

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIO PROFESIONALES IZTACALA

**Clonación y caracterización de un fragmento de conglutina
gama de *Lupinus campestris*, rico en aminoácidos esenciales,
en un plásmido de una cepa de *E. coli*.**

TESIS PROFESIONAL

Que como requisito para obtener el grado de:

Biólogo

Presenta:

RAMIRO GARCIA GUZMÁN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

“Pero no se crea, convocar a todas estas letras fue harto difícil, lograr que se estuvieran quietas requirió látigos de siete colas, amenazas de todo tipo, súplicas, ruegos y promesas. Después vino la pesadilla, intentar una y otra vez armar el rompecabezas de modo que se aproximara, así sea medianamente, al otro rompecabezas que tenemos en la cabeza”.

Subcomandante insurgente *Marcos*.
La Jornada 19 de octubre de 1998.

CARPE DIEM

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Ácidos Nucleicos del departamento de Bioquímica en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Bajo la dirección del Dr. Rogelio Maldonado Rodríguez.

AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo a mis padres en agradecimiento por su total y absoluta confianza y apoyo. Gracias Padre por tu comprensión y ayuda, por darme todas las herramientas para poder caminar por la vida. Por tus cualidades que te hacen ser un gran hombre: tu ingenio, tus maravillosas manos que transforman el oro en obras de arte. A mi Madre por los grandes sacrificios, los desvelos, los consejos, los enormes momentos de felicidad. Por saber que siempre puedo contar contigo. A mis padres que son mi mayor tesoro, por su ejemplo para poder salvar los obstáculos, por disfrutar plenamente día a día cuando caminan los dos juntos tomados de la mano. Por todo el amor que me han dado, que tienen y que transmiten.

A mis hermanos: Rosy, Jorge, Ivan y Ana por ser yo un gran afortunado de tenerlos como hermanos.

A Jaime, Chrystian, Ilse, Isela y Andrea por ser parte de la familia.

A Alfredo, Luis y Lulu, por ser como de la familia.

A Bety por tu apoyo, confianza, comprensión, cariño y el gran amor que me das.

A Gustavo por compartir tantos momentos y ser un verdadero amigo.

A Gilberto por ser además de un gran maestro, un invaluable amigo.

Al Dr. Rogelio Maldonado por su correcta y paciente dirección para la realización de esta tesis.

A mis sinodales Sergio Vaca, Leticia Moreno, Diego Arenas y Héctor Barrera, por sus comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo.

A los compañeros del laboratorio de ácidos nucleicos y de ciencias biológicas: Maestra Mercedes, Dr. Juan Carlos, Rosalba, Joel, Pedro, Ricardo, Anita, Gaby Ilse, Sakuntala, Socorro, Alejandra, Icoqui, Jesús y Sergio por su amistad.

A los compañeros del CINVESTAV: Tere por tu ejemplo de trabajo y tenacidad. Lúlu, Ramses y Flor por su amistad.

A los compañeros de Iztacala: Esperanza, Maricarmen, Alma, Maricela, Miguel, Héctor, Gerardo, Martha, Pilar y José por el sueño de la biología.

INDICE GENERAL

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	
2.1 Importancia de las leguminosas	2
2.2 Características biológicas del género <i>Lupinus</i>	3
2.3 Distribución geográfica de la planta	4
2.4 Taxonomía	5
2.5 <i>Lupinus campestris</i>	5
2.6 Algunas características nutricionales	5
2.7 Proteínas de reserva en las semillas de las leguminosas	6
2.8 Conglutina γ (gama)	9
2.9 Clonación molecular	16
2.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	16
2.11 Características de los oligonucleótidos iniciadores y del DNA para PCR	18
III. ANTECEDENTES	
3.1 Composición química de la harina de las semillas de <i>Lupinus</i>	20
3.2 Secuencia del gen de la conglutina γ (gama)	20
3.3 Características del vector pUC118	21
IV. JUSTIFICACIÓN	23
V. OBJETIVOS	
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos específicos	24
VI. ESTRATEGIA	25

VII. MATERIAL Y METODOS.

7.1 Soluciones y reguladores	26
7.2 Medios de cultivo	28
7.3 Métodos	
a) Aislamiento de DNA total	29
b) Diseño de oligonucleótidos	30
c) Amplificación por PCR	31
d) Electroforesis en gel de agarosa	33
e) Purificación del producto de PCR y del vector pUC118	33
f) Reacción de restricción con las enzimas EcoRI y BamHI	34
g) Reacción de ligación	34
h) Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	35
i) Selección de las recombinantes	36
j) Técnica a gran escala para la obtención de DNA plasmídico	36
k) Restricción del plásmido recombinante con la enzima BglI	39

VIII. RESULTADOS.

8.1 Extracción de DNA de hojas de <i>Lupinus campestris</i>	40
8.2 Amplificación por PCR para obtener un fragmento de 630 pb del gen de la conglutina gama	40
8.3 Clonación del producto de PCR	40
8.4 Transformación de células competentes	43
8.5 Caracterización de la inserción del fragmento de PCR en las colonias recombinantes	43

IX. ANALISIS Y DISCUSIÓN 47**X. CONCLUSIONES** 54**XI. BIBLIOGRAFÍA** 55**XII. APÉNDICE** 60

INDICE DE TABLAS

Tabla I Proteínas de reserva en semillas	6
Tabla II Proteínas de reserva en semillas de <i>Lupinus</i>	8
Tabla III Composición de aminoácidos en semillas de <i>Lupinus</i>	10
Tabla IV Características del gen de la conglutina gama	14
Tabla V Porcentaje de algunos aminoácidos en la proteína conglutina gama y en el fragmento	21
Tabla VI Codones del fragmento de conglutina gama de baja frecuencia de utilización	46
Tabla VII Frecuencia de utilización de codones en genes de <i>E. coli</i>	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Gen de la conglutina gama	12
Figura 2 Reacción en cadena de la polimerasa	19
Figura 3 Mapa del vector pUC118	22
Figura 4 Producción del DNA recombinante	35
Figura 5 Selección de las cepas recombinantes	38
Figura 6 Obtención de un fragmento de 630 pb.	41
Figura 7 Digestión del plásmido pUC118	42
Figura 8 Crecimiento en placas de agar LB/amp/X-gal	44
Figura 9 Restricción con BglI del plásmido pUC118	45
Figura 10 Caracterización del inserto en el plásmido recombinante	53

I RESUMEN

La conglutina gama es una proteína que representa del 5-6% del total de las globulinas en las semillas de las plantas del grupo lupinus. Esta proteína posee una mayor cantidad de lisina, treonina, triptofano y valina, con respecto a otras globulinas, lo que le confiere un alto valor nutritivo. Además es susceptible a la degradación enzimática cuando previamente se le ha desnaturalizado en un pH ácido, condición que teóricamente se presenta en el estómago. Por lo que hace que este compuesto sea considerado como una fuente alternativa para consumo humano.

En base al análisis de la secuencia reportada del cDNA de la conglutina gama de *Lupinus angustifolius*, se diseñaron oligonucleótidos que generan por PCR un fragmento de 630 pb. Para llevar a cabo la clonación y caracterización de un fragmento de conglutina gama, se purificó el DNA total a partir de hojas frescas de *Lupinus campestris*, se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores 112 y 712 diseñados para generar un producto de 630 pb que presenta sitios de corte para las enzimas EcoRI y BamHI, además de que posee una señal de terminación para la síntesis de la proteína. Una vez obtenido el producto de amplificación por PCR, este se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa, observando que el tamaño corresponde al esperado. Por otro lado se llevo a cabo la extracción del plásmido pUC118, el cual también presenta secuencias de corte para las enzimas EcoRI y BamHI. Tanto el fragmento de conglutina gama obtenido por PCR y el vector, fueron digeridos por las mismas enzimas de restricción, el diseño de los sitios de corte de las enzimas de restricción permite que en la reacción de ligación el inserto entre en fase y en la dirección correcta en el plásmido.

Una vez obtenido el plásmido pUC118 con el inserto (fragmento de conglutina gama), se transformaron células competentes *E. coli* DH5 α . La selección de colonias blancas y azules permite distinguir las células recombinantes de las no recombinantes, por alfa-complementaridad. Cuando las células son transformadas con plásmidos no recombinantes se generan colonias azules al ser crecidas en placas que contienen X-gal, por otro lado los vectores con el inserto producen colonias blancas ya que las cepas recombinantes pierden la capacidad de metabolizar el sustrato cromogénico, debido a la inserción de una secuencia de DNA en el plásmido pUC118. La caracterización del inserto se realizó por digestión del DNA plasmídico tanto de colonias blancas y azules, con la enzima BglI que reconoce secuencias que están fuera del sitio de policlonación. Los productos de la restricción al ser analizados en electroforesis en gel de agarosa, generan bandas con tamaños que corresponden, para el plásmido silvestre de 1578 y 1622 pb. y para el plásmido recombinante de 1622 y 2185, lo que indica que se insertó el fragmento obtenido por PCR utilizando el DNA molde de *L. campestris*.

II. INTRODUCCION

2.1 Importancia de las leguminosas

Los dos grupos de plantas que mayor importancia tienen en la agricultura mundial pertenecen a las familias vegetales de las gramíneas (cereales) y las leguminosas (guisantes, judías, habas, chícharos) que se aprovechan como granos, forrajes y abonos verdes (Whyte, 1968).

Las leguminosas se cultivan desde hace 6000 años por lo menos. Según parece las poblaciones lacustres de Suiza 5000 a 4000 años antes de J.C. cultivaban unas cuantas plantas, incluidos los guisantes. La literatura china menciona el cultivo de la soya entre el año 3000 y el 2000 antes de J.C. Las leguminosas figuraban en los sistemas agrícolas de las primeras dinastías egipcias y posteriormente en la época romana, varios autores realzaron su valor como alimento y como enriquecedoras del suelo. Los indios americanos cultivaban el frijol entre las plantas de maíz desde las épocas más remotas (Whyte, 1968).

La familia de las leguminosas constituyen uno de los grupos más vastos del reino vegetal, pues comprende unos 550 géneros, que incluyen alrededor de 13000 especies distribuidas en todo el mundo, especialmente en las regiones tropicales. La familia de las leguminosas abarca multitud de plantas útiles en la alimentación; como el frijol, garbanzo, lenteja, chícharo, soya, haba, etc. Otras son importantes en la industria y algunas son venenosas. El fruto de las leguminosas es muy característico: una vaina generalmente alargada seca en su madurez, con una sola cavidad donde hay una hilera de semillas (Martínez, 1979).

Otra característica importante de las leguminosas es que sus raíces presentan nódulos formados por colonias de bacterias simbiotes, que fijan el nitrógeno del aire. La infección de las raíces de una planta leguminosa con la especie apropiada de *Rhizobium* o de *Bradyrhizobium* provoca la formación de nódulos en las raíces. Los cuales son capaces de llevar a cabo la conversión del nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado, durante este proceso el nitrógeno es reducido a amonio que posteriormente es convertido a forma orgánica, este proceso se conoce como fijación de nitrógeno, el cual es de importancia agrícola considerable ya que conduce a incrementos muy significativos del nitrógeno combinado en las tierras (Brock, 1991).

En la mayoría de las leguminosas el contenido proteico se encuentra entre un 20 y un 35% lo que las sitúa entre las fuentes más concentradas de estos compuestos, ya que los cereales apenas aportan de 5 a 12%, las carnes de 14 a 28%, el huevo 12%, las frutas, verduras, tubérculos y la leche entre 0.5 y 3%. Las semillas secas de las leguminosas son en general buenas fuentes de tiamina, en tanto que su contenido de vitamina C es virtualmente cero. La mayoría de ellas aporta, por cada 100 gramos entre 0.5 y 1.0 miligramos de tiamina, de 0.1 a 0.5

miligramos de riboflavina y alrededor de 3 miligramos de niacina (Bourges, 1987).

Las plantas del grupo *Lupinus* pertenecen a la familia de las leguminosas y han sido utilizadas extensamente desde tiempos ancestrales tanto en agricultura como en alimentación. En lo que respecta al uso en la alimentación se requiere muchas veces un pre-tratamiento de la semilla para ser posible su consumo. El principal objetivo de este pre-tratamiento, es disminuir el nivel de alcaloides en las semillas amargas. Algunas de las especies de *Lupinus* han sido utilizadas desde hace más de 3000 años por ejemplo en la civilización Inca o Egipcia (Beirão da Costa, 1993).

La tecnología tradicional utilizada para eliminar el sabor amargo de las semillas es mediante un proceso de cocción y posteriormente se lavan en agua corriente. El tostado es también utilizado para eliminar el sabor amargo, es una forma más eficiente de preservar el contenido vitamínico, además es un proceso que consume menos energía. Adicionalmente el tostado se utiliza para producir sustitutos del café. (Beirão da Costa, 1993).

Las proteínas de origen vegetal se muestran como una importante fuente de suplemento alimenticio nutritivo, para el desarrollo de productos alimenticios de alta calidad. Dentro de la familia de las leguminosas un caso notable lo constituyen las plantas del grupo *Lupinus*, las cuales tienen una reserva proteica excepcional ya que es superior a la de la soya, la de los chícharos silvestres y la de los frijoles faba (Kagawa 1987). El grupo de *Lupinus* es una de las leguminosas con el mayor contenido proteico en las semillas, la cantidad depende de la especie y varía desde 31% en la semilla completa de *Lupinus angustifolius*, a un 41% en *L. luteus*, comparado con un 35% presente en las semillas de soya. Otro aspecto interesante del grupo *Lupinus*, como una fuente de proteína, es que su crecimiento se desarrolla en condiciones climáticas y de suelo que la planta de soya no tolera (Duranti, 1981). Debido a las características nutricionales y agronómicas que ofrece el cultivo de *Lupinus*, su aprovechamiento para consumo humano o animal se ha expandido en Europa y Australia, siendo este último el primer país productor y exportador del mundo (Coffey, 1989).

2.2 Características biológicas del género *Lupinus*

El género *Lupinus* se caracteriza por ser plantas herbáceas o arbustivas, anuales o perenes, de tallos solitarios, cespitosos o abundantemente ramificados, de 5 cm a 3 m de alto; flores en racimos terminales pedunculados que normalmente sobresalen del follaje, ocasionalmente las flores son rosadas, rojas, blancas o amarillas. Las semillas son de tamaño y color variable, generalmente semejan el color del suelo del área en que viven las plantas. Este género constituye uno de los grupos más complejos de plantas, como lo atestiguan aproximadamente 1500

nombres publicados para Norte y Sudamérica. Algunas especies de semilla larga habitan la región mediterránea. Este grupo de plantas es muy activo y dinámico, con especies que ocupan hábitats desde el nivel del mar hasta la tundra alpina. Las especies comúnmente son invasoras de terrenos perturbados y desempeñan un papel activo en el ciclo del nitrógeno. También contienen muchos alcaloides amargos y por consiguiente no son atractivas para la mayoría de los animales. Han sido utilizadas en la medicina y las semillas tostadas se emplean como sustituto del café (Dunn, en Rzedowski 1979).

El género *Lupinus* pertenece a la familia Leguminosea, a la subfamilia Papilinoideae.

Se ha encontrado que a principios de la era cristiana *L. albus* estaba bien establecida en la agricultura romana, además de ser cultivada en Grecia desde hace varios siglos. Esta planta también fue conocida en Egipto y Mesopotamia mucho antes que los Romanos y Griegos, estos últimos la llamaban "thermus", en Egipto se conocía como "termus", en Arabia "turmus", en España "atramuz" y "tumursa" en Siria. Otras especies de *Lupinus* de importancia histórica y comercial son *L. angustifolios*, y *L. luteus* (Aguilera, 1978).

2.3 Distribución geográfica de la planta

La distribución geográfica del género *Lupinus* se observa básicamente en dos grandes regiones, la primera se encuentra en el mediterráneo desde el sur de Europa hasta Africa central a la altura de Etiopía, y la segunda región abarca todo el continente Americano excepto las llanuras tropicales de la cuenca del Amazonas. La región del mediterráneo comprende tan solo una docena de especies silvestres de *Lupinus*, de las cuales se cultivan: *L. luteus* y *L. angustifolius*, mientras que en la región americana existen cientos de especies silvestres. De las especies de *Lupinus* en América las únicas que se utilizan en la agricultura son: *L. mutabilis* y la especie mexicana *L. elegans* (Whyte, 1968).

En México se han identificado alrededor de 30 especies, que crecen en forma silvestre y que corresponden al 6% del total de las especies identificadas a nivel mundial. La planta se desarrolla en altitudes que van desde 1800 msnm hasta 4100 msnm, siendo la región central del país el área principal de su distribución (Dunn, 1979).

En el Estado de México se han observado *Lupinus*. Como plantas herbáceas o subarborescentes, muy comunes en los lugares montañosos de 2500 a 3500 msnm. Las hojas son palmado estrelladas y las flores azulado-purpúreas, colocadas en racimos. El fruto es vellosa y sus valvas se enroscan hacia afuera en la madurez. Los *Lupinus* pueden utilizarse como abono verde. (Martínez y Matuda, 1979).

2.4 Taxonomía

Familia: Leguminosae

Subfamilia: Papilionoideae

Tribu: Genisteae

Género: *Lupinus*

Especie: *Lupinus campestris* (McVaugh, 1987).

2.5 *Lupinus campestris*. Planta anual bienal o perene de vida corta; tallos con médula sólida, de 1.5 a 6 dm de alto, ramificados en la parte superior a manera de arbusto. La cantidad de antocianina en los tallos y en las estípulas depende de la altitud, puesto que lo fomentan las noches frías. También conocida de terrenos abandonados y orillas de camino en los estados de Jalisco, Michoacán, México, Morelos, Veracruz y Oaxaca. (Dunn, en Rzedowski, 1979). En Veracruz se le conoce como: frijolillo y garbancillo. En Puebla le nombran galopino, se utiliza como alimento para ganado ovino y caprino.

2.6 Algunas características nutricionales

La mayor parte de los estudios nutricionales o bioquímicos con leguminosas de grano conciernen principalmente a dos factores importantes en la determinación del valor nutritivo y utilización de los nutrientes que contienen. El primero de esos factores son los compuestos de acción antifisiológica como los inhibidores de tripsina y hemaglutininas, los que se destruyen durante la cocción a que se someten previo a su consumo. Por consiguiente, este hecho sugiere que dichos factores no son determinantes de la baja digestibilidad de la proteína de las leguminosas comestibles. El segundo factor de importancia nutricional es la deficiencia de aminoácidos azufrados de que adolece la proteína de las leguminosas de grano, deficiencia que sin embargo no afecta la digestibilidad de la proteína, notándose su efecto mas bien a nivel metabólico (Bressani, 1976).

Sin embargo aunque ya se mencionó, es necesario enfatizar que el lupino es una excelente fuente de proteínas, con un contenido promedio de 42%, siendo las globulinas, consideradas como proteínas de reserva, la fracción mayoritaria (80 a 87%), mientras que las albúminas, proteínas con actividad catalítica corresponden aproximadamente con un 5 a 13% (Dávila, 1995).

A pesar de las ventajas nutricionales referidas, el contenido de alcaloides impide su consumo directo. Es por ello que se han desarrollado tanto programas de mejoramiento para la producción de variedades dulces (bajo contenido de alcaloides), como procedimientos tecnológicos que permitan aislar los componentes de interés (proteínas y grasas) y a su vez reducir los niveles de alcaloides hasta 0.05%, nivel permitido por la FAO para su consumo (Wink, 1995. Aguilera, 1989).

2.7 Proteínas de reserva en las semillas de leguminosas.

Las proteínas de las semillas han sido divididas en cuatro clases: albúminas, denominadas a las proteínas solubles en pH neutro y baja concentración de sal; globulinas llamadas así a la fracción soluble en pH neutro y alta concentración de sal; prolaminas, que corresponde a la fracción soluble en alcohol y glutelinas aquellas solubles a pH alto (Osborne, 1924) (Tabla I). En general la principal fracción de las proteínas de reserva en las dicotiledóneas como las leguminosas son las globulinas, mientras que en las monocotiledóneas como las gramíneas son las prolaminas. (Danielsson, 1949). Las albúminas representan aproximadamente solo el 12% del total de las proteínas en la semilla de las leguminosas y contienen un gran número de especies moleculares distintas, además de una muy baja proporción de aminoácidos esenciales, por lo que su contribución a las propiedades nutricionales esta limitada (Duranti, 1979)

Proteínas de Reserva en Semillas	
ALBÚMINAS	Fracción soluble en pH neutro y baja concentración de sal.
GLOBULINAS	Fracción soluble en pH neutro y alta concentración de sal.
PROLAMINAS	Fracción soluble en alcohol.
GLUTELINAS	Fracción soluble en pH alto.

Tabla I. Proteínas de reserva en semillas

Algunas de las características de las proteínas de reserva de las semillas son:

- Las proteínas de reserva de las semillas son sintetizadas en los tejidos embrionarios.
- Se acumulan casi exclusivamente durante el estadio de expansión celular del desarrollo embrionario.
- Son almacenadas en cuerpos proteicos, hasta la germinación cuando son metabolizados y utilizadas como fuentes de carbón y nitrógeno para el desarrollo germinal.
- Sus genes son regulados principalmente a nivel de transcripción (Wobus, 1995).

El papel esencial de las proteínas de reserva de las semillas es servir como fuentes de nitrógeno y de carbono para el desarrollo vegetal durante la germinación. En general las proteínas de reserva son ricas en glutamina, aspargina y prolina, lo cual es consistente con su papel de fuente de nitrógeno durante la germinación. (Heidecker, 1986). En las especies de leguminosas, las proteínas de reserva consisten principalmente de globulinas del tipo de legumina y vicilina (Casey, 1986). En particular las proteínas de reserva o globulinas deben estar compactadas eficientemente, deben estar disponibles para una degradación enzimática controlada una vez que la semilla ha embebido agua, también deben presentar resistencia al ataque microbiano y a la degradación bajo condiciones climáticas adversas (Tulloch, 1985). Las proteínas de reserva de leguminosas son producidas durante el desarrollo de los cotiledones, estas proteínas se acumulan dentro de los cuerpos proteicos, y son consideradas como proteínas de secreción (Johnson, 1985).

En las semillas de *Lupinus*, las proteínas de reserva están representadas básicamente por proteínas del tipo de legumina y vicilina, también llamadas globulinas 11S y 7S respectivamente, las cuales juntas cuentan alrededor del 80% del total de globulinas (Duranti, 1994a). El grupo de las leguminas esta compuesto de preproteínas de aproximadamente 60 kDa que son cortadas para producir subunidades de 40 y 20 kDa, las cuales permanecen unidas una a la otra mediante puentes disulfuros formando dímeros. Hasta la fecha no se conocen formas glicosiladas de estas proteínas. El grupo de las vicilinas es derivado de preproteínas que van de 50-70 kDa algunas de las cuales están glicosiladas, en algunas especies son cortadas a polipéptidos maduros más pequeños. Ambos grupos de proteínas tiene secuencias líder removidas co-traduccionalmente (Borroto y Dure, 1987).

Además dentro de las globulinas se presentan principalmente cuatro proteínas del grupo de las conglutinas, las cuales son: alfa (α), beta (β), gama (γ) y delta (δ) (cuadro 2). Las conglutinas α , β y δ , son miembros de la extensa familia de proteínas de reserva 11S, 7S y 2S respectivamente, mientras que la conglutina gama (γ) pertenece a una familia de proteínas de reserva que posee características que la sitúan en un grupo distinto (Gayler, 1984).

Proteínas de Reserva en Semillas de <i>Lupinus</i>			
Albúminas	12%		
Globulinas	80-85%	Conglutina α (legumina) 11S	45%
		Conglutina β (vicilina) 7S	30%
		Conglutina γ (gama) 10S	5-6%
		Conglutina δ 2S	10%
		Cinco tipos más	aprox. 9%

Tabla II

Las globulinas de *Lupinus* poseen moléculas de carbohidratos unidos a la proteína, formados principalmente por azúcares neutros con algunas moléculas de N-acetilglucosamina (Duranti, 1981). Algunas de las diferencias más importantes de las conglutinas α y β , con respecto a la conglutina gama es el tamaño y la composición de aminoácidos (Blagrove, 1980).

En base al análisis del cDNA y de la secuencia de aminoácidos, la conglutina gama y la globulina 7S de la soya son proteínas homólogas y distintas de las proteínas de reserva 11S, 7S y 2S. Tanto la globulina 7S de la soya como la conglutina gama tienen propiedades similares en solubilidad, masa molecular y constitución de las subunidades (Kagawa, 1987. Kolivas, 1993).

2.8 Conglutina γ (gama).

La conglutina gama representa aproximadamente del 5-6% del total de las globulinas en la semilla de lupinus (Duranti, 1981). Esta proteína es resistente a las proteasas de semilla y al ataque por tripsina. Así como también presenta una inusual resistencia a la proteólisis durante la germinación. (Duranti, 1984; Cyntharel, 1989). Actualmente está en debate si esta molécula tiene una función de proteína de reserva en la semilla, ya que se ha observado que no es una fuente de aminoácidos durante la germinación, ya que en esta etapa la conglutina gama se hidroliza lentamente, mientras que las conglutininas alfa y beta son hidrolizadas rápidamente (Esnault, 1996).

Por otro lado la conglutina gama presenta diferencias en la composición de aminoácidos con otras globulinas. Posee menor cantidad de aminoácidos ácidos y mayor cantidad de lisina, treonina, triptófano y valina. Cuadro 3. (Gillespie 1974; Duranti, 1979; Duranti, 1981). Lo que le confiere un alto valor nutritivo. Además sus polipéptidos tienen puntos isoeléctricos de 7.5-8.0 y 6.0-6.5 en *L. albus*, y 7.5 y 6.0 en *L. luteus* y son menos ácidos que las conglutininas α y β (Cintharel, 1989; Esnault, 1991).

La conglutina gama es una proteína oligomérica (10S) compuesta por polimerización de una sola subunidad de aproximadamente 40-45 kDa en todas las especies. Este valor puede variar de acuerdo a las especies y a las técnicas utilizadas para su estudio. En *L. angustifolius*, la masa molecular es de 40 a 45 kDa utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida o de 45 a 47 kDa por sedimentación (Blagrove, 1975. Elleman, 1977). En *L. albus*, la subunidad es de 43 a 45 kDa (Restani, 1981). En todas las especies ésta proteína se encuentra formada por una subunidad compuesta de dos péptidos unidos por enlace disulfuro con peso molecular cercano a 17 (cadena ligera) y 30 kDa (cadena pesada).

En las plantas de *L. angustifolius* la conglutina gama se acumula en los cotiledones durante todo su desarrollo, mediante estudios de marcaje con metionina [^{32}S], se demostró que esta proteína es sintetizada como precursores de vida corta y con un peso molecular mas alto. El precursor mayor marcado en los cotiledones juveniles tiene un peso aparente de 51 kDa, estos péptidos tienen vidas medias de menos de dos horas después de su síntesis y son procesados a péptidos maduros de 30 y 17 kDa (Johnson, 1985). De manera muy similar en semillas de *L. luteus* la conglutina gama se deriva de un precursor de 51 kDa, el cual es gradualmente procesado en dos polipéptidos de 33 y 18 kDa (Decker, 1991).

Composición de aminoácidos en Semillas de <i>Lupinus</i> (%)			
	Conglutina α	Conglutina β	Conglutina γ
Lys	3.67	3.56	6.34
His	2.05	1.37	5.53
Arg	9.62	14.00	4.04
Asp	10.01	11.96	11.81
Thr	5.01	2.68	7.43
Ser	4.09	5.62	8.79
Glu	23.67	25.14	10.10
Pro	4.91	4.14	5.98
Gly	4.61	3.36	4.05
Ala	3.30	2.71	4.21
Cys	3.57	0.00	2.62
Val	4.10	3.00	6.30
Met	0.30	0.00	0.75
Ile	4.92	4.17	4.91
Leu	8.11	7.12	9.35
Tyr	3.95	6.80	3.02
Phe	4.07	4.43	4.82
Trp	0.53	0.00	1.11

Tabla III (Duranti, 1979)

Blagrove y Gillespie (1975) han propuesto que la conglutina gama puede estar localizada dentro de los cuerpos proteicos. Durante los primeros pasos de la maduración de las semillas de lupinus blanco (*L. albus*) esta proteína se encuentra localizada en el citosol y en el retículo endoplásmico. Mediante estudios de localización por inmunocitoquímica, la legumina considerada una verdadera proteína de reserva se encuentra localizada en las células de parénquima de los cotiledones durante la germinación de las semillas, a diferencia de la conglutina gama que se localiza tanto en las células vasculares de parénquima como en las células epiteliales, esta diferencia en la ubicación de la conglutina con respecto al patrón observado para la legumina sugiere una función distinta a la de proteína de reserva (Duranti, 1991. Duranti 1994b). La conglutina gama se sintetiza durante el desarrollo temprano de la semilla como un precursor polipeptídico de masa

molecular de entre 47 a 51 kDa el cual es cortado por enzimas proteolíticas a subunidades maduras de 40 a 45 kDa probablemente durante su transporte a los cuerpos proteicos (Cintharel, 1989), en donde se deposita junto con las proteínas de reserva. Esta subunidad está compuesta por dos polipéptidos unidos por enlace disulfuro, uno de aproximadamente 30 kDa (cadena pesada), y el otro de 17 kDa (cadena ligera) (Blagrove, 1980).

Por medio de estudios de microscopía electrónica se ha determinado que el arreglo de la subunidad de la conglutina gama, es muy distinto de la estructura aproximadamente esférica de las globulinas 11S. La molécula de conglutina gama presenta una forma toroidal con un diámetro externo de 10.3 nm y un espesor de 2.2 nm. (Tulloch, 1985).

En base al análisis de la secuencia del cDNA de la conglutina gama se presenta un fragmento de 1499 pb, con un marco de lectura abierto que abarca 1334 pb y codifica para un precursor que tiene 444 aminoácidos de longitud, con un peso molecular de 48 286. El precursor inicia con Met-Ala el cual es el par amino terminal de muchas proteínas vegetales (Kolivas, 1993).

La conglutina gama nativa contiene dos cadenas polipeptídicas separadas por enlace disulfuro, la secuencia de aminoácidos del 291 al 444 corresponde a la cadena menor y su extremo carboxilo terminal coincide exactamente con el codón de paro del extremo 3' del marco de lectura abierto. El extremo amino terminal de la cadena mayor inicia en la Leu₂₉ y la cadena se extiende al menos hasta la Pro₂₈₅ (Elleman, 1977., Kolivas, 1993). El procesamiento del precursor requiere proteolisis. El segmento N-terminal que posee una predominancia de aminoácidos hidrofóbicos, presumiblemente sirve como un péptido señal, el cual puede ser removido por un procesamiento cotraduccional en el residuo 27 (Figura 1). Se requiere también la eliminación de un máximo de cinco aminoácidos de entre las dos cadenas por una proteolisis post-traducciona. La estructura predicha de la prepro-conglutina gama revela una alta hidrofobicidad dentro de la región correspondiente al extremo N-terminal del supuesto péptido señal. Además se presenta un patrón regular de alternancia de regiones hidrofóbicas e hidrofílicas, en casi toda la proteína. A partir de la secuencia de aminoácidos la estructura secundaria predicha para la prepro-conglutina gama contiene una alta proporción de estructura en hoja β -plegada (63%), un poco de α -hélice (2%) y una abundancia de giros β , a intervalos regulares en toda la molécula (Kolivas, 1993).

Gen de la Conglutina gama.

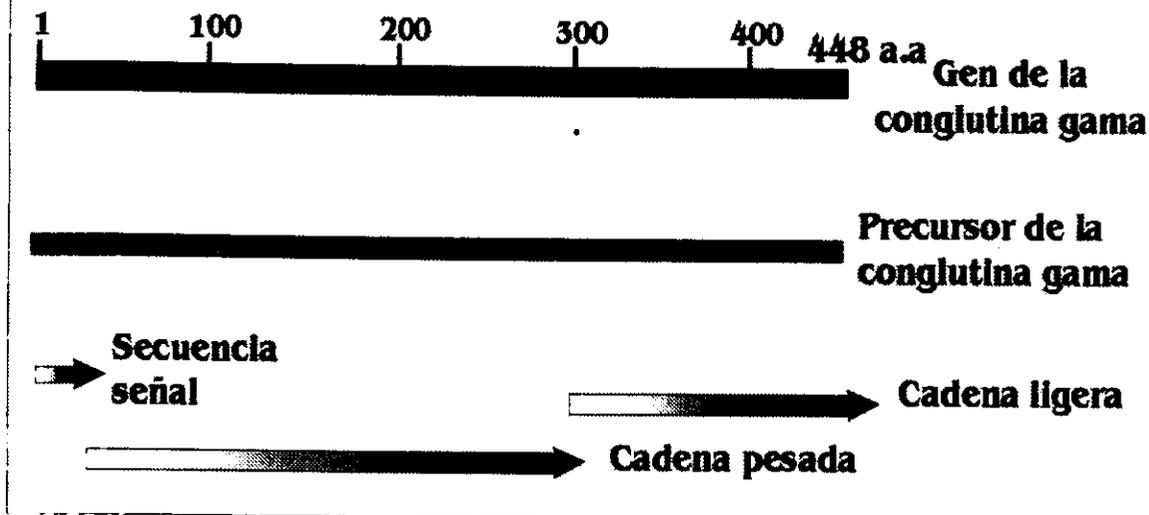


Figura 1 (Kolivas, 1993., Ilgoutz, 1997)

Se ha reportado la identificación del gen de conglutina gama en *L. angustifolius*, a partir de un clon genómico, se secuenció una región de 3.4 kb. (Ilgoutz, 1995). Este fragmento consiste de 1614 pb que franquean la región 5', una región codificante de 1350 pb y 410 pb río abajo a partir del codon de paro. El marco de lectura abierto mas grande del fragmento, predice una proteína con cuatro aminoácidos extras en el extremo amino terminal, que la secuencia predicha a partir del cDNA. El resto de la región codificante de la secuencia genómica fue 100% idéntica a la secuencia obtenida a partir del cDNA. No se presentan intrones en el gen. El sitio de inicio de la transcripción (designado "+1") se encontró 55 pb río arriba a partir del sitio de inicio de la traducción, con una probable caja TATA presente en -33. (Ilgoutz, 1995).

Comparando la similitud de secuencias se encontró una zona de 141 pb, de -1265 a -1125 en el extremo 5' de la región codificante del gene de la conglutina gama, que es un 80% idéntico con un fragmento de 147 pb en la región de -264 a -118 del extremo 5' de la región codificante del gene Bg de la soya (Watanabe, 1994). Además se presentan altos niveles de identidad (90 a 91%) de otras dos regiones no codificantes (-614 a -583 y -238 a -177) del gene de la conglutina gama, con dos regiones no codificantes (-481 a -449 y -339 a -199) respectivamente del gen P-1 de la aspartato amino transferasa de *L. angustifolius* (Kirk, 1994). Aún no se ha establecido si tal conservación refleja alguna función.

La región codificante del gene de la conglutina gama, tiene un alto grado de similitud en la secuencia con la región codificante de otros dos genes. La secuencia de aminoácidos derivada de la región codificante completa del gen de la conglutina gama y el cDNA de la glicoproteína extracelular dérmica de zanahoria (EDGP) presentan un 49% de identidad. (Ilgoutz, 1995). También se ha reportado una alta identidad entre la secuencia de aminoácidos de la conglutina gama y la proteína Bg (Kolivas, 1993). La gran identidad entre las tres secuencias sugiere que estas representan una familia de proteínas muy relacionadas (Ilgoutz, 1995).

Por otro lado utilizando sondas específicas para distintas regiones del gen de conglutina gama, y mediante análisis de hibridación (Southern) se ha establecido que hay una sola copia del gen de la conglutina gama en el genoma haploide de *L. angustifolius*. La expresión del gen es específica para las semillas, al analizar la distribución del mRNA de la conglutina no se detectaron señales en órganos de la planta como: tallos, hojas, o raíces, solamente en los cotiledones en desarrollo. Además se propone que la síntesis de las conglutininas incluyendo alfa, beta y gama, es regulada principalmente a nivel de traducción (Ilgoutz, 1997).

La conglutina gama presenta un carbohidrato unido, que corresponde al 8.8% del peso el cual esta formado principalmente por galactosa. En *L. angustifolius* el peso molecular de estas cadenas es de 1.3 kDa aprox. (Semino, 1985). Se ha encontrado un sitio potencial de glicosilación en el extremo amino de la subunidad pesada derivado del análisis de la secuencia de aminoácidos del cDNA de la conglutina γ (gama) de *Lupinus angustifolius*, la subunidad ligera no presenta carbohidrato (Kolivas y Gayler, 1993). Se ha demostrado también que la conglutina gama tiene la capacidad de unirse a carbohidratos en presencia de iones metálicos lo que sugiere un papel de lectina en las semillas, esta unión se observa solo cuando la proteína posee la cadena de azúcar, es decir, cuando se encuentra glicosilada. (Duranti, 1995b).

Características del gene de conglutina gama	
ORGANISMO	<i>Lupinus angustifolius</i> L. cv unicipop.
FUNCION DEL GENE	Desconocida.
CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DEL GENE	<p>Sitio de inicio de la transcripción (+1) 55 pb. rio arriba del sitio de inicio de la traducción.</p> <p>Region codificante sin intrones.</p> <p>Longitud de la región codificante: 1350 pb.</p> <p>Señales de poliadenilación: 96 pb. y 114 pb rio abajo a partir del codon de paro TAG.</p>
IDENTIDAD SIGNIFICATIVA CON REGIONES DE OTROS GENES	<ol style="list-style-type: none"> 1. Globulina básica (Bg) 7S de la soya (región codificante y un fragmento de 140 pb franqueando la región 5'). 2. Glicoproteina extracelular dérmica (EDGP) de zanahoria (región codificante). 3. Aspartato aminotransferasa de lupinus (dos areas franqueando la región 5').

(Tabla IV. Ilgoutz, 1995.)

Por otro lado se ha observado secreción extracelular de la conglutina gama tanto en estado de ontogénesis como en diversos tratamientos térmicos en semillas de lupinus. Al incubar las semillas de *L. albus* en agua a 60°C durante 3 horas, el 90% de la proteína liberada corresponde a la conglutina gama. También se ha determinado que la unión del carbohidrato al polipéptido es un requisito indispensable para la secreción (Duranti, 1994a). El carbohidrato presente en la cadena pesada de la conglutina gama induce la formación de la estructura terciaria de la proteína, lo que le da cierta resistencia a la digestión con tripsina, en ausencia de este carbohidrato esta resistencia se pierde. Además la conglutina gama (γ) es susceptible a la degradación enzimática cuando previamente se ha desnaturalizado en un pH ácido. (Duranti, 1995a). Estas condiciones se pueden lograr fácilmente en el estómago y tomando en cuenta que la conglutina γ es una molécula rica en aminoácidos esenciales, se puede considerar como una fuente potencial alternativa de proteína para consumo humano.

2.9 Clonación molecular.

La clonación molecular es el procedimiento para producir en el laboratorio muchas copias del mismo DNA. En esencia el DNA a clonar se introduce dentro de un vehículo molecular (vector) y este se reproduce dentro de un organismo hospedero. El vehículo molecular comúnmente es una molécula de DNA de forma circular que lleva dentro de su secuencia de nucleótidos la información para su replicación dentro de la célula hospedera, adicionalmente se le insertan pequeñas regiones de DNA que contienen sitios de restricción en los que se puede introducir el DNA a clonar sin afectar la reproducibilidad del mismo, a estas regiones se les conoce como sitios de multiclonación o policlonación. Los sitios de multiclonación se localizan dentro de un gene que codifica para una marca detectable, tal como una enzima que da una reacción colorida cuando se agrega el sustrato adecuado o alguna actividad que confiera resistencia a un antibiótico. Cuando el DNA se ha clonado dentro de este sitio, se interrumpe y destruye la actividad del gene marcador. Lo anterior es útil para seleccionar las recombinantes en las que el DNA se ha clonado dentro del vehículo molecular. Las recombinantes se introducen dentro del organismo hospedero y se reproducen cada vez que el mismo se replica. Si el organismo hospedero es una bacteria o una levadura la replicación o división celular ocurrirá frecuentemente y el número de copias del DNA recombinante será de decenas de miles de millones en el plazo de uno a dos días (Maldonado, 1998).

2.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) corresponde al proceso bioquímico *in vitro*, mediante el cual las cadenas individuales de DNA blanco o molde son duplicadas por la DNA polimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre 20 y 30) que integran la reacción, al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, (fig. 2) lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de DNA específico sometido al proceso. (Mullis, 1990)

La amplificación de DNA por PCR tiene las siguientes cualidades: especificidad, sensibilidad, sencillez y versatilidad. La especificidad se refiere al procedimiento que sirve para amplificar una porción preseleccionada de la muestra del DNA original. Lo anterior se logra usando un par de oligonucleótidos sintéticos, que a la vez que sirven como iniciadores para la síntesis de DNA, delimitan la región que se va a amplificar. Esto es posible debido a que en condiciones de incubación adecuadas, los oligonucleótidos sólo se unen a los sitios correspondientes de secuencia complementaria.

La sensibilidad es inmejorable ya que con esta técnica se puede amplificar una molécula de DNA, logrando que el número de copias de la región amplificada se incremente en proporción geométrica. La sencillez es notable, ya que la reacción normalmente se realiza de dos a tres horas en un laboratorio equipado modestamente y con personal técnico capacitado. La versatilidad indica que la técnica puede ser aplicada a todo tipo de muestras biológicas, animales o vegetales (sangre, pelo, hueso, músculo, etc.), a organismos en cualquier estadio de desarrollo (embrión, feto, infante, joven, adulto, anciano) y a organismos vivos, muertos, momificados o restos fósiles (Maldonado, 1998).

Los componentes requeridos para una PCR son: DNA, iniciadores (oligonucleótidos) específicos que limitan el gen o segmento de DNA que actúa como molde o blanco para la amplificación, mezcla de desoxinucleósidos trifosfatados (dNTP's), solución amortiguadora de reacción y DNA polimerasa.

Cada uno de los ciclos de reacción consta de tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos, que son:

- 1) **Desnaturalización** ($92-98^{\circ}\text{C}$, 30 a 90 segundos), en el cual se separan y desnaturalizan las dos cadenas complementarias del DNA blanco.
- 2) **Alineamiento** (de $50-60^{\circ}\text{C}$, durante 30-60 segundos), en el que se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de DNA molde desnaturalizado.
- 3) **Extensión** ($70-74^{\circ}\text{C}$, 30 a 90 segundos) se realiza la síntesis del DNA, en el que la polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados al DNA blanco al ir polimerizando los desoxinucleótidos libres, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción.

La terminación de estos tres pasos es lo que comprende un ciclo y normalmente este ciclo de tres pasos se repite de 30 a 50 veces (figura 2).

El ciclo siguiente se inicia en el mismo tubo, con los mismos componentes de la mezcla de la reacción, pero contiene ahora el doble de cadenas sencillas de DNA molde que el anterior y finaliza convirtiendo éstas en cadenas dobles (Barrera, 1993).

2.11 Características de los oligonucleótidos iniciadores y del DNA blanco para PCR:

Los oligonucleótidos iniciadores son las secuencias que definen el segmento de DNA a amplificar. La longitud de los iniciadores debe ser de 18 a 30 pb, aunque oligos de mayor o menor tamaño también funcionan. El contenido de CG debe ser similar al contenido del molde y del otro iniciador, idealmente se propone una proporción de 50-60% de CG. El oligonucleótido no debe presentar autocomplementariedad, para evitar la formación de estructuras secundarias, o complementaridad con el otro iniciador (Bangnam, 1994).

Por otro lado la secuencia blanco del DNA que se desea amplificar debe poseer las siguientes características: Longitud: de 150-500 pb. Aunque longitudes entre 100 y 2000 pb en ocasiones pueden ser amplificadas eficientemente. Debe ser una secuencia única, para evitar la competencia de moldes no deseados. Es adecuado que la secuencia a amplificar se encuentre en un alto número de copias, para minimizar el número de ciclos requeridos para amplificación, sin embargo ya que la sensibilidad de la PCR es muy alta, esta condición no es relevante. La presencia de un sitio reconocido por una enzima de restricción, ayuda para verificar la especificidad del producto amplificado (Bangnam, 1994).

Reacción en Cadena de la Polimerasa

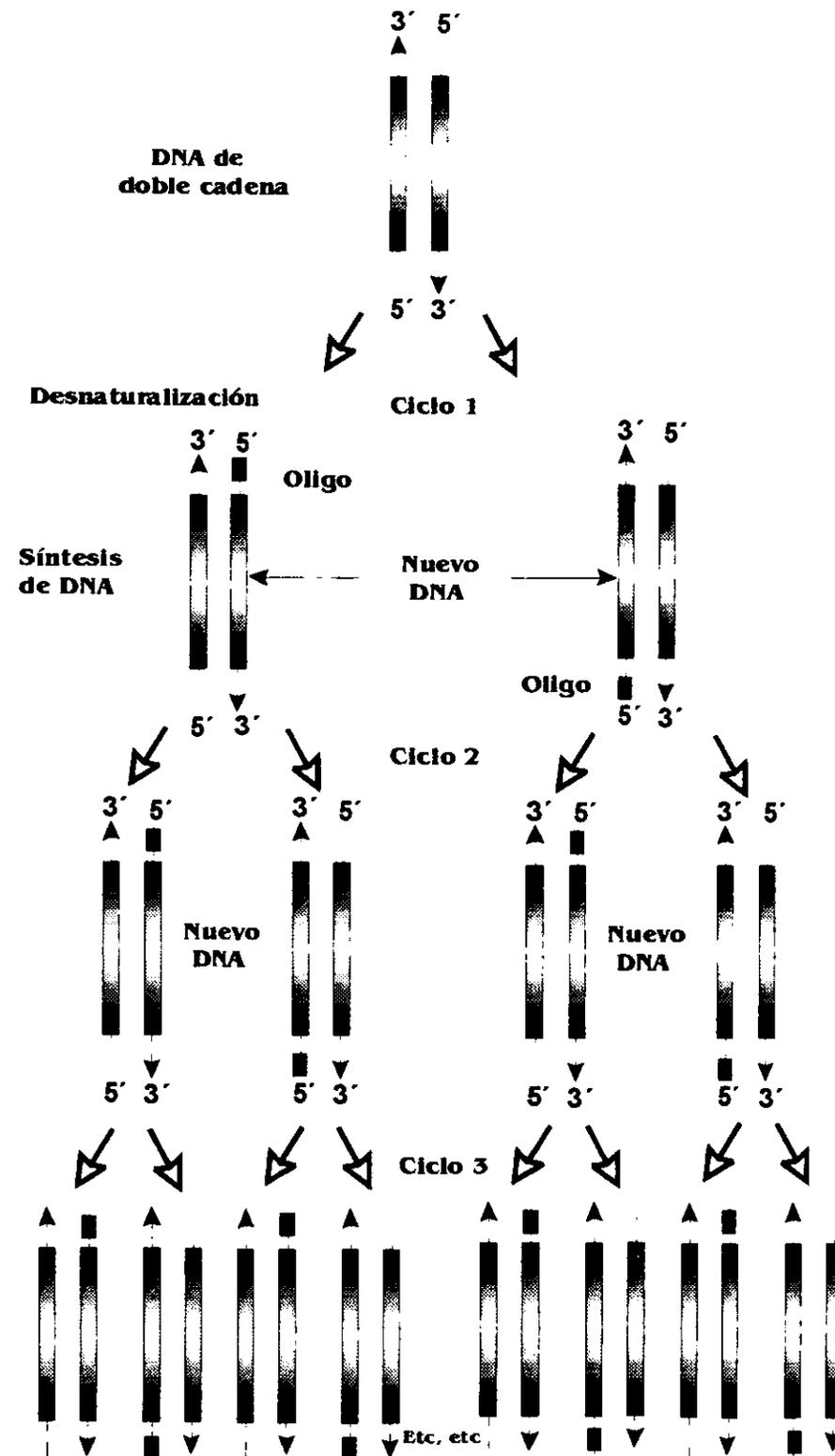


Figura 2 Amplificación de segmentos de DNA por Reacción en Cadena de la Polimerasa.

III. ANTECEDENTES

3.1 Composición química de la harina de semilla de lupinus.

En el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos se está estudiando una especie silvestre colectada en el Estado de Morelos e identificada como *Lupinus campestris*. La composición química de la harina de sus semillas ha mostrado un contenido de proteína y grasas de 49.3 y 13.2% respectivamente, sin embargo el grano presenta un contenido de alcaloides del 0.5%, nivel superior al aceptado por los organismos internacionales de salud que es de 0.05% (Dávila, 1995). Por lo que es necesario utilizar vías alternativas para el aprovechamiento de este recurso. Debido a esto se propone mediante el uso de la tecnología del DNA recombinante, insertar un fragmento del gene de la conglutina gama en un plásmido de *E. coli*, ya que es un polipéptido rico en aminoácidos esenciales, se puede considerar como una fuente potencial alternativa de proteína para consumo humano.

3.2 Secuencia del gen de la conglutina γ (gama).

Se ha secuenciado el cDNA de la conglutina γ a partir de *L. angustifolius* (Kolivas, 1993). Se muestra la secuencia completa del cDNA de la conglutina γ .

```

1 tagaaagggtt tcacatacat ggcacgaaat atgggtcata tccttcatat tctagtaatc
61 tctcttttctt actcttttctt ttttgatca tcttcatcac aagactcaca atcattatat
121 cataattctc aaccacttc ttctaaacca aacctccttg ttctaccggt tcaagaagat
181 gcttcaaccg gacttcattg ggccaatata cataagagaa caccacttat gcaagttcca
241 ctctactag acctaaatgg taacactta tgggtaacat gttccaaca ctactcatct
301 tcaacatacc aagcaccatt ttgtcactcc actcaatgct ctagagccaa cactcaccaa
361 tgcttcaactt gcaccgattc aaccacaaca agaccgggtt gccataaaa cacatgtggc
421 ctcttgctta gtaaccgggt tactcaagaa agtgggtag gtgagcttgc acaagatgta
481 ctagctatac attcaactca tggatcaaaa ctagggccaa tggttaaagt ccctcaattc
541 ctcttctctt gtgcaccttc ctctcttggc caaaagggtc ttccaaaaa cgtccaagggt
601 gctcttgggc ttgggtcaagc accgatttca ctacagaacc aacttttctc ccactttgga
661 ctcaaagcag aattctctgt atgtctctct cgttactcaa catcaaatgg tgctatatta
721 ttcggagata ttaatgacc aaataataac aattacatcc acaatagcct tgatgttttg
781 catgacttgg tgtacacccc attaaccata agcaaacaag gtgagtactt tatccaagtc
841 aatgccataa gggtaaaaa acacttgggt atcccaacta aaaaccatt tatctacca
901 tcatcaacat cataccatgg aagtggtaga attggaggag ctttgattac aactacacac
961 ccttacaccg ttcttagcca ctctatattt gaggtcttta ctcaagtgtt tgctaacaat
1021 atgcaaaaac aagctcaagt taaagctgtg gggccatttg ggttatgcta tgactcaagg
1081 aaaataagtg gtggtgctcc tagtgttgat ctatttttgg ataagaatga tgctgttttg
1141 agaatctcta gtgagaattt tatggttcaa gcacaagatg gggtttcatg tttagggttt
1201 gtggatggag ggggtcatgc tagagctgga attgcattag gggcacacca cttggaagaa
1261 aacttgggtg tgtttgattt ggaaagggtc aggggtgggt ttaactcaa tcattgaag
1321 tcttatggaa aaacatgttc taatctcttt gaccttaaca atccttagga tccataaact
1381 atggagagag gaaaaggtac ttagagagtt tatgcttaac tattaagtaa gcatgtactt
1441 gctatgtggt taataatata aagaataaag agtttgaagt aaataaaaat gctacttgtg
1501 ttgtaaatga gtaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

Las secuencias subrayadas indican la zona donde hibridan los oligonucleótidos iniciadores lo que dará un producto de 630 pb. Ver materiales y métodos

En el fragmento que se genera la proporción de los aminoácidos esenciales metionina y de cisteína aumenta considerablemente, además el porcentaje de fenilalanina y triptofano se mantiene muy similar, con respecto a la proteína original como lo muestra la siguiente relación.

	Conglutina gama 448 a.a		Fragmento de 198 a.a	
	Número de a.a	Porcentaje	Número de a.a.	Porcentaje
Residuos de Cisteína	11	2.4%	8	4.0%
Residuos de Fenilalanina	21	4.8%	8	4.0%
Residuos de Metionina	4	0.8%	3	1.5%
Residuos de Triptofano	5	1.1%	2	1%

Tabla V Porcentaje de algunos aminoácidos en la proteína cong lutina gama y en el fragmento.

3.3 Características del vector pUC118

Se deriva del vector pUC18, posee las secuencias en *cis* requeridas para la iniciación y terminación de la síntesis de DNA del bacteriófago M13 y para el empaquetamiento del DNA en la cápside del bacteriófago. Este vector puede aceptar segmentos de DNA foráneo y puede ser propagado como un plásmido. Cuando las células que albergan este plásmido son infectadas con el fago filamentoso M13, las copias de una hebra del DNA plasmídico son sintetizadas y empaquetadas dentro de las partículas de la progenie del bacteriófago. La hebra sencilla del DNA puede ser aislada de las partículas del fago y usadas como molde para determinar la secuencia nucleotídica del DNA insertado, para mutagénesis sitio-dirigida, y para la síntesis de sondas específicas. (Sambrook, 1989).

Mapa del Vector pUC118.

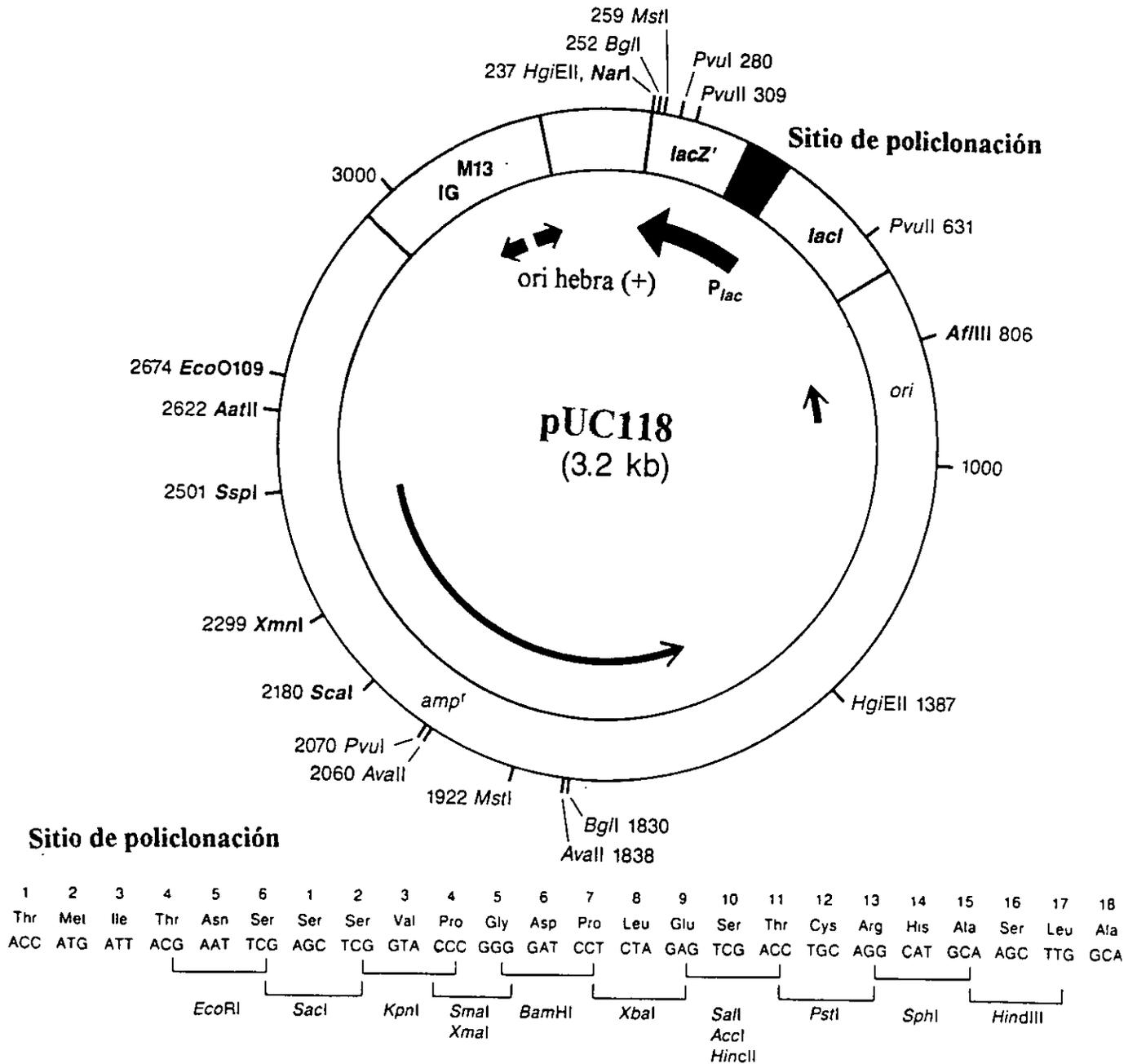


Figura 3 Mapa del vector pUC118

IV. JUSTIFICACION

Siendo la conglutina gama una proteína rica en aminoácidos esenciales, que además es susceptible a la degradación enzimática cuando previamente se le ha desnaturalizado a un pH ácido, condición que teóricamente se presenta en el estómago. Hacen que este compuesto sea considerado como una fuente alternativa de proteína para consumo humano.

Por lo que se propone, mediante la tecnología del DNA recombinante, clonar un fragmento de la conglutina gama en el plásmido pUC118 de una cepa de *E. coli*.

V OBJETIVOS

5.1 Objetivo General:

- Clonar y caracterizar un fragmento de conglutina γ (gama) rico en aminoácidos esenciales de *Lupinus campestris* en el plásmido pUC118 de *E. coli*.

5.2 Objetivos Específicos:

- Amplificar mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) un fragmento de 630 pb del gen de la conglutina γ (gama) de *Lupinus campestris* rico en aminoácidos esenciales: metionina y cisteína.
- Insertar el producto de PCR en el vector pUC118
- Introducir el vector con el inserto a células competentes de *E. coli* y sembrar en medio con antibiótico.
- Aislar las células recombinantes en base a la pérdida del gen de la β -galactosidasa.
- Confirmar la presencia de la inserción del fragmento en las colonias recombinantes, por digestión del plásmido con la enzima BglI.

VI. ESTRATEGIA

Meta 1. Aislar el DNA total de células de *L. campestris*

Meta 2. Amplificar por Reacción en Cadena de la Polimerasa el fragmento del gen que codifica para la conglutina γ .

Meta 3. Mediante electroforesis en gel de agarosa identificar el fragmento del gen que codifica para la conglutina γ (producto de PCR).

Meta 4. Purificar el producto de PCR utilizando el sistema de GlassMax.

Meta 5. Digerir con las enzimas de restricción Eco RI y Bam HI el fragmento del gen de la conglutina γ

Meta 6. Cortar el plásmido pUC118 con las enzimas de restricción Eco RI y Bam HI.

Meta 7. Insertar el fragmento del gen de la conglutina γ en el plásmido pUC118

Meta 8. Transformar células competentes de *E. coli* con el DNA recombinante.

Meta 9. Seleccionar a las colonias blancas crecidas en medio con X-Gal y antibiótico.

Meta 10 Caracterizar la inserción del fragmento de conglutina gama en el vector de las colonias recombinantes, mediante la determinación del peso molecular del plásmido, cortado con la enzima de restricción BglI.

VII. MATERIAL Y METODOS

7.1 Soluciones y Reguladores.

Tris-HCl 1 M pH 8.0:

Se disolvieron 121.1 g de Tris base en 800 ml de agua desionizada. Se ajustó el pH a 8.0 adicionando HCl concentrado, verificando con el potenciómetro, se aforó la solución con agua desionizada a 1 litro, se esterilizó durante 15 minutos a 15 libras/plg² de presión.

Regulador de TBE 10X (Tris-Boratos):

Tris	108 g
Ácido bórico	55 g

Adicionar 4 ml de EDTA 0.5 M pH 8 y aforar hasta 1 litro con agua destilada. Para la electroforesis en gel de agarosa se utilizó una dilución 1:10.

Regulador de reacción para PCR 10X:

25 mM de MgCl₂, 500 mM de KCl, 100 mM de TRIS-HCl pH 9.0 y 1 % de tritón X-100.

Bromuro de etidio 10 mg/ml:

Para teñir el gel, se diluyen 3 µl de esta solución en 100 ml de agua de la llave, el gel se deja 1 minuto en la solución, después se enjuaga 3 veces con agua de la llave.

Colorante de corrimiento:

Azul de bromofenol 0.2%, cianol de xileno 0.2 %, glicerol 6.25%, EDTA 0.25 M.

Para preparar 10 ml:	Azul de bromofenol	20 mg
	Cianol de xileno	20 mg
	Glicerol	625 µl
	EDTA	0.93 gr.
	Agua destilada	aforar a 10 ml.

Regulador Low TE (Baja capacidad reguladora):

Tris-HCl	10 mM (pH 7.4)
EDTA	1 mM (pH 8.0)

Solución de fenol saturado:

Para las extracciones con fenol, éste se trató previamente con una solución de tris-HCl 1M pH 7.5, hasta que el fenol presentó un pH de 7.5, verificándose con papel pH.

Preparación de RNAsa:

Se preparó RNAsa pancreática (RNAsa A) a una concentración de 10 mg/ml en acetato de sodio 0.01 M pH 5.2 y se distribuyó en alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf. Se calentaron a 100°C por 15 minutos en baño maría. Las alícuotas se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Preparación de TE pH 8.0:

Se adicionaron 2.5 ml de Tris-HCl 1M pH 8 y 0.5 ml de EDTA 0.5 M a pH de 8 a 50 ml de agua desionizada, se mezcló y se aforó a 250 ml con agua desionizada para obtener una solución a una concentración de 10 mM tris-HCl y 1 mM EDTA. La solución obtenida de TE se esterilizó a 15 libras/plg² de presión por 15 minutos.

Regulador de extracción:

Tris HCl pH 7.5	100 mM
MgCl ₂	25 mM
EDTA	25 mM
2-Mercaptoetanol	14 mM
Triton X100	2% (v/v)
Acetato de sodio	1.4 M

Regulador para restricción:

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)
10 mM MgCl ₂
50 mM NaCl

Regulador para ligación:

250 mM Tris-HCl (pH 7.6)
50 mM MgCl ₂
5 mM ATP
25% PEG 6000 (polietilen glicol)

Solución de unión a GlassMax : NaI 6 M

Regulador TAE 1X

40 mM Tris-acetato.

1 mM EDTA a pH 8.3.

Regulador de lavado:

Regulador de lavado concentrado (Gibco BRL)	37.5 μ l
Agua destilada	712 μ l
Etanol absoluto	750 μ l

7.2 Medios de Cultivo

Para el cultivo de *E. coli* se utilizó el medio YT preparado de acuerdo a la siguiente formulación:

Bactotripton	8 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Agar	17.5 g
Agua destilada para aforar a	1 litro

Se disolvieron los componentes en 800 ml de agua destilada, se aforó a 1 litro y se esterilizó durante 15 libras/plg² de presión por 15 minutos. Antes del vaciado en las placas se dejó enfriar hasta 50°C y se vaciaron 20 ml en cada placa. Para las placas con ampicilina se adicionó el antibiótico al medio a una concentración final de 50 μ g/ml.

Medio LB/Amp/X-gal:

Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Agua destilada para aforar a	1 litro

Se esteriliza en autoclave, se enfría a 65°C, se agrega ampicilina (concentración final de 100 μ g/ml) y X-gal (concentración final de 33 μ g/ml).

Medio S.O.C:

Bactotripton	2 %
Extracto de levadura	0.5%
NaCl	10 mM
HCl	2.5 mM
Mg ⁺²	20 mM (a partir de una solución patrón 2 M filtrada esterilizada 1 M MgCl ₂ ·6 H ₂ O, 1 M MgSO ₄ ·7H ₂ O)

Glucosa 20 mM (de una solución patrón filtrado esterilizado 2 M). Se mezcla bactotripton, extracto de levadura, NaCl y HCl en agua destilada, se esteriliza en autoclave, se enfría a temperatura ambiente, después se agrega la solución patrón filtrada esterilizada de Mg⁺² y de glucosa.

Las muestras biológicas de *Lupinus campestris* fueron proporcionadas por el CEPROBI (Centro de Productos Biológicos) del estado de Morelos.

7.3 Métodos**a) Aislamiento de DNA total**

Extracción de DNA de hoja de *Lupinus campestris*.

Se utilizó una proporción de 2.5 ml de regulador de extracción por gramo de muestra. Se pesaron de 5 a 10 gr. de hojas frescas de *L. campestris*, se homogeneizó en potter y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se precipitó durante 1 hora con un volumen de isopropanol frío (-20°C). Enseguida se centrifugó a 12 000 rpm por 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70% dos veces. Se dejó secar hasta eliminar totalmente el alcohol y se resuspendió en 10-30 µl de regulador Low TE, dependiendo de la cantidad de muestra. A continuación se realizó una extracción con fenol-TE pH 8, se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos se recuperó la fase acuosa, este paso se repitió dos veces. También se llevó a cabo una extracción fenol-cloroformo, se centrifugó a 10 000 rpm por 5 minutos. Enseguida se realizó una extracción con cloroformo, se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos y se recuperó la fase acuosa. Se precipitó durante una hora con dos volúmenes de isopropanol frío (-20°C). Se lavó dos veces con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 10-30 µl de regulador Low TE.

La muestra se trató con RNAsa por una hora a 37⁰C a una concentración final de 10 mg/ml y se repitieron las extracciones con fenol, fenol-cloroformo y cloroformo. Se precipitó nuevamente con isopropanol y se lavó con etanol al 70%. Finalmente se resuspendió la pastilla de DNA con 5 µl de regulador Low TE por cada gramo de muestra empleada.

b) Diseño de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR de un fragmento del gene de conglutina γ (gama)

Para la amplificación por PCR de un fragmento de la conglutina gama (γ) de 630 pb. Se diseñaron en base a la secuencia de *Lupinus angustifolius*, los oligonucleótidos 112 y 712, los cuales generan un producto en los que se incluyeron sitios de corte para las endonucleasas de restricción EcoRI y BamHI, presentes también en el vector pUC118. Permitiendo además la entrada en fase y en la dirección correcta del inserto, y tiene también incluida una señal de terminación para la traducción de la proteína.

Proceso del diseño de los oligonucleótidos iniciadores para la amplificación por PCR.

(A)- Secuencia reportada del gene de conglutina gama en *Lupinus angustifolius* (Kolivas, 1993).

(B)- Oligonucleótidos diseñados para amplificar un producto de 630 pares de bases

(A)- 5' tca tta tat cat aat tct caa 3'

(B)- 5' tca tta tat cag aat tct caa 3'

(A)- 5' gct ata tta ttc gga gat att aat gac cca 3'

secuencia complementaria 3' cga tat aat aag cct cta taa tta ctg ggt 5'

secuencia invertida 5' tgg gtc att aat atc tcc gaa taa tat agc 3'

(B) 5' tgg gtc att agg atc ccc gaa **tta** tat agc 3'

ALTO

Oligonucleótido	5'-----3'	longitud en nucleótidos
112	5' <u>tcattatcagaattct</u> caa 3'	21
712	5' tgggtcatt <u>aggatcccc</u> gaattatatagc 3'	30

Las secuencias subrayadas son reconocidas por la enzima de restricción EcoRI en el oligo 112 y por la enzima BamHI en el oligo 712, que se encuentran también en el plásmido pUC118, lo que permite la entrada en fase y en la dirección correcta del inserto en el vector, por otro lado el oligo 712 presenta además una señal de terminación para la síntesis de la proteína.

c) Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Los oligonucleótidos para realizar la amplificación por PCR fueron adquiridos de Genosys Biotechnologies Inc.

Se preparó la mezcla de reacción para la amplificación de la siguiente manera:

Reactivos	Volumen / 100 μ l	Concentración Final
Oligo iniciador 112	1 μ l	0.2 μ M
Oligo iniciador 711	1 μ l	0.2 μ M
Regulador de reacción 10X	10 μ l	1 X
Mezcla de dNTP's (2 μ l c/u)	8 μ l	0.2 mM
DNA molde	1 μ l	1 ng/ μ l
H ₂ O para HPLC	78.5 μ l	-----
Enzima Taq polimerasa	0.5 μ l	2.5 unidades/100 μ l.
Aceite mineral	2 gotas	-----

Se colocaron los tubos eppendorf con la mezcla en el termociclador modelo MiniCyclerTM marca MJ Research. Se incubaron a 95°C por 5 minutos, posteriormente se agregaron 0.5 μ l de la enzima Taq DNA polimerasa (2.5 unidades). Se inició el programa que corresponde a las siguientes temperaturas y tiempos:

Paso	Etapa	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización	96°C	1 minuto
2	Alineamiento	40°C	1 minuto
3	Extensión	72°C	1 minuto
4	Extensión final	72°C	5 minutos

Se repiten los pasos 1 a 3 por 29 ciclos.

Al finalizar la incubación el producto de amplificación de PCR se analizó en gel de agarosa al 1%

Producto amplificado por PCR

```

1  S  L  Y  Q  N  S  Q  P  T  S  S  K  P  N  L  L  V  L  P  V
2  tca tta tat cag aat tct caa ccc act tct tct aaa cca aac ctc ctt gtt cta ccc gtt
1  Q  E  D  A  S  T  G  L  H  W  A  N  I  H  K  R  T  P  L  M
2  caa gaa gat gct tca acc gga ctt cat tgg gcc aat atc cat aag aga aca cca ctt atg
1  Q  V  P  L  L  L  D  L  N  G  K  H  L  W  Y  T  C  S  Q  H
2  caa gtt cca ctc cta cta gac cta aat ggt aaa cac tta tgg gta aca tgt tcc caa cac
1  Y  S  S  S  T  Y  Q  A  P  F  C  H  S  T  Q  C  S  R  A  N
2  tac tca tct tca aca tac caa gca cca ttt tgt cac tcc act caa tgc tct aga gcc aac
1  T  H  Q  C  F  T  C  T  D  S  T  T  T  R  P  G  C  H  N  N
2  act cac caa tgc ttc act tgc acc gat tca acc aca aca aga ccg ggt tgc cat aac aac
1  T  C  G  L  L  S  S  N  P  V  T  Q  E  S  G  L  G  E  L  A
2  aca tgt ggc ctc ttg tct agt aac ccg gtt act caa gaa agt ggg tta ggt gag ctt gca
1  Q  D  V  L  A  I  H  S  T  H  G  S  K  L  G  P  M  V  K  V
2  caa gat gta cta gct ata cat tca act cat ggc tcc aaa cta ggg cca atg gtt aaa gtc
1  P  Q  F  L  F  S  C  A  P  S  F  L  A  Q  K  G  L  P  N  N
2  cct caa ttc ctc ttc tct tgt gca cct tcc ttc ctt gcc caa aag ggt ctt cca aac aac
1  V  Q  G  A  L  G  L  G  Q  A  P  I  S  L  Q  N  Q  L  F  S
2  gtc caa ggt gct ctt ggg ctt ggt caa gca ccg att tca cta cag aac caa ctt ttc tcc
1  H  F  G  L  K  R  Q  F  S  V  C  L  S  R  Y  S  T  S  N  G
2  cac ttt gga ctc aaa cga caa ttc tct gta tgt ctc tct cgt tac tca aca tca aat ggt
1  A  I  ALTO F  G  D  P  N  D  P
2  gct ata taa ttc ggg gat cct aat gac cca

```

Secuencia teórica esperada del producto amplificado por PCR en base a los oligonucleótidos diseñados. 1- secuencia de aminoácidos en código de una letra. 2- secuencia completa del producto obtenido por PCR. La secuencia a la que se unen los oligonucleótidos iniciadores esta encerrada en un rectángulo, las secuencias de corte de EcoRI (**gaattc**) y BamHI (**ggatcc**) subrayadas y resaltadas en "negritas" y la secuencia de "alto" escrita con letra itálica.

d) Electroforesis en gel de agarosa

Se colocaron 10 μ l de las muestras del producto de amplificación por PCR mezclados con 2 μ l de colorante de carga (40% sacarosa y 0.8% de azul de bromofenol) en un gel de agarosa al 1% preparado con regulador de borato (TBE 1X) se aplicó un voltaje constante de 70 volts. El corrimiento del gel se detuvo cuando el colorante llegó al extremo opuesto del gel. Las bandas del DNA se tiñeron con una solución de bromuro de etidio 10 mg/ml. Después de 5 minutos el gel se lavó con agua y las bandas se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

e) Purificación del producto de PCR y el vector pUC118 utilizando el sistema de aislamiento GlassMax.

El método de purificación de GlassMax se basa en hacer pasar el DNA a través de una membrana de sílica y por catálisis con yoduro de sodio 6M el DNA se pega a la matriz y es posible eliminar por lavados los contaminantes. Finalmente se eluye el DNA con ayuda de regulador TE a 65°C. Este DNA puede ser utilizado para clonación, secuenciación o PCR.

Este método de purificación reporta un 50% o más de eficiencia en la recuperación de DNA a partir de geles de agarosa, y una eficiencia de remoción de contaminantes de:

Tipo de contaminante	% de Remanencia	% de Eliminación
dNTP	0.1	99.9
Proteínas	0.2	99.8

Se calentaron 200 μ l de regulador TE 1X a 65°C en baño maría (esta solución se utilizó posteriormente para eluir el DNA de la matriz de GlassMax).

Se adicionaron 600 μ l de la solución de unión al GlassMax a la muestra de DNA, (que se obtuvo a partir de un gel agarosa) inmediatamente después se agregaron 30 μ l de regulador TAE 1X, se calentó la mezcla a 50 °C durante 5 a 7 minutos hasta que se fundió la agarosa. Se mantuvo la mezcla en hielo por 5 minutos. Se ensambló el GlassMax y se transfirió la mezcla al cartucho, posteriormente se centrifugó a 13 000 g por 20 segundos. Se removió el cartucho y se descartó el filtrado. Se agregaron 400 μ l de regulador de lavado frío al cartucho y se centrifugó a 13 000 g por 20 segundos, se removió el cartucho y se desechó el filtrado. Se repitió esto en dos ocasiones más.

Después de remover el último lavado, se centrifugó el cartucho por 1 minuto para eliminar totalmente el regulador. Se transfirió el cartucho a un nuevo tubo y se agregó por el centro 34 μl de regulador TE 1X a 65°C, es necesario incubar el sistema en el baño maría dos minutos a 65°C para mejorar el resultado. Se centrifugó a 13 000 g por 20 segundos para eluir el DNA y el cartucho es descartado. El DNA se almacenó en hielo.

f) Reacción de restricción del producto de PCR y del vector pUC118 con las enzimas EcoRI y BamHI

En dos tubos eppendorf se agregaron los siguientes reactivos:

- Tubo 1: 10 μl de DNA del producto de PCR (inserto)
 Tubo 2: 10 μl de DNA del vector pUC118. (vector)

Se agregaron los reactivos de acuerdo al siguiente orden:

Tubo	H ₂ O (μl)	Regulador para restricción	BamHI (10 U/ μl)	EcoRI (10 U/ μl)
1 (inserto)	5 μl	6 μl	3 μl	6 μl
2 (vector)	5 μl	6 μl	3 μl	6 μl

Se mezclaron suavemente y se incubaron las muestras a 37°C durante 1 hora. Para determinar si se produjo el corte por parte de las enzimas de restricción, los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa al 1%

g) Reacción de ligación del producto de PCR con el vector pUC118

Del paso anterior se calentó el tubo 1 (inserto) y el tubo 2 (vector) a 65 °C durante 10 minutos para inactivar las enzimas de restricción.

Se preparó un tubo de reacción con los siguientes componentes.

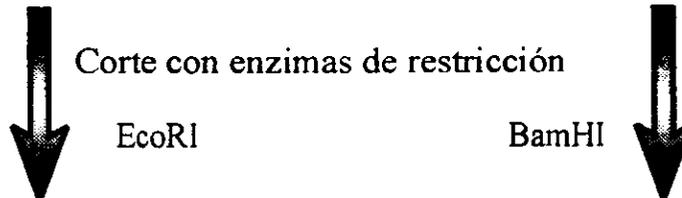
Vector: pUC118/ <i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i>	1 μl
Inserto: producto de PCR	8.5 μl
Regulador de ligación 5X	5 μl
Agua	9.5 μl
<u>T4 DNA ligasa (0.25 u)</u>	<u>1 μl</u>
Volumen total	25 μl

Se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas

Producción del DNA recombinante

Fragmento de la conglutina gama de 630 pares de bases producto de PCR

TCATTATATCAGGAATTCTCAA*****GCTATATAATTCGGGGATCCCTAATGACCCA
 AGTAATATAGTCTTAAGAGTT*****CGATATATTAAGCCCCTAGGATTACTGGGT



AATTCTCAA*****GCTATATAATTCTGGG
 GAGTT*****CGATATATTAAGCCCCTAG

Plásmido pUC118 que
 presenta sitios de corte
 para EcoRI y BamHI

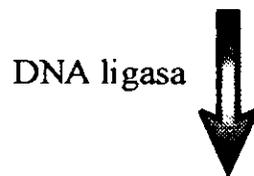
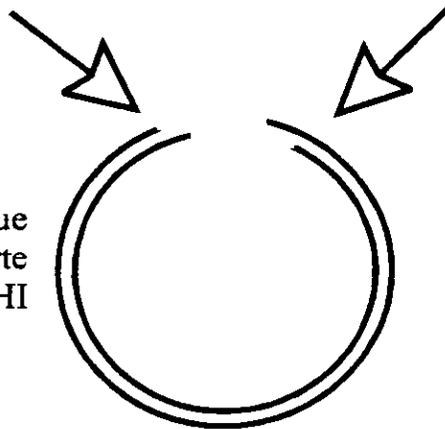


Figura 4. Producción del DNA recombinante. El fragmento de conglutina gama se cortó con las enzimas EcoRI y BamHI y se insertó en el plásmido pUC118

h) Transformación de células competentes de *E. coli*

Se utilizaron células competentes *E. coli* DH5 α de Life Technologies Library Efficiency.TM Esta cepa presenta α -complementaridad con el gen de la β -galactosidasa del fagémido pUC118. Se tomó una alícuota de 100 μ l de células competentes en un tubo falcon. Se agregaron 5 μ l del plásmido recombinante pUC118/conglutina γ . Se mezclaron suavemente las células durante 5 segundos. Posteriormente se incubaron en hielo por 30 minutos. Enseguida se incubaron en baño maría a 42°C durante 45 segundos. Después de esto se colocaron en hielo durante dos minutos. Se agregaron 900 μ l del medio SOC y se incubaron a 37°C con agitación suave durante una hora. Se tomaron 100 μ l de las células transformadas y se sembró en caja petri con medio LB/Amp/X-gal. Se incubó a 37°C toda la noche.

i) Selección de las recombinantes.

La selección de colonias blancas y azules permite distinguir las recombinantes de las no recombinantes debido a las características del vector y de *E. coli* DH5 α .

El vector pUC118 contiene un fragmento del operon lac, el cual codifica para un péptido (el péptido α del gen lacZ) que posee α -complementaridad con el péptido omega de la mutante del gen lac (mutante Δ Z) presente en la cepa hospedadora de *E. coli* DH5 α que restablece la actividad de β -galactosidasa.

La actividad de la enzima β -galactosidasa se detecta sembrando las células transformadas en medio selectivo que contiene un sustrato cromogénico (X-gal). El sustrato es transformado por la enzima en un color azul.

La inserción del fragmento del gen de la conglutina γ en el sitio de multiclonación del plásmido produce colonias blancas debido a la inactivación del péptido α , los plásmidos no recombinantes producen colonias azules.

j) Técnica a gran escala para la obtención de DNA plasmídico

Se creció un cultivo de 30 ml de la cepa bacteriana acarreadora del plásmido hasta una fase log. tardía (D.O.₆₀₀ aprox. 0.6). El cultivo puede ser inoculado con una colonia bacteriana aislada o con una alícuota de un cultivo líquido inoculado con una colonia aislada.

Se inoculó 500 ml de medio L precalentado a 37°C conteniendo la cantidad apropiada de antibiótico en un frasco de 2 litros con 25ml del cultivo en fase log tardía, se incubó el cultivo por exactamente 2.5 horas a 37°C con agitación vigorosa (300 ciclos/min.). La D.O.₆₀₀ del cultivo resultante debe ser de aproximadamente 0.4.

Opcionalmente: Se adicionó 2.5ml de una solución de cloramfenicol (34mg/ml en etanol) la concentración final del cloramfenicol es de 170mg/ml . Se incubó el cultivo por un periodo de 12-16 horas a 37°C con vigorosa agitación (300ciclos/min.).

La cosecha de las células bacterianas se realizó por centrifugación a 4000 rpm/15min. Se desechó el sobrenadante. Se lavó el paquete bacteriano con 100ml de STE pre-enfriado. Se resuspendió el paquete celular con 10 ml de una solución pre-enfriada de sacarosa al 10% en Tris- HCl (pH 8.0) se pasó la suspensión a un tubo de 30 ml.

Se agregaron 2 ml de solución de lisozima (10 mg/ml en 10mM Tris-HCl pH 8) preparada al momento. La lisozima no trabaja eficientemente si el pH de la solución es menor de 8.0. Se adicionaron 8 ml de 0.25M de EDTA (pH 8). Se mezcló la suspensión por inversión y se incubó por 10min en baño de hielo.

Se adicionaron 4 ml de SDS al 10% inmediatamente se mezcló girando sobre las paredes del tubo para que se disperse completamente el SDS sobre toda la suspensión bacteriana. Se debe realizar cuidadosamente para que se produzca el mínimo número de cortes en el DNA .

Tan pronto se mezclaron, se adicionó 6 ml de NaCl 5M (concentración final 1M). Se dejó reposar el tubo en hielo por lo menos una hora. Para remover el DNA de alto peso molecular y organelos celulares se realizó una centrifugación a 3000 rpm/30min a 4°C. Cuidadosamente se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio de 50 ml. Se realizó una extracción con fenol-cloroformo y una con cloroformo.

Se pasó la fase acuosa a un frasco de 250ml y se adicionaron 2 volúmenes de etanol a temperatura ambiente, se mezcló perfectamente y se dejó reposar a temperatura ambiente de 1-2 horas. Se recuperó el ácido nucleico por centrifugación a 5000g por 20 min. a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol al 70% a temperatura ambiente y se centrifugó a 5000g por 20 min. a 4°C. Se eliminó totalmente el etanol y se redisolvió el DNA con 3 ml de TE (pH 8.0).

Selección de las Recombinantes

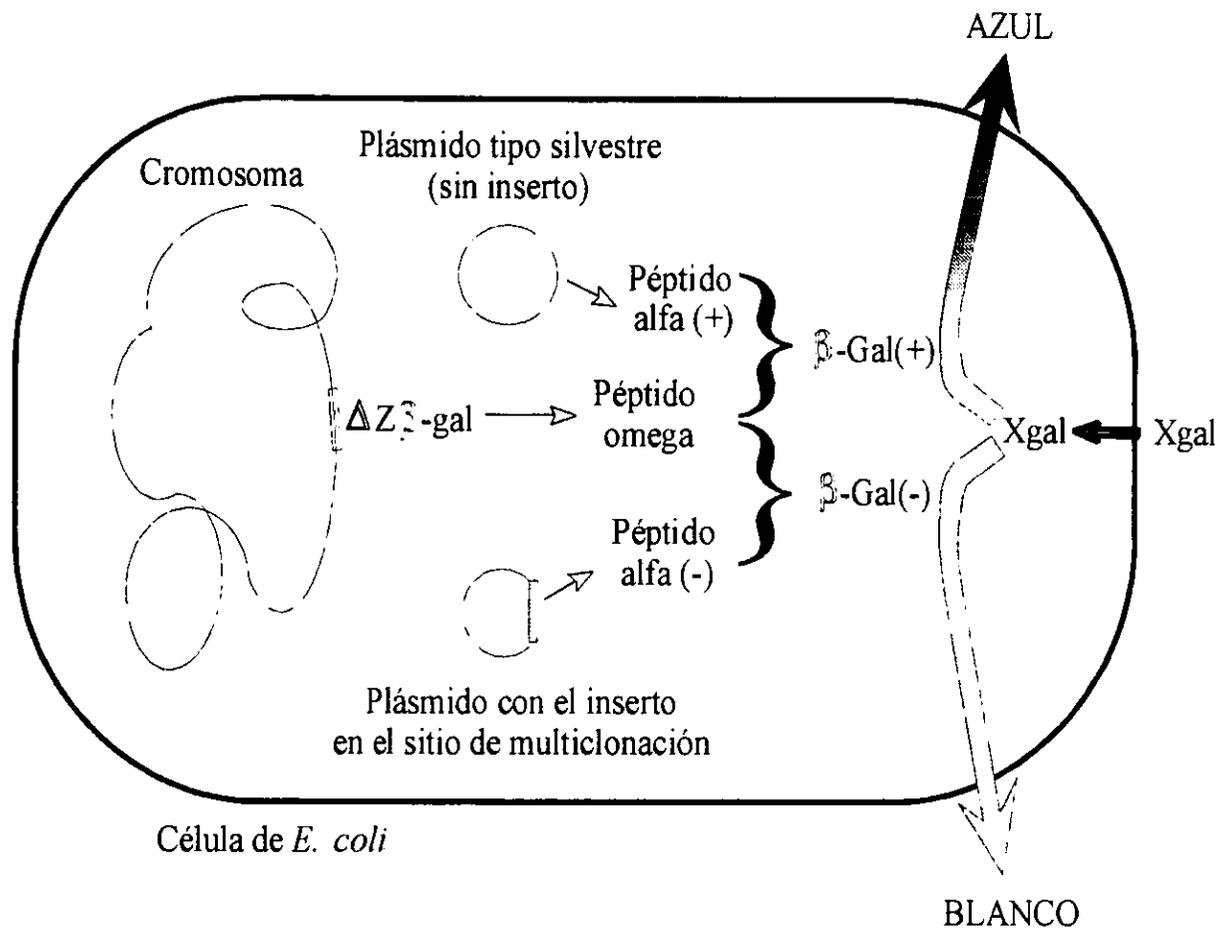


Figura 5. La cepa hospedadora de *E. coli* DH5α codifica para el péptido omega de la mutante del gen lac (mutante ΔZ) que posee alfa complementariedad con el péptido alfa del gen lac Z codificado por un fragmento del operón lac que se encuentra en el plásmido pUC118, genera una enzima β-galactosidasa activa. La actividad de la enzima β-galactosidasa se detecta sembrando las células transformadas en medio selectivo que contiene un sustrato cromogénico (X-gal). Este sustrato al ser metabolizado por la enzima produce colonias de color azul. Por otro lado al insertar el fragmento del gen de la conglutina gama en el sitio de policlonación del plásmido, se producen colonias blancas, ya que no se sintetiza el péptido alfa y no se lleva a cabo la α-complementariedad. Los plásmidos recombinantes forman colonias blancas.

k) Reacción de restricción del plásmido recombinante con la enzima BglI.

Se purificó DNA plasmídico de una colonia transformante (blanca).

En un tubo eppendorf se agregaron los reactivos de acuerdo al siguiente orden:

DNA plasmídico	H ₂ O (μ l)	Regulador para restricción	BglI (10 U/ μ l)
10 μ l	5 μ l	6 μ l	3 μ l

Se mezclaron suavemente y se incubó la muestra a 37°C durante 1 hora. Para determinar si se produjo el corte por parte de la enzima de restricción, el producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 1%

VIII. RESULTADOS.

8.1 Extracción del DNA de hojas de *Lupinus campestris*.

A partir de muestras de hojas frescas de *Lupinus campestris* colectadas en el estado de Morelos y proporcionadas por el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, se realizó la extracción del DNA genómico. Para determinar la calidad del DNA se llevo a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1%(fig. 6 carril 1). La integridad de este DNA se presenta de manera adecuada, por lo que se utilizó como molde para la amplificación de un fragmento de conglutina gama mediante reacción en cadena de la polimerasa.

8.2 Amplificación por PCR para obtener un fragmento de 630 pb. del gen de la conglutina gama.

Utilizando como DNA molde, el DNA genómico obtenido de las hojas de lupinus y con los oligonucleótidos iniciadores 112 y 712, se llevó a cabo la amplificación de una secuencia de DNA del gen de conglutina gama durante 30 ciclos (ver métodos) lo que generó un fragmento con un tamaño aproximado de 630 pb (fig. 1 carril 2). El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1%, la banda que se observa del producto de la reacción corresponde al tamaño esperado. Este producto de PCR se purificó cortando la banda presente en el gel de agarosa siguiendo el protocolo del sistema de GlassMax.

8.3 Clonación del producto de PCR.

El producto purificado de PCR se sometió a digestión con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI, lo que permitió tenerlo preparado para insertarlo en el vector pUC118. El vector pUC118 se obtuvo a partir de la célula hospedadora *Escherichia coli*. (fig. 7 carril 1). Este plásmido fue digerido con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI, (fig. 7 carril 2) las cuales reconocen también sitios similares en el producto de PCR, lo que permite que el fragmento de la conglutina gama entre en fase y en la dirección correcta en el vector. El plásmido digerido se purificó utilizando el sistema de GlassMax (fig.7 carril 3). La mezcla del vector y el fragmento de PCR, ambos digeridos con las enzimas EcoRI y BamHI, se colocaron en un tubo eppendorf junto con la DNA ligasa de T4 para la reacción de ligación, se incubaron a temperatura ambiente durante 3 horas (ver métodos). Esta mezcla generó el DNA recombinante formado por el fragmento de PCR ligado al vector pUC118 (pUC118/conglutina gama). El cual fue utilizado para la transformación de células competentes.



Figura 6. Obtención de un fragmento de 630pb empleando como molde el DNA genómico total de *L.campestris*. En la figura se muestra en el carril 1 el DNA genómico total extraído de las muestras de hojas de *Lupinus*. En el carril 2 se observa el producto de PCR obtenido después de 30 ciclos utilizando como molde el DNA genómico total y los iniciadores 712 y 112. En el carril 3 se muestra el marcador de peso molecular λ Hind III. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1%.

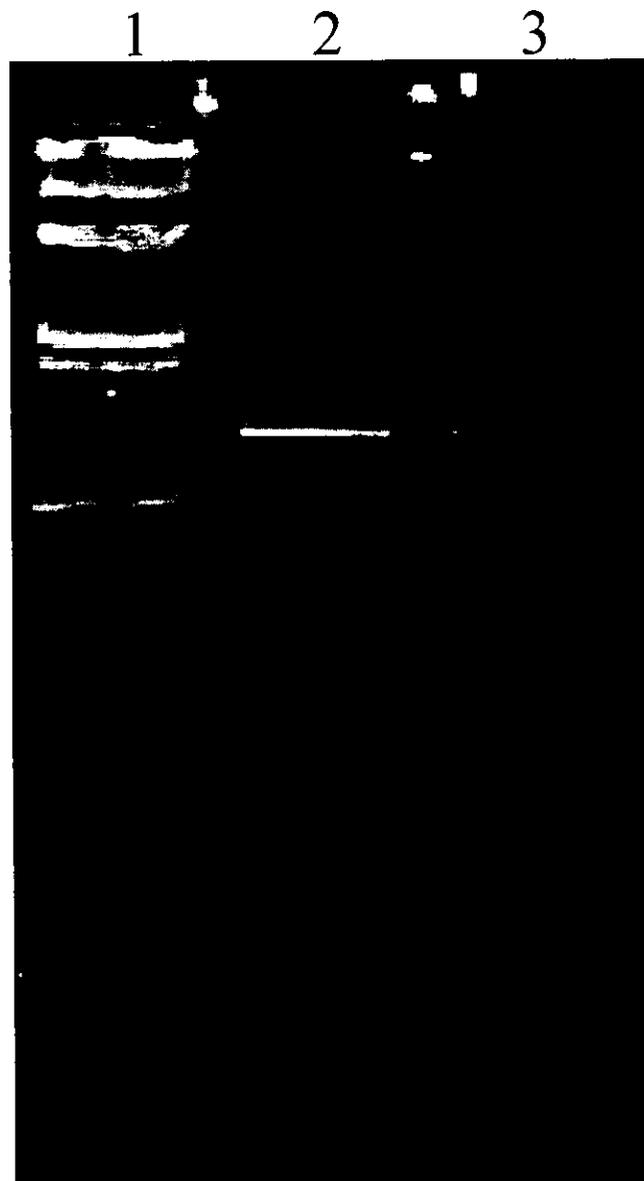


Figura 7. Digestión del plásmido pUC118. La figura muestra en el carril 1 el plásmido pUC118 en forma silvestre después de ser extraído de las células hospedadoras de *E. coli*. En el carril 2 se muestra el mismo plásmido después de ser sometido a una digestión con EcoRI y BamHI a 37°C durante 1 hora, esta banda tiene un tamaño cercano a los 3.2Kb. En el carril 3 se muestra el vector pUC118 digerido y después de la purificación utilizando el sistema Glass Max. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1%.

8.4 Transformación de células competentes para obtener cepas recombinantes.

El plásmido con el inserto (pUC118/conglutina gama) se utilizó para transformar células competentes *E. coli* DH5- α (Lifetechnologies). El plásmido pUC118 silvestre, tiene la característica de presentar α -complementariedad con el gen de la β -galactosidasa de las células de *E. coli*. La actividad de la enzima β -galactosidasa se detecta sembrando las células transformadas en medio selectivo que contiene LB/amp/X-gal. El sustrato cromogénico X-gal es transformado por la enzima en un color azul. De esta manera los plásmidos que no presentan el inserto generan colonias con una coloración azul. Por otro lado la inserción del fragmento del gen de la conglutina gama en el sitio de multiclonación del plásmido provoca la inactivación del péptido alfa por lo que los plásmidos recombinantes producen colonias blancas (fig 8).

La selección de las colonias que presentan el plásmido con el inserto, se llevo a cabo por la coloración, es decir, se escogieron colonias blancas como candidatas para caracterizar la inserción del fragmento de 630 pb de la conglutina gama en el plásmido

8.5 Caracterización de la inserción del fragmento de PCR en las colonias recombinantes.

De las colonias que recibieron el vector pUC118/conglutina gama y crecieron en medio LB/Amp/X-gal, se seleccionaron dos colonias blancas, (recombinantes) para caracterizar la inserción del fragmento de PCR en el plásmido. Se purificó el DNA de dos colonias que perdieron el gen de la β -galactosidasa (colonias blancas) y el DNA de una colonia azul (no recombinante) como control, para comparar el tamaño de los fragmentos, mediante la digestión con la enzima de restricción BglI. Los productos de la reacción de restricción se analizaron en una electroforesis de agarosa al 1%(fig. 9).

La enzima BglI corta en los sitios 252 y 1830 del vector pU118 silvestre (fig 3), los cuales se encuentran fuera de la región de multiclonación, que es la zona donde se insertó el fragmento de la conglutina gama.

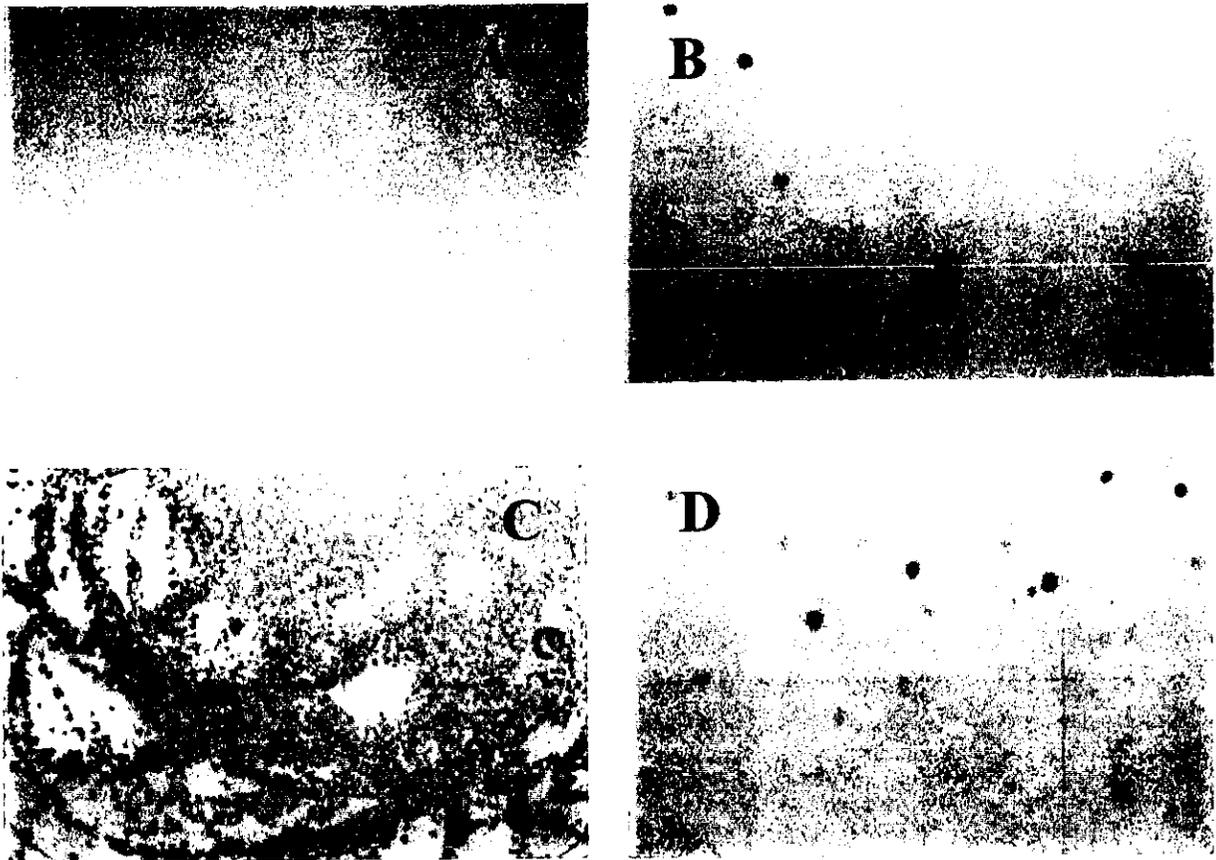


Figura 8. Crecimiento en placas de agar LB con ampicilina y X-gal. La figura muestra el crecimiento de las bacterias transformadas. Figura A. Testigo negativo, estas bacterias no recibieron el plásmido. Figura B Testigo de corte, en este caso las bacterias recibieron el plásmido cortado. Figura C Testigo positivo, estas bacterias recibieron el plásmido silvestre. Figura D Muestra problema, estas bacterias recibieron el plásmido tratado con el inserto de 630 pb.

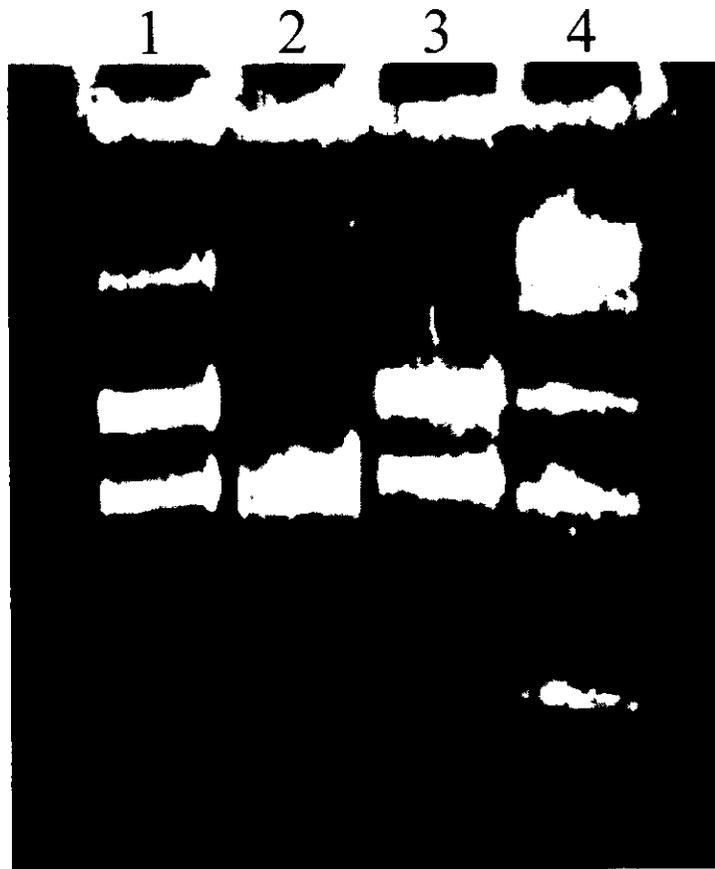


Figura 9. Digestión con BglI del plásmido pUC118 recuperado de las bacterias recombinantes. Carril 1 y 3 muestra la digestión del DNA plasmídico de una colonia incolora crecida en medio LB/Amp/X-gal, en este caso se observan 2 bandas de 2100 y 1600pb aproximadamente. Carril 2 muestra la digestión del DNA de una colonia de color azul, las bandas aquí presentes muestran tamaños de 1500 y 1600pb. Carril 3 Marcador de pesos moleculares. Las muestras se analizaron en una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

En base a la secuencia obtenida del gen de conglutina gama de *Lupinus angustifolius* (Kolivas, 1993). Se analizó la frecuencia de utilización de los codones del fragmento teórico esperado del gen de la conglutina gama.

Producto amplificado por PCR

```

1  S  L  Y  Q  N  S  Q  P  T  S  S  K  P  N  L  L  V  L  P  V
2  tca tta tat cag aat tct caa ccc act tct tct aaa cca aac ctc ctt gtt cta ccc gtt
1  Q  E  D  A  S  T  G  L  H  W  A  N  I  H  K  R  T  P  L  M
2  caa gaa gat gct tca acc gga ctt cat tgg gcc aat atc cat aag aga aca cca ctt atg
1  Q  V  P  L  L  L  D  L  N  G  K  H  L  W  Y  T  C  S  Q  H
2  caa gtt cca ctc cta cta gac cta aat ggt aaa cac tta tgg gta aca tgt tcc caa cac
1  Y  S  S  S  T  Y  Q  A  P  F  C  H  S  T  Q  C  S  R  A  N
2  tac tca tct tca aca tac caa gca cca ttt tgt cac tcc act caa tgc tct aga gcc aac
1  T  H  Q  C  F  T  C  T  D  S  T  T  T  R  P  G  C  H  N  N
2  act cac caa tgc ttc act tgc acc gat tca acc aca aca aga ccg ggt tgc cat aac aac
1  T  C  G  L  L  S  S  N  P  V  T  Q  E  S  G  L  G  E  L  A
2  aca tgt ggc ctc ttg tct agt aac ccg gtt act caa gaa agt ggg tta ggt gag ctt gca
1  Q  D  V  L  A  I  H  S  T  H  G  S  K  L  G  P  M  V  K  V
2  caa gat gta cta gct ata cat tca act cat ggc tcc aaa cta ggg cca atg gtt aaa gtc
1  P  Q  F  L  F  S  C  A  P  S  F  L  A  Q  K  G  L  P  N  N
2  cct caa ttc ctc ttc tct tgt gca cct tcc ttc ctt gcc caa aag ggt ctt cca aac aac
1  V  Q  G  A  L  G  L  G  Q  A  P  I  S  L  Q  N  Q  L  F  S
2  gtc caa ggt gct ctt ggg ctt ggt caa gca ccg att tca cta cag aac caa ctt ttc tcc
1  H  F  G  L  K  R  Q  F  S  V  C  L  S  R  Y  S  T  S  N  G
2  cac ttt gga ctc aaa cga caa ttc tct gta tgt ctc tct cgt tac tca aca tca aat ggt
1  A  I  ALTO  F  G  D  P  N  D  P
2  gct ata taa ttc ggg gat cct aat gac cca

```

Secuencia teórica esperada del producto amplificado por PCR en base a los oligonucleótidos diseñados. 1- secuencia de aminoácidos en código de una letra. 2- secuencia completa del producto obtenido por PCR.

Los codones del fragmento de conglutina gama de frecuencia de uso mas bajo son los siguientes:

Aminoácido	Codon	Frecuencia de aparición en el fragmento de conglutina gama
Prolina	ccc	Dos
Leucina	cta	Siete
Arginina	aga	Tres
Cisteina	tgt	Cuatro
Isoleucina	ata	Dos
Arginina	cga	Uno

Tabla VI

IX. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.

La idea principal del clonaje molecular es insertar el segmento de DNA de interés en una molécula de DNA que se replica autónomamente, llamada vector de clonaje o vehículo, de forma que el segmento de DNA es replicado con el vector. El clonaje de este vector quimérico en un organismo huésped apropiado como *E. coli* resulta en la producción de grandes cantidades del segmento de DNA insertado. Si el gen clonado está flanqueado por secuencias de control (adecuadamente situadas) para la síntesis de RNA y proteína, el huésped puede producir también grandes cantidades del RNA y de la proteína codificados por este gen (Voet, 1992).

La extracción del DNA a partir de hojas frescas de *Lupinus campestris*, fue el paso inicial para la amplificación por PCR de un fragmento del gene de la conglutina gama, para posteriormente clonar esta secuencia de DNA en el vector pUC118.

El DNA genómico purificado de *lupinus* se analizó por medio de una electroforesis en gel de agarosa para observar su integridad, la banda que se presenta en la figura 6 carril 1 corresponde a una muestra del DNA total obtenido de las hojas de *lupinus*, se presenta una zona bien definida donde migró el DNA en el gel de agarosa y no se observa el barrido característico cuando el DNA está degradado, por lo que se consideró que el material genético se encuentra en buen estado para que sea utilizado como molde para la reacción de PCR.

Para la amplificación de un fragmento del gene de la conglutina gama se diseñaron los oligonucleótidos 112 y 712, los cuales presentan sitios de restricción para las enzimas EcoRI y BamHI. Se utilizó como DNA molde el obtenido de hojas frescas de *Lupinus campestris*. El producto de amplificación al ser analizado en un gel de agarosa genera una banda con un tamaño ligeramente mayor a la banda de referencia de 564 pb del marcador de peso molecular (fig.6 carril 2 y 3). El tamaño esperado del fragmento que se amplificó por PCR es de 630 pb. el cual corresponde a la migración de la banda observado en la electroforesis en gel de agarosa (fig 6 carril 2).

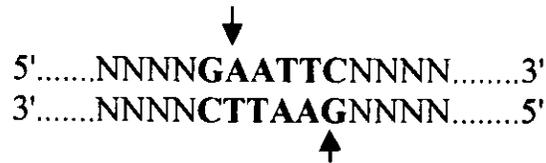
Se purificó el plásmido pUC118 extraído de la cepa hospedadora de *E. coli* y se analizó en una electroforesis (fig. 7 carril 1). Al analizar una muestra del vector mediante electroforesis en gel de agarosa, se observa que se presentan varias bandas las cuales corresponden a las distintas conformaciones que posee el plásmido debido al superenrollamiento, el cual es una propiedad topológica del DNA duplex circular cerrado covalentemente. Las diferentes conformaciones del DNA dadas por el grado de superenrollamiento provocan que la velocidad de migración en una electroforesis aumente con el grado de superhelicidad de las moléculas de DNA ya que se presentan estructuras compactas y retorcidas (Voet, 1992. Lewin 1997).

Al cortar con enzimas de restricción el DNA superenrollado, este se lineariza o se relaja, es decir se pierde el enrollamiento de la cadena de DNA sobre si misma. En la fig. 7 carril 2 se muestra una electroforesis en gel de agarosa del vector pUC118 digerido con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI, en la que se presenta una sola banda ya que el plásmido está linearizado, debido al corte provocado por las enzimas. En el carril 3 de la fig. 7 se muestra al plásmido digerido y purificado utilizando el sistema de Glass Max, el tamaño del plásmido corresponde a 3.2Kb.

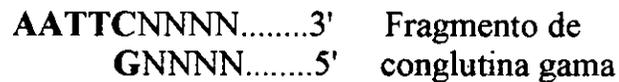
Una vez obtenido el fragmento de la conglutina gama amplificado por PCR y el vector pUC118 aislado de cepas de *E. coli* y purificado del gel de agarosa, se generó el DNA recombinante.

La unión de un fragmento extraño de DNA a un vector de clonación requiere una reacción entre los extremos del fragmento y los del vector. Ello se consiguió creando secuencias complementarias en el fragmento ya que el vector ya las presentaba, de modo que cuando se encontraran juntos pudieran recombinar para formar un DNA quimérico. Para lo cual se emplearon enzimas de restricción que hacen cortes en bisel, produciendo extremos cohesivos, es decir, uncatenarios y complementarios. Se utilizaron dos enzimas EcoRI y BamHI las cuales reconocen sitios en el fragmento de la conglutina gama amplificado por PCR con los oligonucleótidos 112 y 712 diseñados para generar esos sitios de corte, además el vector pUC118 también presenta sitios reconocidos por estas enzimas.

Eco RI reconoce una secuencia palindrómica que consiste de 6 bases (destacadas en negritas), y la enzima corta los enlaces indicados por las flechas verticales

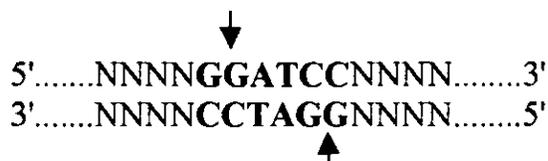


Los fragmentos de ADN a cada lado del sitio de corte se separan y como el corte se hace en bisel, los extremos poseen secuencias complementarias de ADN unicitenario



La complementariedad permite que los extremos cohesivos se unan por emparejamiento de bases. El corte con EcoRI produce siempre los mismos extremos cohesivos aunque las moléculas cortadas sean diferentes. Ello permite que las dos moléculas cortadas se unan.

El mismo mecanismo general sucede para la enzima BamHI la cual reconoce una secuencia palindrómica distinta de 6 bases:



Los fragmentos de ADN se separan y se generan extremos que poseen secuencias complementarias de ADN unicitenario



Después de la restricción del fragmento de conglutina gama y del plásmido, es necesario unirlos utilizando la DNA ligasa de T4 (ver métodos) la cual forma los enlaces covalentes entre el vector y el inserto de DNA. Este procedimiento generó el plásmido recombinante o quimérico (pUC118/conglutina gama).

Bajo este diseño experimental se producen ventajas importantes en la construcción del vector. Permite que el inserto entre en fase y en la dirección correcta en el plásmido. Por lo que se mantiene el marco de lectura, es decir, ya que el código genético se lee en grupos de tres nucleótidos (codón) cada uno de los cuales representa un aminoácido, la secuencia nucleotídica de la cadena de DNA insertado, corresponderá a la secuencia esperada de aminoácidos de la proteína. Además en la posición 5' de la zona de policlonación del vector, se encuentra el promotor del operón lac, lo que provoca que la RNA polimerasa se una a los sitios de iniciación y transcriba un RNA mensajero que posea la secuencia del fragmento de conglutina. Otra característica importante es la presencia de un codón de terminación en el extremo 3' del inserto, ya que los codones de terminación unen factores de liberación, que inducen que la peptidil transferasa hidrolice el enlace peptidil-tRNA, esto trae consigo el dejar de incorporar aminoácidos a la cadena polipeptídica, es decir, indica que finaliza la traducción. Lo anterior son condiciones importantes a considerar, cuando se plantea la expresión de un gen que ha sido manipulado para ser introducido a una célula.

Por otro lado en el plásmido recombinante los sitios de corte de las dos enzimas (EcoRI y BamHI) no se pierden, lo que es muy útil en caso de querer recuperar el fragmento del gen de la conglutina gama.

Después de construir el vector recombinante (pUC118/conglutina gama) se procedió a transformar células competentes.

El huésped bacteriano incorpora un plásmido si los dos se ponen en contacto en un proceso que es facilitado enormemente por la presencia de Ca^{2+} (que se cree aumenta la permeabilidad de la membrana). Un vector plasmídico absorbido llega a establecerse permanentemente en su huésped bacteriano (transformación) con una eficiencia de 0.1% aprox. (Voet, 1992).

En este caso se utilizaron células competentes *E. coli* DH5 α de alta eficiencia de transformación de Lifetechnologies. El plásmido pUC118 produce el péptido α de la β -galactosidasa el cual complementa la delección de la mutante *lac* en la cepa de *E. coli*. Cuando las células son transformadas con plásmidos no recombinantes se

generan colonias azules al ser crecidas en placas que contienen X-gal, por otro lado los vectores con el inserto producen colonias blancas (fig 5).

En la figura 8 se muestra el crecimiento de las células de *E. coli* transformadas en placas de medio LB con ampicilina y X-gal. La fig. A corresponde a un control negativo, son bacterias que no recibieron el plásmido, ya que únicamente el vector presenta el gen de resistencia a ampicilina, solo podrán crecer aquellas células que posean el gen de resistencia al antibiótico, por lo tanto no hay crecimiento de las células que no recibieron el vector. La fig. B muestra el crecimiento de las bacterias que recibieron el plásmido cortado con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI, pero sin el fragmento del gen de la conglutina, en este caso se observa una densidad muy baja de crecimiento de colonias, además todas presenta la coloración azul, aquellas que crecieron incorporaron el plásmido, el cual probablemente se recircularizó o alguno de los plásmidos que fue adsorbido no se cortó por las enzimas de restricción, dándole a las células la resistencia al antibiótico y la capacidad de producir la enzima β -galactosidasa activa, proporcionando una coloración azul a las colonias crecidas en la placa.

En el tratamiento de las células competentes con el plásmido pUC118 silvestre, es decir, sin el inserto, pero el plásmido cerrado, la densidad de colonias que crecieron es muy alta al comparar el crecimiento con los otros tratamientos (fig 8C), además todas las colonias presentan la coloración azul, lo que indica que se trata del plásmido circular sin el inserto de la secuencia del fragmento del gen de la conglutina gama.

En la figura 8D se muestra el resultado del crecimiento cuando se mezclaron las células competentes con el plásmido recombinante (pUC118/conglutina gama), en este caso se presentan tanto colonias azules como colonias blancas. Todas las células que crecieron son resistentes a ampicilina por poseer este gen que se encuentra en el vector, sin embargo las colonias blancas tienen interrumpido el gen que codifica para el péptido alfa que complementa con el péptido omega de la β -galactosidasa presente en el cromosoma bacteriano, por lo que no pueden metabolizar el sustrato cromogénico X-gal. Lo que indica que la interrupción del péptido alfa es debida a la inserción de una secuencia de ADN.

Para caracterizar el inserto presente en el vector se purificó el DNA plasmídico de dos colonias blancas y de una colonia azul que sirvió de control para comparar. El DNA obtenido se sometió a restricción con la enzima BglII, la cual reconoce dos secuencias en el vector silvestre, en los sitios 252 y 1830, estos se

encuentran fuera de la región de multiclonación (fig 3). Las bandas producidas por la restricción del DNA plasmídico se muestran en la figura 9, el carril 1 y 3 presentan el resultado obtenido de dos colonias blancas, en donde se observan dos bandas de 2100 y 1600 pb aproximadamente. Por otro lado la digestión del DNA plasmídico obtenido de una colonia azul, genera dos bandas con tamaños de 1500 y 1600pb aproximadamente (fig. 9 carril 2). La banda de 1600 se mantiene en los tres carriles, sin embargo las colonias blancas generan un fragmento mayor de aproximadamente 2200 y el segmento de 1500 no se presenta. Esto es debido a la inserción en el vector de una secuencia de DNA de aproximadamente 630pb que se generó por PCR. Como se ejemplifica en la figura 10.

Los resultados analizados anteriormente sugieren que el segmento que se insertó en el vector pUC118 corresponde al producto obtenido por PCR, el cual es un fragmento generado por los oligonucleótidos 112 y 712 diseñados para amplificar un segmento de la secuencia del gen de conglutina gama derivado de *Lupinus campestris*.

Por otro lado, hay que considerar algunos aspectos para futuros experimentos de expresión. Ya que la velocidad a la cual se traduce el mensaje contenido en la molécula de mRNA a su respectiva cadena polipeptídica puede ser controlada, en parte por su contenido de codones que sean reconocidos por las moléculas mas abundantes de tRNA disponibles. En los genes de organismos superiores los codones tampoco son utilizados al azar, sin embargo existen variaciones importantes en la frecuencia de utilización de codones de organismo a organismo. Este es un aspecto que debe tomarse en cuenta cuando se plantea la expresión de un gen ajeno, ya que el empleo de genes con codones de baja frecuencia de utilización puede resultar en una baja expresión del producto génico de interés.

En base a la secuencia obtenida del gen de conglutina gama de *Lupinus angustifolius* (Kolivas, 1993). Se analizó la frecuencia de utilización de los codones del fragmento teórico esperado del gen de la conglutina gama (tabla VI).

La cantidad de codones de utilización de frecuencia baja presentes en el fragmento de conglutina gama son 19, tomando en cuenta que el número total de aminoácidos en el fragmento es de 198, la proporción de codones de frecuencia baja es de 9.5% lo cual no es significativo para considerarlo como un factor que afecte la expresión del gen en el vector pUC118 que es donde se clonó.

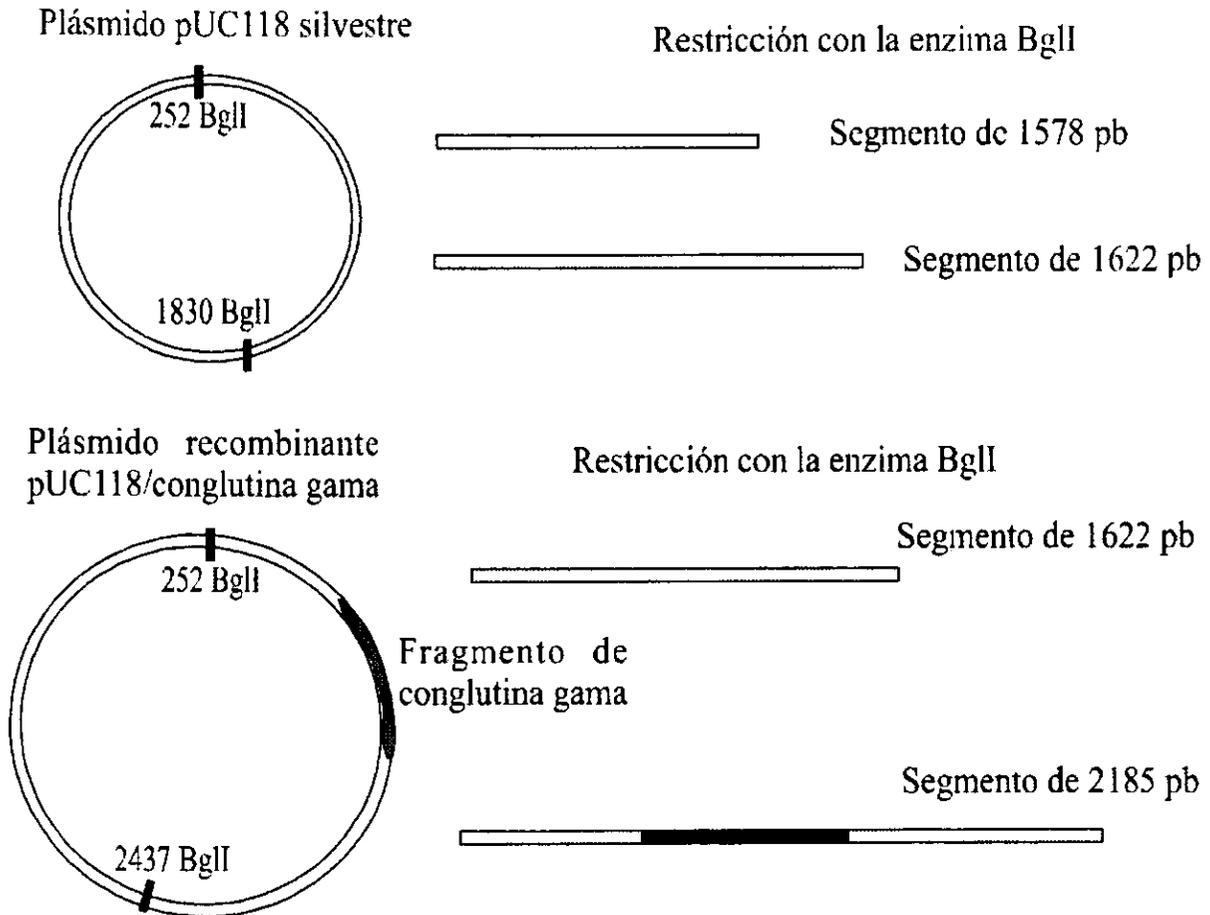


Figura 10 Caracterización del inserto en el plásmido recombinante

Sin embargo, también hay que considerar que las proteínas de las células vivas sufren un recambio permanente. Este recambio controla el nivel de enzimas reguladores y permite la eliminación de proteínas anormales que de otra forma interferirían con los procesos celulares. Por lo que se sugiere llevar a cabo estudios induciendo a las células transformantes con IPTG para determinar la expresión del fragmento clonado en las cepas recombinantes.

X. CONCLUSIONES

- A partir de DNA obtenido de *Lupinus campestris* y utilizando los oligonucleótidos 112 y 712, se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa un producto de 630 pb.

- Se generó el plásmido recombinante formado por el vector pUC118 más el producto de amplificación por PCR.

- Las cepas recombinantes perdieron la capacidad de metabolizar el sustrato cromogénico X-gal, debido a la inserción de una secuencia de DNA en el plásmido pUC118.

- Las colonias transformadas presentan un inserto en el vector pUC118 que corresponde al producto obtenido por PCR, el cual es un fragmento generado por los oligonucleótidos 112 y 712 diseñados para amplificar un segmento de la secuencia del gen de la conglutina gama derivado de *Lupinus campestris*.

XI. BIBLIOGRAFIA

- Aguilera J. M., Tier A. 1978. The revival of the lupin. *Food Technol.* 32: 70-76.
- Aguilera J. M. 1989. Development of Processes and uses of lupins for food. En: *Proceedings of the world congress vegetable protein utilization in human food and animal feedstuffs.* Thomas M. Apple White. American O. L. Chemistry Society. Illinois pp 139-142.
- Bangnam, R. M. 1994. The Polymerase Chain Reaction in *Methods in Molecular Biology. Protocols in Human Molecular Genetics.* Mathew Ch. G. Vol. 9 pp 1-8.
- Barrera S. H., Ortiz L. R., Rojas M. A., Reséndez P. D. 1993. Reacción en Cadena de la Polimerasa. *Ciencia y Desarrollo.* 28, 108: 50-60.
- Berião da Costa, M. L., 1993. Lupin Technology: Perspectives. 500-502. En VIIth International Lupin Conference Evora, Portugal. Neves J. M. y Berião da Costa, M. L (Editors). Instituto Superior de Agronomia-Technical University of Lisbon Portugal.
- Blagrove R., Gillespie J. M. 1975. Isolation, purification and characterization of seed globulins of *Lupinus angustifolius*. *Aust. J. Plant. Physiol.* 2: 13-27.
- Blagrove R., Gillespie J. M., Lilley G. G., Woods E. F. 1980. Physicochemical studies of conglutin γ a storage globulin from seeds of *Lupinus angustifolius*. *Aust. J. Plant. Physiol* 7: 1-13.
- Borroto K., Dure L. 1987. The globulin seed storage proteins of flowering plants are derived from two ancestral genes. *Plant. Mol. Biol.* 8: 113-131.
- Bourges R. H. 1987. Las leguminosas en la alimentación humana. Cuadernos de nutrición. Vol. 10. No 2. pp 17-32.
- Bressani R., Elias G., Molina R. 1976. Estudios sobre la digestibilidad de la proteína de varias especies de leguminosas. *Archivos latinoamericanos de nutrición.* Vol 27 (2): 215-231.
- Brock D. T., Madigan T. M. 1991. *Microbiología.* Ed. Prentice Hall Hispanoamerica. S.A. México. pp 648, 715.

- Casey R., Domoney C., Ellis N. 1986. Legume storage proteins and their genes. Oxford Surveys Plant. Mol. Cell Biol. 3: 1-95.
- Citharel J., Dellamare D. 1989. Synthesis of γ -conglutin during seed maturation in *Lupinus albus*. Plant. Physiol. Biochem. 27: 211-218.
- Coffey, R. 1989. Lupins as Energy -rich protein source for feed and food. En: Proceedings of the world congress vegetable protein utilization in human food and animal feedstuffs. Thomas M. Apple White. American O. L. Chemistry Society. pp 410-414.
- Danielsson, C. E. 1949. Seed globulins of the gramineae and leguminosae. Biochem. J. 44: 387-400.
- Dávila, O. G., Sepúlveda J. G., Rodríguez A. L., Bermúdez T. K., 1995. Lupino ¿para que domesticarlo? En: Plantas: Biotecnología, Agronomía, Nutrición. Eds Bermúdez K. T. y Jiménez P. COFAA-IPN. México. pp 56-66.
- Decker, J. E., Gwozdz, E. A. 1991. Storage globulins synthesised in vitro by polyribosomes and mRNA from developing seeds of *Lupinus luteus*. Plant Physiol. Biochem. 29: 269-280.
- Dunn, David B. Lupinus, in Flora Fanerogámica del Valle de México, by J. Rzedowski and G. C. de Rzedowski. pp 326-338. México, D.F., 1979.
- Duranti M., Cerletti P., 1979. Amino acid composition of seed proteins of *Lupinus albus*. J. Agri. Food. Chem., 27: 977-978.
- Duranti M., Restani P., Poniatowska M., Cerletti P., 1981. The seed globulins of *Lupinus albus*. Phytochemistry. 20: 2071-2075.
- Duranti M., Cucchetti E., Cerletti, P. 1984. Changes in composition and subunits in storage proteins of germinating lupin seeds. J. Agric. Food. Chem. 32: 490-493.
- Duranti M., Faoro F., Harris N. 1991. Inmunocytochemical localization of conglutin γ and legumin-like globulin in developing and mature seeds of *Lupinus albus*. Protoplasma 161: 104-110.

- Duranti M., Gius C., Faoro F., Scarafoni A. 1994a. Heat induced synthesis and tunicamycin secretion of the putative storage glycoprotein conglutin γ from mature lupin seeds. *Eur. J. Biochem.* 222: 387-393.
- Duranti M., Faoro F., Harris N. 1994b. The unusual extracellular localization of conglutin γ in germinating *Lupinus albus* seeds rules out its role as storage protein. *J. Plant Physiol.* 143: 711-716.
- Duranti M., Gius C., Sessa F., Vecchio G. 1995a. The sacharide chain of lupin seed conglutin- γ is not responsible for the protection or the native protein from degradation by trypsin, but facilitates the refolding of the acid-treated protein to the resistant conformation. *Eur. J. Biochem.* 230: 886-891.
- Duranti M., Gius C., Scarafoni A. 1995b. Lectin-like activity of lupin seed conglutin γ , a glycoprotein previously referred to as a storage protein. *J. Exp. Bot.* 46, 287: 725-7228.
- Elleman, T. C. 1977. Amino acid sequence of the smaller subunit of conglutin γ , a storage globulin of *Lupinus angustifolius*. *Austr. J. Biol. Sci.* 30: 33-45.
- Esnault M. A., Merceur A., Citharel J., 1991. Characterization of globulins of yellow lupin seeds. *Plant. Physiol. Biochem.*, 29: 573-583.
- Esnault M. A., Cintharel J., Thomas D., Guegan P., Cavalier A. 1996. Behaviour of conglutin γ , a major lupin seed during germination. *Plant. Physiol. Biochem.* 34: (1) 101-109.
- Gayler, K., Boadle B., Snook M., Johnson D., 1984. Precursors of storage proteins in *Lupinus angustifolius*, *Biochem. Journal* 221: 333-341.
- Gillespie J. M., Blagrove R. J., 1974. Improving the content of essential amino acids in lupin seed. *Seach.*, 5: 600-601.
- Heidecker, G., Messing, J. 1986. Structural analysis of plants genes. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 37: 439-466.
- Ilgoutz C. S., Gayler K. R. 1995. Isolation of the conglutin gamma gene (GSDB accession number L39786) from *Lupinus angustifolius* L. (PGR95-024). *Plant Physiol.* 108: 1747.

- Ilgoutz, C. S., Knittel N., Lin M. J., Sterle S., Gayler R. K. 1997. Transcription of genes for conglutin γ and a leginsulin-like protein in narrow-leaved lupin. *Plant Molecular Biology*. 34: 613-627.
- Johnson, D., Knight, J., Gayler, R. 1985. Biosynthesis and processing of legumin-like storage proteins in *Lupinus angustifolius* (lupin). *Biochem. J.* 232: 673-679.
- Kagawa, H., F. Yamauchi, y H. Hirano. 1987. Soybean basic 7S globulin represents a protein widely distributed en legume species. *FEBS Lett.* 226: 145-149.
- Kirk, C. A., Mett V., Reynolds PHS. 1994. The aspartate aminotransferase-P1 gene from *Lupinus angustifolius*. *Plant Mol Biol* 21: 397-401 Agricola Medline.
- Kolivas S., Gayler K. R. 1993. Structure of the cDNA coding for conglutin γ a sulphur-rich protein from *Lupinus angustifolius*. *Plant. Mol. Biol.* 21: 397-401.
- Lewin, Benjamin. 1997. *Genes VI*. Oxford University Press. pp 109-112, 623-629.
- Maldonado Rodríguez R., Jimenez C. E. 1998. *Biología molecular en medicina*. Ed. Limusa, México. pp 12-15
- Martinez Maximino, Eizi Matuda. 1979. *La flora del Estado de México. Tomo II. Biblioteca Enciclopédica del Estado de México. Gobierno del Estado de México.* pp 120-125.
- McVaugh Rogers, 1987. *Flora Novo-Galicia. Ed. Ann. Arbor. The University of Michigan. Press Vol 5. Leguminosae.* pp 387-389.
- Moran L. A., Scrimgeour H. R., Rawn j. D. 1994. *Biochemistry*. Prentice Hall. New York. USA. pp: 28.23-28.32.
- Mullis, K. B., 1990. The unusual origin of polimerasa chain reaction. *Scientific American*. Vol 262. 43-46.
- Osborne, T., B. 1924. *The Vegetable Proteins*. London. Longmas, Green. pp. 154
- Restani, P., Duranti, M., Cerletti, P., Simonetti, P. 1981. Subunit composition of the seed globulins of *Lupinus albus*. *Phytochemistry* 20:2077.

- Sambrook, J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular Cloning Laboratory Manual. Second Edition Cold Spring Harbor. Laboratory Press. pp 1.14
- Semino, A., Restani, P., Cerletti, P. 1985. Effect of bound carbohydrate on the action of trypsin on lupin seed glycoproteins. J. Agri. Food. Chem. 33: 196-199.
- Tulloch, P. A., Blagrove, R. J. 1985. Electron microscopy of seed-storage globulins. Arch. Biochem. Biophys. 241: 521-532.
- Voet, D., Voet J. 1992. Bioquímica. Ed. Omega. Barcelona. pp 891-894.
- Watanabe Y, Hirano H. 1994. Nucleotide sequence of the basic 7S globulin gene from soybean. Plant Physiol 105: 1019-1020 Agricola Medline.
- Wink, M., Meibner C., Witte L. 1995. Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. Phytochem. 38 (1): 139-153.
- Wobus, U., Borisjuk, L., Panitz, R., Manteuffel, R., Baumlein, H., Wohlfajrt, T., Heim, U., Weber, H., Mísera, S., Weschke W. 1995. Control of seed storage protein gene expression: New aspects on an old problem. J. Plant. Physiol. 145: 592-599.
- Whyte R. O. y L. Nilson. 1968. Las leguminosas en la agricultura. FAO. pp 1-2, 323-324.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

XII APENDICE

Tabla VII: FRECUENCIA DE UTILIZACION DE CODONES EN GENES DE *E. coli*

Primera Posición (extremo 5')	Segunda posición				Tercera Posición (extremo 3')
	U	C	A	G	
U	UUU Phe (192)	UCU Ser (104)	UAU Tyr (154)	UGU Cys (47)	U
	UUC Phe (182)	UCC Ser (94)	UAC Tyr (134)	UGC Cys (61)	C
	UUA Leu (109)	UCA Ser (68)	UAA Alto (20)	UGA Alto (8)	A
	UUG Leu (115)	UCG Ser (80)	UAG Alto (2)	UGG Trp (128)	G
C	CUU Leu (102)	CCU Pro (66)	CAU His (116)	CGU Arg (241)	U
	CUC Leu (99)	CCC Pro (43)	CAC His (107)	CGC Arg (221)	C
	CUA Leu (32)	CCA Pro (82)	CAA Gln (132)	CGA Arg (31)	A
	CUG Leu (546)	CCG Pro (238)	CAG Gln (301)	CGG Arg (46)	G
A	AUU Ile (272)	ACU Thr (102)	AAU Asn (163)	AGU Ser (72)	U
	AUC Ile (265)	ACC Thr (234)	AAC Asn (239)	AGC Ser (152)	C
	AUA Ile (41)	ACA Thr (65)	AAA Lys (365)	AGA Arg (21)	A
	AUG Met (265)	ACG Thr (127)	AAG Lys (120)	AGG Arg (14)	G
G	GUU Val (201)	GCU Ala (174)	GAU Asp (323)	GGU Gly (276)	U
	GUC Val (142)	GCC Ala (235)	GAC Asp (218)	GGC Gly (302)	C
	GUA Val (116)	GCA Ala (206)	GAA Glu (434)	GGA Gly (70)	A
	GUG Val (253)	GCG Ala (331)	GAG Glu (192)	GGG Gly (97)	G

Se analizaron un total de 9997 codones en moléculas de mRNA de *E. coli*, los números entre paréntesis indican las ocasiones en que fue utilizado cada codón (Moran, 1994).