

Ho
21.

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química

**Modificación de la Expresión Génica por
Bencil-Adenina en Ejes Embrionarios de Maíz,
determinada por Differential Display**

T E S I S

que para obtener el Título de

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

Alberto Gómez Gutiérrez

México, D.F.

1997

**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.

Jurado Asignado

Presidente Prof. Medina Jiménez Beatriz Albina

Vocal Prof. Vázquez Ramos Jorge Manuel

Secretario Prof. Robles Flores Martha

1 er. Suplente Prof. Rendon Huerta Erika Patricia

2o. Suplente Prof. Pedraza Chaverri José

Sitio donde se desarrolló el Tema :

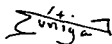
Ciudad Universitaria, Facultad de Química, Conjunto "E", Departamento de
Bioquímica, Laboratorio 114.

Asesor del Tema :



Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos

Supervisor Técnico :



M. en C. José Juan Zúñiga Aguilar

Sustentante :



Alberto Gómez Gutiérrez

Tabla de Contenido

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	VII
AGRADECIMIENTOS	IX
DEDICATORIAS	XI
GLOSARIO	XIII
INTRODUCCIÓN	1
MALZ	1
Características Botánicas	1
Estructura de la Semilla	2
DESARROLLO DE LA PLANTA	3
GERMINACIÓN	4
Metabolismo de la Germinación	6
Fitoreguladores	7
Citocininas	10
ANTECEDENTES IMBIBICIÓN	10
HIPOTESIS	13
OBJETIVOS	15
GENERAL	15
ESPECÍFICOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	17
REACTIVOS	17
MATERIALES	18
Biológico	18
Físico	18
EQUIPO	18
OBTENCIÓN DE EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ	19
IMBIBICIÓN DE EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ	19
EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ	19
EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ	20
CUANTIFICACIÓN DE ARN Y ADN POR ESPECTROFOTOMETRÍA	20
TRATAMIENTO DE ARN TOTAL CON DNASA I	21
TRATAMIENTO DE ADN TOTAL CON RNASA	21
CORTE DE ADN GENÓMICO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	21
ENSAYO DE ARSA "DIFFERENTIAL DISPLAY"	21
Marcaje Radiactivo de oligodT ₁₂₋₁₈ -VN	22
RT-PCR radiactivo	22
Autoradiografía	23
Aislamiento de los ADNc Diferenciales del Gel de Poliacrilamida	24
PCR no Radiactivo Reamplificación de los ADNc Diferenciales	24
ENSAYOS DE HIBRIDACIÓN EN NORTHERN BLOT	25

Electroforesis de ARN	25
Northern blot	26
Marcaje de Sonda Radiactiva por Cebador Aleatorio (Random Primer).....	27
Columna de Sephadex G-50	27
Hibridación y Autoradiografía	28
<i>ENSAYOS DE HIBRIDACIÓN EN SOUTHERN BLOT</i>	28
Electroforesis de ADN	28
Southern blot	29
Hibridación y Autoradiografía.....	29
<i>CLONACIÓN</i>	29
Minipreparaciones	30
RESULTADOS	31
"DIFFERENTIAL DISPLAY"	31
Fundamento de la Técnica.....	31
Ensayos.....	34
<i>NORTHERN BLOT</i>	45
<i>SOUTHERN BLOT</i>	45
<i>CLONACIÓN</i>	47
ANÁLISIS DE RESULTADOS	49
"Differential Display"	49
Reamplificaciones	50
Southern blot	51
Hibridación por RT-PCR no radiactivo	52
CONCLUSIONES	53
APÉNDICE	55
<i>SOLUCIONES</i>	55
BIBLIOGRAFÍA	1

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura Página

FIGURA 1. DIAGRAMA DE LA SEMILLA DE MAÍZ.....	2
FIGURA 2. BENCILADENINA	9
FIGURA 3. DIAGRAMA DE TRANSFERENCIA DE ARN A MEMBRANA DE NYLON.....	26
FIGURA 4. IDENTIFICACIÓN DE GENES DIFERENCIALES POR "DIFFERENTIAL DISPLAY".....	32
FIGURA 5. ENSAYO DE "DIFFERENTIAL DISPLAY" UTILIZANDO CEBADORES OLIGO-DT-VG Y OPM-02.....	36
FIGURA 6. ENSAYO DE "DIFFERENTIAL DISPLAY" UTILIZANDO CEBADORES OLIGO-DT-VG Y OPM-03.....	37
FIGURA 7. ENSAYO DE "DIFFERENTIAL DISPLAY" UTILIZANDO CEBADORES OLIGO-DT-VG Y OPM-04.....	39
FIGURA 8. ENSAYOS DE "DIFFERENTIAL DISPLAY" UTILIZANDO CEBADORES OLIGO-DT-CC Y OPM-10.....	40
FIGURA 9. ENSAYO DE "DIFFERENTIAL DISPLAY" UTILIZANDO CEBADORES OLIGO-DT-VG Y OPM-04.....	41
FIGURA 10. GEL DE AGAROSA AL 1 % TENIDO CON ETBR. REAMPLIFICACIONES DE BANDAS α , β , γ , δ , α_1 , β_1 , γ_1 , δ_1 , ϵ_1 , ϵ_2 Y α_2	43
FIGURA 11. GEL DE AGAROSA AL 1 % TENIDO CON ETBR. REAMPLIFICACIONES DE BANDAS A, B, C, D, E, F, G Y H.....	43
FIGURA 12. SOUTHERN DE ADN GENÓMICO CORTADO CON DIFERENTES ENZIMAS DE RESTRICCIÓN UTILIZANDO COMO SONDA LA BANDA REAMPLIFICADA A.....	46
FIGURA 13. SOUTHERN DEL ADNc E, EN RT-PCR DE LA COMBINACION CC-M10.....	46
FIGURA 14. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1.5 %. PLÁSMIDO AISLADO DE COLONIAS DE <i>E. COLI</i> INVØF ^r TRANSFORMADAS CORTADO CON Eco RI.....	48

TABLA 1. COMBINACIONES DE CEBADORES UTILIZADOS PARA LOS ENSAYOS DE "DIFFERENTIAL DISPLAY".....	34
TABLA 2. NÚMERO DE ADNc REAMPLIFICADOS POR COMBINACIÓN DE CEBADORES.....	42
TABLA 3. BANDAS REAMPLIFICADAS CON LAS BANDAS QUE PRODUCEN Y SUS PESOS MOLECULARES.....	44

AGRADECIMIENTOS

- Deseo agradecer en primer lugar a mis padres Marina Yolanda y Vinicio por su apoyo incondicional durante toda mi vida y principalmente por darme el ejemplo de lucha ante cualquier adversidad.
- Agradezco también al Dr. Jorge M. Vázquez Ramos por la dirección de esta tesis y por ayudarme a encontrar el camino de la ciencia.
- A mis amigos del Laboratorio 114 por acompañarme y compartir lo bueno y lo malo de este proceso.
- Por último a todos aquellos que de alguna u otra forma, sientan que influyeron positiva o negativamente en la realización de esta tesis.

DEDICATORIAS

- ☉ A mis padres (de nuevo) como un símbolo de lo que ellos han formado de mi.
- ☉ A Vini y a Ezequiel, por acompañarme en todos los cambios importantes en mi vida como mis hermanos.
- ☉ A toda mi familia, ya estando cerca, ya estando lejos, pero siempre estando ahí.
- ☉ A Dulce, cuyo anhelo y alegría de vivir será siempre un ejemplo para mí en lo más profundo de mí ser.
- ☉ A Rocio, por el tiempo que compartimos y el dilema irónico que formamos.
- ☉ A todos mis amigos de 1er semestre : Paty, Greta, Andrés, Edmundo, Erick, José Luis, Iván, Ercilia, Ricardo, Abigail, Alicia, Gaby, Lourdes, Vero, Erika, Rigoberto y muy en especial a Yukari. A todos ellos por ese semestre inolvidable.
- ☉ A todos mis amigos de la facultad por estar ahí como tales en ese tiempo de presiones, alegrías, enojos, decepciones, formación, lucha; en fin quien haya estado en la facultad sabe a lo que me refiero.
- ☉ A mis amigos del grupo por enseñarme a ser mejor persona y darme más que sólo motivaciones para seguir adelante.
- ☉ Por último, a aquellos que se quieran considerar mis enemigos por no poder compartir mi forma de pensar y de actuar. Espero haber cumplido sus expectativas.

GLOSARIO

ABA.	Ácido Abscisico.
ADN.	Acido Desoxirribonucleico
ADNc.	ADN complementario al ARNm.
ARN.	Acido Ribonucleico
ARNm.	Ácido ribonucleico mensajero.
ARNr.	Ácido ribonucleico ribosomal.
ARNt.	Ácido ribonucleico de transferencia.
ATP.	Adenosina Trifosfato.
BA.	Benciladenina, 6.-bencil-aminopurina (C ₁₂ H ₁₁ N ₅).
dATP.	Desoxadenosina Trifosfato.
dCTP.	Desoxicitidina Trifosfato
DEPC.	Dietilpirocarbonato
dGTP.	Desoxiguanosina Trifosfato.
DNasa.	Desoxirribonucleasa.
dNTP.	Mezcla de dATP, dCTP, dGTP y dTTP en la misma concentración.
dTTP.	Desositimidina Trifosfato.
EDTA.	Acido etilén-1,2-diamino-tetracético.
EtBr.	Bromuro de Etidio, Bromuro de 3,8-Diamino-5-etil-6-fenilfenantridio.
GA.	Ácido Giberélico.
IAA.	Ácido Indolacético.
IPTG.	Isopropil β-D-tiogalactopiranosido
MOPS.	Ácido 3-(N-morfolin)-propano sulfónico
PCR.	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
RNasa.	Ribonucleasa.
RT.	Transcripción Reversa
RT-PCR.	Transcripción reversa seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa

Glosario

SDS.	Dodecil Sulfato de Sodio.
SSC.	Amortiguador con NaCl ajustado a pH=7.0 con NaOH.
STE.	Amortiguador con NaCl Tris y EDTA pH=8.0.
TAE.	Amortiguador Tris-Acético y EDTA pH=8.0
Taq.	ADN Polimerasa recombinante en <i>E. coli</i> de <i>Thermus aquaticus</i> .
TBE.	Amortiguador Tris-Bórico y EDTA pH=8.0.
Tm.	Temperatura de Fusión del ADN.
U.	Unidad de Actividad enzimática.
U.A..	Unidad de Absorbencia.
X-Gal.	5-bromo-5-cloro-3-inolil- β -D-galactósido.

INTRODUCCIÓN

Maíz

Uno de los alimentos de mayor importancia económica y nutricional en México y otros países latinoamericanos es el maíz, ya que forma parte de la nutrición básica de estos países, y es una de las pocas plantas nativas de América con trascendencia, no sólo económica sino cultural. Nutritivamente hablando, se considera inferior a otros cereales por su bajo contenido proteico, pero posee alto contenido en almidones, lo cual hace al maíz importante fuente de carbohidratos en la alimentación. Aparentemente la primera referencia histórica a esta planta se realiza en 1492, por expedicionarios españoles en Cuba, aunque se han encontrado semillas de maíz en cuevas que aportan evidencia de su presencia en México desde el año 2500 A.C. (Kozłowski, 1972; Jugenheimer, 1976).

Características Botánicas

El maíz (*Zea mays* L.) es una angiosperma, pertenece a la familia de las gramíneas y a la tribu Maydeae, que incluye 8 géneros, de los cuales solamente 3 son de importancia económica para la cultura occidental. De estos 3 géneros el *Euchlena*, o teosinte, como se conoce en México, es la planta silvestre más cercana al maíz. El maíz pertenece al género *Zea*, del cual es principal representante. Además, existen las diferentes variedades y cultivares del mismo, que dependen de la zona de cultivo y condiciones topográficas del terreno de siembra (Jugenheimer, 1976).

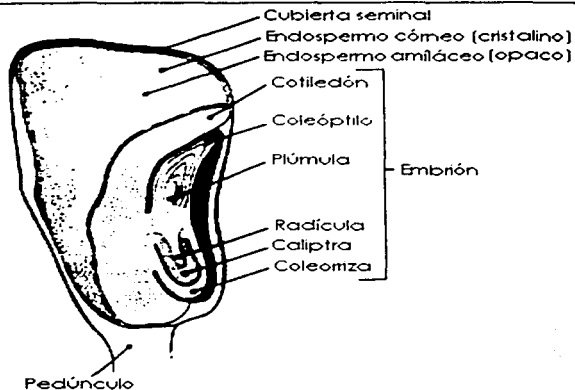


Figura 1. Diagrama de la Semilla de Maíz.

Estructura de la Semilla

Una semilla verdadera es un óvulo fertilizado maduro que contiene una planta en estado embrionario. La semilla de angiosperma es aquella que se produce a partir de plantas unisexuales, por lo que se realiza la fertilización del óvulo femenino por un tejido diferente a aquel en donde se encuentra el polen. Posee 3 estructuras básicas: el embrión, compuesto por el eje embrionario y uno o más cotiledones; el endospermo, reserva nutritiva para el desarrollo y crecimiento del embrión; y la cubierta seminal, de gran importancia por su composición y permeabilidad, de la que

depende la interacción con el medio para el desarrollo de la semilla. El eje embrionario se compone de la radícula, raíz rudimentaria; de un hipocotilo, donde se encuentran unidos los cotiledones, y de la plúmula, que formará el tallo y las hojas. En el caso del maíz por ser una monocotiledónea sólo presenta un cotiledón (Figura 1); se dice que posee un endospermo almidonoso y un pericarpio multicapa (Bidwell, 1979; Steeves, 1983; Mayer y Poljakoff-Mayber, 1984; Bewley y Black, 1994).

Desarrollo de la Planta

Existen varias clases de control en el desarrollo de las plantas, los cuales se pueden clasificar según su origen y se han podido apreciar, desde la formación de la semilla, hasta la maduración de la planta en crecimiento. Según Bidwell (1979), existen 3 tipos de control de desarrollo : el genético, el organismico y el ambiental, los cuales pueden actuar a diferentes niveles, ya sea genético, bioquímico, celular o de organización.

El control genético se realiza mediante la regulación de genes, ya sea reprimiéndolos o expresándolos, seleccionando la información necesaria para la división, el desarrollo y el crecimiento de cada tejido u órgano de la planta. Esto se realiza en determinado momento del desarrollo y en una condición ambiental específica, lo cual da organización a las células de la planta y también las regula.

Los controles organismicos son los que están mediados por estímulos generados en el interior de órganos o como resultado de esa organización celular. Este control considera principalmente a los fitoreguladores, sustancias de origen vegetal que pueden regular el crecimiento y desarrollo de la planta, de las que se tratará con mayor profundidad más adelante.

Introducción

El control ambiental se produce por algún estímulo externo a la semilla o planta, del cual depende el camino para el desarrollo de la misma; por ejemplo la luz, la temperatura, la gravedad, la humedad de la tierra y aire, los nutrientes, y todo factor externo que pueda influir de alguna forma en el óptimo desarrollo de la semilla, o en la correcta maduración de la planta.

En cuanto a la formación y desarrollo de la semilla se han determinado cuatro etapas básicas: la histodiferenciación, en donde se realiza la morfogénesis y se seleccionan los tejidos para funciones específicas de la semilla; la maduración, etapa donde el embrión alcanza la longitud máxima y se acumulan todas las sustancias de reserva que necesitará el embrión; la desecación, en donde se disminuye la humedad hasta un 5-10%; y la quiescencia, etapa en la cual el metabolismo de la semilla se reduce al mínimo, quedando lista para germinar. Se dice que la formación de la semilla es directamente dependiente de la desecación de la misma, ya que pierde humedad hasta un punto que se considera mínimo, lo que hace pensar que el embrión de la planta va a ser resistente a la desecación (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1984).

Germinación

Se conoce como germinación a un número muy grande de procesos: la germinación de semillas, la germinación de esporas de bacterias, hongos o levaduras, así como el desarrollo del tubo de polen cuando éste se fertiliza. El común denominador de estos conceptos es que en todos se produce la reanudación de procesos de desarrollo y crecimiento interrumpidos (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1984). La germinación es un proceso poco esclarecido, debido a la dificultad de su estudio y a las diversas concepciones que se tienen de la misma (Murray, 1984). Aún

refiriéndose únicamente a la germinación de semillas, no se ha llegado a un acuerdo (Bewley y Black, 1994).

La germinación de semillas es un término difícil de definir, ya que su rango de establecimiento se determina en gran medida del objetivo del estudio que se realice. En general, se ha dicho que la germinación comienza con la entrada o absorción de agua del medio a la semilla, llamada imbibición, y termina con el inicio de la elongación del eje embrionario, que usualmente es la radícula. Para los agrónomos comienza con la imbibición y termina con la emergencia de la plántula del suelo; para los fisiólogos de plantas ha terminado mucho antes, con la elongación necesaria para emerger, después de la cual se encuentra en estado post-germinativo (Bewley y Black, 1994).

Para los fines de estudio planteados en nuestro grupo de trabajo, se define la germinación como el conjunto de eventos metabólicos y fisiológicos que suceden desde la imbibición de la semilla hasta la primera división celular, después de la cual la semilla se encuentra en post-germinación. En la germinación de ejes embrionarios de maíz, sabemos que las primeras figuras mitóticas marcadas, que son indicativas de división celular, aparecen aproximadamente entre las 26-30 horas después de la imbibición (Baiza *et al.*, 1989).

La toma de agua, o imbibición, y condiciones ambientales óptimas como luz, humedad, temperatura, etc., son eventos que pueden promover el inicio de la germinación. En maíz se sabe que estos factores activan en primera instancia a las células de meristemo de raíz y a las células de la coleoriza. La primera protrusión, o elongación, del eje embrionario de la semilla la realiza la coleoriza dando lugar a la raíz, y la segunda protrusión la realiza la plúmula (Kozlowski, 1972).

Metabolismo de la Germinación

El metabolismo de la semilla es anfóbico, es decir que involucra catabolismo de reservas y anabolismo de nuevos compuestos para la síntesis de nuevas células y tejidos. Los procesos de germinación son resultado de la imbibición de agua por la semilla, la reactivación de organelos y macromoléculas preexistentes, como ARN (de los 3 tipos, ARNm, ARNt y ARNr), ribosomas, mitocondrias y enzimas; y subsecuentes procesos que tratan de restablecer el metabolismo de la planta, con el fin de lograr el desarrollo y crecimiento (Ching, 1972). Se han realizado varias revisiones sobre el metabolismo de la germinación, en donde se involucran entre otros factores la producción de ATP, la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas, y la reparación y replicación de ADN (Osborne, 1983). Los eventos tempranos en la germinación son: la hidratación de la pared celular y coloides citoplasmáticos, que depende de el grado de humedad y cubierta seminal; la síntesis de ATP inmediatamente después de la imbibición, como metabolito necesario para proporcionar energía y para la síntesis de ácidos nucleicos (se ha encontrado que los niveles de ATP en la célula embrionaria son muy bajos); la síntesis de ARN, la que a la par de la síntesis de ATP, se encuentra desde los 20 min posteriores a la imbibición y se encuentra ARNt y ARNr a los 40min en arroz (Sen *et al.*, 1975). En ejes embrionarios de maíz se ha determinado que el ARNm presente en la semilla seca, en comparación con el sintetizado *de novo*, posee diferente patrón de síntesis proteica, sugiriendo que existe un mecanismo de regulación de la expresión durante la germinación (Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984). Paralelamente a estos eventos comienza la reparación de estructuras dañadas y reparación de ADN, ya que no se ha observado pérdida de éste en semilla seca, y que la síntesis de ADN no es del tipo replicativo (Osborne *et al.*, 1980). Eventos subsecuentes son la expansión celular y

replicación del ADN. Resultados obtenidos en ejes embrionarios de maíz indican que este evento es tardío en la germinación, lo que es de esperarse porque la replicación es un evento que precede a la terminación de la germinación (Baiza *et al.*, 1989) y a la movilización de reservas (Osborne, 1984). También se ha estudiado la actividad de la ADN polimerasa, como parte de los eventos germinativos en ejes embrionarios de maíz y se ha estimado el tiempo en que esta actividad participaría en procesos de replicación del ADN (Vázquez-Ramos *et al.*, 1988).

Fitorreguladores

Haciendo una analogía con las sustancias químicas encontradas en animales, se han nombrado hormonas vegetales o fitorreguladores a ciertos compuestos producidos en las plantas que pueden regular su metabolismo. Los fitorreguladores se dividen por su fórmula química en: el grupo de las giberelinas, el grupo de las auxinas, las citocininas, el grupo del ácido abscísico, el etileno y otros compuestos de regulación de desarrollo (Bewley y Black, 1994; Rojas y Ramírez, 1993). A últimas fechas se ha publicado nueva información sobre los brasinosteroides, que se propone, forman una nueva familia de fitorreguladores de gran importancia dados los eventos que controlan (Rojas y Ramírez, 1993; Cloude *et al.*, 1996). Aún con las divisiones descritas, no se puede hablar de un efecto independiente para cada uno de los fitorreguladores, ya que se ha encontrado evidencia de la necesidad de la presencia de varios para obtener un efecto previamente descrito para uno solo.

Las Auxinas son compuestos análogos o con efectos semejantes al ácido indolacético (IAA), principal auxina natural, cuyo mecanismo de acción propuesto es sobre los ácidos nucleicos. Su efecto más apreciable es la promoción o inhibición del alargamiento celular, que va a depender de la concentración de auxina. Se sintetizan principalmente en el ápice del tallo y en tejidos jóvenes, además de que

Introducción

activan a ciertas enzimas del ciclo del ácido cítrico. Dependiendo de su concentración controlan la protrusión de la radícula y raíces adventicias, estimulándola, o a diferente concentración inhibiéndola; también promueven la supresión de las yemas laterales y tallos secundarios (Rojas y Ramírez, 1993; Bidwell, 1979).

Se conocen hasta 72 tipos diferentes de giberelinas siendo todos compuestos análogos al ácido giberélico, es decir, compuestos con estructura química similar. Se sabe que actúan desreprimiendo genes a nivel de ARN. Su acción principal es el alargamiento de los tallos en plantas, inducen la síntesis de amilasa durante la germinación, y como caso específico, interactúan con el fitocromo. Como efecto macroscópico, se dice que inducen la germinación y toman parte en la floración (Rojas y Ramírez, 1993; Bidwell, 1979).

El etileno se produce en grandes cantidades en los frutos por madurar, se sintetiza a partir de la metionina, y en las hojas promueve la senilidad. Se ha encontrado evidencia de la inducción de síntesis de proteínas y de ARN, probablemente por una proteína unida a etileno. Las auxinas estimulan la producción de etileno en la planta (Rojas y Ramírez, 1993; Bidwell, 1979).

El grupo del ácido abscísico (ABA), que se sintetiza a partir del farnesilpírofosfato o a partir de violoxantina, lo conforman los compuestos relacionados con estructura semejante. Su nombre proviene del efecto observado de la promoción de abscisión de hojas, pero se ha descubierto que tiene más influencia en el mantenimiento del letargo, por ejemplo en semillas o en árboles perennes. Al parecer el ácido abscísico tiene un mecanismo de acción contrario al de las giberelinas uniéndose a los ácidos nucleicos, y de igual manera que éstas, puede

interaccionar con el fitocromo. Se le considera como un inhibidor del desarrollo, debido a que suspende los procesos para su promoción (Rojas y Ramírez, 1993).

Los brasinosteroides inducen alargamiento y división celular, la cual es distinta a la obtenida por las giberelinas, citocininas y auxinas. Se ha propuesto que actúan directamente sobre el ARN. Existen estudios sobre su presencia necesaria en algunas plantas para el desarrollo de tallos y hojas (Rojas y Ramírez, 1993; Cloude *et al.*, 1996).

Los otros fitoreguladores son varios y se encuentran en concentraciones menores a los anteriores, como los inhibidores fenólicos y terpenlactónicos que inhiben el desarrollo del embrión; las poliaminas que estimulan el desarrollo de algunas plantas superiores y se propone que activan a las citocininas (Rojas y Ramírez, 1993)

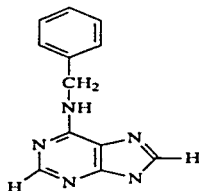


Figura 2. Benciladenina

Introducción

Citocininas

Son sustancias que promueven, como característica específica, la división celular o citocinesis, de donde proviene su nombre. La primera en descubrirse fue la 6-furfúrilaminopurina o cinetina, como producto de la degradación del ADN. Del conocimiento de su estructura se han sintetizado compuestos análogos a ésta, que se caracterizan por tener grupos sustituyentes en el nitrógeno 6 (N6) del anillo purínico de la adenina, como la Benciladenina (BA) que posee un bencilo en esa posición (Figura 2), que le confiere efectos parecidos a los de la cinetina. Este compuesto impide la senilidad en tejidos que empiezan a envejecer (Bidwell, 1979). También se han encontrado unidas al extremo 3' del anticodón del ARNt, por lo que se supone su intervención en la síntesis de proteínas, lo cual no ha sido comprobado. Generalmente se sintetizan en tejidos con alto grado de actividad meristemática, es decir de alta proliferación celular, como la punta de la raíz en planta o radícula en semilla, que es el principal sitio de síntesis de citocininas en plantas (Rojas y Ramírez, 1993). También existen proteínas que se unen a citocininas, las que se clasifican como factores de unión a citocininas (CBF), y se piensa que de alguna forma pueden modular su acción (Moore, 1989). Aunado a esto, se ha demostrado que las citocininas pueden activar orígenes de replicación en *Sinapis alba* (Houssa *et al.*, 1990). Estudios posteriores han revelado que las citocininas podrían controlar la expresión génica (Teramoto *et al.*, 1994 y 1996).

Antecedentes Inmediatos

En nuestro grupo de trabajo se ha determinado que la benciladenina, citocinina sintética, promueve varios eventos durante la germinación. La benciladenina es promotora de la síntesis reparativa de ADN en ejes embrionarios de maíz, en las primeras horas de la germinación (Zaraín *et al.*, 1987), al mismo tiempo que

aumenta la actividad de la ADN polimerasa, más no la cantidad de enzima (Vázquez-Ramos y Reyes, 1990). Por medio de técnicas histoquímicas, se ha observado que BA provoca la estimulación de la síntesis de ADN nuclear e incrementa hasta por 3 veces el índice mitótico de las células, promoviendo el avance del ciclo celular (Reyes *et al.*, 1991). Por último se ha demostrado que durante la germinación temprana BA produce un pico máximo de estimulación de la síntesis de ADN a las 9 horas de imbibición, y que este efecto se revierte con la aplicación de inhibidores de la transcripción. Estudiando actividad de protein-cinasas totales y de poli-ADP-ribosil polimerasas, se ha observado que estos indicadores, de fosforilación y de reparación de ADN respectivamente, también se estimulan por la adición de BA. Tratando de detectar expresión génica que sea promovida por BA, se han realizado estudios en el laboratorio y se han obtenido 2 clonas por sondeos diferenciales de una biblioteca de ADNc, cuyo correspondiente ARNm es modulado en su expresión por BA (Zúñiga-Aguilar *et al.*, 1995). Los estudios de "Differential Display", metodología utilizada para determinar diferencias de expresión entre poblaciones de mensajeros, no han sido concluyentes, ya que se necesitan varios ensayos con diferentes cebadores para cubrir más posibilidades, lo cual se explicará con detalle en el capítulo de resultados.

HIPOTESIS

De acuerdo a los antecedentes experimentales, algunos de los efectos producidos por BA durante la germinación temprana, son inhibidos al ser inhibida la transcripción, ésto indica que para lograr estos efectos, BA modifica la expresión de genes en etapas tempranas de la germinación.

OBJETIVOS

General

- ◆ Determinar cambios en la expresión génica durante la germinación de ejes embrionarios de maíz promovidos por la adición de Bencil-Adenina.

Específicos

- ◆ Determinar diferencias en la expresión de ARNm estimuladas por BA a las 5 horas de germinación, por medio de ensayos de "Differential Display".
- ◆ Corroborar la presencia de los ARNm correspondientes a los ADNc diferenciales obtenidos, en el genoma o el ARN total del eje embrionario, utilizando los mismos ADNc como sondas en ensayos de Northern blot y Southern blot.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico o, en su caso, de grado Biología Molecular.

Agarosa, Urea, ELONGASE™ Amplification System, RTS T4 Kinase Labeling System, SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase, Tris, MOPS, TRIzol®, fueron de Gibco-BRL, Life Technologies, Inc..

NaHClO, Ácido Acético Glacial, Etanol Absoluto, H₂SO₄, HCl, Cloroformo, Alcohol Isoamílico, NaCl, MgCl₂, KCl, Sacarosa, NaOH, EDTA, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, Acetato de Sodio, Acetato de Potasio, Isopropanol, se obtuvieron de Química Mallinckrodt, de J.T. Baker o de MERCK.

6-bencilaminopurina, cloramfenicol, DEPC, β-Mercaptoetanol, X-Gal, IPTG, Bromuro de Etidio se adquirieron de Sigma Chemicals.

RNasa Libre de DNasa, DNasa I Libre de RNasa, Glucógeno, Taq DNA Polymerase, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Eco RI, Hind III, Bam HI, Fenol, fueron de Boehringer Mannheim.

Random Primer Extension Labeling System, [α-³²P]-dCTP, [γ-³²P]-ATP, fueron de NEN®-DuPont.

Sephadex 40, de Pharmacia LKB Biotechnology.

Cebadores de Anclaje (oligodT₁₁-AG, oligoT₁₁-CG, oligoT₁₁-GG y oligoT₁₁-CC) y Kit M de decámeros aleatorios (OPM-02 [5'-ACAACGCCTC-3']),

Materiales y Métodos

OPM-3 [5'-GGGGGATGAG-3'], OPM-04 [5'-GGCGGTTGTC-3'], OPM-10 [5'-TCTGGCGCAC-3'], OPM-11 [5'-GTCCACTGTG-3']) se adquirieron de Operon Technologies, Inc.

El kit de clonación TA Cloning[®] Kit se obtuvo de Invitrogen Corp.

Materiales

Biológico

Ejes embrionarios de Maiz de la variedad Chalqueño de PRONASE S.A. de C.V.,

Escherichia coli cepa Inv α F⁺ del Kit de Invitrogen.

Físico

Papel Filtro #1, #2 y 3MM de Whatman.

Membranas de Nylon Cargadas Positivamente de Boehringer Mannheim.

Tubos de 0.5, 1.5 mL., puntas para micropipeta RT-20, RT-10, RT-200, RT-5000, de RAININ Instrument Co. Inc..

Película Autorradiográfica Biomax-MR de Eastman Kodak Co.

Seda Miracleth, Algodón.

Equipo

Centrifugas Sorvall[®] Super T-21 y Sorvall[®] MC 12V de Dupont. Aparato de Electroforesis Model S-2, Horizon[®] 58, Horizon[®] 11•14, Fuente de Poder Modelo 250, Secador de Geles GD40/50, de Gibco-BRL, Life Technologies, Inc.. Termociclador Modelo 480 de Perkin Elmer. Horno de Hibridación HIBAYD de LabNet. Transiluminador U.V. de UVP Inc. Horno de Entrecruzamiento SPECTROLINKER[™] XL-1000 de Spectronics Corporation. Incubadora de Thermoline. Contador de Centelleo de Beckman.

Obtención de ejes embrionarios de maíz :

Se utilizó semilla de maíz de la variedad Chalqueño (*Zea mays* L. var. Chalqueño), para disecar el eje embrionario manualmente, con la ayuda de navajas de afeitar, procurando no dañar la constitución del eje y almacenándolos a 4 °C hasta su utilización.

Imbibición de ejes embrionarios de maíz :

Se colocó, en condiciones de esterilidad, papel filtro Whatman #1 en cajas petri de 5 cm de diámetro. Se desinfectaron 100 mg de ejes embrionarios por tratamiento con 100mL de NaClO 0.5% durante 1 min. Se enjuagaron con 100 ml. de agua bidestilada estéril, en 3 ocasiones. Se secaron los ejes embrionarios en campana de flujo laminar por aproximadamente 30 min. Se colocaron los ejes en las cajas petri con el papel filtro, agregando suficiente Solución de Imbibición de BA o Solución de Imbibición Control, para lograr humedecer la totalidad de los ejes (2.5-3 mL), incubándose en obscuridad a 25 °C durante 5 horas.

Extracción de ARN total de ejes embrionarios de maíz :

Se homogenizaron perfectamente 100 mg de ejes embrionarios embebidos, en un mortero con 2 mL de TRIzol[®]. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 10 min. Se adicionaron 300 µL de Alcohol Isoamílico-Cloroformo (1:50) (AI:Cl) y se agitó vigorosamente. Se centrifugó a 4000 g por 10 min a 4 °C. Cuidando de no tomar nada de la interfase, se transfirió la fase acuosa, que queda en la parte superior, a un tubo estéril. Se adicionó un cuarto del volumen de la mezcla (AI:Cl), se agitó vigorosamente y se centrifugó a 4000 g por 10 min a 4 °C. Se tomó la fase acuosa colocándola en un tubo estéril y se adicionó un tercio de volumen de TRIzol[®]. Se repitieron dos extracciones con 300 µl de AI:Cl. La última fase acuosa

Materiales y Métodos

se transfirió a un tubo estéril y se adicionó 1 volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol al 100 % a -20 °C, mezclando suavemente por inversión del tubo. Se guardó por 30 min a -70 °C. Se centrifugó, y se lavó dos veces con etanol al 70 % agitando suavemente. Se centrifugó a 4000 g por 5 min a 4 °C. Se eliminó cuidadosamente todo el etanol residual, secando la pastilla durante 5 min a 37 °C ó 3 min a 55°C. Se resuspendió aproximadamente en 500 µL de H₂O libre de RNasa.

Extracción de ADN Genómico de Ejes Embrionarios de Maíz :

Se homogenizaron 20-50 ejes embrionarios en mortero con nitrógeno líquido hasta dejar un polvo fino. Se agregaron 20 mL de Amortiguador de Extracción y se incubó a 65 °C por 10 min. Se adicionaron 6.6 mL de Acetato de Potasio 5 M, se mezcló bien e incubó en hielo 30 min. Se centrifugó a 38600 g por 20 min a 4 °C. Se filtró el sobrenadante a través de una tela Miracloth, en un tubo que contenía 20 mL de Isopropanol a 4 °C, mezclando suavemente y se dejó reposar a -20 °C por al menos 30 min. Utilizando un gancho de vidrio estéril se colectó el ADN precipitado en forma viscosa y se transfirió a un tubo estéril de 1.5mL., se resuspendió en 100 µL de H₂O y se trató con RNasa.

Cuantificación de ARN y ADN por espectrofotometría :

Se midió la absorbencia de 1 µL de ARN o ADN a cuantificar en una celda de cuarzo de 1 mL a 260 nm de longitud de onda, aforando al volumen de la celda con agua bidestilada. Se corrigieron las lecturas tomadas restando las lecturas de los blancos, que se habían tomado previamente, tomando en cuenta que 40 µg/µL de RNA = 1 U.A. a 260 nm y 50 µg/µL de ADN = 1 U.A. a 260 nm. Con estos datos se determinó la concentración en µg/µL de ARN o de ADN en la muestra original.

Tratamiento de ARN total con DNasa I :

A un tubo de 1.5ml. se adicionó : 50 µg de ARN total, 20 U de Inhibidor de RNasa, 10 U de DNasa I libre de RNasa, 5 µL. de amortiguador de DNasa 10 X y agua libre de RNasa hasta 50 µL. Se incubó por 45 min a 37 °C. Se aforó con agua libre de RNasa a 300 µL. y se extrajo con 300 µL. de Cloroformo-Fenol (1:5) (Cl:F). Se centrifugó a 15000 g por 5 min a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Se adicionó 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M, pH=5.2 y 2 volúmenes de etanol 100 % a -20 °C. Se dejó reposar 30 min a -70 °C y se centrifugó a 15000 g por 5 min a 4 °C. Se resuspendió la pastilla en aproximadamente 50 µL. de H₂O libre de RNasa. Se cuantificó de nuevo el ARN y se precipitó el volumen que se iba a utilizar, lo restante se dejó precipitado hasta su uso. Se observó la integridad del ARN en un gel desnaturalizante de formaldehído.

Tratamiento de ADN total con RNasa :

Se trataron aproximadamente 100 µg de ADN resuspendido con 5 µL de RNasa (40 U/µL) durante al menos 30 min a 37 °C. Se precipitó de nuevo con 0.1 de volumen de Acetato de Sodio 3 M pH: 5.2 y 2 volúmenes de etanol. y se dejó a -20 °C por al menos 30 min.

Corte de ADN Genómico con Enzimas de Restricción :

Se colocaron aproximadamente 20 µg de ADN genómico tratado con RNasa resuspendidos en 8 µL. totales, con 1 µL. de la enzima a utilizar y con 1 µL. del amortiguador respectivo. Se incubó a 37 °C por al menos 4 horas.

Ensayo de ARNm-"Differential Display" :

Por cada ensayo de ARNm-"Differential Display" se utilizó un cebador de anclaje específico con la fórmula oligodT-VN, donde V=A, G ó C y N=A, G, C ó T,

Materiales y Métodos

dependiendo del ensayo. Se eligió al azar el decámetro aleatorio de la mezcla entre los disponibles en el kit OPM. Se realizó una modificación al protocolo original de los autores (Liang y Pardee, 1992) marcando radiativamente el extremo 5' del oligonucleótido, en lugar de incorporar la marca en la reacción de PCR.

Marcaje Radiactivo de oligodT₁₁-VN :

Se utilizó el Kit de Marcaje de Gibco BRL RTS T4 Kinase y se agregó a cada tubo con 10 U de T4 cinasa : 8 μ l. de oligodT₁₁-VN 10 μ M, 4 μ L de γ -[³²P]-ATP 0.1 μ Ci/ μ L (0.4 μ Ci) y 8 μ l. de H₂O, y procurando resuspender cuidadosamente la reacción del tubo, se incubó a 37 °C durante 45 min. Se calentó a 55 °C durante 5 min para desnaturalizar a la enzima. Se enfrió en hielo y se utilizó inmediatamente.

RT-PCR radiactivo :

Para la reacción de síntesis de la primera cadena de ADNc se mezclaron los siguientes reactivos por cada tubo :

Amortiguador SSII 5 X	4.0 μ L.
dNTP (250 μ M)	1.6 μ L.
oligodT ₁₁ -VN (10 μ M)	2.0 μ L.
Inhibidor de RNasa (10 U/ μ L)	0.4 μ L.
ARN Libre de ADN	1-2 μ g
H ₂ O Libre de RNasa	c.b.p. 19 μ L.

Se programó previamente el termociclador para un solo ciclo de la siguiente manera : se comenzó a 65 °C por 5min, se incubó a 37 °C por 60 min, se desnaturalizó a 95 °C por 5 min y terminó a 4 °C hasta retirar los tubos del bloque del termociclador. Se colocan los tubos en el bloque y se inicia el ciclo. Cuando se hubieron cumplido 10 min del ciclo a 37 °C se agregó 1 μ L de SuperScript II™, manteniendo la temperatura del tubo.

Se tomaron las reacciones de primera cadena de ADNc y la de marcaje radiactivo de oligodT₁₁-VN, para la reacción de PCR del "Differential Display" :

Amortiguador Mezcla AB	4.0 µL
dNTP (10mM)	0.4 µL
5' [³² P]-oligodT ₁₁ -VN	5.0 µL
Reacción de la 1a. Cadena	2.0 µL
Decámero Aleatorio (2µM)	2.0 µL
ELONGASE™ Enzyme Mix	1.5 µL
Agua Libre de RNasa	c.b.p. 20 µL

Se agregaron 2 gotas de aceite mineral a cada tubo. Se programó previamente el termociclador con los siguientes 3 ciclos de temperatura. El primero para desnaturalizar el ADN a 94 °C por 5 min. El segundo ciclo alinea los cebadores a 40 °C por 2 min, polimeriza el ADN a 72 °C por 30 s y por ultimo a 94 °C por 30 s para volver a desnaturalizar el ADN y se realizó 40 veces. El tercer ciclo solamente fue a 72 °C por 10 min y cambió a 4 °C hasta retirar los tubos del termociclador. Se colocan los tubos en el bloque y se inicia el programa.

Se extrajeron los productos de PCR con 100 µL de Cloroformo centrifugando a 4000 g por 30s a 4 °C. Se separaron los 20 µL de reacción como fase acuosa superior en un papel parafilm de la fase orgánica residual y se colocaron en un tubo de 500 µL.

Autoradiografía :

Por cada 7 µL de reacción de PCR se agregaron 4 µL de Amortiguador de Carga de Secuenciación. Se corrió esta mezcla en un gel de secuenciación hasta que el segundo colorante estuvo en el límite de la parte inferior del gel, que en un gel de secuenciación al 6% de acrilamida fue en 4 horas. Se secó el gel utilizado en un papel 3 M, con un desecador de geles por 2 horas a 80 °C. Se midieron las c.p.m. del

Materiales y Métodos

gel en su totalidad, y de esta emisión, dependió el tiempo de exposición del mismo, contra una película autorradiográfica a -70°C .

Aislamiento de los ADNc Diferenciales del Gel de Poliacrilamida :

Se cortaron del gel expuesto las bandas consideradas diferenciales y se colocaron en tubos de 0.5 mL estériles con 100 μL de H_2O libre de RNasa. Se dejaron 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se calentó el tubo en agua a 95°C por 15 min. Se centrifugó a 4000 g por 2 min a 4°C , para concentrar vapores y precipitar el gel y restos de papel. Se enfrió y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, añadiendo : 10 μL de acetato de sodio 3 M pH=5.2, 5 μL de glucógeno (10 mg/mL) y 200 μL de etanol 100 % a -20°C ; se agitó suavemente y se dejó reposando a -70°C durante 30 min. Se centrifugó a 15000 g por 15 min a 4°C . Se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 200 μL de etanol 75 % a -20°C . Se retiró el sobrenadante y se secó la pastilla por 5 min a 37°C . Se resuspendió la pastilla en 10 μL de H_2O libre de RNasa. Se procedió a reamplificar.

PCR no Radiactivo. Reamplificación de los ADNc Diferenciales. :

La reamplificación se realizó utilizando las mismas condiciones de PCR del RT-PCR radiactivo, a excepción de que la concentración de dNTP fue de 20 μM y no se adicionaron isótopos radiactivos.

H_2O libre de RNasa	20.4 μL .
Amortiguador 10 X PCR	4.0 μL
dNTP (250 μM)	3.2 μL
Decámero Aleatorio (2 μM)	4.0 μL
oligodT ₁₁ -VN (10 μM)	4.0 μL
Templado cDNA	4.0 μL
Taq ADN polimerasa	0.4 μL

Se programó el termociclador de la misma forma que el PCR radiactivo. Se tomaron 4µl. de esta reacción y se llevó a cabo una segunda ronda de reamplificación, a las mismas condiciones de temperatura del termociclador. Se observó su corrimiento en gel de agarosa al 1.0 % con TAE 1 X con escalera de pesos moleculares de ADN.

Ensayos de Hibridación en Northern blot :

Electroforesis de ARN :

Se hizo un gel desnaturalizante de agarosa con reactivos libres de RNasa. Se prepararon 56 ml. de gel fundiendo en 35 ml. de agua la suficiente agarosa para quedar al 1.5 % final, enfriándola a 60 °C y agregándole formaldehído 2 mM y FGRB 1 X, mezclando suavemente y vaciando en el molde del gel, de preferencia en una campana de extracción debido a los vapores tóxicos del formaldehído.

Se preparan las muestras mezclando las siguientes sustancias en un tubo de 500µL :

ARN (~30µg)	4.5 µL
FGRB 10 X	1.0 µL
Formaldehído 37%	3.5 µL
Formamida	10.0 µL

Se incubaron las muestras a 65 °C por 15 min y después se enfriaron en hielo. Se centrifugaron a 4000 g por 5s a temperatura ambiente, para depositar la muestra en el fondo del tubo. Se agregaron 2 µL de FGLB estéril libre de RNasa y 1 µL de solución EtBr (1 µg/ml. en acetato de amonio 0.1 M), mezclando suavemente. Se precorrió el gel a 5 V/cm durante 5 min en FGRB 1X. Se cargaron inmediatamente las muestras en sus respectivos pozos. Se corrió el gel a 3-4 V/cm hasta la distancia

Materiales y Métodos

deseada marcada por el Xilen-Cianol y el azul de bromofenol. Se observó en el transiluminador la integridad del ARN y se procedió a realizar el Northern blot.

Northern blot :

Se transfirió el gel por elución capilar a una membrana de nylon de la siguiente forma. Se colocaron en una mesa en el orden que se observa en la Figura 3 los materiales y reactivos indicados :

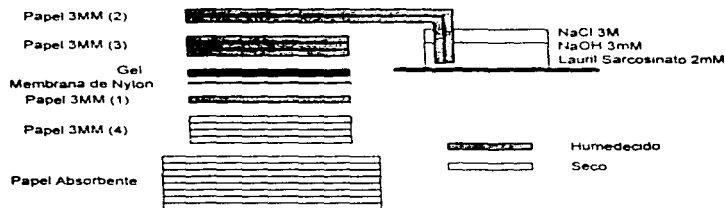


Figura 3 Diagrama de transferencia de ARN a membrana de nylon

Antes de colocar la membrana de nylon se humedeció en la solución de transferencia de un solo trazo para evitar burbujas en ella, y se colocó sobre el papel 3 MM humedecido con la misma solución. Se colocó el gel con los pozos hacia arriba para que la membrana tenga el mismo orden de carga que el gel. Se colocaron los papeles 3 MM humedecidos encima y se introdujeron en un recipiente con el amortiguador, cuidando que los papeles 3 MM fueran del mismo tamaño que el gel y la membrana para asegurar una transferencia eficiente, a excepción de los que están introducidos en el amortiguador. Se transfirió por 12-24 horas. Una vez terminada la

transferecia se cortó el gel junto con la membrana marcando el sitio de lectura de los pozos. Se verificó la elución completa del ARN a la membrana, incubando el gel en una solución con EtBr 1 mg/ml, para observar el posible ARN residual en el transiluminador de U.V..

Se entrecruzó el ARN a la membrana de nylon en un horno de entrecruzamiento de luz U.V. a 120,000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ durante 30 s.

Marcaje de Sonda Radiactiva por Cebador Aleatorio (Random Primer)

Se desnaturalizaron de 30-50 ng, cuantificados en gel, del fragmento reamplificado de ADNc obtenido por "Differential Display", incubándolo a 100 °C por 5 min. Se enfrió en hielo 5 min. Se agregaron 6 μL de Amortiguador de Reacción, 6 μL de dNTPs menos dCTP, ~30 μCi de [α - ^{32}P] dCTP, H_2O hasta los 30 μL y 1 μL del fragmento Klenow de la ADN pol I de *E. coli*. Se incubó por 2 h a 37 °C. Se adicionaron 8 μL de EDTA 250 mM pH 8.0 y 160 μL de STE. Se tomó 1 μL para medir la incorporación (cuenta 1), el cual se consideró como el 100 %. se pasó por una columna de Sephadex G-50 pH 7.0 a 1600 g por 4 min a temperatura ambiente. Se tomó 1 μL del filtrado para medir incorporación (cuenta 2).

La incorporación del isótopo radiactivo se midió en el contador de centelleo en el rango del tritio. La cantidad de c.p.m. se multiplicó por 2 y se dividió entre la cantidad de ADN colocada para marcaje. Se comparó este valor de la cuenta 1 con el valor de la cuenta 2, obteniendo el % de incorporación.

Columna de Sephadex G-50 :

Se empaquetó lentamente la columna en una jeringa de 1 mL de insulina con la resina Sephadex G-50 equilibrada en STE pH 8.0, centrifugándola a 1600g a temperatura ambiente, hasta completar las 100 unidades insulínicas. Se lavó con 100

Materiales y Métodos

μL de STE pH=8.0 4 veces. Se agregó la sonda purificada y se dió un último ciclo de centrifugación a la misma velocidad y temperatura.

Hibridación y Autoradiografía :

Se colocó la membrana fijada en la solución de hibridación en un agitador a 60-65 °C por 2-4 horas en el horno de hibridación. Se desnaturalizó por 5 min el segmento de ADNc marcado radiactivamente, y se enfrió en hielo; se utilizó suficiente sonda para tener 10^7 c.p.m. por hoja de membrana de nitrocelulosa (12x14cm). Una vez transcurrido el tiempo de prehibridación, se tiró la solución de hibridación presente y se agregó nueva solución atemperada, junto con la sonda desnaturalizada teniendo cuidado de no bajar la temperatura del horno por mucho tiempo. Se mantuvo en el horno de hibridación en rotación continua a 60-65 °C durante 12-20 horas. Se lavó la membrana en SSC 0.1 X y SDS 0.5 % (p/v) a 60-65 °C por 5 min, dos veces y por 10 min dos veces, cambiando la solución de lavado. Se realizó una autoradiografía de la membrana de nylon, procurando que esta no se secase envolviéndola en plástico.

Ensayos de Hibridación en Southern blot :

Electroforesis de ADN

Se utilizaron muestras de ADN cortado con enzimas de restricción o de productos totales de RT-PCR. Se realizó de manera análoga a la electroforesis de ARN, pero utilizando TAE IX como amortiguador, en el gel y el amortiguador de corrimiento. Se hizo el gel al 1-1.4% de agarosa, agregando 1 μL de solución de EtBr. Se prepararon las muestras con TAE-IB y se cargaron en el gel en los respectivos pozos. Se corrió el gel entre 60-90 Amp durante 30-60 min dependiendo del corrimiento deseado.

Southern blot

Una vez que se tuvo la electroforesis de ADN, se desnaturalizó el ADN con NaOH 0.5 N y NaCl 1.5 N durante 45 min y se neutralizó 2 veces con Tris-HCl pH=7.4 1 M y NaCl 1.5 N, por 20min en cada ocasión. Se colocó el sistema de transferencia como en la , pero utilizando SSC 10-20 X como amortiguador de transferencia, por un tiempo de 12-24 horas.

Hibridación y Autoradiografía

Se realizó bajo las mismas condiciones del Northern blot.

Clonación

Se utilizó el plasmido pCR™ 2.1 que venía en el Kit de clonación TA Cloning® Kit para clonar productos de PCR. Se utilizó una reacción de PCR con menos de 5 horas de realizada para no perder las As que coloca la *Taq* polimerasa en los extremos 3' del segmento amplificado, utilizadas para la ligación.

Se colocó la reacción de ligación como sigue : 1 µL de Amortiguador de Ligación, 1 µL de T4 DNA Ligasa, 2 µL de pCR™2.1 (25 ng/µL), ~10 ng de producto de PCR y agua estéril hasta completar 10 µL de la reacción. Se incubó a 14 °C ± 0.3 por toda la noche, se colocó a 4 °C, utilizándose lo más pronto posible.

La reacción de transformación se realizó de la siguiente manera : a 2 tubos conteniendo *cu* 50 µL de células competentes *InvitE* se les agregó, a cada uno, 2 µL de 0.5 M β-mercaptoetanol, mezclando suave y cuidadosamente con la punta de la pipeta. Se agregaron 2 µL y 4 µL de la reacción de ligación, en cada tubo respectivamente, agitando de la misma manera, y se incubaron por exactamente 30 min en hielo. Se realizó un choque térmico a 42 °C por exactamente 30 seg sin mezclar los tubos, y se regresaron a hielo por otros 2 min. Se agregaron 450 µL de medio SOC a temperatura ambiente y se agitaron los tubos por 1 hora

Materiales y Métodos

a 37 °C a 225 rpm en un agitador orbital. Se sembraron 200 μ L y 400 μ L de cada tubo en 2 cajas respectivamente que contenían medio LB con 50 μ g/mL de Ampicilina, 50 μ g/mL de X-Gal e IPTG. Se dejó crecer por 24 horas y se realizaron minipreparaciones de las colonias blancas encontradas.

Minipreparaciones

Se tomó una asada de la colonia y se creció por 12 horas en 2 mL de medio líquido LB con 50 μ g/mL de ampicilina. Se tomaron 1.5 mL y se centrifugaron a 4000 g por 10 min a 4 °C. Se resuspendió en 200 μ L de Solución I a 4 °C. Se adicionaron 400 μ L de solución II a temperatura ambiente, agitando manualmente. Por último, se agregaron 300 μ L de solución III a 4 °C, se agitó por 10 seg y se dejó en hielo 3.5 min. Se centrifugó a 12000 g por 5 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Se realizó una extracción con Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1), y se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes etanol 100 % a -20 °C. Se resuspendió en STE pH=8.0 según el volumen de la pastilla.

Se cortó colocando 0.1 volúmenes de amortiguador de la enzima de restricción y 0.1 volúmenes de la enzima de restricción, con 0.8 volúmenes de plásmido. Se observó en gel la presencia del inserto.

RESULTADOS**“Differential Display” :****Fundamento de la Técnica**

El aislamiento de genes expresados diferencialmente es de suma importancia para el estudio de cambios entre dos poblaciones de células contrastantes, utilizando técnicas como la hibridación substractiva para este fin. En 1992 Liang y Pardee desarrollaron una nueva metodología para aislar genes expresados diferencialmente, de los cuales no se conoce la secuencia. Tiene como fundamento el que al utilizar una subpoblación de ARNm en lugar de toda la población, se pueden detectar y aislar mejor diferencias de expresión entre tratamientos. Para la reducción de la población de ARNm que se va a analizar, se utilizan cebadores de oligo-dT con dos nucleótidos de anclaje degenerados (oligo-dT-VN, donde V puede ser A, G o C y N puede ser A, G, C o T), para la síntesis de la primera cadena de ADNc, los cuales en primera instancia pretenden dividir en 12 la población total de ARNm. Con el fin de hacer más representativos los genes poco expresados, se realiza una reacción de PCR, para lo cual se utiliza el oligo-dT-VN para la síntesis de la primera cadena y un decámero aleatorio que se pueda unir hacia el extremo 5' del ADNc resultante, incorporando en las reacciones un nucleótido radiactivo como marcador. Se corren las muestras en un gel de secuenciación y se expone contra una película fotográfica, en la cual se pueden observar bandas diferenciales las cuales pueden ser aisladas y reamplificadas cortándolas del gel. Esta metodología se esquematiza en la Figura 4.

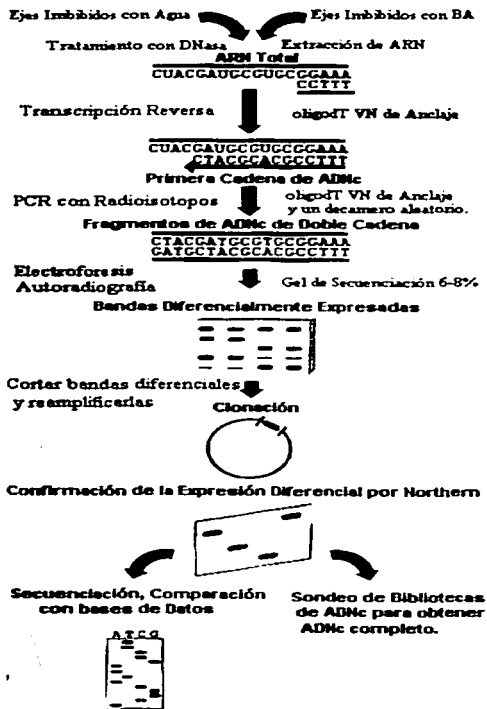


Figura 4. Identificación de genes diferenciales por "Differential Display".

De acuerdo al diagrama se pueden esperar cuatro expresiones diferenciales posibles : la aparición del mensaje o su aumento y la desaparición del mensaje o su disminución, lo cual se puede observar porque el PCR reamplifica proporcionalmente los segmentos de ARN.

Como se mencionó previamente, en un inicio se planteaba la posibilidad de la existencia de 12 combinaciones posibles de oligo-dT-VN (Liang y Pardee, 1992), pero los mismos autores observaron poco después una degeneración en el primer nucleótido (V) para el reconocimiento de el oligo-dT-VN por la Transcriptasa Reversa y la *Taq* Polimerasa; es decir, que estas enzimas tenían poca especificidad hacia ese nucleótido por lo que seleccionaban de una manera parecida la población de ARN, reduciendo las posibles combinaciones a 4 (oligo-dT-VA, oligo-dT-VC, oligo-dT-VG y oligo-dT-VT) donde V puede ser A, C o G (Liang, Averboukh y Pardee, 1993). Un año después, los mismos autores propusieron el uso de un solo nucleótido de anclaje en el oligo-dT para la selección de las poblaciones de ARNm, concluyendo en su trabajo que el uso de este oligonucleótido reduce la redundancia de mensajes (Liang *et al.* 1994); sin embargo, el uso de dos nucleótidos de anclaje sigue siendo válido como ellos mismos lo reconocen (Liang y Pardee, 1995).

Como se puede apreciar, la selectividad de los mensajes amplificados finalmente la dará el oligo-dT utilizado; pero debido a que tiene baja temperatura de fusión (T_m), se obliga a hacer un alineamiento del cebador oligo-dT a temperaturas bajas, de aproximadamente 40 °C, a la cual pueden reamplificarse inespecíficamente segmentos de ADN que no fueron eliminados totalmente del ARN produciendo falsos positivos o falsos negativos. Por lo anterior, se deben tratar las muestras de ARN total con DNasa, para eliminar el ADN residual. Aún así, se deben tener controles negativos de la reacción de transcripción reversa; es decir, poner la

Resultados

reacción de PCR a partir de ARN sin haber hecho la primera cadena de ADNc. De esta forma, si existe ADN residual que se pueda reamplificar, se observará en estos carriles de la autoradiografía, evitando falsos positivos al buscar la expresión diferencial.

Por la misma naturaleza de la reacción del PCR, se recomienda hacer las reacciones de polimerización *in vitro* por duplicado, ya que se asegura de alguna manera la repetibilidad de las diferencias encontradas, debido a que es una reacción controlada por concentración de sales, concentración de enzima, concentración de templado, tiempo de alineamiento, tiempo de polimerización y temperatura.

Ensayos

Se realizaron aproximadamente 10 ensayos de "Differential Display" con diferentes cebadores de anclaje y aleatorios. Solamente 5 de estos ensayos mostraron diferencias que fueron consideradas significativas en el bandeo producido. Las combinaciones de cebadores de los ensayos anteriores, se realizaron como se muestra en la Tabla 1 incluyendo sus T_m :

Tabla 1. Combinaciones de Cebadores Utilizados para los ensayos de "Differential Display"

Cebador de Anclaje	Cebador Aleatorio
5'-GGGTTTTCG-3'	5'-ACAGGTCG-3'
5'-GGGTTTTCG-3'	5'-GGGTTTTCG-3'
5'-GGGTTTTCG-3'	5'-GGGTTTTCG-3'
5'-GGGTTTTCG-3'	5'-TCTGTCACG-3'
5'-GGGTTTTCG-3'	5'-GTTCAGTC-3'

Nota : oligo-dT-VG, corresponde a oligodT-AG, oligodT-GG y oligodT-CG.

Resultados

Aunque se observa que las T_m de varios de los cebadores utilizados son menores a la de alineamiento utilizada, si se determinó incorporación de marca radiactiva, lo que indica que el alineamiento se produjo con la ayuda del decámero aleatorio que posee una T_m , en general, mayor a la utilizada.

Los ensayos de "Differential Display" realizados que mostraron diferencias de expresión, se exponen a continuación, de la Figura 5 a la Figura 9, con los oligonucleótidos utilizados y las bandas cortadas en los pies de figura.

En la Figura 5 se observa el ensayo realizado con la combinación VG-M2, de la cual se cortaron 4 bandas, 2 como producto de estimulación (α y δ) y 2 producto de represión (β y γ) por BA. La observación de la expresión resulta poco clara ya que existe una aglomeración de diferentes bandas, que produce un encubrimiento de las bandas diferenciales, tanto en la fotografía de la película expuesta como en la digitalización. Para asegurar que se observaron bien las diferencias se realizó más de un gel de secuenciación a diferentes concentraciones de acrilamida y/o de fuerza iónica del amortiguador de corrida, para corroborar las bandas cortadas y solamente se presenta el que se obtuvo con mayor claridad. En este gel, en los carriles 1 y 6 que se colocan como control negativo del ensayo, se pueden apreciar varias reamplificaciones inespecíficas de ADN residual (X), que no fue eliminado totalmente por la DNasa; para el análisis diferencial no deben considerarse las bandas de los carriles 2, 3, 4 y 5 que están a la altura de éstas. Afortunadamente no existieron bandas diferenciales a la altura de donde se encontraron las bandas reamplificadas a partir de ADN residual.

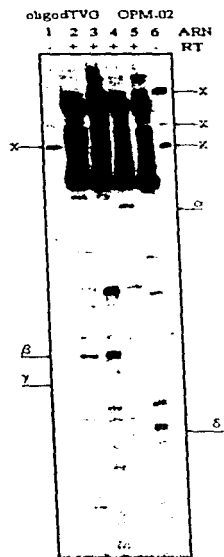


Figura 5. Ensayo de "Differential Display" utilizando cebadores oligo-dTVG y OPM-02. Carril 1 y 6 : controles negativos de RT-PCR de ARN 5C y 5BA respectivamente. Carril 2 y 3 : RT-PCR de ARN 5C y Carriles 4 y 5 : RT-PCR de ARN 5BA. Las flechas indican las bandas que se consideraron diferenciales y la letra asignada. Las flechas a la izquierda indican disminución de la expresión por BA y las flechas a la derecha indican estimulación de la expresión por BA.

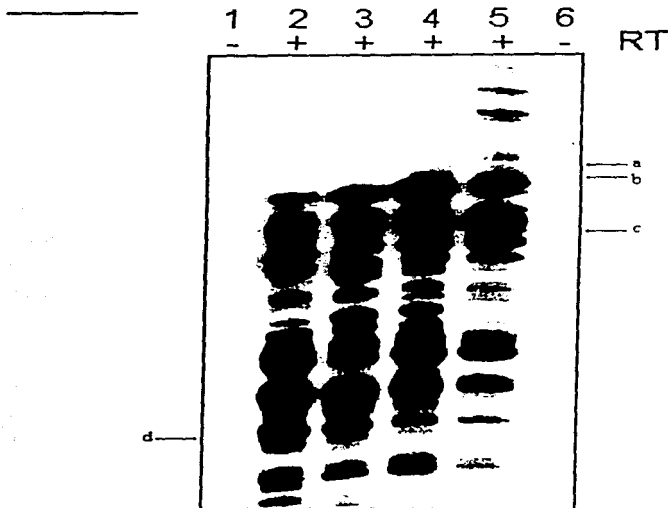


Figura 6. Ensayo de "Differential Display" utilizando cebadores oligo-dT-VG y OPM-03. Carril 1 y 6 : Controles negativos de RT-PCR de ARN 5C y 5BA respectivamente. Carriles 2 y 3 : RT-PCR de ARN 5C y Carriles 4 y 5 : RT-PCR de ARN 5BA. Las flechas indican las bandas que se consideraron diferenciales y la letra asignada. Las flechas a la izquierda indican disminución de la expresión por BA y las flechas a la derecha indican estimulación de la expresión por BA.

Resultados

En la Figura 6 se observa una amplificación del ensayo realizado con la combinación VG-M3, del cual se cortaron 4 bandas : 3 producto de estimulación (a, b y c) y 1 como producto de represión (d) por BA. En este ensayo pareciera que dos de las bandas que se estimulan con BA (a y b) aparecen *de novo*, sin embargo no se puede asegurar esto. La banda (c) se incrementa, porque ya estaba presente, y la (d) disminuye, porque no desaparece, con la adición de BA.

En la Figura 7 se observa la amplificación del ensayo realizado con la combinación VG-M4, de la cual se seleccionaron 4 bandas : 2 estimuladas por BA (e y h) y 2 reprimidas (f y g). En este caso se observan claramente los segmentos de ADNc, donde se aprecia la estimulación y la represión, por lo cual se cortaron las bandas correspondientes. En este caso también se repitieron geles para obtener mejor definición de bandas diferenciales.

El ensayo realizado con la combinación CC-M10 se observa en Figura 8, del cual se cortaron un total de 6 bandas diferenciales : 5 estimuladas (α_1 , β_1 , γ_1 , δ_1 y ξ_1) y 1 reprimida (ϵ_1) por BA. En este ensayo también se realizaron repeticiones de los geles de secuenciación a diferentes tiempos de corrimiento y concentración de acrilamida, como se observa en la figura, por lo que en uno de ellos no se aprecia la banda ξ_1 . La variación en la separación de bandas entre los geles y por lo tanto la nitidez de ambos es debido al peine utilizado en el corrimiento, en el primer gel que se observa se utilizó un peine de "dientes de tiburón" en donde no se forman los pozos de cargado y por lo tanto las bandas quedan juntas una a la otra; en el segundo se utilizó un peine formador de pozos, en donde existe acrilamida entre éstos y permite una mayor definición entre bandas de diferentes carriles.

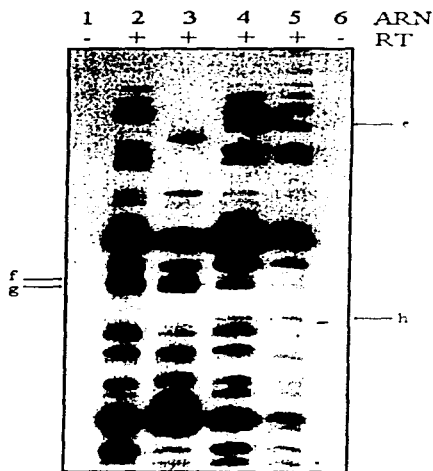


Figura 7. Ensayo de "Differential Display" utilizando cebadores oligo-dT-VG y OPM-04. Carril 1 y 6: Controles negativos de RT-PCR de ARN 5C y 5BA respectivamente.

Carriles 2 y 3: RT-PCR de ARN 5C y Carriles 4 y 5: RT-PCR de ARN 5BA. Las flechas indican las bandas que se consideraron diferenciales y la letra asignada. Las flechas a la izquierda indican disminución de la expresión por BA y las flechas a la derecha indican estimulación de la expresión por BA.

Resultados

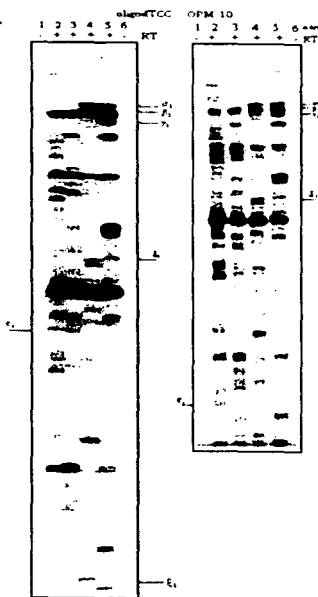


Figura 8. Ensayos de "Differential Display" utilizando cebadores oligo-dT-CC y OPM-10. Carriles 1 y 6 : Controles negativos de RT-PCR de ARN 5C y 5BA respectivamente, Carriles 2 y 3 : RT-PCR de ARN 5C y Carriles 4 y 5 : RT-PCR de ARN 5BA. Las flechas indican las bandas que se consideraron diferenciales y la letra asignada. Las flechas a la izquierda indican disminución de la expresión por BA y las flechas a la derecha indican estimulación de la expresión por BA.



Figura 9. Ensayo de "Differential Display" utilizando cebadores oligo-dT-CC y OPM-11. Carril 1 y 6 : Controles negativos de RT-PCR de ARN 5C y 5BA respectivamente. Carriles 2 y 3 : RT-PCR de ARN 5C y Carriles 4 y 5 : RT-PCR de ARN 5BA. Las flechas indican las bandas que se consideraron diferenciales y la letra asignada. Las flechas a la izquierda indican disminución de la expresión por BA y las flechas a la derecha indican estimulación de la expresión por BA

Resultados

Por último en la Figura 9 se observa el ensayo obtenido de la combinación de oligonucleótidos CC-M11, de la cual se aisló solamente 1 banda estimulada por BA (α_2). Más abajo de la banda se observa una diferencia de expresión (X_1), que pareciera ser estimulada por BA; sin embargo, esta banda no se cortó y reamplificó por el tamaño que presenta y además porque no era clara su estimulación al compararla con otros geles de acrilamida que se corrieron con esta misma combinación.

De estos ensayos se cortaron las bandas marcadas, que poseen expresión diferencial, y se reamplificaron. Se cortaron un total de 19 bandas con la distribución observada en la Tabla 2, que indica el número de bandas diferenciales cortadas por combinación de cebadores.

Tabla 2. Número de ADNc reamplificados por combinación de cebadores

Combinación	ADNc reamplificados
VG-M2	4
VG-M3	3
VG-M4	4
CC-M10	6
CC-M11	1

Los ADNc reamplificados de la manera descrita fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.0 % y se comparan contra una escalera de tamaños de 100 pb (pares de bases) de ADN, para así conocer su tamaño en pares de bases. En la Figura 10 se observan los productos de las reamplificaciones con las combinaciones VG-M3 y VG-M4 y en la Figura 11 las reamplificaciones de las combinaciones VG-M2, CC-M10 y CC-M11.

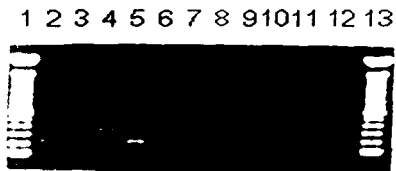


Figura 10. Gel de Agarosa al 1 % teñido con EtBr. Carril 1 y 13 : Escalera de 100 pb de ADN. Carriles 2 al 12 : reamplificaciones de bandas α , β , γ , δ , α , β , γ , δ , ϵ , ζ y η respectivamente

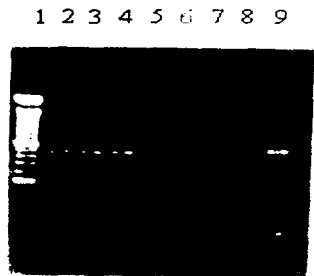


Figura 11. Gel de Agarosa al 1 % teñido con EtBr. Carril 1 : Escalera de 100 pb de ADN. Carriles 2 al 9 : reamplificaciones de bandas a, b, c, d, e, f, g y h respectivamente.

Resultados

En la Tabla 3 se muestran los tamaños aproximados de las bandas cortadas de todas las combinaciones de acuerdo a la comparación con la escalera de 100 pb de ADN. Puede observarse en cada caso que las bandas corresponden en su mayoría a segmentos de ADN únicos, aunque en otros existen múltiples bandas o barridos. 13 corresponden a genes estimulados y 6 corresponden a genes reprimidos.

Tabla 3. Bandas Reamplificadas con las bandas que producen y sus pesos moleculares

Banda Cortada	Reamplificaciones Obtenidas	Tamaño en Pares de Bases	Modificación Diferencial por BA.
a	1	490 pb	Estimulada
b	1	490 pb	Estimulada
c	1	490 pb	Estimulada
d	4	1000, 550, 450 y 300 pb	Reprimida
e	1	400pb	Estimulada
f	2	700 y 650pb	Reprimida
g	-----	Barrido de 500-200pb	Reprimida
h	4	850, 700, 600 y 550 pb	Estimulada
α	2	360 y 250 pb	Estimulada
β	1	200 pb	Reprimida
γ	1	390 pb	Reprimida
δ	1	250 pb	Estimulada
α_1	1	400 pb	Estimulada
β_1	1	410 pb	Estimulada
γ_1	1	390 pb	Estimulada
δ_1	-----	Barrido de 100-200 pb	Estimulada
ϵ_1	1	260 pb	Reprimida
ξ_1	1	190 pb	Estimulada
α_2	2	400 y 150 pb	Estimulada

Northern blot

Se realizaron varios intentos de corroboración de la expresión de los diferentes mensajes por Northern blot utilizando cada uno de los ADNc obtenidos como sonda, pero con resultados fallidos; por lo anterior no se pudo utilizar este ensayo como corroboración de la presencia de mensajes con la expresión modificada por BA. Como una alternativa de corroboración de los segmentos diferenciales se realizaron ensayos de hibridación en ADN genómico. Se utilizó ADN genómico cortado con enzimas de restricción para observar si algunas de estas reamplificaciones corresponden a regiones del genoma de las células del eje embrionario.

Southern blot :

De los ensayos de southern blot realizados con las sondas α , α_1 , β , β_1 , γ y ϵ_1 , elegidas haciendo una evaluación de sus características como su tamaño en pares de bases, la cantidad de bandas producidas y expresión diferencial, sólo se obtuvo una hibridación específica de la banda (a), como se muestra en Figura 12. Las demás reamplificaciones no se probaron.

Como se aprecia en la autorradiografía, cuando el ADN genómico se corta con Bam HI se obtiene una sola banda de alto peso molecular, de aproximadamente 7000 pb; con Eco RI o con Hind III, se obtiene una banda de peso molecular menor, de aproximadamente 900pb. Lo anterior nos indica que el ADN de la banda (a) corresponde a una región genómica transcribible.

Resultados

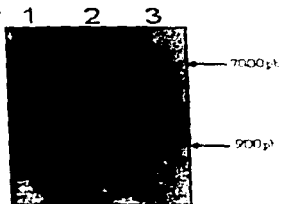


Figura 12. Southern de ADN genómico cortado con diferentes enzimas, utilizando como sonda la banda reamplificada a Carril 1 - Alu III, Carril 2 - Eco RI y Carril 3 - Eco RI.

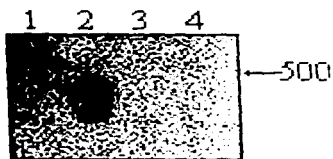


Figura 13. Southern del ADN c, en RT-PCR de la c. Carril 1 y 4: PCR de ARN 5C y 5BA respectivamente. Carril 2 y 3: PCR de ARN 5C y 5BA respectivamente.

Como una opción a la corroboración de los ADNc diferenciales por hibridación en Northern blot, se utilizó una variación de la técnica de RT-PCR que nos ayudó a corroborar la presencia de estos mensajes en células de maíz. Mediante esta técnica se corroboró que la banda ϵ_1 podía hibridar contra un ADNc proveniente de un ensayo tipo "Differential Display", por medio de southern blot. Para esto se utilizó la misma combinación de cebadores (CC-M10) y el ensayo de RT-PCR se hizo en ausencia de marca radiactiva. La totalidad del ADNc obtenido se hibridó contra ADNc de la banda ϵ_1 marcado radiactivamente. En la Figura 13 se observa que existe la hibridación solo contra ADNc proveniente de ejes embrionarios control incubados por 5 horas (Carril 2), más no contra ADNc de ejes embrionarios imbibidos con BA, como era de esperarse. La banda corresponde al tamaño esperado, aunque también aparece una banda de poca intensidad de menor tamaño.

Clonación

Se clonó la banda ϵ_1 ya que fue aquella en la que se confirmó por ensayos de hibridación en RT-PCR su comportamiento diferencial. Para la clonación se utilizó el plásmido pCRT[™] 2.1, y su confirmación se puede observar en Figura 14, donde se corta con Eco RI para liberar al inserto, y comparando los segmentos resultantes en tamaño con la reamplificación de ϵ_1 utilizada para la ligación, se observa que el ADN clonado es prácticamente del mismo tamaño. Esto se realizó con el fin de poder asegurar que existe una sola banda de reamplificación y además, en experimentos a futuro, secuenciar con mayor facilidad la banda reamplificada, y de esta forma poder conocer la naturaleza del gene aislado.

Resultados

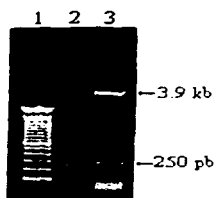


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Carril 1: Escalera de 100 pb. Carril 2: Reamplificación de ν_1 . Carril 3: Plásmido aislado de colonias de *E. coli InvαF'* transformadas cortado con *Eco RI*.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

"Differential Display"

Los ensayos realizados inicialmente fueron difíciles de estandarizar, ya que se tuvieron problemas con la pureza del ARN, debido a que al parecer existían residuos de la extracción del ARN que inhibían a la polimerasa (*Taq*), como podrían ser productos de oxidación del fenol. Por lo anterior se cambió a la ELONGASE™ que es una combinación de 2 polimerasas, la polimerasa clásica *Taq* y otra polimerasa de *Pyrococcus sp.*, las que juntas dan mayor procesividad (tiempo que dura la polimerasa unida al molde de ADN) y permiten obtener segmentos mayores en las reacciones de PCR; de esta manera parece se que reduce la inhibición por los residuos de la extracción en el ARN.

Como se puede apreciar en la generalidad de los ensayos, se tienen varios controles: contra contaminaciones de ADN, contra expresiones no repetitivas, contra los problemas inherentes de la reacción en cadena de la polimerasa por sus propias variables. Además, para completar los ensayos de "Differential Display" se tienen que confirmar las bandas diferenciales con ensayos como el Northern blot, y en ocasiones con ensayos de protección a nucleasa (RPA) que son más sensibles que el Northern blot, para poder corroborar la expresión genética. Lo anterior parece un proceso difícil por la naturaleza de cada uno de los ensayos, pero esta metodología fue planteada por sus creadores como un método más fácil de detección de genes expresados diferencialmente, que la hibridación subtractiva, ya que la búsqueda es más eficiente y puede amplificar diferencias mínimas de expresión; a su vez, esta

Análisis de Resultados

última característica es también una de las causas por las que los ensayos normales de Northern blot no siempre dan resultados positivos para los ADNc aislados. El ensayo de "Differential Display" reduce tiempos de experimentación comparándolo con la hibridación sustractiva (Zúñiga-Agular *et al.*, 1995) y hace más fácil el aislamiento de ADNc diferencial, motivos por los cuales se pretendió estandarizar esta técnica y utilizarla en la búsqueda de diferencias de expresión. Esto obliga a manejar el ensayo de "Differential Display" con mucho cuidado, hasta determinar con exactitud diferencias de expresión y tratar de extrapolarlas a genes completos relacionándolos con su función, y concluir con la confirmación de la expresión diferencial que detecta.

Reamplificaciones

El muestreo inicial de las reamplificaciones de los ADNc parece indicar que existen 13 ADNc que son estimulados y 6 que son reprimidos por BA. Como se puede observar, algunas de las reamplificaciones de los ADN complementarios, pueden producir mas de una banda de diferente tamaño, lo cual podría parecer inconsistente con la técnica, pero no lo es, ya que no se sabe si son varias o sólo una posible forma de alineamiento de los cebadores; es decir, que en el mismo ADNc se puedan alinear varias veces los cebadores, con la posibilidad de reamplificar varios tamaños de el mismo ADNc. En estudios de refinamiento del "Differential Display", Liang y Pardee, recomiendan que solamente se reamplifiquen fragmentos de ADNc de tamaño mayor a 500 pb, ya que si son menores se hace más difícil su comprobación por Northern blot (Liang y Pardee, 1995), lo que puede explicar los experimentos fallidos en este ensayo, al ser pocas las bandas reamplificadas obtenidas con tamaños mayores a los 500 pb. Pero como no se sabe si es una, algunas o todas las bandas que aparecen en las reamplificaciones las que son

diferenciales, se deben utilizar todas, por lo que se recomienda clonar las bandas antes de corroborarlas por otras metodologías. Aunado a esto, es de esperarse que la técnica de "Differential Display" reamplifique mensajes muy poco expresados, es decir que se encuentran en cantidades muy pequeñas en el ARN total del eje embrionario, y que al tratar de ser confirmados por Northern blot pudieran producir una hibridación suficiente para imprimirse en la placa autorradiográfica. Como una solución alterna al problema de confirmación de mensajes se realizaron hibridaciones contra RT-PCR no radiactivo, lo que se explica más adelante, las cuales han dado resultados positivos. Una técnica innovadora para la confirmación de ADNe considerados diferenciales es el ensayo de protección a ribonucleasa (RPA) por medio del cual se pueden detectar cantidades de ARN menores a 7 ng (Pharmingen, 1996), el cual no hemos realizado aún, pero que se pretende estandarizar en estudios de seguimiento a los ADNe diferenciales aislados, que no han sido confirmados.

Southern blot

El resultado de la hibridación del ADNe (a) contra ADN genómico cortado con enzimas de restricción indica, en primer lugar, que en el genoma sí existe la secuencia complementaria, ya que la hibridación se realizó a temperatura alta (60 °C) y con lavados muy astringentes a la misma temperatura y de baja fuerza iónica; y en segundo lugar que existe una sola copia del gene que está codificando para (a), ya que es muy difícil que se encuentre más de un sitio de restricción en el gene utilizando varias enzimas de restricción.

Este ensayo en realidad no confirma la presencia diferencial como ARNm del ADNe aislado, pero sí permite saber que la contraparte del mensaje existe en el

genoma y que no es un artificio. Los ensayos de RPA nos permitirán determinar la posible expresión diferencial del mensaje a lo largo de la germinación.

Hibridación por RT-PCR no radiactivo

La hibridación obtenida en el RT-PCR frío de r_1 , confirma al menos parcialmente la existencia en el ARN total de maíz de este segmento, y que se desaparece con la adición exógena de BA. El doblete que se produce con la hibridación, puede deberse a varias posibilidades de alineamiento del cebador, como se observa al obtenerse una sola banda en la reamplificación y corroborarse en la clonación. Otra posibilidad que quedó descartada, es la de que se cortara la banda del gel de acrilamida de una manera errónea y no fuera diferencial; por lo tanto, la hibridación en Southern blot del RT-PCR debería dar una hibridación parecida en ambos tratamientos (control y con BA). Esto no fue así, ya que lo que se observa en el ensayo de hibridación corresponde al comportamiento diferencial del ADNc (Figura 13). La clonación deja ver la banda del mismo tamaño al reamplificado, con un ligero aumento de tamaño (10-20 pb) por los sitios de corte de Eco RI dentro del plásmido, lo cual indica que se obtiene un solo segmento de ADNc. Sería conveniente demostrar la expresión diferencial del segmento de ADNc clonado a lo largo de la germinación, en presencia o ausencia de fitoreguladores.

Esta técnica de confirmación ha dado buenos resultados en general en el laboratorio, ya que si el ARNm que se amplifica por "Differential Display" es poco abundante, la hibridación por RT-PCR no radiactivo nos permite identificar ese ADNc. Por cuestiones de tiempo no se pudieron confirmar más ADNc diferenciales por esta técnica, pero aunado a los estudios de RPA, que se piensan implementar, se realizarán posteriormente estos ensayos de cada segmento diferencial restante considerado significativo.

CONCLUSIONES

- Con las combinaciones de cebadores utilizadas, el ensayo de RT-DD muestra al menos 19 precursores putativos (ARNm) de ADNc, de los cuales 13 podrían ser estimulados y 6 reprimidos por la acción de BA.

- La secuencia del ADNc (a), existe en el genoma de maíz y se observa como una sola copia del gene, con las enzimas utilizadas.

- Los experimentos de RT-PCR muestran que el ADNc ϵ_1 reconoce al menos 2 ADNc que son amplificados mediante estos ensayos, cuyo mensaje podría desaparecer a las 5 horas de germinación con BA. Esto indicaría que este gene es regulado negativamente por la benciladenina.

- Fue difícil la comprobación de la existencia de mensajes diferenciales obtenidos por "Differential Display" por Northern blot, debido probablemente a la baja representación de tales mensajes en el total del ARN.

Conclusions

The results of the present study indicate that the use of a high-resolution, high-contrast, and high-contrast ratio (HRC) display can significantly reduce the time required to detect a target in a complex scene. This is particularly true when the target is small and the background is complex. The HRC display also reduces the number of false detections and the number of missed detections. These results are consistent with previous research on the benefits of high-contrast displays for visual search tasks (e.g., [1]). The HRC display also improves the overall accuracy of the search task. This is particularly true when the target is small and the background is complex. The HRC display also improves the overall accuracy of the search task. This is particularly true when the target is small and the background is complex. The HRC display also improves the overall accuracy of the search task. This is particularly true when the target is small and the background is complex.

APÉNDICE

Soluciones :

10X EGRB (Amortiguador de Corrida en Gel de Formaldehído) : MOPS 0.1M, Acetato de Sodio 40mM y 5mM EDTA pH= 8. Disolver 20.6g de MOPS (Ácido 3-(N-Morfolin) propanosulfónico) en 800mL de acetato de sodio 50mM libre de RNasa, ajustar el pH a 7.0 con NaOH 2N. Agregar 10mL de EDTA 0.5mM pH=8.0 libre de RNasa. Aforar a 500 mL con agua bidestilada libre de RNasa. Esterilizar la solución por filtración con a través de un filtro Millipore de 0.2µm de poro y guardar a temperatura ambiente protegido de la luz.

5X Amortiguador A : 300 mM Tris-SO₄ pH=9.1, 90 mM (NH₄)₂SO₄ y 5 mM Mg₂SO₄.

5X Amortiguador B : 300 mM Tris-SO₄ pH=9.1, 90 mM (NH₄)₂SO₄ y 10 mM Mg₂SO₄

Amortiguador de Carga de Secuenciación : Formamida 95% , Xilen-Cianol 0.25 % y Azul de Bromofenol 0.25 %.

Amortiguador de Extracción : 100mM Tris-HCl pH=8.0, 50mM EDTA, 500mM NaCl, 10mM β-Mercaptoetanol, 1.3% SDS.

Amortiguador Mezcla AB : 4 µL de 5X Amortiguador A y 6 µL de 5X Amortiguador B. Con una concentración final de Mg²⁺ de 0.333 mM.

EGLB (Amortiguador de Carga en Gel de Formaldehído) : 50% de Glicerol, EDTA 1mM pH=8.0, Azul de Bromofenol 0.25% y Xilen Cianol al 0.25%.

Apéndice

H₂O Libre de RNasa: Se agrega 1 mL de DEPC a 1 L de Agua Bidestilada y desionizada, se agita por toda la noche y se esteriliza 15 min a 20 lb² en Autoclave.

Medio LB: 1.0 % de Triptona, 0.5 % de extracto de levadura y 1.0 % de NaCl a pH=8.0. Para medio sólido agregar 15 g/L de agar-agar.

Medio SOC: 2 % de Triptona, .05 % de extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM de glucosa.

Solución I: Glucosa 50mm, 25 mm Tris-HCl y 10 mm EDTA pH=8.0.

Solución II: 0.2 n NaOH y 1 % de SDS.

Solución III: 60 % 5 m KAcO, 11.5 % de Acido Acético Glacial y 28.5 % de Agua.

Solución BA 10⁻³ M: Se disuelven 5.6 mg de N⁶-benciladenina (P.M. 225.3 g/mol) con 1 mL de NaOH 0.1 N, y se aforan a 25 mL con Agua bidestilada y desionizada.

Solución Control: Se prepara de la misma forma que la BA 10⁻³ M pero sin agregar BA.

Solución de Imbibición: 50 mM Tris-HCl pH=7.6, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2% sacarosa, 10 µM cloramfenicol y BA 10⁻⁵ M o su equivalente de solución control según el tratamiento.

Solución de Prehibridación: 150 mM NaH₂PO₄, 150 mM Na₂HPO₄, 7 % SDS, 1 mM EDTA pH=8.0.

STE ó TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA y 100 mM NaCl pH = 8.0.

TAE 50X: 2 M Tris-Acetato y 0.05 M EDTA pH=8.0.

TAE-LB 6X : TAE 6X, Glicerol 30 %, Xilen-Cianol 0.25 % y Azul de Bromofenol 0.25 %.

TBE 5X : 0.45 M Tris-Borato y 0.005 M EDTA pH=8.0.

BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Bewley, J.D., Black, M., "SEEDS. Physiology of Development and Germination", 2nd ed., Plenum Pub. Corp., New York, U.S.A., 1994.
- ❖ Bidwell, R.G.S., "Fisiología Vegetal", A.G.T. Editor, 1ª ed. en esp., México, 1979.
- ❖ Cloude, S.D., Langford, M., McMorris, T.C., (1996), A Brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development", *Plant Physiol.* **111**:671-678.
- ❖ Ching, T.M., "Metabolism of Germinating Seeds", in: Vol. 2, "Germination Control, Metabolism and Pathology", "Seed Biology: Physiological Ecology Series", Academic Press, Inc., U.S.A., 1972.
- ❖ Chomezynski, P., Sacchi, N., (1987), "Single-step method of Rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction", *Anal. Biochem.*, **162**:156-459.
- ❖ Houssa, C., Jacquard, A., Bernier, G., (1990), "Activation of replicon origins as a possible target of cytokinins in shoot meristems of *Sinapis*", *Planta*, **181**:324-326.
- ❖ Jugenheimer, R.W., "Corn. Improvement, Seed Production and Uses", Jhon Wiley & Sons., 1976, U.S.A.:
- ❖ Kozłowski, T.T., Gunn, C.R., "Importance and Characteristics of Seeds", in: Vol. 1, "Importance and Characteristics of Seeds", "Seed Biology: Physiological Ecology Series", Academic Press, Inc., U.S.A., 1972.
- ❖ Leshem, Y., "The Molecular and Hormonal Basis of Plant Growth Regulation", Pergamon Press, Israel, 1973.
- ❖ Liang, P., Weimin, Z., Xiaoying, Z., et al, (1994), " "Differential Display" using one-base anchored oligo-dT primers", *Nucleic Acid Res.*, **22**:5763-5764.
- ❖ Liang, P., Averboukh, L., Pardee, A., (1993), "Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of "Differential Display": refinements and optimization", *Nucleic Acid Res.*, **21**:3269-3275.
- ❖ Liang, P., Pardee, A., (1992), ""Differential Display" of Eukaryotic Messenger RNA by Means of the Polymerase Chain Reaction", *Science*, **257**:967-970.
- ❖ Mayer, A.M., Poljakoff-Mayer, A., "The Germination of Seeds", 4th ed., Pergamon Press, Great Britain, 1984.

Bibliografía

- ❖ Mohr, H., Schopfer, P., "Plant Physiology", Springer, Germany, 1995.
- ❖ Moore, T.C., "Biochemistry and Physiology of Plant Hormones", 2nd ed., Springer-Verlag, U.S.A., 1989.
- ❖ Murray, D.R., "Seed Physiology", Vol 1. "Development", Ed. Murray, D.R., Australia, 1984.
- ❖ Osborne, D.J., Sharon, R., Ben-Ishai, R., (1980), "Studies on DNA and DNA repair in germinating embryos of rye (*Secale cereale*)", *Isr. J. Bot.*, **29**:259-279.
- ❖ Osborne, D.J., (1983), "Biochemical Control systems operating in early hours of germination", *Can. J. Bot.* **61**:3568-3577.
- ❖ "Pharmingen Catalog 1996-1997", "RiboQuant™ Multi-probe Ribonuclease protection assay (RPA) System", Pharmingen, pp 511-513.
- ❖ Reyes, J., Jiménez-García, I.F., González, M.A., Vázquez-Ramos, J.M., (1991), "Benzyladenine-stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize", *Seed Sci. Res.*, **1**:113-117.
- ❖ Ridge, I., Editor, "Plant Physiology", Ed. Hodder & Stoughton, Great Britain, 1991.
- ❖ Rojas, M., Ramírez, H., "Control Hormonal del Desarrollo de las Plantas", 2^a ed., Ed. Limusa, México, 1993.
- ❖ Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", Vols. 1,2 y 3; 2nd ed., CSH Laboratory Press, U.S.A., 1989.
- ❖ Sánchez de Jiménez, E., Aguilar, R., (1984), "Protein Synthesis Patherns", *Plant Physiol.*, **75**:231-234.
- ❖ Sen, S., Payne, P.I., Osborne, D.J., (1975), "Early ribonucleic acid synthesis during the germination of rye (*Secale cereale*) embryos and the relationship to early protein synthesis", *Biochem. J.*, **148**:381-387.
- ❖ Steeves, T.A., (1983), "The evolution and biological significance of seeds", *Can. J. Bot.* **61**:3550-3560.
- ❖ Teramoto, H., Momotani, E., Takeba, G., Tsuji, H., (1994), "Isolation of a cDNA clone for a cytokinin-repressed gene in excised cucumber cotyledons", *Planta*, **193**:573-579.
- ❖ Teramoto, H., Momotani, E., Takeba, G., Tsuji, H., (1996), "Isolation and characterization of cDNAs for cytokinin-repressed genes", *Plant. Gr. Reg.*, **18**:59-70.

- ❏ Vázquez-Ramos, J.M., López, S., Vázquez, E., Murillo, E., (1988). "DNA integrity and DNA polymerase in Deteriorated Maize Embryo Axes", *J. Plant Physiol.*, **133**:600-604.
- ❏ Vázquez-Ramos, J.M., Reyes, J., (1990). "Stimulation of DNA synthesis and DNA polymerase activity by benzyladenine during early germination in maize seeds", *Can. J. Bot.*, **68**:2590-2594.
- ❏ Zarain, M.H., Bernal-Lugo, I., Vázquez-Ramos, J.M., (1987). "Effect of benzyl adenine on the DNA synthesis during early germination of maize embryo axes", *Mut. Res.*, **181**:103-110.
- ❏ Zúñiga-Aguilar, J.J., López, I., Gómez, A., Vázquez-Ramos, J.M., (1995). "Does benzyladenine stimulate DNA metabolism by modifying gene expression during maize germination?", *Seed. Sci. Res.*, **5**:219-226.
- ❏ Zúñiga, J.J., "Efecto de Benciladenina sobre la población de RNA mensajeros durante la germinación de Maíz", Tesis de Licenciatura, Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Química, 1991.