



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

77
Res
1995

FACULTAD DE CIENCIAS

"CONSTRUCCION DE UNA BIBLIOTECA DE ADN COMPLEMENTARIO DE VAINA DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L)."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGO

PRESENTA:

ENRIQUE HERNANDEZ HERNANDEZ



MEXICO D. F. FEBRERO

1995.

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE

Jefe de la División de Estudios Profesionales

Facultad de Ciencias

Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron el pasante(s)

Enrique Hernández Hernández

con número de cuenta 8509137-3 con el Título:

"Construcción de una biblioteca de ADN complementario de vaina de frijol (Phaseolus vulgaris L)".

Otorgamos nuestro **Voto Aprobatorio** y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Biologo.

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
	Dra. Herminia Loza Tavera		<i>Herminia Loza T.</i>
Director de Tesis	Dra. Alejandra Mainero del Paso		<i>Alejandra Mainero</i>
	M. en C. José Juan Zuñiga Aguilar		<i>J. J. Zuñiga</i>
	Bio. Carlos Alberto Castillo Pompeyo		<i>C. A. Castillo</i>
Suplente	M. en C. Patricia Guadalupe Orozco Soto		<i>P. G. Orozco</i>
Suplente			

ABREVIATURAS.

- ADN:** Acido desoxirribonucleico.
ADNc: ADN complementario.
ARN: Acido ribonucleico.
ARNm: ARN mensajero.
ARNr: ARN ribosomal.
ARNt: ARN de transferencia.
TCA: Acido tricloroacético.
C3: Plantas cuyo primer compuesto estable después de la fijación del CO₂ es un compuesto de tres C (Gliceraldehído 3-fosfato).
C4: Plantas cuyo primer compuesto estable después de la fijación del CO₂ es un compuesto de cuatro C (ácidos málico o aspártico).
CAM: Plantas con el metabolismo ácido de las crasuláceas.
cpm: Cuentas por minuto.
dNTP: Mezcla deoxirribonucleótidos trifosfatos.
DEPC: Dietil-pirocarbonato.
EDTA: Etilendiamino tetraacetato.
EGTA: Etilen glicol Acido tetraacético.
IP TG: Isopropil tio β-D-galactosido.
Kb: Kilobase.
LB: Medio Luria-Bertoni.
M: Molaridad.
mg: Miligramo.
ml: Mililitro.
ng: Nanogramos.
nm: Nanómetros.
pb: Pares de bases.
PDB: Amortiguador de dilución del fago.
PEPC: Fosfoenolpiruvato carboxilasa.
PEP: Fosfoenolpiruvato.
RUBISCO: Ribulosa-1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa.
RT: Transcriptasa reversa.
TRIS: Tris-(hidroximetil) aminometano.
ufp: Unidades formadoras de placas.
μg: Micro gramo.
μl: Micro litro.
X-Gal: 5-Bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-galactosido.
(α-³²P): Fosforo 32 marcado con emisiones alfa.

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado a todas aquellas personas por las cuales siento un profundo cariño y respeto.

A mis padres, el señor **Silvestre Hernández Reyes** la señora **Eustolia Hernández Becerril**.

A mis hermanos, **David**

Alberto

Andrea

Agustín

Julio

Jesús

y Nora

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias al apoyo recibido por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (D.G.A.P.A).

Al proyecto D.G.A.P.A. IN-203592 titulado "Fosfoenolpiruvato carboxilasa de frijol: regulación y expresión genética", por la beca proporcionada.

Al Departamento de Bioquímica de la División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Química por permitirme desarrollar este trabajo en sus instalaciones.

A la Dra. Herminia Loza Tavera por su dirección, consejos y experiencia transmitida para la realización de la presente Tesis.

Al M. en C. José Juan Zuñiga por su orientación, consejos y asesoría brindada.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Alfredo, Javier, Leonel, Claudia y Gabriela con quienes compartí momentos gratos, pero sobre todo por su amistad desinteresada y porque siempre estuvieron dispuestos a colaborar.

A todos los compañeros del Departamento de Bioquímica que siempre estuvieron en la mejor disposición para brindar una ayuda cuando más se necesitaba.

CONTENIDO

página

I. RESUMEN

II. INTRODUCCIÓN.

- 1.- IMPORTANCIA DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR Y DE LAS BIBLIOTECAS DE GENES.
- 2.- LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE VAINA DE FRIJOL.

III.- REVISIÓN DE LITERATURA.

- 1.- FIJACIÓN DEL CO₂ EN VAINA DE FRIJOL.
- 2.- BIBLIOTECAS DE GENES.
- 3.- TIPOS DE BIBLIOTECAS
- 4.- DIFERENCIAS ENTRE LOS DISTINTOS TIPOS DE BIBLIOTECAS.
- 5.- BIBLIOTECAS DE ADNc.
- 6.- CARACTERÍSTICAS DE UNA BUENA BIBLIOTECA DE ADNc.
- 7.- EXTRACCIÓN DE ARNm POLY (A)⁺.
- 8.- VECTORES.
- 9.- λZIPLOX.
- 10.- ESTRATEGIA PARA LA CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE ADNc EN λZIPLOX.

IV. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES

V. OBJETIVOS.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

- 1.- MATERIAL BIOLÓGICO.
- 2.- EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.
- 3.- ELECTROFORESIS DE ARN EN AGAROSA.
- 4.- EXTRACCIÓN DE ARNm POLY (A)⁺.
- 5.- SÍNTESIS DE PRIMERA CADENA DE ADNc.
- 6.- SÍNTESIS DE SEGUNDA CADENA DE ADNc.
- 7.- ADICIÓN DEL ADAPTADOR SAL I.
- 8.- DIGESTION CON NOT I.
- 9.- CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.
- 10.- LIGACIÓN DEL ADNc AL VECTOR.
- 11.- REACCIÓN DE EMPAQUE.
- 12.- TITULACIÓN DE LA BIBLIOTECA.
- 13.- ESCISION in vivo DEL pZL1 DE λZIPLOX.
- 14.- MINIPREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO.

15.- ANÁLISIS DE DNA PLASMÍDICO DIGERIDO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

16.- ANÁLISIS DE SÍNTESIS DE PRIMERA Y SEGUNDA CADENA DE ADNc.

VII. RESULTADOS.

1.- EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL Y ARNm POLY (A) +

2.-SÍNTESIS DE ADNc.

3.- ANÁLISIS DE SÍNTESIS DE PRIMERA Y SEGUNDA CADENA DE ADNc.

4.- CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA Y LIGACIÓN DEL ADNc.

5.- LIGACIÓN Y EMPAQUE DEL ADNc.

6.-TITULACIÓN DE LA BIBLIOTECA

7.- EXCISION DEL ADNc.

VIII. DISCUSIÓN.

1.- PASOS IMPORTANTES EN LA CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA DE ADNc DE VAINA DE FRIJOL.

2.- ANÁLISIS DE LA BIBLIOTECA CONSTRUIDA.

IX. CONCLUSIÓN.

X. REFERENCIAS.

I. RESUMEN.

La Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) cataliza la fijación del CO₂ en fosfoenolpiruvato (PEP) para formar oxaloacetato y fosfato inorgánico. La PEPC es una enzima clave implicada en la fijación del CO₂ en plantas y algunos otros organismos. La función metabólica que desempeña el producto de esta enzima depende del tejido y del tipo de planta bajo estudio.

Este trabajo está comprendido dentro de un proyecto general más amplio llamado "Fosfoenolpiruvato carboxilasa de frijol: regulación y expresión génica", el cual tiene por objeto determinar el número de genes que codifican a la PEPC en vaina de frijol, analizar su secuencia y sus regiones reguladoras, así como comparar el grado de identidad existente entre esta y otras PEPC descritas.

El paso inicial y quizá el más importante para llevar al cabo este objetivo es la construcción de una biblioteca de ADNc de vaina de frijol a partir del ARN mensajero aislado de un estadio de desarrollo de la vaina en donde se conozca que el gen de la PEPC está siendo expresado.

En este trabajo se realizó la construcción y caracterización de una biblioteca de ADNc de vaina de frijol de siete días después de la floración. La síntesis del ADNc se realizó por medio de una transcriptasa reversa (SuperScript RT II Gibco, BRL), con la cual se obtuvieron 21.47 μ g de ADNc, los cuales se clonaron en el vector λ ZIPLOX, el cual contiene un vector plasmídico multifuncional, el pZL1, este es un vector inducible por IPTG. Después de la clonación se tituló la biblioteca obteniéndose un título de 2.28×10^8 ufp/ μ g ADNc. Los ADNc sintetizados tienen un tamaño desde 500 pb a 8 Kb. La recuperación

del plásmido se realizó por un mecanismo de escisión *in vivo* que es una característica importante que ofrece el vector; y los ADNc clonados se recuperaron por medio de cortes de ADN con enzimas de restricción. Los resultados de las electroforesis sirvieron para analizar los tamaños de ADNc clonados, obteniéndose un tamaño promedio de 2.9 Kb, y los insertos con mayor frecuencia clonados tienen tamaños de 2.4 y 2.5 Kb.

Estos resultados indican que la biblioteca construida tiene las características necesarias para ser considerada como una buena biblioteca de ADNc, y en base a esto, existen altas probabilidades de no sólo la secuencia de la PEPC, sino también encontrar cualquier otro gen que este siendo expresado en vaina de frijol.

II INTRODUCCIÓN.

1. IMPORTANCIA DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR Y DE LAS BIBLIOTECAS DE GENES.

Entre las más excitantes áreas de las ciencias modernas está la Biología Molecular y una de sus aplicaciones: la Ingeniería Genética (Schuler y Zielinski, 1989). La Ingeniería Genética es el conjunto de técnicas que realizan manipulaciones sobre el ADN. Esta disciplina se encarga de aislar genes, de precisar su estructura y, por último, de introducir el gen "purificado" y eventualmente modificado en las células de un organismo distinto al de origen (Davies, 1987). La interacción entre la Biología Molecular y la Ingeniería Genética ha permitido desarrollar una gran cantidad de productos que han mejorado la calidad de vida de la población, tales como medicamentos, proteínas, organismos hiperproductores, vacunas, etc. (Dodet, 1987., Langley-Danzysz, 1987 Pétiard, 1987., Tempe y Schell, 1987).

Recientemente tanto la investigación biomédica como la biotecnológica han experimentado cambios revolucionarios con el desarrollo de la manipulación genética, la manipulación genética se define como la formación de nuevas combinaciones de material heredable por la inserción de moléculas de ácidos nucleicos (producidos por cualquier medio fuera de la célula) en algún virus, plásmido bacteriano o algún otro vector tal que permita su incorporación dentro de algún organismo hospedero en el cual no exista naturalmente, pero en el que sean capaces de continuar

propagándose (Old y Primrose, 1989). El término de manipulación genética puede ser aplicado a una gran variedad de técnicas *in vitro* e *in vivo*.

Una de las técnicas que ha permitido el desarrollo de la Ingeniería Genética es la construcción de bibliotecas de genes. Una biblioteca tiene por objeto reunir la información genética de un determinado organismo, clonando fragmentos de ADN o de ADN complementario (ADNc) relativamente pequeños en algún vector, esto permite almacenar la información genética de un organismo dentro de unos pocos centenares de miles de fagos o plásmidos. El construir una biblioteca es un paso prioritario y muy importante para realizar una gran cantidad de experimentos con múltiples aplicaciones que tengan como finalidad obtener, clonar y posteriormente manipular un gen de particular interés.

Una vez clonado y aislado el gen de interés éste puede servir para analizar diferentes aspectos tales como estructura, secuencia, expresión temporal y espacial, etc; con lo cual se tendría información acerca del funcionamiento y regulación del gen. Una vez conocida toda la información posible acerca de él se podría efectuar transfección para generar organismos transgénicos que permitan un análisis *in vivo* de la expresión de ese gen. La manipulación genética abre posibilidades de mejoramiento genético de especies vegetales, por ejemplo el incrementar el rendimiento en la producción de semillas o frutos, resistencia a plagas y enfermedades, a altas concentraciones salinas, a temperaturas extremas o sequía, y con ello favorecer el cultivo de ciertas especies en condiciones ambientales adversas.

2. LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE VAINA DE FRIJOL.

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una planta de la familia de las leguminosas y su semilla tiene un amplio consumo dentro de la mayor parte de la población mexicana debido a su fácil adquisición y a su bajo costo.

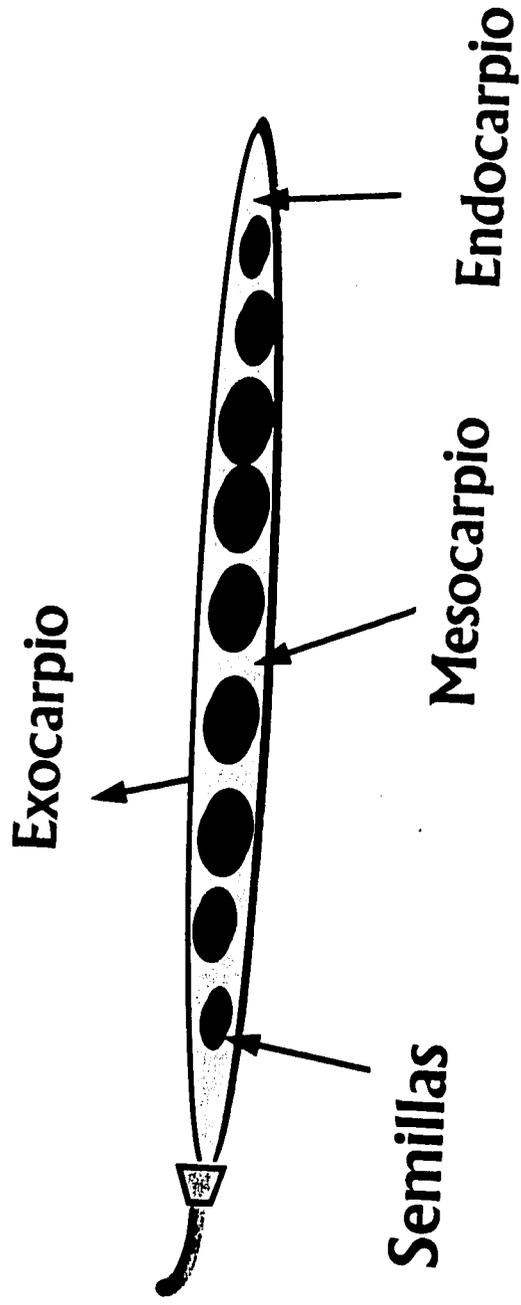
El hecho de poseer un alto contenido proteico hace a la semilla del frijol una buena alternativa para satisfacer las demandas proteicas de una gran parte de la población que no tiene acceso a proteínas de origen animal, siempre y cuando se complemente la dieta con algunos otros alimentos que contengan los aminoácidos esenciales que no tiene el frijol.

En la vaina de frijol cuando se encuentra madura pueden apreciarse tres partes más o menos distintas, desde el exterior hacia el interior, a las cuales se les denomina exocarpio, mesocarpio y endocarpio (Fahn, 1990), a la pared del fruto que proviene de la pared del ovario se le denomina pericarpio (Figura 1).

Flinn *et al* (1977) observaron en frutos de leguminosas, que la vaina, contribuye con aproximadamente un 10% al carbono de la semilla a través de la fijación del CO₂ respirado, lo cual es una cantidad nada despreciable considerando la producción total.

El análisis de la fijación del CO₂ por medio de las enzimas fijadoras RUBISCO y PEPC en los frutos muestra que muy poco CO₂ atmosférico es fijado por medio de la RUBISCO en relación con lo que fijan las hojas (Blanke y Lenz, 1989). En un trabajo realizado por

Estructura interna de vaina de frijol



Delgado (1992) en frijol, se observó que la actividad de la PEPC se localizaba en mayor cantidad en tejido interno de la vaina, la alta actividad de la PEPC está correlacionada con las condiciones que operan dentro de la vaina: altos niveles de CO₂, niveles relativamente bajos de clorofila y una penetración restringida de la luz a través del pericarpio. Sin embargo, la ruta por la cual se lleva al cabo la reasimilación del CO₂ en la vaina no está clara.

La Fosfoenolpiruvato carboxilasa [EC 4.1.1.31] (PEPC) cataliza la fijación del CO₂ en fosfoenolpiruvato (PEP) para formar oxaloacetato y fosfato inorgánico (Kodaki *et al*, 1985). La PEPC es una enzima clave implicada en la fijación del CO₂ en plantas y algunos otros organismos. La función metabólica que desempeña el producto de esta enzima dependerá del tejido y del tipo de planta bajo estudio. Así en hojas de plantas con fotosíntesis de tipo C₃, como el frijol, la PEPC se encarga de proveer compuestos de cuatro carbonos que se introducen al ciclo de Krebs (función anaplerótica) y que pasan a formar parte de aminoácidos. En plantas con fotosíntesis tipo C₄ la PEPC cataliza la fijación fotosintética del CO₂ en la primera reacción de la ruta C₄. En plantas que presentan el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) la función de la PEPC es también de tipo fotosintético.

El frijol es una planta del tipo C₃ por lo cual se esperaría que la PEPC presentara un comportamiento correspondiente a esta isoforma. Sin embargo, la alta actividad de esta enzima presente en vaina es atípica con respecto a la que se observa en hoja. Por otro lado las condiciones ya señaladas anteriormente no permiten definir certeramente la ruta por la cual se lleva a cabo la fijación del CO₂ en el tejido interno de la vaina de frijol.

El desarrollo de este trabajo está comprendido dentro de un proyecto general más amplio llamado "Fosfoenolpiruvato carboxilasa de frijol: regulación y expresión génica", el cual tiene por objeto determinar el número de genes que codifican a la PEPC en vaina de frijol, analizar su secuencia y sus regiones reguladoras, así como comparar el grado de identidad existente entre esta y otras PEPC descritas.

El enfoque que se pretende seguir para abordar este problema es aislar el gen de la PEPC que se expresa en vaina de frijol, analizar su secuencia y compararla con las de otros tipos de PEPC descritos. El grado de identidad que presente la PEPC de vaina de frijol con los diferentes tipos de PEPC descritos puede ayudarnos a esclarecer el tipo de PEPC que se encuentra presente en este tejido. El paso inicial y quizá el más importante para llevar al cabo este objetivo es la construcción de una biblioteca de ADNc de vaina de frijol a partir del ARN mensajero aislado de un estadio de desarrollo de la vaina en donde se conozca que el gen de la PEPC está siendo expresado.

Los niveles de identidad han sido descritos por Sugimoto *et al* (1992) con base en la secuencia de aminoácidos presentes en algunos tipos de PEPC descritos en la literatura, el porcentaje de identidad encontrado entre la PEPC de plantas tipo C₃ es del 88%, mientras que al comparar la PEPC de plantas tipo C₃ con las CAM estas tienen un grado de identidad del 82%, por lo que respecta al porcentaje de identidad existente entre la PEPC de plantas tipo C₃ y las C₄ el valor es de 73%.

III REVISIÓN DE LITERATURA.

1. FIJACIÓN DEL CO₂ EN VAINA DE FRIJOL.

El análisis de las enzimas fijadoras de CO₂ en los frutos muestra que muy poco CO₂ atmosférico es fijado por medio de la RUBISCO (enzima del ciclo de reducción fotosintética del carbono) en relación a lo que fijan las hojas. La actividad de esta enzima en las paredes de la vaina de chícharo es de 10 a 100 veces menor que la actividad en las hojas (Hedley *et al.*, 1975). En el pericarpio verde del grano de trigo se ha detectado una preponderancia de productos de PEPC marcados, tales como aspartato, citrato, malato y glutamato después de 1 minuto de exposición a ¹⁴CO₂ en luz (Aoyagi y Bassham, 1984). Además, considerando la actividad de la PEPC, se han descrito relaciones de PEPC:RUBISCO de 1.7 a 14 para el fruto de tomate, mientras que para hoja los valores son alrededor de 0.1 (Bravdo *et al.*, 1977; Laval-Martin *et al.*, 1977). Por otro lado las características cinéticas de PEPC de fruto difieren grandemente de la PEPC de otros tejidos u órganos (Blanke *et al.*, 1986).

Esto ha llevado a proponer a Blanke y Lenz (1989) que en los frutos está ocurriendo un tipo de fotosíntesis característico de este órgano al cual denominaron "fotosíntesis de fruto". Sin embargo, hasta la fecha no se ha definido si realmente la PEPC del fruto está funcionando fotosintéticamente. El hecho de que esta enzima tenga un papel anaplerótico importante en algunos tejidos hace suponer que ésta podría ser su principal función en fruto. En un trabajo realizado en frijol por Delgado (1992), se observó que la actividad de la

PEPC era mayor en tejido interno de la vaina. Por otro lado, al proporcionar a la cavidad interna de la vaina $^{14}\text{CO}_2$ durante 1 minuto se observó que aparecían marcados los compuestos sacarosa, glicina, serina, almidón, ácido aspártico, ácido glutámico y glutamina. Esto indica que el CO_2 se está fijando en el tejido interno de la vaina, pero la ruta por la cual se lleva a cabo no está clara.

Aparte de la asimilación fotosintética del carbono, otras funciones se han atribuido a la PEPC tales como proveer de compuestos de carbono al ciclo de Krebs (función anaplerótica) y los cuales pasan a formar parte de aminoácidos, generación de NADPH, refijación del CO_2 , asimilación de nitrógeno, síntesis de aminoácidos y mantenimiento del pH/electroneutralidad (Tirumala y Raghavendra, 1992).

2. BIBLIOTECAS DE GENES.

Una biblioteca o genoteca es una colección de material genético de un individuo de interés insertado en algún vector para posteriormente buscar la secuencia de algún gen que se encuentre presente o que este siendo expresado en algún tipo de células características (Nossal, 1988).

La construcción de bibliotecas de genes representa un método esencial para cualquier investigador que esté tratando de esclarecer la importancia y el papel que algún gen esté desempeñando dentro de un organismo. De ahí que represente quizás, el paso inicial a seguir

para tratar de conocer de manera integral, la estructura del gen y cómo está regulado, teniendo estos conocimientos muy claros pueden desarrollarse una gran cantidad de experimentos que permitan conocer cómo se está expresando dicho gen bajo ciertas condiciones de desarrollo.

Con base en lo anterior no es difícil entender la importancia que tiene desarrollar de manera confiable y eficiente esta metodología: la construcción de una biblioteca, ya sea genómica o de ADNc.

3. TIPOS DE BIBLIOTECAS.

Existen dos tipos de bibliotecas comúnmente usadas:

Bibliotecas genómicas.- preparadas a partir del ADN total del organismo bajo estudio, dicho ADN es digerido con una endonucleasa de restricción y cada fragmento es clonado en algún vector. La biblioteca debe contener un número suficientemente abundante de clonas para que exista la posibilidad estadística de que todos los genes se encuentren presentes.

Bibliotecas de ADNc .- construidas a partir del ARN mensajero que se encuentra presente en algún tejido o tipo de células específicas y que únicamente contiene copias de aquellos genes que están siendo activamente expresados en ese tejido particular o tipo de célula (Brown, 1991). Para la construcción de estas bibliotecas el ARNm sirve de molde para sintetizar ADNc por acción de la Transcriptasa Reversa (RT).

4. DIFERENCIAS ENTRE LOS DISTINTOS TIPOS DE BIBLIOTECAS.

Las diferencias existentes entre ambos tipos de bibliotecas se generan por el origen mismo de cada una de ellas. Las bibliotecas genómicas por estar construidas a partir del ADN total, contienen toda la información genética de un individuo, y por ello brindan la posibilidad de obtener secuencias más grandes y por lo tanto un gen completo incluyendo las regiones reguladoras del gen de interés. Mientras que las bibliotecas de ADNc únicamente incluyen la información genética de los ARNm que están siendo activamente expresados en un determinado tejido. La probabilidad de encontrar el mensaje completo del gen de interés no es del 100%, ya que esto depende de la procesividad de la RT lo cual está en función de la calidad y pureza de la enzima y del ARNm que sirve de molde. En lo referente al tamaño de las secuencias encontradas, en la biblioteca de ADNc van a ser menores en comparación con las obtenidas de la biblioteca genómica. Esto es debido a que en el momento en que son transcritos los mensajes a partir del ADN los intrones son removidos por un proceso llamado corte y reunión (splicing), y aunque estos intrones son parte constitutiva de un gen, no son traducibles a polipéptidos (Lehninger *et al*, 1993). Por otro lado estos fragmentos de ADNc no llevan las regiones reguladoras del gen.

Dado que en una biblioteca genómica el ADN es digerido con una endonucleasa de restricción, esto le proporciona extremos cohesivos para ser clonados en el vector y por lo tanto la metodología general de la construcción de una biblioteca genómica se reduce a la

extracción del ADN, su corte con enzima de restricción y clonación. Por lo contrario, la construcción de una biblioteca de ADNc implica un mayor número de pasos lo cual repercute en los cuidados que se deben de tener, y en la mayor cantidad de controles que se deban introducir en cada una de las reacciones. Esto no significa de ninguna manera que la construcción de una biblioteca genómica sea fácil, sino que desde el punto de vista metodológico implica un menor número de pasos.

En lo que respecta a la probabilidad para aislar un gen, en ambos tipos de bibliotecas ésta va a depender del número de copias que tenga el gen y del número de mensajes que se encuentren presentes en la célula. Si hablamos de un mensaje que es abundante y que está siendo activamente expresado, esto podría facilitar en un momento dado la búsqueda del gen de interés en una biblioteca de ADNc.

5. BIBLIOTECAS DE ADNc.

La conversión de ARNm a una molécula de ADNc con el propósito de clonarla es compleja y difícil, ya que implica una serie de reacciones enzimáticas que por su misma naturaleza son altamente específicas y sensibles a cualquier factor exógeno que pueda afectar el curso de la reacción (Kimmel y Berger, 1987).

Desde que las primeras clonas de ADNc fueron obtenidas a mediados de los años 70's, diferentes métodos han sido desarrollados para incrementar la eficiencia de síntesis de una doble cadena de ADNc y muchas mejoras han sido introducidas a los vectores de

clonación y a las enzimas involucradas. Además, los avances teóricos y técnicos que se han logrado en el área de Biología Molecular en la década de los 80's ha permitido aislar clonas de ADNc correspondientes a especies extremadamente raras de ARNm.

Los ARNm pueden ser clasificados en la célula como de alta, media y baja abundancia. De alta abundancia si existen 30 copias de ARNm por célula de la secuencia de interés, media si existen 15 copias por célula del mensaje de interés y baja cuando existen muy pocas copias o al menos una copia (Farrell, 1993).

De manera general la construcción de una biblioteca de ADNc puede resumirse en cuatro pasos: extracción de ARNm poly (A)⁺, síntesis de ADNc, adición de adaptadores y clonación.

6. CARACTERÍSTICAS DE UNA BUENA BIBLIOTECA DE ADNc.

Todas las buenas bibliotecas de ADNc poseen tres características que las distinguen de las malas bibliotecas: 1) contener la suficiente cantidad de todas las secuencias de interés, algunas de las cuales derivan de ARNm de baja abundancia; 2) incluir el número mínimo de clonas que tenga insertos pequeños (<500 pb) de ADNc; y 3) estar compuestas de insertos de ADNc que hayan sido copiados de ARNm.

Las bibliotecas pueden clasificarse como direccionales o al azar. Todos los miembros de una biblioteca direccional contienen insertos de ADNc clonados con una orientación específica; esto es, que el 100% de los insertos clonados tengan una orientación 5'→3', mientras que

las bibliotecas al azar contienen insertos de ADNc clonados en cualquier orientación, 50% 5'→3' y 50% 3'→5'.

Algunas de las bibliotecas direccionales son construidas en un vector de expresión y el gen clonado está controlado por un promotor inducible. Estas dos características ofrecen la facilidad de realizar el escrutinio de la biblioteca por técnicas Inmunológicas.

7. EXTRACCIÓN DE ARNm.

La construcción de una buena biblioteca de ADNc comienza con la extracción de un ARNm de alta calidad, ya que de esto depende la cantidad de información que pueda ser convertida a ADNc.

Se sabe que alrededor del 1 al 5% del ARN total es ARNm (Farrell, 1993), para poder aislar esta pequeña fracción del ARNr y del ARNt se conocen diferentes métodos, entre los cuales destacan la extracción por columna de oligo (dT) celulosa, el papel de afinidad por el mensajero y las esferas magnéticas. Estos tres métodos se basan en el mismo principio que parte de que la casi totalidad de los ARNm presentan una cola de poly-A en el extremo (3') y esta característica permite unir por complementación los ARNm a la secuencia de oligo (dT) a la columna, al papel y a las esferas.

Al analizar cada uno de los tres métodos se pueden detectar diferencias en cuanto a la pureza, rendimiento y tiempo invertido en el proceso. En nuestro caso se optó por las esferas magnéticas por ser un método novedoso y práctico, además de que la limpieza y calidad del ARN poli A+ son bastante aceptables, y la cantidad obtenida con

este método se ajusta al valor requerido para iniciar la construcción de una biblioteca de ADNc que es de 1 a 5 μg de ARNm.

8. VECTORES

En la actualidad se ha diseñado una gran variedad de vectores. Desde que Cohen y colaboradores en 1973 diseñaron el primer vector, el pSC101, todos los vectores que hasta la fecha se han elaborado reúnen ciertas características tales como poder clonar fragmentos de ADN desde algunos pares de bases (pb) hasta varias kilo bases (kb). Se les han introducido además secuencias de orígenes de replicación, promotores, sitios múltiples de clonación, resistencia a antibióticos, etc.; lo cual les proporciona más versatilidad en el manejo.

Los vectores se pueden clasificar principalmente en cuatro tipos dependiendo del modo de replicación en la bacteria hospedera: vectores plasmídicos, cósmidos, bacteriófagos de doble cadena y de cadena sencilla de ADN. Una quinta categoría podría incluirse y es aquella que combina las propiedades de los plásmidos y de los bacteriófagos de cadena sencilla de ADN (Brown, 1991).

En años recientes ha sido diseñada una nueva generación de vectores que reúne ciertas cualidades de sus antepasados y características innovadoras que hacen muy atractivo su empleo. Algunas de estas características son: expresión regulada por un promotor inducible, mecanismos de escisión *in vivo*, clonación direccional, etc.

9. λ ZIPLOX.

El λ ZIPLOX es un vector de expresión que combina una eficiente clonación de ADNc y un fácil escrutinio de la biblioteca con la ventaja de tener un vector plasmídico multifuncional. El λ ZIPLOX contiene el plásmido pZL1 flanqueado por secuencias loxP y entre la parte izquierda y derecha contiene brazos de λ gt10 y λ gt 11 (Figura 2). Cuando el promotor lac es inducido con IPTG el gen clonado es expresado como una proteína en la porción amino terminal de β -galactosidasa codificado por lacZ'. Después de la clonación y selección de la clona de interés por pruebas inmunológicas o por hibridación con ácidos nucleicos, el ADNc puede ser recuperado por medio de la replicación autónoma de pZL1 usando el protocolo de escisión *in vivo* y eliminando así la tediosa subclonación. El λ ZIPLOX puede clonar fragmentos de hasta 8.4 kb. El pZL1 contiene 19 sitios únicos de restricción en el sitio múltiple de clonación flanqueados por promotores SP6 y t7 RNA polimerasa y contiene el origen de replicación del bacteriófago P1.

El pZL1 es de 4.3 kilo bases, que deriva del pSPORT1, una de las características importantes del pZL1 es que puede existir como plásmido de cadena doble o de cadena sencilla, el plásmido de cadena sencilla ofrece ventajas para poder secuenciar. Cuando es escindido de λ ZIPLOX el pZL1 es idéntico a pSPORT1, excepto porque este último contiene un sólo sitio loxP y la secuencia Inca para una alta producción de plásmido, contiene una secuencia loxP instalada en un sitio BspH 1 y el locus de incompatibilidad del fago P1 Inca en el otro sitio BspH I.

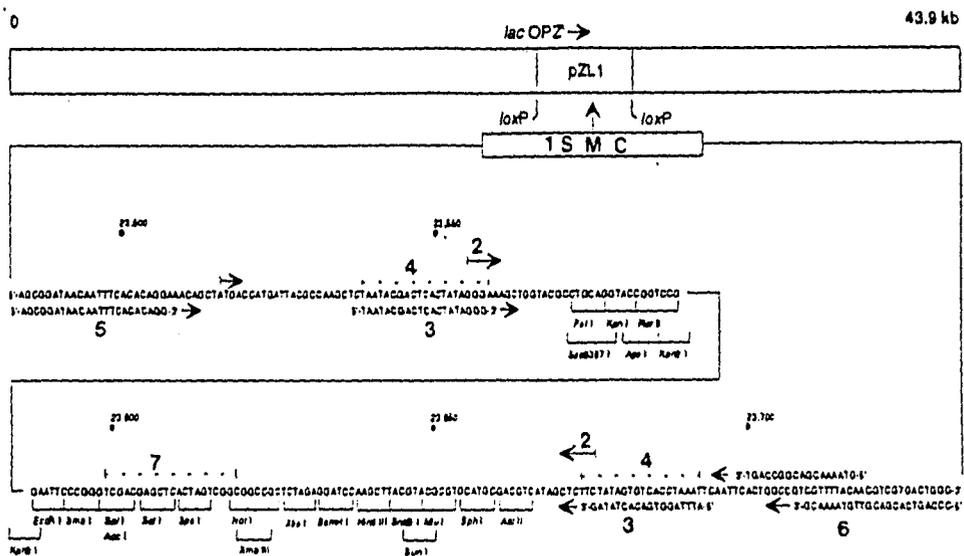


Figura 2. Mapa del λ ZIPLOX de 43.9 kb en el cual se encuentra el pZL1 flanqueado por las dos secuencias *loxP* y mostrando con detalle 1) el Sitio Múltiple de Clonación (S. M. C.), 2) Inicio de Transcripción, 3) Promotor Inicial, 4) Promotor, 5) Secuencia del Inicializador Reverse, 6) Secuencia del Inicializador Forward, 7) 21 Bases Removidos para Not I-Sal I.

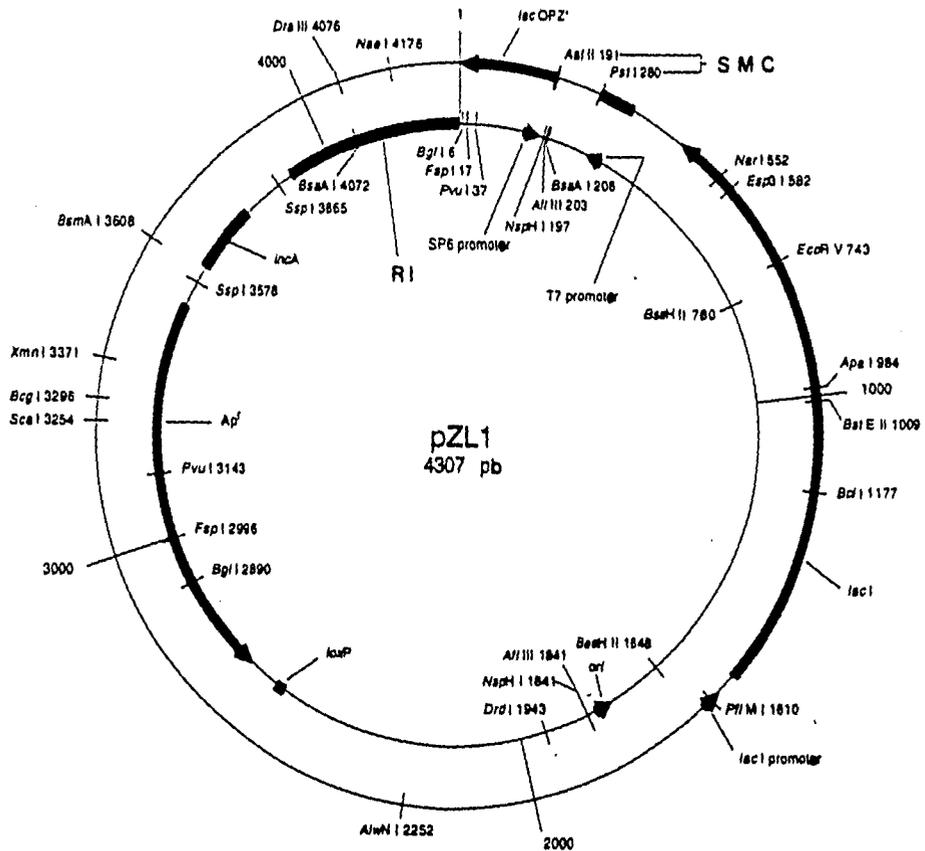


Figura 3. Mapa del pZL1 de 4.3 kb, señalando el sitio múltiple de clonación (S. M. C.), los sitios *loxP* y la región *inca*, región intergénica (R. I), así como los sitios de restrcción, la resistencia al antibiótico y las regiones reguladoras.

Todas las otras características del pSPORT 1 fueron cuidadosamente conservadas en pZL1 (Figura 3).

El λ ZIPLox es de aproximadamente 43.9 Kb y fue construido a partir de un fragmento de 23.1 Kb de λ gt10 digerido en el brazo izquierdo con Hind III, y de un fragmento Sal I de 12.7 Kb derivado del brazo izquierdo de una mutante de λ gt11. A este fago se le pueden insertar teóricamente fragmentos de ADNc de hasta 8.4 Kb (D'Alessio *et al.*, 1992).

La escisión *in vivo* está determinada porque el bacteriófago PI ha desarrollado el sistema de recombinación sitio-específico compuesto de dos elementos: un locus que actúa en cis (loxP) y una proteína (Cre) la cual corta los dos sitios loxP que se encuentran flanqueando al pZL1 (Hoess and Abremski, 1985). Una vez liberado y circularizado el pZL1 el locus Inca del pZL1 bloquea físicamente el origen de replicación del pZIP, que es un plásmido propio de la cepa DH10B capaz de realizar la excisión *in vivo*, debido a que codifica a la proteína Cre (Figura 4).

10. ESTRATEGIA PARA LA CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE ADNc EN λ ZIPLOX.

La síntesis de la primera cadena se lleva a cabo por medio de la SuperScript II RT, la cual es una Transcriptasa reversa producto de ingeniería genética y que posee dos características importantes, una es que la actividad de RNasa que es parte integral de todas las demás RT está notablemente disminuida y la segunda es que la actividad de

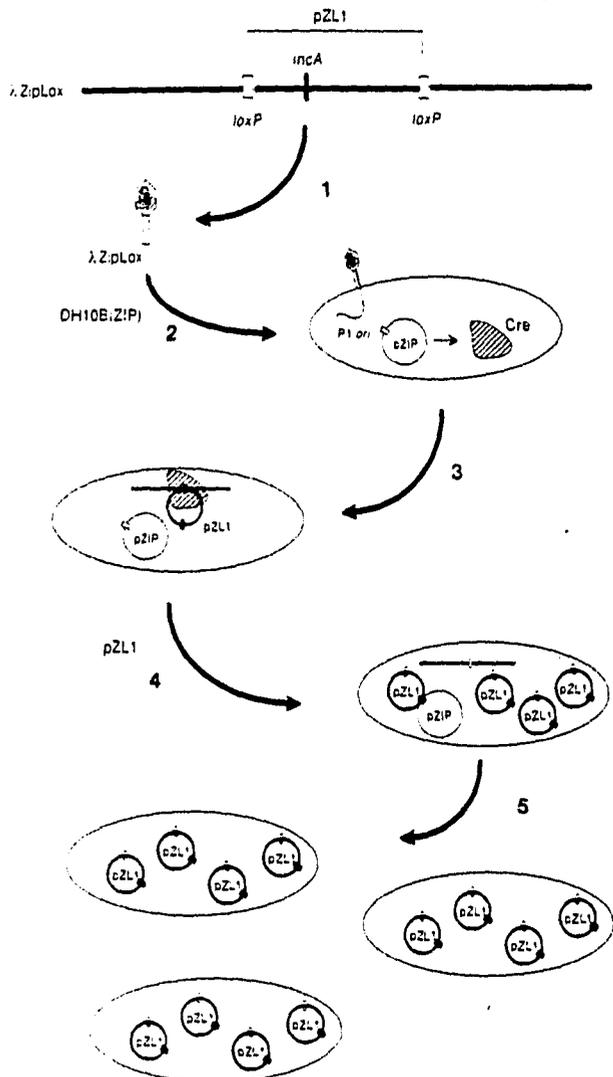
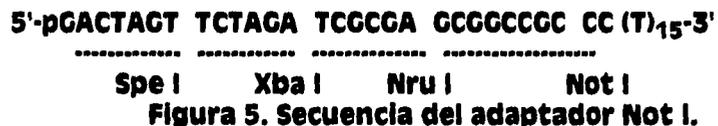


Figura 4. Mecanismo de excisión *in vivo* del pZL1 de λ ZIPLOX. 1) Empaque *in vitro* del ADN de λ ZIPLOX, 2) Infección de la cepa DH10B por el fago λ ZIPLOX, 3) Escisión del pZL1 del ADN de λ ZIPLOX a través de una proteína Cre nativa de la cepa, 4) Replicación del pZL1 y bloque del origen de replicación del pZIP que es el plásmido de la cepa, por medio del *incA*, 5) División celular y selección por resistencia al antibiótico que le confiere el pZL1.

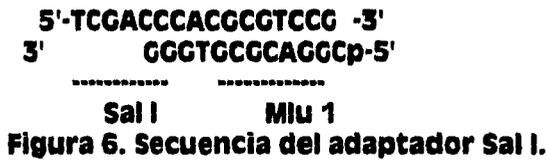
polimerasa ha sido significativamente mejorada en relación a la SuperScript I.

La RT utiliza como iniciador un adaptador Not I de 44 bases de largo el cual contiene 15 residuos dT y 4 sitios de restricción que son relativamente raros en el genoma (Fig. 5). Este primer adaptador va a unirse a la cola de poly A del ARNm y a partir de ahí la RT va a iniciar la síntesis de la primera cadena.



El siguiente paso es la síntesis de la segunda cadena utilizando ADN polimerasa I de *E. coli*, la cadena sintetizada por esta enzima va a reemplazar al ARNm que sirvió de molde para la síntesis de la primera cadena. Para esto la reacción de síntesis de la segunda cadena incluye además otras dos enzimas, una RNasa H que va a degradar el ARNm que sirvió de molde y una ligasa que unirá los distintos fragmentos sintetizados, lo cual va a permitir que los fragmentos de ADNc de tamaño mayor a 2 kb puedan ser producidos.

Ya sintetizada la doble cadena de ADNc adaptadores Sal I son ligados por medio de una T4 ADN ligasa, la cual va a unir el adaptador a ambos lados de la molécula. Este adaptador Sal I es de 16 bases de largo (Fig.6).



Después de este paso sigue una digestión con Not I que va a servir para dejar libre el extremo 3' de la cadena de ADNc y de esta forma dejar extremos pegajosos a ambos lados de la molécula. El extremo 5' lleva un sitio Sal I, mientras que al 3' lleva el sitio Not I y esto le va a conferir direccionalidad al ADNc al momento de clonarlo en el vector.

Las cadenas de ADNc deben de estar marcadas con (α - ^{32}P) dCTP, lo cual permite cuantificar la cantidad de ADNc sintetizada, calcular la eficiencia de síntesis y monitorear también la síntesis.

El siguiente paso es una cromatografía en columna, que permite separar los fragmentos de ADNc por tamaño para de esta manera clonar las fracciones de mayor longitud. El uso de esta técnica permite también cuantificar la cantidad de ADNc que se va a clonar, dado que el ADNc está marcado radiactivamente. Otro objetivo de la cromatografía es eliminar los adaptadores que podrían en un momento dado competir con las moléculas de ADNc por los sitios de unión al vector.

La clonación del ADNc se lleva a cabo en el ADN de λ ZIPLOX, con sitios Not I-Sal I el cual es un vector de expresión inducible con IPTG. Este vector ofrece 2 ventajas importantes: una es que el escrutinio de la biblioteca se puede realizar por pruebas inmunológicas o por

hibridaciones con sondas específicas de ácidos nucleicos y la segunda es que se puede realizar una subclonación automática gracias a que existe la posibilidad de realizar la ya mencionada escisión *in vivo*, la cual se lleva a cabo en la cepa *E. coli* DH10B.

Finalmente las bacterias que tienen el pZL1 y por tanto las que poseen el ADNC de interés son seleccionadas por resistencia a ampicilina y por la coloración blanca cuando son crecidas en el medio en presencia de IPTC y X-Gal.

IV ANTECEDENTES EXPERIMENTALES

El desarrollo de este trabajo está comprendido dentro de un proyecto general más amplio llamado "Fosfoenolpiruvato carboxilasa de frijol: regulación y expresión génica", el cual tiene por objeto determinar el número de genes que codifican a la PEPC en vaina de frijol, analizar su secuencia y sus regiones reguladoras, así como comparar el grado de homología existente entre ésta y otras PEPC descritas. En estudios previos realizados por Flores (1994) se observó que los transcritos de la PEPC desaparecían después de los 14 días del desarrollo de la vaina, mientras que Delgado (1992) detectó que la actividad de la enzima se mantenía aún a los 21 días. Esto sugiere que hasta los 14 días del desarrollo de la vaina la PEPC podría estar regulada a nivel transcripcional mientras que después su regulación es a nivel postraducciona.

V. OBJETIVOS.

- ◆ Construir una biblioteca de ADNc de vaina de frijol de 7 días después de la floración en el vector λ ZIPLOX.
- ◆ Caracterizar la biblioteca por análisis del peso molecular de los insertos de ADNc clonados en el vector.

VI MATERIALES Y MÉTODOS.

1. MATERIAL BIOLÓGICO.

El material biológico empleado fueron vainas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L variedad black Valentine) de 7 días después de la floración, el cultivo estuvo bajo el cuidado de la M. en C. Adriana Delgado del Colegio de Postgraduados de Chapingo. Las plantas fueron cultivadas en macetas con tierra de hoja bajo condiciones de invernadero. Las vainas de frijol fueron colectadas y congeladas con nitrógeno líquido para ser almacenadas a -70°C.

2. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL (Sheen and Bogard, 1985; Schuler and Ziellinski, 1989).

Para trabajar con ARN se recomienda tratar el agua con DEPC (dietil-pirocarbonato), el cual es un inhibidor de RNasa (Sambrook, et al .1989).

1. Tomar 5 gramos de vaina de frijol, colocarlos en un mortero frío y macerar con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.
2. Inmediatamente después agregar 3 ml de amortiguador de extracción (Tris-HCl 100 mM, [pH 8.6], 2% de sarkosil, tiocianato de guanidina 4 M, EDTA 25 mM, EGTA 25 mM, β -mercaptoetanol 100 mM) por gramo de tejido.
3. Pasar el tejido a un tubo falcon de 50 ml y agregar 1.5 ml de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) por gramo de tejido, el fenol debe estar saturado con STE (NaCl 10 mM, Tris 10 mM, EDTA 1 mM).
4. Agitar vigorosamente en vortex por 10 minutos y centrifugar en (Beckman modelo GS-6R) a 1157 x g a 4°C durante 10 minutos.
5. Recuperar la fase acuosa y reextraer con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) 2 veces y una vez más con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).

6. De aquí recuperar nuevamente la fase acuosa, la cual se transfiere a un tubo corex de 30 ml y los ácidos nucleicos se precipitan con 0.6 volúmenes de isopropanol frío dejando a -20°C toda la noche o al menos 2 horas.
7. A continuación centrifugar (Beckman modelo J2-21M/E, en un rotor JA-20) a $12100 \times g$ a 4°C por 60 minutos.
8. Decantar el sobrenadante y secar el botón.
9. Lavar el botón 2 veces con 3 ml de etanol al 70%.
10. Secar el botón y resuspenderlo perfectamente en 5 ml de amortiguador TE (Tris HCl 10 mM [pH 7.5], EDTA 1mM).
11. Agregar 200 μl de NaCl 5 M y 12.5 ml de etanol absoluto frío. Incubar a -20°C por lo menos durante 2 horas.
12. Centrifugar a $12100 \times g$ durante 30 minutos a 4°C .
13. Decantar el sobrenadante y secar el botón.
14. Resuspender perfectamente el botón en 1 ml de amortiguador TE.
15. Pasar 10 μl de la muestra a tubo ependorf y ajustar a 1 ml con H_2O estéril y hacer lecturas al espectro a 230, 260 y 280 nm.
16. Con las lecturas obtenidas calcular la concentración de los ácidos nucleicos con la ecuación número 1:

$$(A_{260}) \times (42.5 \mu\text{g/ml}) \times (\text{factor de dilución}) = \text{ácidos nucleicos } (\mu\text{g/ml}).$$

17. Ajustar la concentración de los ácidos nucleicos a 750 $\mu\text{g/ml}$ diluyendo con amortiguador TE.
18. Medir el volumen final de los ácidos nucleicos y agregar 0.25 volúmenes de urea 8 M y 0.25 volúmenes de Cloruro de Litio 7 M, este último valor en base al volumen obtenido después de agregar la urea.
19. Mezclar y dejar en baño de hielo al menos durante 2 horas.
20. Centrifugar a $12100 \times g$ durante 30 minutos a 4°C .
21. Decantar el sobrenadante y resuspender perfectamente el botón en 2 ml de amortiguador TE.

22. Pasar 25 μ l de la muestra a tubo ependorf y agregar 975 μ l de H₂O.

23. Hacer lecturas al espectro a 230, 260 y 280 nm. Calcular la recuperación de RNA utilizando la ecuación número 2:

$$(A_{260}) \times (40 \mu\text{g/ml}) \times (\text{factor de dilución}) \times (\text{volumen del material recuperado en ml}) = \text{ARN obtenido en } \mu\text{g.}$$

NOTA: La relación A₂₆₀/A₂₈₀ debe ser mayor o igual a 1.8 para considerar que los ácidos nucleicos se encuentran libres de proteínas. La A₂₃₀ debe ser menor que A₂₆₀. Lecturas altas de A₂₈₀ indican residuos de fenol en la preparación, esto se puede solucionar con una precipitación con etanol.

24. Agregar 200 μ l de acetato de potasio 3 M y 4 ml de etanol absoluto frío, dejar a -20°C durante 30 minutos.

25. Centrifugar a 12100 x g por 30 minutos a 4°C.

26. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón en 2 ml de amortiguador TE.

27. Repetir la precipitación con etanol y NaCl

28. Centrifugar a 12100 x g por 30 minutos a 4°C.

29. Decantar el sobrenadante, secar el botón perfectamente y posteriormente resuspenderlo en H₂O.

Para comprobar la integridad del ARN extraído realizar una electroforesis desnaturizante.

3.-ELECTROFORESIS DE ARN EN AGAROSA (Sambrook *et al.*, 1989).

1. Con el ARN total extraído se realizó una electroforesis desnaturizante y para esto se utilizaron 30 μ g de la muestra, los cuales fueron desnaturizados en formamida desionizada al 50% (v/v), formaldehído 2.2 M, amortiguador de fosfatos 1X (10X = 100 mM fosfato de sodio [pH 7], EDTA 10 mM pH 8).

2. Calentar la muestra a 65°C durante 15 minutos y cargarla en un gel de agarosa al 1.2 % (p/v), que contenga 2.6 M de formaldehído y

amortiguador de fosfatos 1X (para un gel de 100 ml; 1.2 g de agarosa, 73.73 ml de agua, calentar en un horno de microondas, esperar a que enfríe y agregar 10 ml de amortiguador de fosfatos 10X y 16.21 ml de formaldehído).

3. Aplicar las muestras con amortiguador de carga 1X (50% de glicerol, 1 mM EDTA [pH 8], 0.25% azul de bromo fenol, 0.25% xilen cianol) al gel.
4. Correr en una electroforesis horizontal empleando como amortiguador de corrida fosfatos 1X.
5. Aplicar una corriente de 100 volts durante aproximadamente 3.5 horas hasta que el colorante del amortiguador de carga llegue a 3 cm del borde.
6. Teñir el gel con una solución de bromuro de etidio 10 µg/ml, desteñir con agua estéril hasta poder observar las bandas del ARN en un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta (UVP,INC).

4.-EXTRACCIÓN DE ARNm Poly (A) + .

La purificación del ARNm se llevó a cabo según el protocolo del PolyATtract mRNA Isolation Systems (Promega).

1. A un tubo ependorf estéril vertir 1 mg de ARN total y llevar a un volumen final de 500 µl con agua .
2. Desnaturalizar la muestra a 65°C por 10 minutos.
3. Agregar 3 µl de Oligo(dT)-biotinilado y 13 µl de SSC (NaCl 3 M, Citrato de Sodio 0.3 M) 20X.
4. Mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente hasta que descienda la temperatura.
5. Resuspender las esferas magnéticas con estreptavidina (SA-PMP) golpeando suavemente hasta que estén completamente dispersas y posteriormente capturarlas con el stand magnético (MS) verificando que todas las partículas se adhieran a una de las paredes del tubo.
6. Cuidadosamente tomar el sobrenadante.
7. Lavar las SA-PMP 3 veces con 300 µl de SSC 0.5X capturando cada vez las SA-PMP con el MS y removiendo cuidadosamente el sobrenadante.

8. Al final del último lavado resuspender las SA-PMP en 100 μ l de SSC 0.5X.
9. Al tubo que contiene las SA-PMP resuspendidas agregar el ARN total desnaturalizado e incubar a temperatura ambiente por 15-20 minutos.
10. Capturar las SA-PMP con el MS y cuidadosamente tomar el sobrenadante sin disgregar el botón.
NOTA: Se recomienda recuperar el sobrenadante y mantenerlo hasta estar completamente seguro de la unión y elución satisfactoria del ARNm.
11. Lavar las partículas 4 veces con 300 μ l de SSC 0.1X y resuspenderlas golpeando suavemente el tubo hasta que se encuentren completamente dispersas.
12. Después del lavado final remover con mucho cuidado la fase acuosa sin dispersar las partículas.
13. Para eluir el ARNm resuspender suavemente las SA-PMP en 100 μ l de agua estéril
14. Capturar magnéticamente las SA-PMP y transferir el ARNm eluido en la fase acuosa a un tubo estéril.
15. Repetir la elución del ARNm, pero ahora con 150 μ l de agua.
16. Cuantificar espectrofotométricamente la cantidad de ARNm purificado, utilizando una celda tratada con una solución de HCl:CH₃OH (1:1) y lavada abundantemente con H₂O tratada con DEPC.
17. Una vez cuantificado el ARNm obtenido se verificó la integridad del mismo mediante una electroforesis desnaturalizante en un minigel de agarosa al 1.2%, usando 2 μ g de ARNm, para esto se siguió el protocolo número 3 de materiales y métodos.
18. Para facilitar el manejo del ARNm Pol(A)⁺ en el inicio de la síntesis de la primera cadena de ADNc, el ARNm se puede liofilizar.

5.-SÍNTESIS DE PRIMERA CADENA DE ADNc.

Para la elaboración de la biblioteca se utilizó el SuperScript Lambda System (Gibco BRL) No.Cat.18256-016.

1. Para iniciar la reacción de la síntesis de la primera cadena se agregaron 2 μl del iniciador adaptador Not I al tubo que contenía los 3 μg del ARNm, al cual previamente se le había agregado 7 μl de agua tratada con DEPC.
2. Después se desnaturalizó la mezcla calentando 10 minutos a 70°C, colocándola inmediatamente en hielo y se dio un pulso de centrifugación.
3. A continuación se agregaron los siguientes componentes de la primera reacción:
 - 4 μl de amortiguador 5X de la primera cadena (250 mM Tris-HCl [pH 8.3], 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂).
 - 2 μl de DTT 0.1 M
 - 1 μl de mezcla de dNTP 10 mM (dATP, dCTP, dTTP, dGTP 10 mM de cada uno).
 - 1 μl [α -³²P] dCTP (1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$).
4. Una vez que se han adicionado en orden los compuestos anteriormente descritos, mezclar suavemente y dar un pulso de centrifugación.
5. Colocar el tubo a 37°C por 5 minutos para equilibrar la temperatura.
6. Posteriormente se agregan 3 μl de Transcriptasa Reversa SuperScript II (RT) (200 U/ μl). (La cantidad de la RT agregada varía en función directa de la cantidad de ARNm empleado; por cada μg de ARNm agregar 1 μl de enzima). El volumen final de la reacción debe ser de 20 μl , los cuales se ajustan agregando agua al ARNm que se encuentra liofilizado.
7. Mezclar suavemente e incubar a 37°C por 1 hora.
8. Al término de la reacción colocar el tubo en hielo y cuantificar la cantidad de radiactividad incorporada. Para esto hay que retirar 2 μl de la reacción de la primera cadena y agregarle 43 μl de EDTA (pH 7.5) 20 mM y 5 μl de ARNt de levadura.
9. Con los restantes 18 μl iniciar inmediatamente la síntesis de la segunda cadena.
10. Mientras la reacción de la segunda cadena se está incubando, aplique por duplicado en un filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/C), 10 μl de la alícuota retirada de la primera cadena.

11. Secar uno de los filtros a temperatura ambiente, este filtro va a servir para cuantificar la actividad específica del dCTP en la reacción mediante la ecuación número 3:

$$\text{Actividad Específica (cpm)} \times (\text{pmol dCTP}) = \frac{\text{cpm}/10\mu\text{l}}{200 \text{ pmol dCTP}/10 \mu\text{l}}$$

12. Lavar el otro filtro 3 veces durante 5 minutos cada vez en un matraz con 50 ml de TCA frío al 10% (p/v) que contenga 1% de piro fosfato de sodio (p/v). Lavar el filtro una vez con 50 ml de etanol al 95% a temperatura ambiente por 2 minutos.

13. Secar el filtro a temperatura ambiente. Este filtro va a ser empleado para determinar los niveles de ADNc con la ecuación número 4:

$$\text{Cantidad de ADNc } (\mu\text{g}) = \frac{(\text{cpm}) \times (50 \mu\text{l}/10 \mu\text{l}) \times (20 \mu\text{l}/2 \mu\text{l}) \times (4 \text{ pmol dNTP}/\text{pmol dCTP})}{(\text{cpm}/\text{pmol dCTP}) \times (3030 \text{ pmol dNTP}/\mu\text{g ADNc})}$$

14. Colocar los filtros en un vial con líquido de centelleo y cuantificar los niveles de radiactividad en un contador de centelleo.

15. Precipitar los restantes 30 μl agregando 15 μl acetato de amonio 7.5 M y 90 μl de etanol absoluto (-20°C).

16. Mezclar vigorosamente y centrifugar a temperatura ambiente por 20 minutos a 14000 x g.

17. Tomar cuidadosamente el sobrenadante y lavar el botón con 500 μl de etanol al 70% (-20°C).

18. Centrifugar por 5 minutos a 14000 x g y tomar el sobrenadante.

19. Secar el ADNc por 10 minutos a 37°C para evaporar los residuos de etanol y proceder al análisis de los productos de ADNc.

6.-SÍNTESIS DE SEGUNDA CADENA DE ADNc.

- Con los 18 μ l restantes de la reacción de la primera cadena iniciar la síntesis de la segunda cadena, agregando las siguientes sustancias:
 - 93 μ l de agua tratada con DEPC
 - 30 μ l de amortiguador de la segunda cadena [100 mM Tris-HCl (pH 6.9), 450 mM de KCl, 23 mM MgCl₂, 0.75 mM β -NAD, 50 mM (NH₄)₂SO₄].
 - 3 μ l de mezcla de dNTP 10 mM (dAPT, dCTP, dGTP, dTTP 10 mM de cada uno de ellos.).
 - 1 μ l de *E. coli* ADN ligasa (10 U/ μ l).
 - 4 μ l de *E. coli* ADN polimerasa I (10 U/ μ l).
 - 1 μ l de *E. coli* ARNasa H (2 U/ μ l).
 - 1 μ l de [α -³²P] dCTP (10 μ Ci/ μ l).
- Una vez agregados los compuestos anteriores en ese orden se mezclaron suavemente, después se dio un pulso de centrifugación y se incubó el total de la reacción 2 horas a 16°C.
- Al término de las 2 horas se agregó 2 μ l de T4 ADN polimerasa (5 U/ μ l) y se continuó incubando a 16°C por 5-10 minutos.
- Una vez terminada la reacción se colocó el tubo en hielo y se le agregaron 10 μ l de EDTA 0.5 M. De este tubo se retiraron 10 μ l de la reacción y se agregaron en un tubo que contenía 35 μ l de EDTA 20 mM (pH 7.5) y 5 μ l de ARNt de levadura. Esta mezcla va a servir para cuantificar la actividad específica y los niveles de la segunda cadena de ADNc, empleando las ecuaciones 5 y 6 respectivamente:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{cpm}/10 \mu\text{l}}{500 \text{ pmol dCTP}/10 \mu\text{l}}$$

$$\text{Cantidad de ADNc } (\mu\text{g}) = \frac{(\text{cpm}) \times (50 \mu\text{l}/10 \mu\text{l}) \times (150 \mu\text{l}/10 \mu\text{l}) \times (4 \text{ pmol dNTP}/\text{pmol dCTP})}{(\text{cpm}/\text{pmol dCTP}) \times (3030 \text{ pmol dNTP}/\mu\text{g ADNc})}$$

5. Al resto de la reacción de la segunda cadena se le agregó 150 μ l de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló vigorosamente para posteriormente centrifugar a temperatura ambiente por 5 minutos a 14000 x g.
6. Cuidadosamente se tomaron 150 μ l de la fase superior y se transfirieron a otro tubo para posteriormente agregarle 70 μ l de acetato de amonio y 500 μ l de etanol absoluto. Mezclar vigorosamente y centrifugar por 20 minutos a 14000 x g.
7. Cuidadosamente tomar el sobrenadante y lavar el botón con 500 μ l de etanol al 70%.
8. Centrifugar durante 5 minutos a 14000 x g y tomar el sobrenadante.
9. Secar el ADNc a 37°C durante 10 minutos para evaporar los residuos de etanol. El botón de ADNc puede ser detectado marcando en el tubo el sitio en donde es esperado después de la centrifugación y monitoreándolo con un contador Gaiger.

7.-ADICIÓN DEL ADAPTADOR Sal I.

1. Al ADNc seco del paso anterior se le agregan los siguientes reactivos:
 - 25 μ l de agua tratada con DEPC
 - 10 μ l del amortiguador de T4 ADN ligasa 5X [250 mM Tris-HCl (pH7.6), 50 mM de $MgCl_2$, 5 mM de ATP, 5 mM de DTT, 25 % PEG 800 (p/v)].
 - 10 μ l del adaptador Sal I (1 μ g/ μ l).
 - 5 μ l de T4 ADN ligasa (1 U/ μ l).
2. Mezclar suavemente e incubar la reacción a 16°C por 16 horas al menos.
3. Al termino de este tiempo agregar 50 μ l de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar vigorosamente y centrifugar a temperatura ambiente por 5 minutos a 14000 x g.
4. Tomar cuidadosamente 45 μ l de la fase superior y transferirlo a otro tubo.

5. Agregar 25 μ l de acetato de amonio 7.5 M y 150 μ l de etanol absoluto.
6. Mezclar vigorosamente y centrifugar a temperatura ambiente por 20 minutos a 14000 x g.
7. Tomar cuidadosamente el sobrenadante y lavar el botón con 500 μ l de etanol al 70%.
8. Centrifugar 5 minutos a 14000 x g y tomar el sobrenadante.
9. Secar el ADNc a 37°C por 10 minutos para eliminar los residuos de etanol.

8.-DIGESTION CON Not I.

1. Al ADNc seco del paso anterior se le agregan los siguientes reactivos.

41 μ l de agua tratada con DEPC.

5 μ l de amortiguador reactivo 7 [50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 50 mM KCl].

4 μ l Not I (15 U/ μ l).

2. Mezclar suavemente e incubar la reacción a 37°C por 2 horas.
3. Al término de las 2 horas agregar 50 μ l de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar vigorosamente, centrifugar a temperatura ambiente durante 5 minutos a 14000 x g.
4. Cuidadosamente tomar 45 μ l de la fase superior y pasarlos a un tubo nuevo.
5. Después agregar 25 μ l de acetato de amonio y 150 μ l de etanol absoluto.
6. Mezclar vigorosamente, centrifugar durante 20 minutos a 14000 x g.
7. Tomar cuidadosamente el sobrenadante, lavar el botón con 500 μ l de etanol al 70%.
8. Centrifugar por 5 minutos a 14000 x g y tomar el sobrenadante.
9. Secar el ADNc a 37°C por 10 minutos.

9.-CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.

1. Disolver el ADNc en 100 μ l de amortiguador TEN [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mM EDTA, 25 mM NaCl autoclaveado], permitiendo que el botón se hidrate en hielo.
2. Permitir que una columna de Sephacryl S 500 HR de 50 mm de largo por 10 mm de diámetro se drene por completo y eliminar el etanol que contiene. Después agregar 800 μ l de amortiguador TEN y permitir que drene por completo, esto tarda alrededor de 15 minutos, repetir la operación de drenado 3 veces más.
3. Agregar los 100 μ l del ADNc a la columna y coleccionar el efluente en el tubo número 1 (aproximadamente 100 μ l).
4. Agregar otros 100 μ l de amortiguador TEN y coleccionar el efluente en el tubo número 2, permitiendo que la columna drene completamente, en otras palabras hasta que deje de gotear.
5. Una vez que la columna fue drenada completamente, agregar otros 100 μ l de amortiguador TEN e ir coleccionando el efluente de la columna gota a gota en tubos independientes.
6. Continuar agregando 100 μ l de amortiguador TEN y seguir coleccionando el efluente de la columna de gota a gota en tubos individuales hasta completar una serie de 20 tubos.
7. Con la ayuda de una pipeta automática calcular el volumen de cada fracción y determinar el volumen de elución acumulado.
8. Identificar la fracción en la cual el valor del volumen acumulado no exceda de 550 μ l y cuantificar en un contador de centelleo las cuentas Cerenkov de cada una de las fracciones.
9. Determinar el fondo, que servirá de referencia para definir a partir de que fracción se va a tomar en consideración para analizar la cantidad de ADNc obtenida.
10. Para cada fracción en la que las cuentas Cerenkov excedan del valor de fondo calcular la cantidad de ADNc empleando la ecuación número 7:

$$\text{Cantidad de ADNc}(\eta\text{g}) = \frac{(\text{Cerenkov cpm}) \times 2 \times (4 \text{ pmol dNTP/pmol dCTP}) \times (1000 \eta\text{g}/\mu\text{g ADNc})}{(\text{Actividad Específica})(\text{cpm/pmol}) \times (1515 \text{ pmol dNTP}/\mu\text{g ADNc})}$$

11. Analizar cuidadosamente los datos de la tabla y decir cuales de las fracciones son las que va a poner en la reacción de ligación. En ella se requieren de 20-50 η g de ADNc por lo que tal vez sea necesario reunir 2 o más fracciones para completar los 20 η g.
12. Agregar posteriormente 5 μ l de ARNt, 0.5 volúmenes de acetato de amonio y 2 volúmenes de etanol absoluto.
13. Mezclar vigorosamente y centrifugar a temperatura ambiente por 20 minutos a 14000 x g.
14. Tomar el sobrenadante cuidadosamente y lavar el botón con 500 μ l de etanol al 70%.
15. Centrifugar 5 minutos a 14000 x g, tomar el sobrenadante y secar el ADNc a 37°C por 10 minutos.

10.-LIGACIÓN DE ADNc AL VECTOR.

Para llevar al cabo las reacciones de ligación y empaque se utilizó el vector λ ZIPLOX, Not I-Sal I Arms (Gibco BRL No. Cat. 15394-018) Figura

1.

1. Preparar en un tubo a 4°C amortiguador 5X ADN ligasa, esto se realiza mezclando 10 μ l del amortiguador 10X ADN ligasa con 10 μ l de DTT 100 mM.
2. Una vez preparado el amortiguador, agregar a temperatura ambiente los siguientes componentes al tubo que contenga el botón del ADNc seco:
 - 1 μ l de amortiguador 5X ADN ligasa.
 - 2 μ l (0.5 μ g) λ ZIPLOX, digerido en los sitios Not I-Sal I.
 - 20-50 η g de ADNc seco.
 - 1 μ l de agua destilada estéril.
 - 1 μ l de T4 ADN ligasa (1 U/ μ l).
3. Mezclar suavemente con la pipeta y dejar la reacción incubando por 3 horas a temperatura ambiente.

11. Analizar cuidadosamente los datos de la tabla y decir cuales de las fracciones son las que va a poner en la reacción de ligación. En ella se requieren de 20-50 η g de ADNc por lo que tal vez sea necesario reunir 2 o más fracciones para completar los 20 η g.
12. Agregar posteriormente 5 μ l de ARNt, 0.5 volúmenes de acetato de amonio y 2 volúmenes de etanol absoluto.
13. Mezclar vigorosamente y centrifugar a temperatura ambiente por 20 minutos a 14000 x g.
14. Tomar el sobrenadante cuidadosamente y lavar el botón con 500 μ l de etanol al 70%.
15. Centrifugar 5 minutos a 14000 x g, tomar el sobrenadante y secar el ADNc a 37°C por 10 minutos.

10.-LIGACIÓN DE ADNc AL VECTOR.

Para llevar al cabo las reacciones de ligación y empaque se utilizó el vector λ ZIPLOX, Not I-Sal I Arms (Gibco BRL No. Cat. 15394-018) Figura 1.

1. Preparar en un tubo a 4°C amortiguador 5X ADN ligasa, esto se realiza mezclando 10 μ l del amortiguador 10X ADN ligasa con 10 μ l de DTT 100 mM.
2. Una vez preparado el amortiguador, agregar a temperatura ambiente los siguientes componentes al tubo que contenga el botón del ADNc seco:
 - 1 μ l de amortiguador 5X ADN ligasa.
 - 2 μ l (0.5 μ g) λ ZIPLOX, digerido en los sitios Not I-Sal I.
 - 20-50 η g de ADNc seco.
 - 1 μ l de agua destilada estéril.
 - 1 μ l de T4 ADN ligasa (1 U/ μ l).
3. Mezclar suavemente con la pipeta y dejar la reacción incubando por 3 horas a temperatura ambiente.

11.-REACCIÓN DE EMPAQUE.

Después de que el ADNc ha sido clonado en el ADN de λ este debe ser empacado *in vitro* para producir los fagos funcionales. Para esto se utilizó el sistema λ Packing System de Gibco BRL (No. Cat 18294-017).

1. Tomar del congelador de -70°C los tubos con los extractos y colocarlos inmediatamente en hielo, uno de los tubos contiene las cabezas mientras que el otro contiene las colas de los fagos. Para que el fago quede funcional es necesario que el ADN esté circularizado y concatenado.
2. Una vez que ambos tubos se han descongelado dar un pulso de centrifugación.
3. Transferir 1-10 μl del ADNc ligado al tubo azul e inmediatamente transferir los 15 μl del tubo amarillo al tubo azul.
4. Mezclar suavemente con la punta de la pipeta.
5. Dar un pulso de centrifugación.
6. Incubar 3 horas a 20°C .
7. Al término de la incubación agregar 500 μl de PDB [50 mM Tris-HCl (pH 7.9), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 0.01% (p/v) gelatina].
8. Agregar 20 μl de cloroformo, permitir que el cloroformo se impregne por 10 a 20 minutos. Almacenar a 4°C .

12.-TITULACIÓN DE LA BIBLIOTECA.

Para conocer la eficiencia a la cual se empacó el ADNc en el vector, es necesario realizar la titulación de la biblioteca.

1. Activar la cepa Y1090 con 200 μl de medio S.O.C. (20 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl, 250 mM de KCl pH7, 10 mM de MgCl_2 y 20 mM de glucosa por litro de medio) incubar por 10 minutos a 37°C .
2. Sembrar esta cepa en un medio rico (LB: 10 g de peptona, 5 gramos de extracto de levadura, 10 g de NaCl por litro de medio) en cajas de petri e incubar toda la noche a 37°C .

3. Inocular una colonia, que se encuentre perfectamente aislada del resto, en 10 ml de medio rico, que contenga 0.2% de maltosa (p/v).
4. Incubar a 37°C toda la noche con agitación de 200 r.p.m.
5. De la biblioteca almacenada a 4°C preparar 3 diluciones 1, 0.1 y 0.01 en tubos de ensaye empleando para este fin el PDB.
6. Una vez realizadas las diluciones de la biblioteca, agregar 200 μ l del cultivo de la bacteria Y1090, mezclar suavemente e incubar a 37°C durante 30 minutos (sin agitación).
7. Al término del tiempo de incubación agregar 3-6 ml de agar suave (Top Agar) 7 gramos de agar por litro de medio NZY, este agar suave debe estar a 50°C, agitar rápidamente y verter el contenido inmediatamente a cajas con medio NZY (15 g por litro).
8. Esperar a que solidifique el agar suave para invertir las cajas e incubar a 37°C de 8 a 12 horas hasta observar las placas de lisis.
9. Contar las placas de lisis en cada uno de los platos y valorar el título de la biblioteca calculando las ufp (unidades formadoras de placas).

NOTA. El medio NZY (Gibco BRL) es igual que el T-TYN., la única diferencia es que el NZY ya contiene MgCl₂. El NZY se prepara con 21 g del medio por litro, agregando 10 ml de Tris HCl pH (7.2) y ajustar el pH a 7.2 con NaOH. Es importante que las cajas antes de ser empleadas se encuentren perfectamente secas, ya que si no es así se corre el riesgo de que una de las gotas calga a la superficie del medio y provoque que las placas de lisis se barran. Es recomendable colocar un papel filtro en la parte interna de la caja para que absorba la humedad excesiva.

13.-ESCISIÓN *in vivo* DEL PLÁSMIDO pZL1 DE λ ZIPLOX.

Con esta técnica lo que se pretende realizar es escindir o liberar el plásmido pZL1 que tiene clonado el ADNc, del ADN del fago λ ZIPLOX. Una vez realizado lo anterior el plásmido se circulariza y se seleccionan las clonas que contengan el ADNc por la resistencia a ampicilina que le confiere el pZL1 (Figura 3).

1. Activar la cepa DH10B con 200 μ l de medio S.O.C. e incubar por 10 minutos a 37°C.
2. Sembrar esta cepa en una caja de petri con medio rico que contenga 10 μ g/ml de kanamicina e incubar a 37°C toda la noche.
3. Tomar una sola colonia e inocular 10 ml de medio rico que contenga 10 μ g/ml de kanamicina.
4. Incubar el cultivo a 37°C con agitación a 200 r.p.m.
5. Con la ayuda de puntas para pipetas estériles recortadas tomar las placas de lisis obtenidas al inocular la cepa Y1090 y colocarlas en un tubo de micro centrífuga que contenga 250 μ l de PDB, mezclar vigorosamente por 10 segundos e incubar a temperatura ambiente por 60 minutos.
6. Tomar 25 μ l del paso anterior y mezclar con 100 μ l de la cepa DH10B e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
7. Sembrar el total del contenido del tubo en una caja de petri con medio rico que contenga 10 mM MgCl₂ y 100 μ g/ml de ampicilina y si se desea calcular el porcentaje de eficiencia de empaque del ADNc, se agrega al medio 0.01% de X-Gal y 2 mM de IPTG, cuantificando el número de colonias azules que en teoría no contienen ningún fragmento de ADNc.
8. Invierta la caja petri e incube a 37°C toda la noche.

14.-MINIPREPARACIÓN (Birnboim and Doley, 1979; Brown, 1991).

Con este método se reproduce a escala una sola clona bacteriana que contenga el ADN plasmídico de interés, que para este caso es el que contiene el fragmento de ADNc clonado. Una vez hecho lo anterior el siguiente paso es el aislamiento y la purificación del plásmido.

1. Tomar una colonia que se encuentre perfectamente aislada e inocular 10 ml de medio LB con 100 μ g/ml de ampicilina.
2. Incubar a 37°C toda la noche con agitación 200 r.p.m.
3. Vertir 2 ml de este medio a un tubo de micro centrífuga y centrifugar 5 minutos a 12500 g. Guardar el resto del cultivo a 4°C.

4. Retirar el medio por aspiración dejando la pastilla tan seca como sea posible.
5. Resuspender la pastilla mezclando vigorosamente con 100 μ l de Solución I fría (50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl (pH 8), 2 mg/ml de lisozima).
6. Dejar 10 minutos en hielo.
7. Agregar 200 μ l de Solución II recién preparada (0.2 N NaOH, 1% SDS).
8. Mezclar el contenido por inversión rápidamente de 3 a 5 veces. No agitar.
9. Incubar en hielo 10 minutos.
10. Agregar 150 μ l de acetato de potasio 1 M pH 4.8.
11. Mezclar suavemente invirtiendo el tubo durante 10 segundos.
12. Incubar en hielo durante 10 minutos.
13. Centrifugar 15 minutos a 12500 x g a 4°C.
14. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
15. Agregar un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar vigorosamente.
16. Centrifugar 5 minutos a 12500 x g.
17. Transferir el sobrenadante y precipitar con 1 ml de etanol absoluto.
18. Dejar 10 minutos a -20°C.
19. Centrifugar a 12500 x g por 10 minutos.
20. Lavar el botón con 500 μ l de etanol al 70%.
21. Decantar y secar el botón tanto como sea posible.
22. Resuspender el botón en 20 μ l de agua estéril.

15.-ANÁLISIS DE ADN PLASMÍDICO DIGERIDO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

1. A partir del ADN plasmídico obtenido en la minipreparación, utilizar un volumen adecuado de ADN (5-10 μ g de ADN) y agregarle 2 μ l del amortiguador con el cual trabaje la enzima con la que se realizará el corte.

2. Agregar la cantidad de agua estéril que sea necesaria, tomando en cuenta que el volumen final de la reacción debe de ser de 20 μ l.
 3. Agregar a la reacción 1 μ l de la endonucleasa de restricción (5-10 unidades).
 4. Dar un pulso de centrifugación y mezclar perfectamente.
 5. Poner a incubar la reacción a la temperatura en la cual la enzima trabaje a su máxima actividad, durante 2-5 horas.
 6. Preparar un gel de agarosa al 1% con amortiguador TBE (45 mM Tris-boratos, 1 mM EDTA)
 7. Calentar en un horno de microondas hasta derretir perfectamente la agarosa, permitir que la temperatura descienda hasta aproximadamente 50°C.
 8. Agregar al gel bromuro de etidio en solución (10 mg/ml), 0.5 μ g por ml de gel.
 9. Mezclar perfectamente el bromuro con la agarosa y vertir sobre el molde.
 10. Esperar a que la agarosa polimerice durante 60 minutos, retirar cuidadosamente el peine del gel.
 11. Desnaturalizar las muestras digeridas a una temperatura de 90°C durante 10 minutos, inmediatamente después colocar las muestras en hielo y agregar 2 μ l de amortiguador de carga (sacarosa 37%, EDTA 50 mM, azul de bromo fenol 0.1%, SDS 0.01%) y mezclar perfectamente, si es necesario dar un pulso de centrifugación.
 12. Colocar las muestras en los pozos del gel y correrlas a 60-80 volts durante aproximadamente 3 horas.
- NOTA:** No olvidar colocar un marcador de peso molecular, como por ejemplo ADN del fago λ digerido con Eco R1, Hind III o ambas enzimas de restricción.
13. Observar los patrones de restricción en un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta.

16.-ANÁLISIS DE SÍNTESIS DE PRIMERA Y SEGUNDA CADENA DE ADNc.

1. A las alícuotas de ADNc de los puntos 5.19 y 6.10 agregar 10 μ l de agua estéril para disolver el botón de ADNc.
2. Preparar un gel de agarosa al 1.4% y correr una electroforesis como en los puntos 15.6 al 15.12.
3. Aplicar una corriente de 50 volts durante aproximadamente 4 horas.
4. Desechar el gel durante 2 horas a 60°C.
5. Colocar el gel completamente seco en papel "envelopack" y guardarlo en un chasis para autorradiografía con pantallas intensificadoras (Dupont Cronex lightning plus-T ML 400015) y películas para rayos X (Cronex Dupont) en contacto con el gel.
6. Dejar exponiendo a -70°C por el tiempo necesario.
7. Revelar la película con solución de revelado (Kodak GBX) durante 3-5 minutos.
8. Lavar la película con abundante agua corriente.
9. Colocar la película en solución fijadora (Kodak GBX) por 3-5 minutos.
10. Lavar la película con abundante agua corriente, hasta quitar las sales.

Nota. Cuando se trabaja con películas para rayos X hacerlo en completa oscuridad.

VII RESULTADOS.

1.-EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL Y ARNm Poly (A) + .

La purificación del ARN total se inició a partir 5 gramos de tejido de vaina de frijol de siete días después de la floración, que había sido previamente colectado, congelado con nitrógeno líquido y almacenado a -70°C . Esta extracción se realizó en presencia de los agentes caotrópicos isotiocianato de guanidina y β mercaptoetanol para inhibir las ribonucleasas existentes en el tejido y posteriormente se realizó una precipitación diferencial con Cloruro de Litio y Urea.

Al final de la extracción se obtuvieron 4.5 mg de ARN total, con una relación A_{260}/A_{280} nm de 1.94. Esto indica una obtención de 900 μg de ARN total por gramo de tejido y que la muestra de ARN se encuentra prácticamente libre de proteínas.

Una vez comprobada la limpieza del ARN total se procedió a la obtención del ARN poliadenilado, para lo cual se empleó 1 mg de ARN total y al final del protocolo se obtuvieron 5 μg de ARNm. Para verificar la Integridad del ARN total y mensajero aislado se corrió una electroforesis desnaturalizante en agarosa (Figura 7) donde se cargaron 30 μg de ARN total de vaina de frijol y se pueden observar intactas las 4 bandas de ARN ribosomal (70's de 6 kb, 50's de 4 kb, 30's de 1.8 y 10's de 0.8 kb). Por otra parte se cargaron 2 μg de ARNm de vaina de frijol, donde se puede observar un barrido comprendido entre 1 a 3 kb que es el rango donde se encuentran la mayor cantidad de los ARNm, la presencia de un poco de ARN ribosomal puede servir como un indicador que el ARNm se encuentra íntegro y que no existió degradación durante el proceso. Algo que hay que mencionar es la presencia de ARN total y mensajero de hoja de frijol en el gel debido a que en el laboratorio se estaban realizando estudios de traducción in vitro de ARNm de hoja de frijol y se decidió correr las muestras juntas.

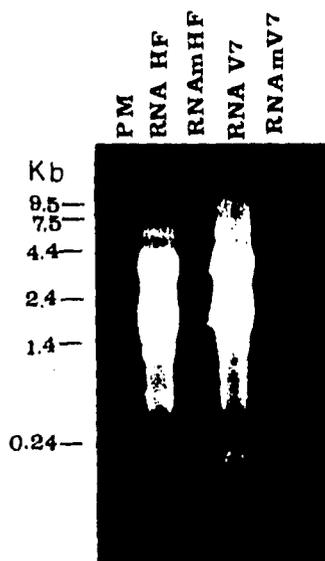


Figura 7. Electroforesis desnaturalizante de ARN total (30 μ g) y de ARNm de hoja de frijol (HF) y vaina de frijol de 7 días (V7) utilizando 3 y 2 μ g de ARNm respectivamente.

2.-SÍNTESIS DE ADNc.

Para iniciar la síntesis del ADNc se utilizó como control un ARNm que el fabricante incluye en el sistema. La cantidad de ARNm control utilizada fue de 1.5 μg . Este control fue muy importante ya que nos permitió conocer la eficiencia a la cual trabaja el sistema y de esta manera comparar los datos obtenidos entre el control y nuestra muestra. La cantidad de ARNm de vaina de frijol empleada para iniciar la síntesis de ADNc fue de 3 μg .

Al término de la síntesis del ADNc la actividad específica del control fue de 66.51 cpm/pmol y de 230.08 cpm/pmol mientras que para vaina fue de 69.12 y de 180.54 cpm/pmol para primera y segunda cadena respectivamente. Aquí hay que hacer notar que la reacción del ARNm control se realizó con 1/2 volumen de la reacción total. Con esto en consideración, la actividad específica se calculó con las ecuaciones 3 y 5 descritas en Materiales y Métodos.

En lo que respecta a la cantidad de ADNc obtenida en la primera cadena utilizando las ecuaciones 4 y 6 descritas anteriormente, en el control se obtuvieron 0.3662 lo cual representa el 24.42% de eficiencia con respecto a la cantidad de ARNm utilizado para iniciar la síntesis del ADNc, mientras que para vaina de frijol se obtuvieron 0.2425 μg que representa el 8.08% de eficiencia con respecto a los 3 μg de ARNm inicial. Para la síntesis de la segunda cadena, en el control se obtuvieron 0.6368 μg que representa el 86% de eficiencia con respecto a la cantidad de ADNc obtenida en la primera cadena; para vaina de frijol se obtuvieron 0.7765 μg de ADNc de doble cadena lo que representa un 160% eficiencia.

3.-ANÁLISIS DE SÍNTESIS DE PRIMERA Y SEGUNDA CADENA DE ADNc

Las alícuotas que se retiraron para cuantificar la actividad específica y la cantidad de ADNc obtenida en la síntesis de la primera y segunda cadena, sirvieron también para realizar una electroforesis en

agarosa. Una vez corrida la electroforesis el gel fue desecado por 2 horas a 60°C y expuesto en autorradiografía, para de esta manera analizar los tamaños de ADNc sintetizados en la primera y segunda cadenas (Figura 8). En dicha autorradiografía se pueden observar tamaños de ADNc sintetizados desde aproximadamente 500 pb y hasta 8 kb, lo cual indica que la enzima RT tuvo una buena procesividad.

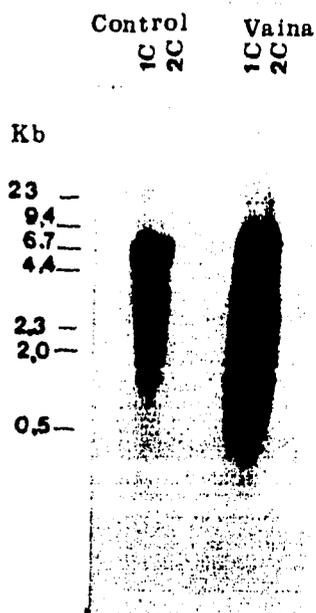


Figura 8. Autorradiografía de síntesis de primera y segunda cadenas de ADNc de vaina de frjol de 7 días y del ARNm control.

4.-CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA Y LIGACIÓN DEL ADNc.

Después de tener el ADNc listo para ser clonado en el vector, es necesario y muy importante pasarlo por una cromatografía en columna de Sephacryl S-500, la cual permite separar por tamaños el ADNc obtenido y eliminar adaptadores para de esta manera introducir a la reacción de ligación los tamaños más grandes de ADNc. Una vez colectadas las alícuotas, medido el volumen de cada una de ellas y calculado el volumen acumulado, no mayor de 550 μ l, éstas fueron colocados en un contador de centelleo con el propósito de medir las cuentas Cerenkov de cada fracción. Con los datos obtenidos se realizaron la tabla 1, así como la gráfica 1.

4.-CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA Y LIGACIÓN DEL ADNc.

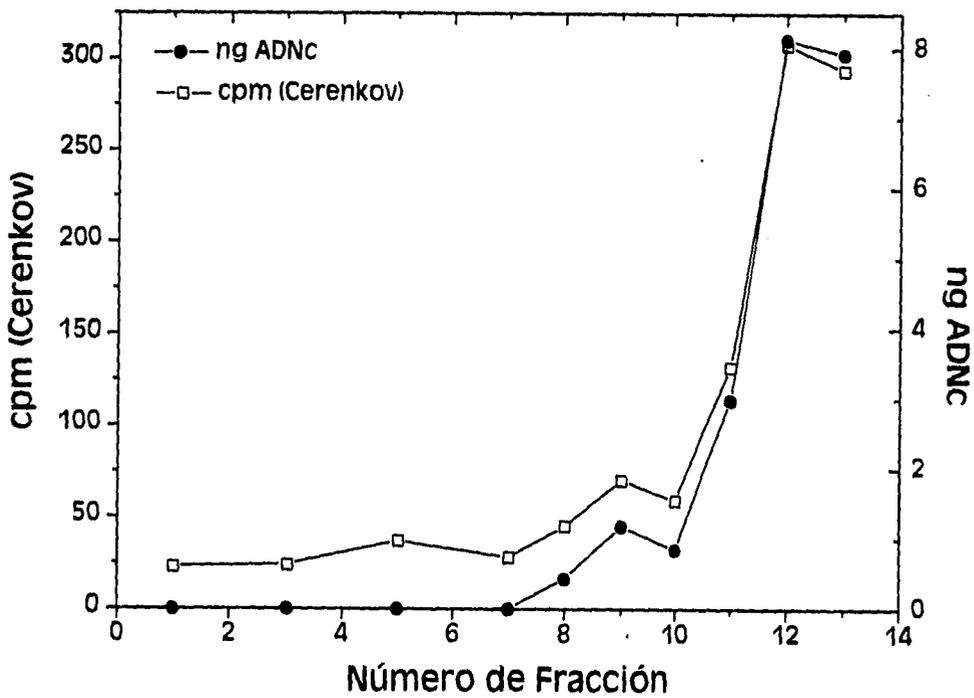
Después de tener el ADNc listo para ser clonado en el vector, es necesario y muy importante pasarlo por una cromatografía en columna de Sephacryl S-500, la cual permite separar por tamaños el ADNc obtenido y eliminar adaptadores para de esta manera introducir a la reacción de ligación los tamaños más grandes de ADNc. Una vez colectadas las alícuotas, medido el volumen de cada una de ellas y calculado el volumen acumulado, no mayor de 550 μ l, éstas fueron colocados en un contador de centelleo con el propósito de medir las cuentas Cerenkov de cada fracción. Con los datos obtenidos se realizaron la tabla 1, así como la gráfica 1.

Tabla 1. Resultados de la cromatografía en columna del ADNc de valna de frijol.

No	A Vol.Fracción n (μl)	B Vol.Total (μl)	C Cuentas Cerenkov (cpm)	D Cantidad de ADNc (ηg)	E Conc. de ADNc (ηg/μl)
1	94	94	34		
2	98	192	31		
3	27	219	34		
4	31	250	23		
5	37	287	24		
6	34	321	37		
7	37	358	28		
8	35	393	45	0.43	0.012
9	33	426	70	1.17	0.035
10	17	443	59	0.84	0.049
11	34	477	132	2.98	0.087
12	32	509	308	8.13	0.254
13	36	545	294	7.92	0.22
14	37	582			
15	34				
16	30				
17	33				
18	35				
19	36				
20	33				

Los datos de la columna C sirvieron para calcular la cantidad de ADNc obtenida por fracción mediante la ecuación número 7, aquí hay que hacer notar que a las fracciones útiles (8-13) se le restaron para realizar el cálculo 30 cpm que es el fondo de cada muestra:

$$\text{Cantidad de ADNc}(\eta\text{g}) = \frac{(\text{Cerenkov cpm}) \times 2 \times (4 \text{ pmol dNTP} / \text{pmol dCTP}) \times (1000 \eta\text{g} / \mu\text{g ADNc})}{\text{Actividad Específica}(\text{cpm} / \text{pmol dCTP}) \times (1515 \text{ pmol dNTP} / \mu\text{g ADNc})}$$



Gráfica número 1. Incremento en la cantidad de ng de ADNC sintetizado, así como las cuentas Cerenkov por el número de fracción. Las fracciones útiles empleadas para la reacción de ligación van de la 8 a la 13.

Los datos resultantes de este cálculo se muestran en la columna D de la tabla 1.

Una vez realizado el cálculo anterior se sumaron las cantidades de ADNc de las fracciones seleccionadas (8-13) y se obtuvieron 21.47 ng, los cuales fueron empleados para la reacción de ligación.

5.-LIGACIÓN Y EMPAQUE DEL ADNc.

Para iniciar la reacción de ligación se emplearon los 21.47 ng de ADNc obtenidos de las fracciones 8 a 13 los cuales fueron ligados al vector λ ZIPLOX en los sitios Not I-Sal I gracias a la direccionalidad que ofrece el sistema. Una vez realizado lo anterior se procedió a empacar el ADN del fago. El porcentaje de eficiencia de empaque se realizó cuantificando el número de colonias azules crecidas en el medio en presencia del inductor IPTG. De aproximadamente 250 colonias solamente se observaron dos colonias azules, lo cual indica un 99% de eficiencia de empaque y esto a su vez nos habla de una eficiente reacción de ligación de los ADNc al vector.

6.-TITULACIÓN DE LA BIBLIOTECA.

Para titular la biblioteca se infectaron bacterias *E. coli* cepa Y1090 con el ADN del fago que contiene el ADNc de vaina de frijol cionado y fueron plaqueadas en medio NZY (Gibco BRL), cultivadas a 37°C durante 12-16 horas hasta observar las placas de lisis, las cuales se cuantificaron siguiendo el método de Josefsen *et al* (1993). Los resultados mostraron un promedio de 74,629.5 placas de lisis por caja en la dilución 10^{-2} , con este dato se realizó el cálculo correspondiente resultando que la biblioteca tiene un título de 2.28×10^8 ufp/ μ g ADNc.

7.-ESCISIÓN DEL ADNc.

Para analizar los tamaños de ADNc clonados se procedió a realizar la excisión del ADNc del pZL1 del ADN de λ ZIPLOX. Para esto se tomaron primero 10 y después 20 placas de lisis seleccionadas al azar y con ellas se infectó la cepa DH10B. De ellas se obtuvo ADN plasmídico el cual fue digerido en un ensayo de restricción con Eco RI y Hind III, para posteriormente analizar los productos de restricción por medio de electroforesis en agarosa (Figuras 9 y 10). Con las electroforesis se puede observar que existen clonas con insertos del mismo tamaño. En esta electroforesis se observan no solamente dos bandas las cuales corresponderían al vector y al inserto, se observan varias bandas en el mismo carril, esto debido a que el ensayo de restricción se está realizando con dos enzimas que reconocen secuencias bastante frecuentes en el ADN y además porque el plásmido puede presentar formas multiméricas. Aquí hay que mencionar que estrictamente el corte tendría que haber sido con Not I-Sal I, pero se hizo con EcoRI - Hind III debido a que estas enzimas son más económicas y también tienen secuencias en el sitio múltiple de clonación.

Después se seleccionaron otras 10 placas de lisis y se realizó el mismo tratamiento, la única diferencia fue que el ensayo se realizó con Eco RI con la finalidad de linearizar el plásmido, para observar bandas mayores a 4.3 Kb, que es el tamaño del plásmido. Al analizar la electroforesis correspondiente lo que se observa son preponderantemente bandas mayores o iguales a 4.3 kb que es el peso molecular del vector, en algunos carriles se pueden observar bandas menores a 4.3 kb lo cual indica que el ADNc clonado tiene alguna secuencia Eco RI (Figura 11).

Finalmente se seleccionaron 5 clonas las cuales se digirieron con Eco RI y al realizar la electroforesis se corrieron también esas 5 clonas pero sin digerir (Figura 12).

Los resultados de estas electroforesis sirvieron para analizar los tamaños de ADNc clonados y la frecuencia con que aparecían, con estos datos se construyó la tabla y gráfica número 2:

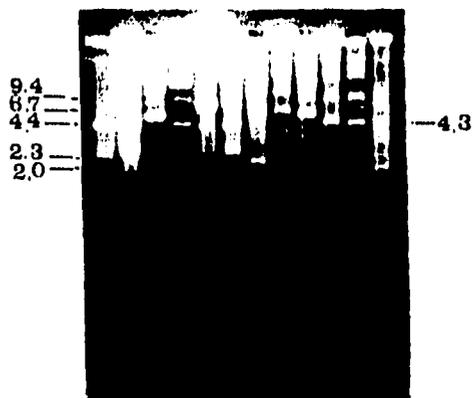


Figura 9. Electroforesis de ADN plasmídico de 10 clones de células DH10B, digerido con EcoRI y Hind III para extraer el ADNc clonado.

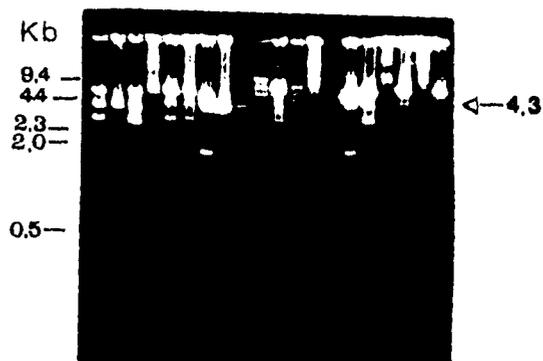


Figura 10. Electroforesis de ADN plasmídico de 20 clones de células DH10B, digerido con EcoR1 y Hind III para extraer el ADNc clonado.

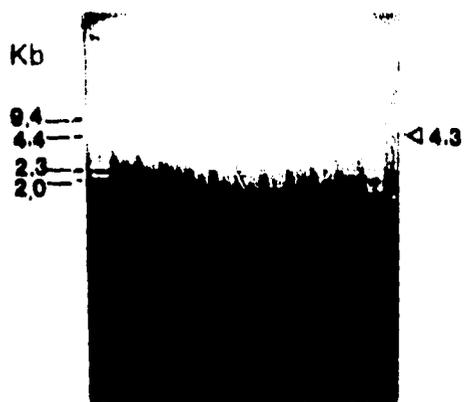


Figura 11. Electroforesis de ADN plasmídico de 10 clones de células DH10B, digerido con EcoR1 para linearizar el plásmido.

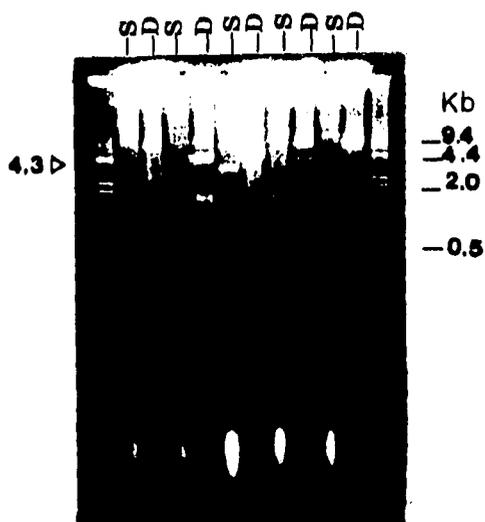
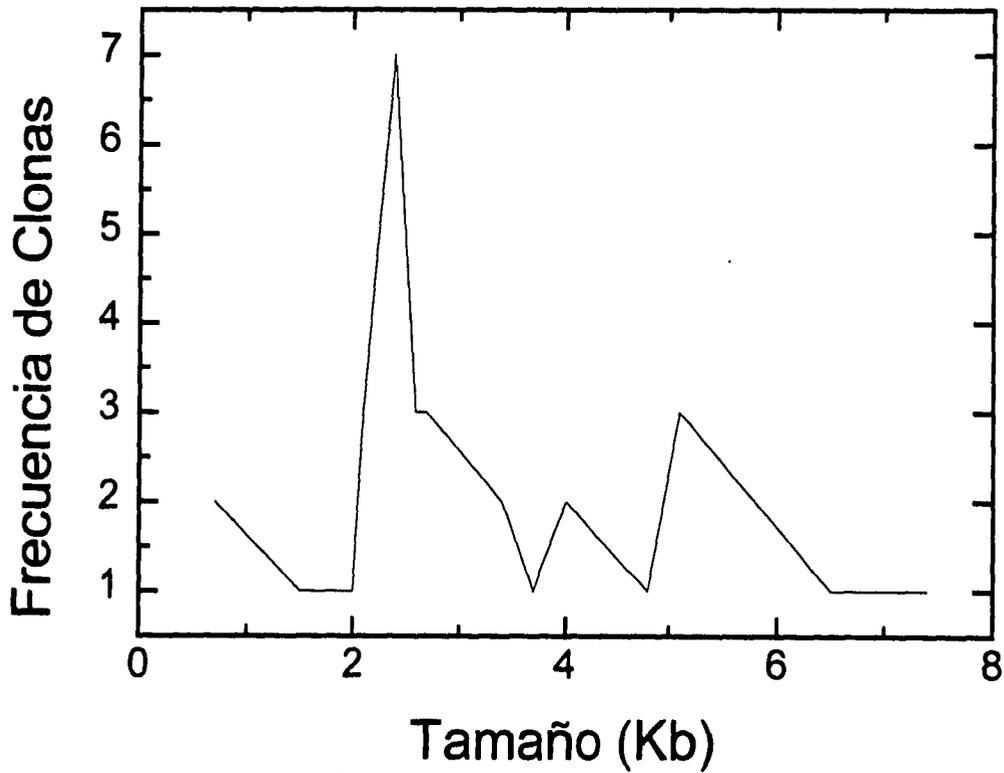


Figura 12. Análisis del patrón electroforetico del ADNc clonado en el pZL1 de 5 clonas de células DH10B elegidas al azar, sin digerir (S) y digerido (D) con EcoR1.

TABLA 2. ANÁLISIS DE INSERTOS DE ADNc OBTENIDOS DE ALGUNAS CLONAS ELEGIDAS AL AZAR.

Tamaño (kb)	Frecuencia de clonas	%
7.4	1	2.7
6.5	1	2.7
5.1	3	8.1
4.8	1	2.7
4.0	2	5.4
3.7	1	2.7
3.4	2	5.4
2.7	3	8.1
2.6	3	8.1
2.5	5	13.51
2.4	7	18.91
2.1	3	8.1
2.0	1	2.7
1.7	1	2.7
1.5	1	2.7
0.7	2	5.4
Total	37	100

De la tabla y gráfica anterior se pueden obtener algunos datos que nos indican algunas características importantes del ADNc clonado, como por ejemplo el tamaño promedio del ADNc, el cual presenta un valor de 2.9 kb; además se obtienen insertos de 7.4 y 0.7 kb que corresponden al tamaño mayor y menor respectivamente de los insertos encontrados en las clonas analizadas, otro resultado importante es el referente a la frecuencia de los tamaños de insertos que se encuentran en las clonas, los tamaños de los insertos con una mayor frecuencia son 2.4 y 2.5 kb, los cuales son valores que se acercan al valor del tamaño promedio de ADNc clonado el cual como ya se mencionó es de 2.9 kb.



Gráfica número 2. Análisis del tamaño de los insertos de ADNc clonados, extraído de algunas clonas seleccionadas al azar, digeridas con endonucleasas de restricción y corridas en electroforesis.

VIII DISCUSIÓN.

1. PASOS IMPORTANTES EN LA CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE ADNC DE VAINA DE FRIJOL.

El primer paso en la construcción de una buena biblioteca de ADnc comienza con la obtención de un ARNm de alta calidad. La calidad de ARNm está relacionada con su pureza e integridad. La pureza puede verificarse realizando lecturas en el espectrofotómetro a 260 y 280 nm, ya que al realizar la relación 260/280 el valor obtenido debe de ser entre 1.8 a 2, si se obtienen lecturas menores de 1.8 es que existen problemas de contaminación por proteínas (Farrell, 1993; Schuler and Zielinski, 1989). Estos valores sugieren una extracción limpia de proteínas, en nuestro caso se obtuvo un valor de 1.94, el cual indica un ARN puro y prácticamente libre de proteínas. La integridad se comprueba realizando una electroforesis desnaturizante como se muestra en la figura 7. En dicha electroforesis se puede observar por una parte un ARN total intacto ya que se distinguen claramente las cuatro bandas de ARNr, lo cual indica que no existió degradación durante el proceso.

Por lo que respecta al análisis de la extracción de ARNm poly (A)⁺, ésta se realizó utilizando los mismos criterios de pureza y calidad. Se conoce el dato de que el peso molecular de los ARNm va de 1 a 10 kb, pero la mayor cantidad de los ARNm se encuentran comprendidos entre 1 y 4 kb, por ésta razón cuando se realiza la electroforesis de ARNm y se trata de comprobar la integridad se debe de observar

claramente un barrido predominante comprendido entre 1 y 4 kb (Brown, 1991). Si se obtiene un barrido por abajo de este intervalo es debido a que muy probablemente existió degradación durante el proceso. Otro aspecto que hay que tomar en consideración para determinar la integridad del ARNm es la presencia de un poco de ARN ribosomal lo cual también puede servir como un indicador de que no existió degradación del ARNm. Como se puede observar en la figura 7 nuestro ARNm presenta ambos criterios de integridad; esto es, presencia de un poco de ARNr y un barrido comprendido entre 1 y 4 kb.

Una vez que se comprobó la pureza e integridad del ARNm obtenido se procedió a la síntesis del ADNc. El hecho de haber marcado radiactivamente ambas cadenas de ADNc nos permitió calcular la eficiencia de síntesis y la cantidad de ADNc obtenida en ambas cadenas. Los resultados obtenidos de eficiencia de síntesis de primera cadena de ADNc fueron de 24.42% y de 8.08% utilizando el ARNm control y el ARNm de vaina de frijol respectivamente. Ambos resultados no lograron alcanzar la máxima eficiencia de síntesis anunciada, que es del 30%. Esto podría atribuirse básicamente a dos cosas, la primera es una sobrestimación del ARNm introducido en la síntesis de primera cadena, producto de una inadecuada lectura en el espectro por contaminación con ARNr, ya que realizando mediciones de una misma muestra en distintos espectros se obtienen lecturas relativamente diferentes y sobre todo cuando son cantidades tan pequeñas, lo que conduciría a una baja estimación de ADNc; la segunda podría deberse a que la enzima RT no haya trabajado a su

máxima actividad, ya que aún con el ARNm control la eficiencia de síntesis no alcanzó la máxima anunciada. Por lo que respecta a la eficiencia de síntesis de la segunda cadena de ADNc, no hubo ningún problema ya que tanto para el control como para nuestra muestra de ARNm resultó como se esperaba, de alrededor del 100% con respecto a la cantidad de ADNc obtenido en la primera cadena.

Con las alícuotas retiradas en la síntesis de la primera y segunda cadenas, marcadas radiactivamente, se realizó una electroforesis y de ésta se obtuvo una autorradiografía. En ésta se observaron los tamaños de las moléculas de ADNc sintetizados en ambas cadenas, dichos tamaños van aproximadamente de 0.5 a 8 kb (Figura 8). Esto indica que la Transcriptasa Reversa presentó una buena procesividad durante la síntesis de la primera cadena de ADNc y que los tamaños de ADNc son bastante buenos ya que se esperaban insertos de 1 y entre 8.4 kb, que es la capacidad teórica de clonación del sistema (D'Alessio, 1992). Estos datos podrían descartar la segunda explicación de la baja estimación del ADNc de primera cadena, en el sentido de que la RT no haya tenido una buena procesividad.

El paso del ADNc a través de la columna de Sephacryl es básico, ya que la columna está perfectamente calibrada para separar por tamaños las moléculas de ADNc obtenidas en cada alícuota y con esto separar las fracciones en donde se espera obtener las moléculas de ADNc más grandes. Este paso de la cromatografía es muy importante porque a través de ellas se puede saber si los tamaños de ADNc sintetizados son adecuados y además si se tiene la cantidad de ADNc

necesaria para la reacción de ligación. El punto de corte de elución de la columna son 550 μ l, volumen en el cual se corre peligro de introducir adaptadores y ADNc de tamaño pequeño. Si ambas cosas no son adecuadas no tiene ningún sentido seguir con la clonación. Al realizar la sumatoria de la columna D de la tabla 1 obtenemos 21.47 η g de ADNc (tabla 1 columna D) los cuales se ajustan perfectamente a la cantidad requerida de ADNc para la reacción de ligación que va de 20 a 50 η g de ADNc (Gruber *et al*, 1991).

2. ANÁLISIS DE LA BIBLIOTECA CONSTRUÍDA.

Después de la reacción de ligación se realizó el empaque *in vitro* del ADNc clonado en los fagos y estos fueron empleados para realizar la titulación de la biblioteca. El título observado fue de 2.28×10^8 ufp/ μ g de ADNc, lo cual es bastante alto ya que los valores mencionados para las buenas bibliotecas están entre 1.5×10^6 y 2×10^9 ufp/ μ g de ADNc (Gruber *et al*, 1991, Glick and Thompson, 1993). Probablemente la cantidad de ADNc empleada en la reacción de ligación fue un factor importante para obtener un título tan bueno en nuestra biblioteca, ya que según Gruber *et al* (1991) la cantidad de ADNc es un factor limitante en la obtención de una alta eficiencia de empaque, pues si las cantidades de ADNc están por abajo o por arriba del intervalo señalado (20-50 η g de ADNc) la eficiencia de empaque disminuye considerablemente.

**ESTA TESIS NO DEBE
SER DE LA BIBLIOTECA**

Al proceder al análisis de los tamaños de ADNc clonados se observó que existen Insertos de ADNc del mismo peso molecular, lo cual indica una frecuencia en la traducción de los mensajes y esto a su vez podría ser relacionado con la abundancia de un ARNm en el tejido. Estos resultados de que algunas clonas presentan un mismo tamaño de inserto es también reportado por D'Alessio (1992); por esta razón se decidió analizar un número más abundante de clonas para proceder al análisis de los insertos clonados.

Se analizaron 37 clonas seleccionadas al azar y en cada una de las electroforesis realizadas se analizaron los tamaños de los insertos de ADNc clonados, con estos se construyó la tabla y gráfica número 2, en las cuales podemos analizar más cuidadosamente la variación de tamaños de ADNc clonados así como la frecuencia con la cual se repliten algunos Insertos los cuales varían entre 0.7 y 7.4 kb. Si observamos la tabla 2 podemos percatarnos que las clonas más abundantes tienen insertos de 2.4 y 2.5 Kb, los cuales son valores muy cercanos al tamaño promedio de ADNc clonado que es de 2.9 Kb, esto también estaría hablando de la abundancia de los ARNm que se encuentran en vaina en este estadio, los cuales corresponderían a los genes que están siendo activamente expresados, por otra parte en un trabajo realizado por Gruber (1991) utilizando el mismo sistema empleado por nosotros menciona tamaño promedio de ADNc clonados de 2.05 kb, e Insertos entre 0.8 y 5.11 kb lo cual corresponde a los insertos mayor y menor encontrados en sus clonas, datos que concuerdan con los parámetros encontrados en este trabajo.

Tomando en cuenta estos resultados , se podría considerar que existen altas probabilidades de encontrar en esta biblioteca la secuencia del gen de la PEPC de vaina de frijol; ya que según la información de otras PEPC descritas en algunas especies de plantas el tamaño del mensaje de esta enzima es de 3.4 kb (Hudspeth, 1992., Kawamura, 1990), y los tamaños de los insertos con mayor frecuencia, así como el tamaño promedio de los insertos clonadosse encuentran cerca del tamaño del mensaje de la PEPC. Por lo tanto las posibilidades de encontrar el mensaje completo de la PEPC son grandes y en el supuesto caso de que no se encontrara el mensaje completo por lo menos se espera encontrar un fragmento de la PEPC de un tamaño apropiado (1-2 Kb) con el cual se podrían continuar haciendo una gran cantidad de experimentos para poder cumplir con los objetivos del proyecto general.

IX CONCLUSIÓN.

Se construyó una biblioteca de ADNc de vaina de frijol en el vector λ ZIPLox, através del cual se puede realizar una escisión *in vivo* para obtener ADN plasmídico de donde se pueden extraer los insertos clonados.

Se pueden resaltar cuatro características importantes de esta biblioteca:

- a) Los tamaños de ADNc sintetizados son de aproximadamente 0.7 a 7.4 kb.
- b) El título que tiene es de 2.28×10^8 ufp/ μ g de ADNc.
- c) El tamaño promedio de ADNc clonado es de 2.9 kb.
- d) Los insertos clonados con mayor frecuencia tienen un tamaño de 2.4 y 2.5 kb.

En base a lo anterior se puede considerar que esta biblioteca de ADNc de vaina de frijol posee las características adecuadas para realizar escrutinios representativos con altas probabilidades de encontrar insertos de ADNc con marcos de lectura abiertos, aún tratándose de secuencias cuya abundancia en el tejido sea muy escasa.

Todo esto nos lleva a concluir que esta biblioteca de ADNc de vaina de frijol tiene las características necesarias para ser considerada como una buena biblioteca.

X. REFERENCIAS.

- Aoyagi, K., and Bassham, J. A. 1984. Pyruvate orthophosphate dikinase of C₃ seeds and leaves as compared to the enzyme from maize. *Plant Physiol.* 75: 387- 392.
- Berben, G., and Gilliquet, V. Improved colony girds. 1993. *Focus* 15, 4.
- Birnboim, H. C. and Doley, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedur for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids. Res.* 7:1513-1517.
- Blanke, M. M., Notton, R. A., and Hucklesby. 1986. Physical and kinetic propertis of photosynthetic phosphoenolpiruvate carboxilase in developing apple fruit. *Phytochemistry.* 25: 601-606.
- Blanke, M. M., and Lenz, F. 1989. Fruit photosynthesis. *Plant Cell and Enviroment* 12: 31-46.
- Bravdo, B. A., Palgi, A., Lurie, S., and Frenkel. 1977. Changing ribulose diphosphate carboxylase/oxygenase activity in ripening tomato fruit. *Plant Physiol.* 60:309-312.
- Brown, T. A. 1991. *Essential Molecular Biology a practical approach.* Vol. II Oxford University, New York.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., and Helling, R. B. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmid *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70: 3240.
- D'Alessio, J. M., Bebee, R., Hartley, J. L., Noon, M. C., and Polayes, D. 1992. Lambda ZipLox. Automatic subcloning of cDNA. *Focus* 14, 76.
- Davies, J. 1987. La Ingeniería genética. *Mundo Científico.* 7,71.
- Delgado, A. A. 1992. Metabolitos formados por la fijación del CO₂ en la cavidad de la vaina de *Phaseolus vulgaris* L. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
- Dodet, B. 1987. Los nuevos diagnósticos biológicos. *Mundo Científico.* 7, 71.
- Fahn, A. 1990. *Plant Anatomy.* Fourt Edition. Pergamon Press. U.S.A.

- Farrell, R. E. 1993. RNA methodologies a laboratory guide for isolation and characterization. Academic Press Inc. U. S. A.
- Flin, A. M., Atkins, C. A., and Pate, J. S. 1977. Significance of photosynthetic and respiratory exchanges in the carbon economy of the developing pea fruit. *Plant Physiol.* 60: 412-418.
- Flores, E. J. 1994. Expresión de los genes de la PEPC en frijol (*Phaseolus vulgaris* L). Tesis de Licenciatura: Universidad Autonoma de Sinaloa.
- Glick, R. A., Thompson, E. J. 1993. Methods in plant molecular Biology and Biotechnology. CRC Press. U.S.A.
- Gruber, C. E., Cain, C., Noon, M. C., and D'Alessio, J. M. 1991. Construction of directional cDNA libraries using the SuperScript Lambda System. *Focus* 13, 1.
- Hedley, C. L., Harvey, D. M., and Kelly, R. J. 1975. Role of PEP carboxylase during seed development in *Pisum sativum*. *Nature*.258: 352-354.
- Hoess, R. and Abremski, K. 1985. Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. *J. Mol. Biol.* 181, 351.
- Hudspeth, R. L., Guala, J. W., Ziyu, D., Edwards, G. E. and Ku, S. B. 1992. Expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 98,458-464.
- Josefsen, K., Wollike, M., and Buschard, K. 1993. Rapid quantitation of cDNA clones on agar plates. *Focus.* 15, 4.
- Kawamura, T. Shigesada, K., Yanagisawa, S., and Izui, K. 1990. Phosphoenolpyruvate carboxylase prevalent in maize roots: isolation of cDNA clone and its use for analyses of the gene and gene expression. *J. Biochem.* 107,165-168.
- Kimmel, A. R., Berger, S. L. 1987. Methods in enzymology. Preparation of cDNA and the generation of cDNA libraries: Overview.152.
- Kodaki, T., Katagiri, F., Asano, M., Izui, K., Katsuki, H. 1985. Cloning of phosphoenolpyruvate carboxylase EC-4. 1. 1. 31 gene from a cyanobacterium *Anacystis nidulans* in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 97: 533-540.

- Langley-Danysz, P. 1987. La biotecnología de los aditivos alimentarios. *Mundo Científico* 7, 71.
- Laval-Martin, D., Farineau, J., and Diamond, J. 1977. Light versus dark carbon metabolism in cherry tomato fruits. *Plant Physiol.* 60: 872-876.
- Lehninger, L. A., Nelson, L. D., and Cox, M. M. 1993. Principles of biochemistry. Worth Publisher. New York.
- Nossal, J. G. 1988. Los límites de la manipulación genética. Gedisa editorial. España.
- Old, R. W. and Primrose, S. B. 1989. Principles of gene manipulation an introduction to genetic engineering. Blackwell scientific publications. Oxford, England.
- Pétiard, V., y Barlaud-Fontane, A. 1987. El cultivo de células vegetales. *Mundo Científico.* 7, 71.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Schuler, M. A., and Zielinski, R. E. 1989. Methods In Plant Molecular Biology. Academic Press, Inc. San Diego California.
- Sheen, J. Y., and Bogorad, L. 1985. Differential expression of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase large subunit gene in bundle sheath and mesophyll cells of developing maize leaves is influenced by light. *Plant. Physiol.* 79: 1072-1076.
- Sugimoto, T., Kawasaki, T., Kato, T., Whitter, R. F., Shibata, D. and Kawamura, Y. 1992. cDNA sequence and expression of a phosphoenolpyruvate carboxilase gene from soybean. *Plant Mol. Biol.* 20: 743-747.
- Tempe, J., y Schell, J. 1987. La manipulación de las plantas. *Mundo Científico.* 7, 71.
- Ting, I. P., and Osmond, C. B. 1973. Multiple forms of plant phosphoenolpyruvate carboxilase associated with different metabolic pathways. *Plant Physiol.* 51: 448-453.

Tirumala, M., and Raghavendra, S. A. 1992. Light activation of phosphoenolpyruvate carboxylase in maize mesophyll protoplasts. *J. Plant Physiol.* 139: 431-435.