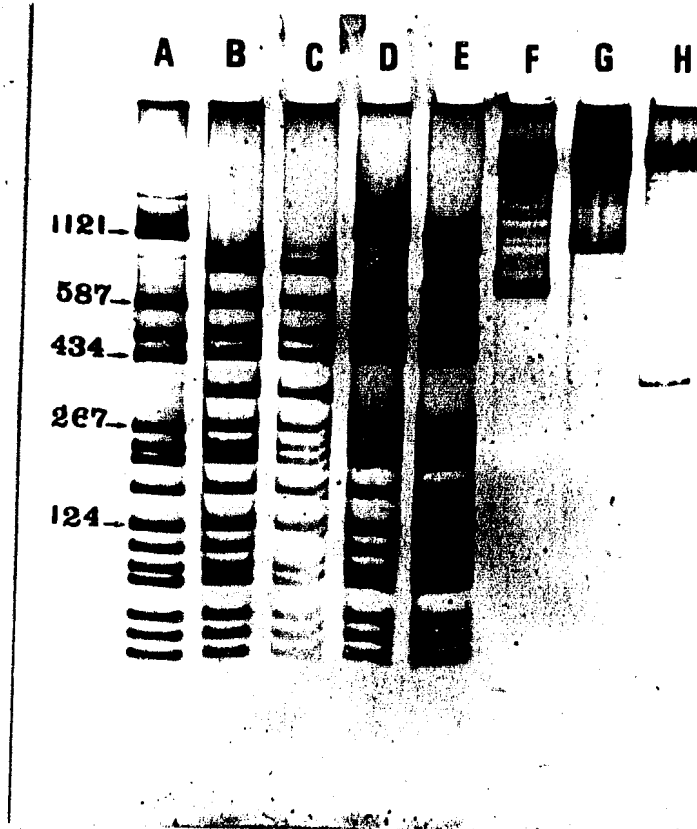


Fig. 5 Patrones de digestión del pNF21. A) pNF21/HaeIII, B) pNF21/HaeIII-EcoRI, C) pNF217/HaeIII-EcoRI, D) pNF21/HaeIII, E) pNF21/HaeIII-HindIII, F) pNF21/EcoRI-HindIII, G) pNF21/EcoRI-BamHI, H) pNF21/BamHI-HindIII.

CONSTRUCCION DEL pNF217.

Para construir este plásmido que contiene el gene híbrido cI-cadena B de insulina se requirió de la síntesis química de un fragmento de ADN que dejara en fase ambos genes. Esto se hizo por la técnica de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida (28) y la secuencia del fragmento sintetizado fue:

5' AGCTCTGGTCGTCGTC
GACCAAGCAGCAATTAA 5'

Este fragmento de ADN es complementario en sus extremos a los dejados por la digestión con las enzimas HindIII y EcoRI pero no regenera dichos sitios. Esto se hizo así debido a que ya hay un sitio de EcoRI entre P_{trp} y cI y hay otro sitio de HindIII en el inserto de la cadena B que se le clonó.

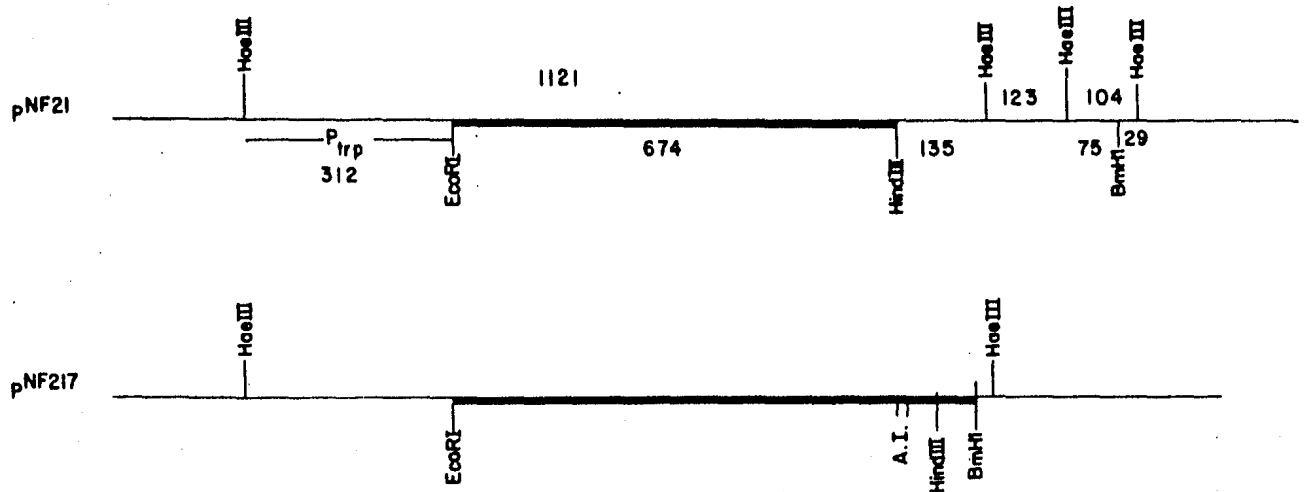
Por otro lado, para obtener el gene de la cadena B de insulina, se utilizó el plásmido pBR271 (34), el cual se digirió con EcoRI-BamHI y se electroeluyó el fragmento de 104 pb.

El vehículo, que en este caso fue el pNF21, se digirió con HindIII-BamHI y se electroeluyó. El vehículo, el adaptador sintético y el fragmento de 104 pb que codifica para la cadena B de insulina humana se ligaron entre sí utilizando la enzima ADN ligasa del fago T4. El producto de la reacción de ligado se usó para transformar células de B. coli HB101.

Las células transformantes se seleccionaron en cajas de medio Luria con Ap. Posteriormente se contraseleccionaron en cajas con Tc. El ADN de las colonias Tc sensibles (Tc^S) se purificó por un microensayo y se analizó su patrón de restricción.

Las enzimas que se usaron para este análisis fueron HaeIII, HindIII, BamHI y una digestión doble HindIII-BamHI. Al plásmido que presentó el patrón de restricción esperado se le llamó pNF217.

Como en el caso anterior, también se muestra una fotografía de las bandas obtenidas con las digestiones hechas a este plásmido para demostrar que su patrón de restricción coincide con el esperado, así como un esquema de la porción del mapa que se modificó y su cuadro de las bandas que desaparecen y de las nuevas que aparecen (fig. 6 y 7).



ENZIMA	DESAPARECE EN pNF21	APARECE EN pNF217
HaeIII	1121, 123 y 104pb	1135pb
HaeIII - EcoRI	1121, 123 y 104pb	312 y 823pb
HaeIII - BmHI	1121, 123 y 104pb	29 y 1106pb
HaeIII - HindIII	1121, 123 y 104pb	87 y 1048pb
EcoRI - HindIII	674pb	736 y 399pb
EcoRI - BmHI	1007pb	794pb
HindIII - BmHI	345pb	58pb

Fig. 6 Mapa de restricción del pNF21 y del pNF217 y patrón de bandas producidas por digestiones sencillas y dobles con las enzimas indicadas.

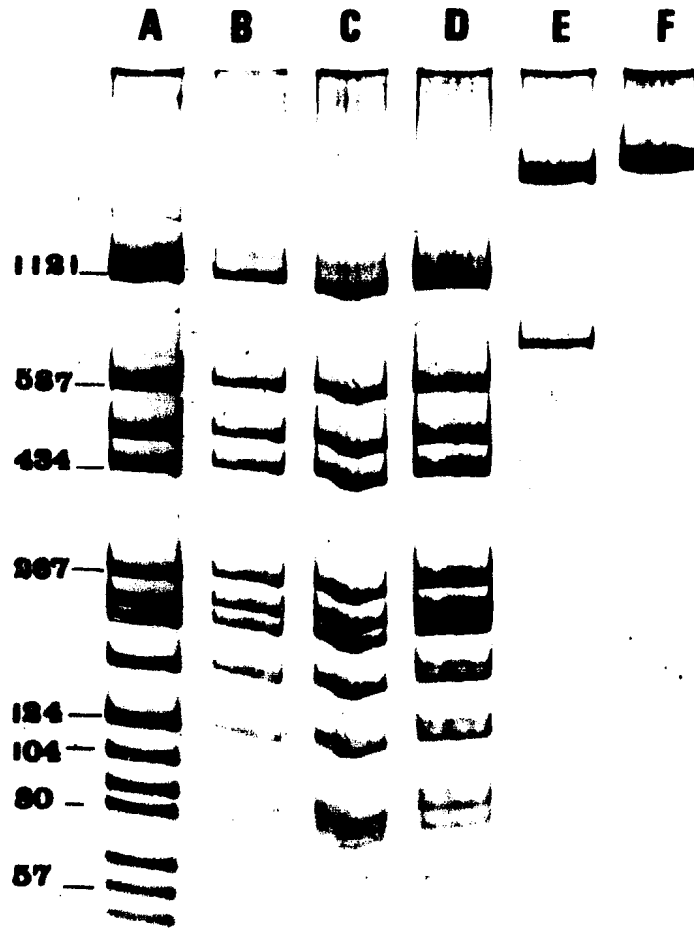


Fig. 7 Patrones de digestión del pNF21 y pNF217. A) pNF21/HaeIII, B) pNF217/HaeIII, C) pNF217/HaeIII-HindIII, D) pNF217/HaeIII-BamHI, E) pNF217/EcoRI-HindIII, F) pNF217/BamHI-HindIII.

ANALISIS EN MINICELULAS.

Los plásmidos pNF21 y pNF217 fueron transformados en la cepa productora de minicélulas, con el fin de identificar que proteínas codificaba cada uno de ellos y se comparó con el patrón del pBR712 (fig.8). En minicélulas, el pBR712 produce una proteína de 34,500 daltons (34.5 Kd) y que es la que confiere resistencia a Tc, también produce otras dos proteínas de 30 y 28 Kd, pertenecientes al precursor y la proteína madura de β -lactamasa (resistencia a Ap). La proteína de resistencia a Tc aparece muy tenue y en muchos casos no se logra ver a menos que se exponga la película de autorradiografía por mucho tiempo.

En el caso del pNF21 se pueden ver las bandas de 30 y 28 Kd y una menor de aproximadamente 18,600 d y que corresponde a la proteína con el N-terminal de CI (159 aminoácidos).

En el pNF217 se encuentran las mismas tres bandas de β -lactamasa, no se encuentra la banda de 18.6 Kd pero si una de aproximadamente 22 Kd y que corresponde a la proteína híbrida CI-cadena B.

Al analizar el patrón de proteínas totales presentes en los extractos de minicélulas de cada uno de los plásmidos mencionados, fue de particular interés el hecho de que existe una proteína que migra a la altura del peso molecular esperado para la proteína híbrida y que se observaba con mayor intensidad que el resto de las proteínas en el mismo carril o que el carril que contiene al control. Esto, en cambio, no ocurrió con la cepa que contenía el plásmido pNF21 (fig.9). Esto sugiere que el producto del pNF217 se acumula.

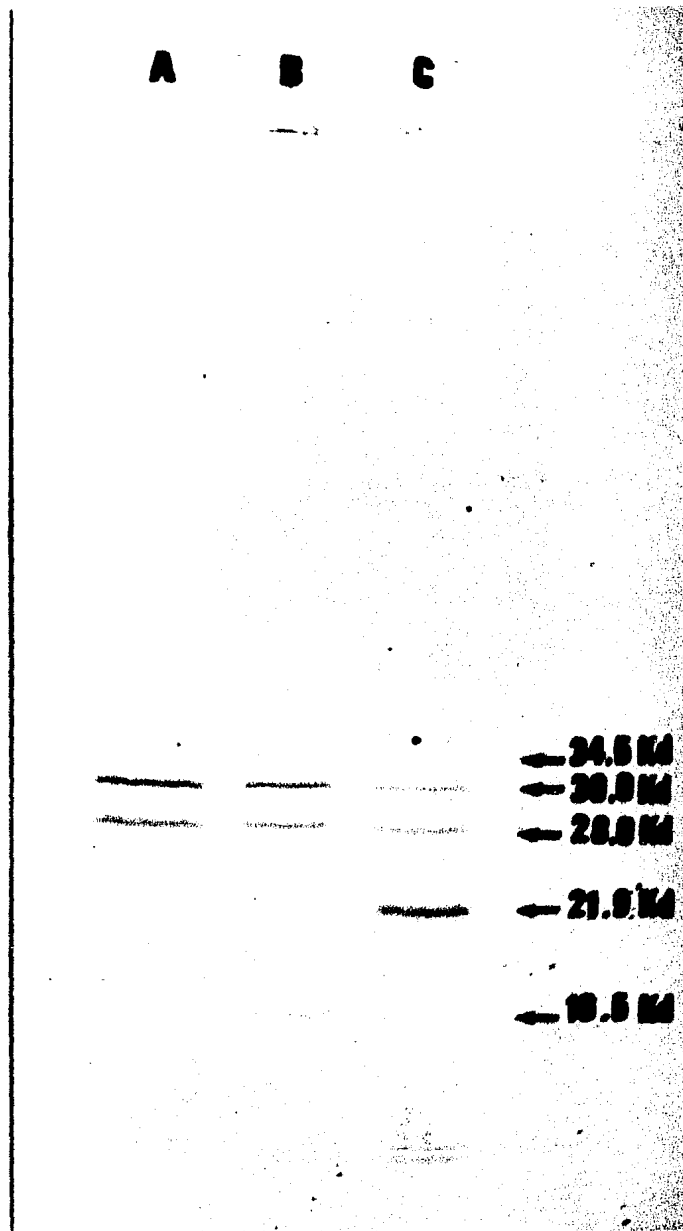


Fig. 8 Autorradiografía de un gel de poliacrilmida de minicélulas del pNF21 y pNF217. A)P678-54/pBR712, B)P678-54/pNF21, C)P678-54/pNF217.

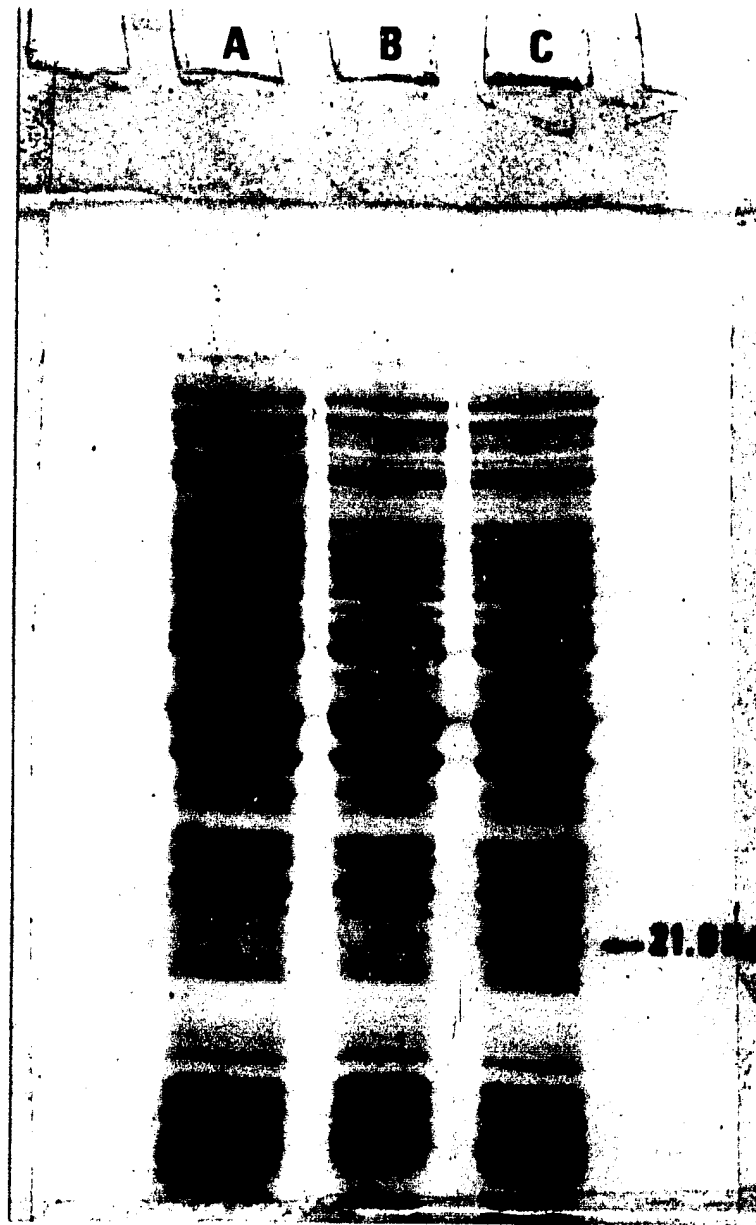


Fig. 9 Gel de poliacrilamida-SDS 15 % de micéculas del pNF21 y pNF217. A)P678-54/pBR712, B)P678-54/pNF21, C)P678-54/pNF217.

A continuación se presenta la secuencia de nucleótidos completa para la proteína híbrida, con su correspondiente secuencia de aminoácidos. En ella se indica la región que corresponde a la secuencia adaptadora y la perteneciente a la cadena B de insulina.

ATG AGC ACA AAA AAG AAA CCA TTA ACA CAA GAG CAG CTT GAG GAC GCA CGT CGC CTT AAA	30	60
MET Ser Thr Lys Lys Lys Pro Leu Thr Gln Glu Gln Leu Glu Asp Ala Arg Arg Leu Lys		
GCA ATT TAT GAA AAA AAG AAA AAT GAA CTT GGC TTA TCC CAG GAA TCT GTC GCA GAC AAG	90	120
Ala Ile Tyr Glu Lys Lys Lys Asn Glu Leu Gly Leu Ser Gln Glu Ser Val Ala Asp Lys		
ATG GGG ATG GGG CAG TCA GGC GTT GGT GCT TTA TTT AAT GGC ATC AAT GCA TTA AAT GCT	150	180
MET Gly MET Gly Gln Ser Gly Val Gly Ala Leu Phe Asn Gly Ile Asn Ala Leu Asn Ala		
TAT AAC GCC GCA TTG CTT ACA AAA ATT CTC AAA GTT AGC GTT GAA GAA TTT AGC CCT TCA	210	240
Tyr Asn Ala Ala Leu Leu Thr Lys Ile Leu Lys Val Ser Val Glu Glu Phe Ser Pro Ser		
ATC GCC AGA GAA ATC TAC GAG ATG TAT GAA GCG GTT AGT ATG CAG CCG TCA CTT AGA AGT	270	300
Ile Ala Arg Glu Ile Tyr Glu MET Tyr Glu Ala Val Ser MET Gln Pro Ser Leu Arg Ser		
GAG TAT GAG TAC CCT GTT TTT TCT CAT GTT CAG GCA GGG ATG TTC TCA CCT GAG CTT AGA	330	360
Glu Tyr Glu Tyr Pro Val Phe Ser His Val Gln Ala Gly MET Phe Ser Pro Glu Leu Arg		
ACC TTT ACC AAA GGT GAT GCG GAG AGA TGG GTA AGC ACA ACC AAA AAA GCC AGT GAT TCT	390	420
Thr Phe Thr Lys Gly Asp Ala Glu Arg Trp Val Ser Thr Thr Lys Lys Ala Ser Asp Ser		
GCA TTC TGG CTT GAG GTT GAA GGT AAT TCC ATG ACC GCA CCA ACA GGC TCC AAG CCA	450	480
Ala Phe Trp Leu Glu Val Glu Gly Asn Ser MET Thr Ala Pro Thr Gly Ser Lys Pro		AGC Ser
TCT GGT CGT CGT CAA TTC ATG TTC GTC AAT CAG CAC CTT TGT GGT TCT CAC CTC GTT GAA	510	540
Ser Gly Arg Arg Gln Phe MET Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu		
GCT TTG TAC CTT GTT TGC GGT GAA CGT GGT TTC TTC TAC ACT CCT AAG ACT TAA TAG	570	
Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr		

Fig. 10 Secuencia nucleotídica y aminoácida de la proteína híbrida cl-cadena B de insulina humana.

— cl N-terminal.

●●● adaptador de insulina.

--- cadena B de insulina.

Una vez que se demostró que se producía una proteína con el peso molecular esperado, el siguiente paso fue saber si esta proteína era soluble o no. Esto es, si la proteína se precipita dentro de la célula en forma de cuerpos de inclusión, nombre que se les da a las proteínas que al sobreproducirse dentro de la célula se precipitan, o si se encuentra en solución en el citoplasma.

Al fraccionar las células en sus componentes se observó que la proteína híbrida estaba dentro de la célula y que pertenecía a la fracción de proteínas precipitables, es decir, que forma cuerpos de inclusión. Este resultado se muestra en la figura 11.

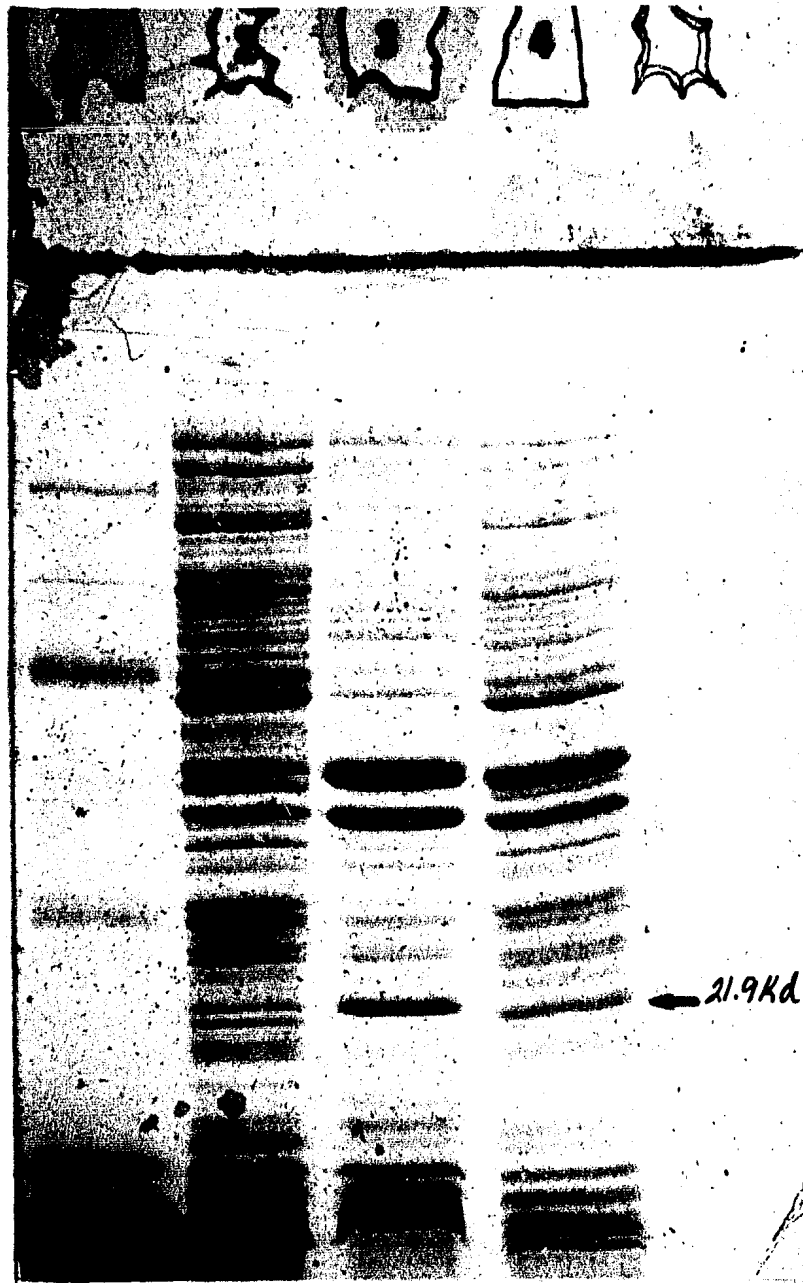


Fig. 11 Gel del poliacrilamida-SDS 15 % de la semipurificación de cuerpos de inclusión de la cepa P678-54/pNF217. 1)fracción de proteínas periplasmicas, 2)fracción de proteínas de membrana y proteínas solubles, 3)fracción de proteínas precipitables, 4)extracto total de P678-54/pNF217.

DISCUSION.

Cuando se desea producir proteínas de interés en la bacteria Escherichia coli, existen dos problemas fundamentales para su obtención que son: la estabilidad de la proteína dentro de la célula y la purificación de esta. Por esta razón fue que se diseñó un vehículo molecular que permitiera la formación de proteínas híbridas estables, que tengan la región N-terminal de ci fusionada a la proteína que se desea purificar.

El represor ci, al igual que otras proteínas que se unen al ADN, tiene tres regiones funcionales; la región que le confiere la afinidad inespecífica por el ADN, la región que le da especificidad por determinada secuencia y la que permite la dimerización. No en todos los casos se pueden delimitar claramente estas regiones, pero en el caso de ci se han identificado dos dominios; el N-terminal que contiene las regiones de afinidad inespecífica y específica y el C-terminal que permite la dimerización (18,20,21). En general, en proteínas que se unen al ADN, el dominio C-terminal es el que ha variado y se dice que todas ellas han evolucionado de un ancestro común (14). La proteína ci además tiene una vida media larga y es de fácil purificación (10).

El hecho de que la región C-terminal sea la que ha variado en las proteínas, nos hizo pensar que podríamos cambiarla sin modificar su estabilidad, características de unión al ADN y su modo de purificación. De este modo podríamos tener la proteína híbrida deseada que se pudiera purificar como la nativa y que le confiriera su estabilidad.

En este caso, la proteína híbrida fue con la cadena B de insulina humana. Los resultados indican que se produce esta proteína y que es estable. También se demuestra que la proteína se sobreexpresa en la capa de minicélulas y que se precipita en cuerpos de inclusión dentro de la célula. Este último punto fue de gran importancia puesto que al precipitarse la proteína, fue imposible lograr la purificación de la proteína por el método reportado para purificar CI (10). Por lo cual será necesario purificarla por el método de purificación de cuerpos de inclusión (29).

Otra característica importante de esta proteína es que no contiene ninguna cisteína en la región correspondiente al CI y las únicas que puede tener son las del péptido que se le fusione, de este modo se evita la formación de puentes disulfuro no deseados y si se podrían formar los adecuados en el péptido del C-terminal o entre péptidos de dos proteínas híbridas, lo cual es un poco más sencillo de solucionar.

El método hasta ahora utilizado para la obtención del péptido ya separado de la proteína híbrida es el de ruptura con bromuro de cianógeno (33), compuesto que rompe la cadena polipeptídica en el grupo carboxilo de la metionina. Como puede notarse, la producción de péptidos por este método, requiere que el péptido que se desea purificar no contenga en su secuencia el aminoácido metionina. En el caso de la proteína híbrida CI-cadena B, los péptidos resultantes de la ruptura con CNBr son los que se muestran en el apéndice I.

APENDICE 1

Péptido	1	2	3	4	5	6	7	8
Peso molecular	4,628	206	4,795	698	2,323	4,205	1,706	3,557
Met	2	1	1	1	1	1	1	0
Ser	3		4	1	3	5	3	1
Thr	2		1			4	2	2
Lys	8		2			3	1	1
Pro	1		1		2	1	2	1
Leu	5		5		1	2		4
Gln	3		1		2		1	1
Glu	5		4	1	2	4		2
Ala	3		6	1	1	3	1	1
Arg	2		1		1	2	2	1
Ile	1		4					
Tyr	1		2	1	2			2
Asn	1		4			1		1
Gly	1	1	4		1	2	2	3
Val	1		3	1	2	2		3
Phe			2		1	3	1	3
His						1		2
Trp						2		
Cys								2
Total de aa.	41	2	45	6	20	37	16	30

Es importante hacer notar que las únicas dos cisteínas se encuentran en el fragmento correspondiente a la cadena B y que ésta representa el 16 % de la proteína híbrida.

CONCLUSIONES.

El sistema de expresión descrito en este trabajo, cumple con varias de las características deseables para poder producir con alta eficiencia una proteína extraña a la bacteria E. coli. Algunas de estas son, la sobreexpresión de la proteína híbrida, lo que indica que el promotor P_{trp} se induce en este sistema y funciona adecuadamente. También se demuestra que la proteína es estable y que se precipita dentro de la célula. Tiene, además, la cualidad de no tener ninguna cisteína en la porción codificada por el clon de tal modo que cualquier cisteína que contenga la proteína híbrida que se construya, pertenecerá al péptido que se desea purificar y esto tiene la ventaja de que se puede purificar con mayor facilidad.

Para poder hacer cualquier otra proteína de fusión con este sistema, se cuenta con un sitio de HindIII al final del fragmento que codifica para el N-terminal, en el cual se puede clonar el gene que se desea expresar ya sea directamente si así queda en fase la lectura de traducción del mensaje, o bien, poniéndole un adaptador sintético que cumpla con esta función. Además, las proteínas híbridas que se construyan, pueden ser sobreexpresadas en este sistema gracias a la presencia del promotor P_{trp}.

PERSPECTIVAS.

Resta por hacer algunas cosas para terminar este trabajo y que son:

- 1) Demostrar que la proteína se puede purificar de manera sencilla y económica.
- 2) Optimizar las condiciones de crecimiento e inducción de la expresión genética bajo control del promotor P_{trp} en los plásmidos pNF21 y pNF217.
- 3) Construir otro plásmido que contenga la cadena A de insulina humana y demostrar que se produce y sobreexpresa de la misma manera que la proteína híbrida con cadena B.

REFERENCIAS.

- 1.- Bolívar, F. 1980. Ingeniería genética molecular. Ciencia 31:155-163.
- 2.- Bolívar, F. 1979. Recombinación "in vitro" de ácidos nucleicos: Ingeniería Genética Molecular. Rev. Lat-amer. Microbiol. 21:37-55.
- 3.- Bolívar, F. 1979. Producción de hormonas humanas por ingeniería genética. Naturaleza 1:23-32.
- 4.- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A., Heyneker, H., Bolívar, F. y Boyer, H. 1977. Expression in E. coli. of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. Science 198:1056-1063.
- 5.- Goeddel, D., Kleid, D., Bolívar, F., Heyneker, H., Yansura, D., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K. y Riggs, A. Expression in E. coli. chemically synthesized genes for human insulin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:106-111.
- 6.- Seeburg, P., Shine, J., Martial, J. A., Bacter, J. D. y Goodman, H. 1977. Nucleotide sequence and amplification in bacteria of a structural gene for rat growth hormone. Nature 270:486-494.
- 7.- Grosjean, H. y Fiers, W. 1982. Preferential codon usage in procaryotic genes: the optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes. Gene 18:199-209.

- 8.- Gouy, H. y Gautier, C. 1982. Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. Nucl. Ac. Res. 10:7055-7074.
- 9.- Miller, J. y Reznikoff, U. 1980. The operon. 2nd. edition. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, USA.
- 10.- Johnson, A. D., Pabo, C. O. y Sauer, R. T. 1980. Bacteriophage lambda repressor and cro protein: interactions with operator DNA. Methods in enzymology 65:839-856.
- 11.- Takeda, Y., Ohlendorf, D.H., Anderson, U. F. y Matthews, B. W. 1983. DNA-binding proteins. Science 221:1020-1026.
- 12.- Sassenfeld, H. H. y Brewer, S. J. 1984. A polypeptide fusion designed for the purification of recombinant proteins. Biotechnology 76-81.
- 13.- Ohlendorf, D. H., Anderson, U. F., Lewis, H., Pabo, C.O. y Matthews, B. W. 1983. Comparison of the structures of cro and lambda repressor proteins from bacteriophage lambda. J. Mol. Biol. 169:757-769.
- 14.- Sauer, R. T., Yocum, R. R., Doolittle, R. F., Lewis, H. y Pabo, C. O. 1982. Homology among DNA-binding proteins suggests use of a conserved super-secondary structure. Nature 298:447-451.
- 15.- Matthews, B. W., Ohlendorf, D. H., Anderson, U. F., Fisher, R. G. y Takeda, Y. 1983. How does cro repressor recognize its DNA target sites? TIBS 25-29.

- 16.- Herskowitz, I. y Hagen, D. 1980. The lysis-lysogeny decision of phage lambda: explicit programming and responsiveness. *Ann. Rev. Genet.* 14:399-445.
- 17.- Hecht, H. H., Nelson, H. C. H. y Sauer, R. T. 1983. Mutations in lambda repressor's amino-terminal domain: implications for protein stability and DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2676-2680.
- 18.- Hawley, D. K. y McClure, W. R. 1983. The effect of a lambda repressor mutation on the activation of transcription initiation from the lambda P_{rm} promoter. *Cell* 32:327-333.
- 19.- Pabo, C. O., Krovatin, W., Jeffrey, A. y Sauer, R. T. 1982. The N-terminal arms of lambda repressor wrap around the operator DNA. *Nature* 298:441-443.
- 20.- Hochschild, A., Irwin, N. y Ptashne, M. 1983. Repressor structure and the mechanism of positive control. *Cell* 32:319-325.
- 21.- Pabo, C. O., Sauer, R. T., Sturtevant, J. H. y Ptashne, M. 1979. Repressor contains two domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1608-1612.
- 22.- Sauer, R. T., Pabo, C. O., Meyer, B. J. y Ptashne, M. 1979. Regulatory functions of the lambda repressor reside in the amino-terminal domain. *Nature* 279:396-400.
- 23.- Backman, K., Ptashne, M. y Gilbert, W. 1976. Construction of plasmids carrying the cI gene of bacteriophage lambda. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:4174-4178.

- 24.- Reeve, J. 1979. Use of minicells for bacteriophage-directed polypeptide synthesis. *Methods in Enzymology*. 68:493-502.
- 25.- Lacks, S. A. 1977. Mechanisms of DNA uptake by cells. *Genetic interactions and gene transfer. Brookhaven Symposia in Biology*. No. 29:147-159.
- 26.- Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- 27.- Bolívar, F., Rodríguez, L. R., Betlach, M.C., y Boyer, H. W. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. I: Ampicillin resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* 2:75-93.
- 28.- Cuevas, G. M. A. 1983. Síntesis de polinucleótidos mediante técnica estandarizada. Adaptador para la endonucleasa BgIII. Tesis para químico farmacéutico biólogo. UNAH. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza. México, D. F.
- 29.- Hartson, F., Lowe, P. A., Doel, M.T., Schoemaker, J. M., White, S. y Angal, S. 1984. Purification of calf prochymosin (prorennin) synthesized in Escherichia coli. *Biotechnology* 800-804.
- 30.- Braus, G., Argast, M. y Beck, C. F. 1984. Identification of additional genes on transposon Tn10:tetC and tetD. *J. Bacteriol.* 160:504-509.
- 31.- Gross, E. 1967. The cyanogen bromide reaction. *Methods in Enzymology*. 11:238-255.

32.- Bolívar, F. 1978. Construction and characterization of new cloning vehicles. III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique EcoRI sites for selection of EcoRI generated recombinant DNA molecules. Gene 4:121-136.

33.- Alvarez, B. A. 1984. Construcción de un sistema biológico para la biosíntesis de las cadenas A y B de insulina humana en *E. coli*. Tesis de licenciado en ciencias de la nutrición y de los alimentos. Universidad Iberoamericana. México, D. F.

34.- Balbás, D. B. P. 1981. Producción de proteínas en bacterias mediante recombinación "in vitro" de ácidos nucleicos. Tesis de licenciado en ciencias de la nutrición y de los alimentos. Universidad Iberoamericana. México, D. F.