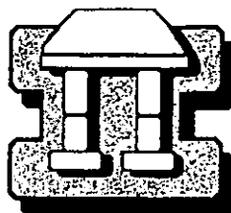


119



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



CAMPUS IZTACALA

**Construcción de un modelo para detectar
mutaciones en una secuencia tipo VNTR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

DULCE ALEJANDRA ROUGON CARDOSO

Director de Tesis:

Dr. J. Gerardo Valadez Sánchez



Edo. de México

2001

293738



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.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN, México, D.F. , Bajo la dirección del Dr. J. Gerardo Valadez Sánchez. Con el apoyo del Dr. Michael Seidman, a quien agradecemos que nos haya proporcionado el plásmido pSP189, utilizado en este trabajo.

A mi familia:

A mi Papá

A mi Mamá

A mi Girl

y

A mi Canis

Por todo el cariño, ayuda, apoyo y comprensión
que me han brindado siempre.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gerardo Valadez Sánchez y a la Biol. Rocío Zamorano Ulloa, por su confianza, apoyo y dedicación en mi trabajo. Y por compartir sus conocimientos conmigo.

A Jorge García Montoya, por tu inmensa ayuda, cooperación, paciencia y cariño.

A la Biol. Josefina Vázquez Mederano, por tu amistad, apoyo y asesoría incondicional por todos estos años.

A mi familia y amigos, por alentarme a seguir adelante.

A mis compañeros de laboratorio:

Fabiola Núñez Cruz,

Guadalupe Ramírez

Icela Sánchez,

Pavel Sierra y

A mis sinodales:

José Luis Sánchez

El Dr. Sergio Vaca Pacheco, por su apoyo y los buenos momentos.

El Dr. Diego Arenas Aranda,

El Mtro. Elías Piedra Ibarra y

La Biol. Irma Dueñas Delfín

por la revisión de mi trabajo, así como por sus consejos.

ÍNDICE

	Página
Índice de figuras	4
Índice de tablas	7
Resumen	8
Abstract	10
Abreviaturas	12
Introducción	14
I. Mutaciones	16
II. Plásmidos tipo "shuttle vector"	17
III. Plásmido pSP189	20
IV. El gen reportero <i>supF</i> de pSP189	21
V. Secuencias VNTR	23
VI. VNTR 33.15	26
VII. Radiación ultra violeta	26
VIII. Mutagénesis	28
Objetivos general y particulares	30
Materiales y métodos	31
I. Plásmido y cepas bacterianas	31
II. Extracción de plásmidos	32
A. Maxipreparación por QIAGEN	32
B. Minipreparación con TS-ELT	34
III. Electroforesis en gel de agarosa	35

IV.	Restricción enzimática de pSP189	36
	A. Corte con <i>Hind</i> III	36
	B. Corte con <i>Eco</i> RI	37
	C. Corte con <i>Mlu</i> I	37
V.	Desfosforilación	38
VI.	Corte de los productos de amplificación con <i>Mlu</i> I	39
VII.	Purificación de los productos de amplificación	40
VIII.	Ligación	41
IX.	Conservación de cepas en glicerol a -70°C	42
X.	Preparación de bacterias competentes	43
XI.	Transformación de bacterias	44
XII.	Extracción de DNA de un gel de agarosa	44
XIII.	Mutagénesis con luz ultra violeta	45
XIV.	Secuenciación	46
	A. Reacción con "BIG-DYE TERMINATOR"	46
	B. Purificación por columnas de "CENTRI-SEP"	47
XV.	Ensayo de actividad de β -galactosidasa	49
XVI.	Análisis estadísticos de la actividad de β -galactosidasa	50
	A. Análisis de varianza	50
	B. Diferencia mínima significativa real	53
Resultados y discusión		55
I.	Construcción del plásmido pAR33.15	55
II.	Preparación del vector	56

III.	Amplificación de la secuencia 33.15	57
	A. Diseño de los iniciadores	57
	B. Ensayo de amplificación	60
IV.	Inserción del VNTR 33.15 en el pSP189	63
V.	Selección de candidatos	67
VI.	Secuenciación del VNTR 33.15	71
VII.	Ensayo de mutagénesis	76
VIII.	Actividad de β -galactosidasa	78
IX.	Análisis de mutaciones	81
Conclusiones		93
Apendice I.	Preparación de soluciones	95
Apéndice II.	Electroferogramas	105
Bibliografía		112

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación esquemática del plásmido pSP189.	21
Figura 2. Estructura secundaria hipotética de la cadena de DNA que codifica para el tRNA <i>supF</i> .	22
Figura 3. Supresión de mutaciones ámbar por medio de <i>supF</i> .	23
Figura 4. Localización de las radiaciones ultravioleta dentro del espectro luminoso.	27
Figura 5. Secuencia de reconocimiento para la enzima <i>MluI</i> .	56
Figura 6. Electroforesis del pSP189 cortado con <i>HindIII</i> y <i>EcoRI</i> .	57
Figura 7. Secuencia 33.15 con regiones flanqueantes (Jeffreys <i>et. al.</i> , 1985a).	59
Figura 8. Electroforesis del producto amplificado por PCR.	62
Figura 9. Secuencia parcial del inserto > 500 pb purificado por GeneClean.	63
Figura 10. Electroforesis de la restricción con <i>MluI</i> de pSP189 y del producto amplificado.	65
Figura 11. Electroforesis de DNA λ / <i>HindIII</i> + T4 DNA ligasa.	66
Figura 12. Patrón de restricción con <i>HindIII</i> de candidatos 1-14.	68
Figura 13. Patrón de restricción con <i>HindIII</i> de candidatos 35-41.	69
Figura 14. Electroforesis de los PCR de los candidatos seleccionados.	70
Figura 15. Secuencia parcial del inserto del candidato 2 obtenida empleando el iniciador "directo".	71

Figura 16.	Secuencia parcial del inserto del candidato 2 variando las condiciones de amplificación.	72
Figura 17.	Secuencia parcial del inserto del candidato 2 incluyendo las secuencias flanqueantes.	74
Figura 18.	Secuencia parcial del inserto del candidato 2 obtenida con el iniciador "reverso".	75
Figura 19.	Porcentaje de sobrevivencia de transformantes MBM7070	78
Figura 20.	Cinética de actividad de β -galactosidasa.	79
Figura 21.	Actividad de β -galactosidasa a las tres horas.	80
Figura 22.	Secuencia del VNTR 33.15 de la clona 2.1 obtenida con el iniciador "directo".	82
Figura 23.	Secuencia del VNTR 33.15 de la clona 2.2 obtenida con el iniciador "directo".	82
Figura 24.	Secuencia del VNTR 33.15 de la clona 2.3 obtenida con el iniciador "directo".	83
Figura 25.	Secuencia del VNTR 33.15 de la clona 2.4 obtenida con el iniciador "directo".	83
Figura 26.	Secuencia del VNTR 33.15 de la clona 2.5 obtenida con el iniciador "directo".	83
Figura 27.	Secuencia del VNTR 33.15 de la clona 2.6 obtenida con el iniciador "directo".	84
Figura 28.	Secuencia del inserto de las clonas 2.1, 2.2 y 2.3 con el iniciador "reverso".	85

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Mutaciones y otras alteraciones del DNA y los cromosomas.	17
Tabla 2. Características relevantes de las cepas y el plásmido utilizados.	31
Tabla 3. Datos utilizados en el análisis de varianza.	51
Tabla 4. Tabla de ANOVA.	52
Tabla 5. ANOVA realizado para encontrar diferencias en la actividad de β -galactosidasa.	52
Tabla 6. Semimatriz que muestra las diferencias reales de la actividad de β -galactosidasa.	54
Tabla 7. Ensayo de amplificación básico para el VNTR 33.15.	61
Tabla 8. Parámetros de amplificación para la secuencia 33.15.	62
Tabla 9. Resultados de la transformación de DH5 α .	67
Tabla 10. Parámetros utilizados para la secuenciación del candidato 2.	72
Tabla 11. Ciclos de PCR sin temperatura de alineamiento.	73
Tabla 12. Número de transformantes transformantes después de exponer pSP189 a luz UV.	77
Tabla 13. Parámetros utilizados para la secuenciación de la subclonas 2.	81
Tabla 14. Porcentaje de mutaciones sobre <i>supF</i> (modificado de Okaichi <i>et al.</i> , 1992).	87
Tabla 15. Porcentaje de mutaciones sobre <i>lacZ</i> (modificado de Wehner y Horneck, 1995).	88

RESUMEN

Las secuencias VNTR (repetidos en tándem de número variable), también conocidas como "minisatélites", son secuencias que generalmente no codifican para un producto apreciable y en las que una secuencia núcleo de entre 15 y 50 pb se repite una y otra vez. Diversos VNTR han sido utilizados como "fingerprints" (huellas digitales del DNA) debido a su alta variabilidad. También se les ha empleado en pruebas criminalísticas y de paternidad disputada. Se sospecha que, en parte, estas secuencias deben su gran variabilidad a una elevada frecuencia mutacional.

Existen muchos reportes acerca de la especificidad mutagénica sobre secuencias codificantes, sobre todo en genes marcadores o "reporteros", pero existen muy pocos experimentos de este tipo sobre secuencias no codificantes, como los VNTR. Esto se debe a que, en general, las frecuencias de mutación son bajas y a que no es sencillo identificar a los organismos mutantes en una secuencia que no codifica para un producto apreciable.

En el presente trabajo se propone un modelo para encontrar mutaciones con mayor facilidad en una secuencia VNTR que no codifica para un producto apreciable. Primeramente fue posible el aislamiento, a partir de DNA genómico humano, de una secuencia minisatélite con las características del VNTR 33.15 reportado previamente (Genbank NT_00741) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa empleando iniciadores dirigidos a las regiones flanqueantes del minisatélite. La secuencia 33.15 obtenida consta de 17 unidades núcleo repetidas en tándem. Difiere de aquella reportada en su longitud y en algunos cambios puntuales en la secuencia nucleotídica. Esto confirma la alta variabilidad de este tipo de secuencias entre individuos de la misma especie.

También se construyó el plásmido pAR33.15 mediante la inserción de la secuencia VNTR 33.15 en el "shuttle vector" pSP189. Debido al procedimiento metodológico empleado, la secuencia 33.15 entró acompañada de otro fragmento genómico no codificante (Genbank NT_023519) pero con características distintas a las de un minisatélite. Al parecer éste segmento de DNA proviene del cromosoma 7.

La construcción pAR33.15 fue empleada en un ensayo para probar el efecto de la radiación no ionizante UV-C sobre la secuencia no codificante tipo VNTR. El 67% de las clonas mutantes en *supF* (un gen reportero contenido en el plásmido pAR33.15) obtenidas, también mostraron algún tipo de alteración en el VNTR 33.15, pero ninguna mutación pudo ser detectada en la secuencia NT_023519, lo cual sugiere que por su naturaleza, las secuencias VNTR tienden a acumular mayor número de mutaciones, o que en ellas las lesiones se reparan con una menor eficiencia.

A diferencia de lo reportado por otros autores en sistemas similares, la totalidad de las mutaciones observadas en el presente trabajo sobre el VNTR 33.15 fueron transversiones. Esto podría explicarse si los dímeros de pirimidinas que ocasionan las transiciones fueron reparadas eficientemente, ya que a las bacterias no se les privó de la luz y esta es necesaria para activar los mecanismos de reparación de estos aductos.

En consecuencia, el modelo propuesto en el presente trabajo parece adecuado para estudiar el efecto de algunos mutágenos sobre secuencias para las que no existe un método de selección de las clonas mutantes, como lo es una secuencia minisatélite no codificante del genoma humano.

ABSTRACT

VNTR sequences (Variable Number of Tandem Repeats), also known as "minisatellites", usually do not codify for any noticeable product. These sequences contain regions in which a small number of bases (15-50), known as the core, are tandemly repeated. Because of its extreme variability among individuals, several VNTRs have been used for fingerprint analysis to clarify paternity disputes and in forensic tests. It is thought that the high variability of VNTRs is due to its high mutation frequency.

There are a lot of reports about the mutagenic specificity over coding sequences, mostly on reporter genes, but only a few of them in non-coding sequences such as VNTRs. This is due to the low mutation frequency rate and to the difficulty to identify mutant organisms in a sequence that does not codify for a noticeable product.

In this work, a model is proposed for an easier finding of mutations on a VNTR that does not codify for a noticeable product. First, it was possible the isolation from human genomic DNA, of a minisatellite with the characteristics of the VNTR 33.15 already reported (GenBank NT_007741). It was made by the polymerase chain reaction using primers directed to the flanking regions of the minisatellite. The amplified sequence consists of 17 tandemly repeated core units. Compared to with that reported, it differs in its length and in some punctual nucleotide changes. These results support the idea that these kinds of sequences are highly variable between organisms of the same species.

By cloning the VNTR 33.15 into the shuttle vector pSP189, it was possible the construction of the plasmid pAR33.15. Because of the methods employed, the sequence 33.15 was inserted with another non-coding genomic fragment

(GenBank NT_023519). This fragment has different characteristics to those of a minisatellite, and seems to arise from chromosome 7.

pAR33.15 construction was employed to test the effects of the non-ionising UV-C radiation over a non-coding VNTR. Sixty seven percent of the mutants obtained in *supF* (a reporter gene contained in pAR33.15) also showed some change in the VNTR 33.15, but no mutation could be detected in the sequence NT_023519. These results suggest that VNTR sequences tend to accumulate a higher number of mutations, or that the damages are more efficiently repaired.

Differing from that reported in similar systems, the total mutations over the VNTR 33.15 observed in this work were transversions. One explanation could be the efficient repair of the pyrimidine dimers that cause transitions. This could be likely since the bacteria were not taken away from light, which is necessary for activating the mechanisms of adduct repair.

In summary, the model proposed in the present work seems adequate for studying the effects of some mutagens over sequences for which does not exist a mutant selection method as it is a non-codifying minisatellite of the human genome.

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de Varianza.
Ap ^R	Resistencia a ampicilina.
BLAST	Herramienta computacional básica para buscar alineamientos locales en secuencias nucleotídicas.
CIAP	Calf intestinal alkaline phosphatase 1U/100 pmol de fosfatos.
CME	Cuadrado Medio del Error.
DO	Densidad Óptica.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
DMSR	Diferencia Mínima Significativa Real.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético.
EtOH	Alcohol etílico.
g	Aceleración debida a la gravedad.
HPRT	Gen de la Hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa.
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactopiranosido.
j	Joules.
Kb	Kilo bases.
LB	Luria Bertani.
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero.
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica de EUA.
<i>ori</i>	Origen de replicación.

ONPG	<i>o</i> - nitrofenil - β - D - galactósido
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PEG	Polietilénglicol.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
<i>Taq</i> DNA pol	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i> .
T_m	Temperatura de alineamiento.
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano.
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia.
U	Unidades internacionales.
UFC	Unidades formadoras de colonia.
UV	Ultravioleta.
V	Volts.
VNTR	Repetidos en tándem de número variable.
www	Red Mundial.
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido.
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i> .

INTRODUCCIÓN

Aunque la duplicación del DNA es muy precisa, no es perfecta. En algunas ocasiones ocurren cambios en el DNA debido a errores de la polimerasa, radiaciones o agentes químicos y la nueva pieza de DNA contiene uno o más nucleótidos cambiados. Ese cambio, llamado mutación, puede llevarse a cabo en cualquier parte del DNA. Si la mutación ocurre en la secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido particular, podría cambiar un aminoácido en la cadena polipeptídica (Nagao *et al.*, 1978). Este cambio podría alterar las propiedades de la proteína resultante. Estas secuencias nucleotídicas codificantes, sin embargo, están protegidas de sufrir mutaciones por diferentes mecanismos que corrigen los cambios y evitan que se expandan. Las secuencias no codificantes del DNA a menudo están formadas por grupos de nucleótidos que se repiten uno tras otro. Dada su alta variabilidad de individuo a individuo, se sospecha que en las secuencias no codificantes la frecuencia mutacional es mayor respecto a las secuencias codificantes. Se cree que ello en parte se debe a los errores en los alineamientos que ocurren durante el apareamiento de los cromosomas (Jeffreys *et al.*, 1988). A pesar de que una lesión en este tipo de secuencias en general no es tan grave, no quiere decir que estas secuencias no sean importantes. Actualmente las secuencias de repetidos son utilizadas como marcadores genéticos informativos y herramientas de utilidad en la ciencia forense y el mapeo genético.

Las secuencias VNTR (repetidos en tándem de número variable, por sus iniciales en inglés), también conocidas como "minisatélites", pertenecen a este grupo de secuencias no codificantes en las que una secuencia núcleo de entre 15 y 50 pb se repite una y otra

vez (Levinson y Gutman, 1987; Henderson y Petes, 1992; Weber y Wong, 1993). Diversos VNTR han sido utilizados como "fingerprints" (huellas digitales del DNA) debido a su alta variabilidad (Jeffreys *et al.*, 1985b). Analizando simultáneamente varias secuencias VNTR, la probabilidad de que dos personas tengan la misma combinación es tan baja que por ello se les ha empleado en pruebas criminalísticas y de paternidad disputada. Algunas de estas secuencias VNTR han mostrado una alta frecuencia de mutaciones (Ogheir *et al.*, 1997; Deka *et al.*, 1994; Budowle *et al.*, 1991).

Existen muchos reportes acerca de la especificidad mutagénica sobre secuencias codificantes, sobre todo en genes marcadores o genes "reporteros" (ver por ejemplo Moshinsky y Wogan, 2000; Englander y Howard, 1997; Okaichi *et al.*, 1992; Protic-Sabljić y Kraemer, 1986; Protic-Sabljić *et al.*, 1986), pero existen muy pocos experimentos de este tipo sobre secuencias no codificantes (Englander y Howard, 1997). Esto se debe en parte a las bajas frecuencias de mutación y a que no es sencillo encontrar organismos mutantes en una secuencia que no codifica para un producto apreciable. Por ello las técnicas para hacerlo son más costosas.

En el presente trabajo se propone un modelo para encontrar mutaciones con mayor facilidad en una secuencia VNTR que no codifica para un producto apreciable. El modelo consiste en la inserción de la una secuencia VNTR en el plásmido pSP189, que es clasificado como un "shuttle vector" dado que es capaz de replicarse tanto en bacterias como en células de mamífero. Este plásmido además contiene el gen reportero *supF* y un gen de resistencia a ampicilina. Después de haber realizado esta construcción, se probó su eficiencia mediante la exposición del mismo a luz ultravioleta y la detección de mutaciones sobre la secuencia VNTR.

I. MUTACIONES

Una lesión genética puede inactivar el producto de un gen o modificar su actividad para efectuar una tarea ligeramente diferente; la creación de una propiedad completamente diferente es un evento muy raro. La pérdida de la función ocurre con mayor frecuencia, ya que puede ocurrir por una gran variedad de lesiones diferentes (en uno o varios genes). Por otra parte, el cambio de función requiere una alteración genética que modifique una propiedad específica sin que se dé una inactivación simultánea del gen. Las lesiones que inactivan funciones celulares esenciales (el aparato de replicación, o los procesos involucrados en la expresión de genes importantes) por lo general son letales (Starlinger, 1977).

El material biológico básico de los genetistas es una cepa o clona que consiste en una población de células genéticamente idénticas. Una clona es un cultivo puro, y técnicas como las empleadas para aislar cultivos puros se aplican directamente para aislar clones para su análisis genético. Una mutación se observa como un cambio súbito heredable en el fenotipo de un organismo. Es frecuente referirse a una cepa aislada de la naturaleza como tipo natural o silvestre y a las cepas aisladas del tipo silvestre a través de mutaciones como mutantes. Las mutaciones pueden clasificarse de acuerdo a diferentes criterios. La tabla 1 muestra una clasificación de las mutaciones.

Tabla 1. Mutaciones y otras alteraciones del DNA y los cromosomas*.

Mutaciones puntuales:

- Substituciones de bases (transiciones y transversiones).
- Adiciones y eliminaciones que provocan corrimientos en el marco abierto de lectura ("frameshift").

Eliminaciones que abarcan segmentos grandes de DNA.

Translocaciones.

Inversiones.

Elementos insercionales:

- Transposones.
- Retrotransposones.

Recombinación:

- Conversión génica.
- Intercambio no simétrico de cromátidas hermanas.
- Entrecruzamiento somático desigual.

Replicación desproporcionada del DNA (amplificación).

*Adaptado de Ramel (1989)

II. PLÁSMIDOS TIPO "SHUTTLE VECTOR"

A principios de los años 80 la atracción de la tecnología del DNA recombinante comenzaba a presentarse en campos donde anteriormente no se habían hecho análisis moleculares. Uno de ellos fue la mutagénesis de células de mamífero. La tecnología de la manipulación génica ofreció la oportunidad de recuperar genes mutantes para los que había protocolos de selección efectivos (como el HPRT; Maher y McCormick, 1996). Se pensó que así podría conocerse la función del gen completo. A pesar de la viabilidad de esos protocolos, el tiempo y esfuerzo requerido desalentó a la mayoría de los investigadores (Seidman, 1996). Un protocolo alternativo, basado en "shuttle vectors", resultó más

atractivo. Un shuttle-vector consiste en secuencias blanco de DNA para monitorear actividad mutagénica y secuencias adicionales que permiten la replicación y selección tanto en bacterias como en células de mamífero (Kraemer y Seidman, 1989). El extenso análisis de virus del DNA causantes de tumores, como el SV40, definió la información genética necesaria para su replicación viral en mono y en células de humano. La Biología y la Biología molecular de los plásmidos bacterianos también habían sido desarrolladas independientemente. Así, ha sido posible demostrar que las construcciones moleculares con las funciones de replicación del virus SV40 (el gen del antígeno-T y el origen de replicación) unidos con los componentes de los plásmidos bacterianos (el origen de replicación del plásmido y el marcador de resistencia a algún antibiótico) pueden replicarse en células de mono y pueden ser recuperados e introducidos en bacterias. (Peden *et al.*, 1980; Lusky y Botchan, 1981). Primeramente, estos experimentos fueron demostraciones del principio, la tecnología de los shuttle vectors no tenía ninguna aplicación. Como algunos investigadores estaban interesados en estudiar la mutagénesis en células de mamífero, agregaron un gen marcador bacteriano. El vector resultante, después de ser tratado con un agente que dañara el DNA, sería introducido en células de mamífero, podría replicarse, ser recuperado e introducido en la bacteria para su análisis, pues las colonias bacterianas con mutaciones en el gen marcador podrían ser reconocidas por la selección microbiológica estándar y la naturaleza de las mutaciones podría ser identificada por secuenciación.

Los primeros autores en publicar acerca de estos sistemas reportaron una observación que no se había considerado en la estrategia original. Ellos encontraron que durante la transfección (la introducción del "shuttle vector" a células de mamífero) y replicación intracelular, ocurrían mutaciones con alta frecuencia en el gen marcador

(Razzaque *et al.*, 1983; Calos *et al.*, 1983). La frecuencia era muy alta como para permitir experimentos limpios con agentes que dañan el DNA. Los análisis de los plásmidos mutantes indicaron que la mayoría de las mutaciones eran eliminaciones, y también se encontraron adiciones de DNA celular, así como mutaciones puntuales. Estas observaciones (confirmadas por Sarker *et al.*, 1984) desacreditaron la estrategia completa.

Los investigadores tomaron caminos diferentes para solucionar el problema. Calos y sus colaboradores encontraron una línea celular (Ad293) con una frecuencia baja de mutación espontánea (Lebkowski *et al.*, 1984). Ellos fueron capaces de generar un espectro mutacional sobre *lac I* con el vector original en estas células usando diferentes mutágenos (Lebkowski *et al.*, 1985). El valor de este experimento era que los datos obtenidos con el sistema *lac I* en *Escherichia coli* pudieron ser comparados con los obtenidos con el mismo marcador en células de humano (Hsia *et al.*, 1989).

Por otro lado, el grupo de Seidman estaba interesado en poder hacer experimentos en diferentes tipos de cultivos primarios y líneas celulares. Su estrategia requería cambiar el diseño del vector. Su nueva construcción contiene al pequeño gen *supF*, que codifica para un tRNA supresor, insertado entre el origen de replicación del plásmido y el gen para la resistencia a ampicilina (Seidman *et al.*, 1985). Las eliminaciones que inactivaran al plásmido podrían, en muchos casos, haber inactivado alguna de estas secuencias indispensables. El nuevo plásmido funcionó bien y la frecuencia de mutación espontánea disminuyó de 50 a 100 veces en las mismas células que había dado tan altos niveles en los experimentos iniciales. Aparte de la ventaja de la baja frecuencia de mutación espontánea, el análisis de las secuencias mutantes se hizo mucho más rápido debido al pequeño tamaño del gen marcador. Este vector, llamado pZ189, ha sido utilizado por muchos grupos para

caracterizar una serie de mutágenos y carcinógenos (Kraemer y Seidman, 1989). La clave del éxito de este vector es el pequeño tamaño del sitio blanco de detección de las mutaciones. El tamaño de este sitio fue reducido posteriormente con un plásmido derivado del pZ189, el pSP189, el cual tiene una frecuencia de mutación espontánea aún más baja (Seidman, 1989). Desde ahí, varios grupos han desarrollado otros sistemas de tipo shuttle vectors (Menck *et al.*, 1987; Kain, 1995; Chalfie, 1994).

III. PLÁSMIDO pSP189

Paris y Seidman (1992) desarrollaron un shuttle vector para estudiar la mutagénesis en células de mamífero probando la independencia de mutaciones idénticas. Como ya se dijo, las mutaciones se presentan con mayor frecuencia en algunos sitios en un gen que en otros, y en una colección de plásmidos mutantes de una sola transfección de células de mamífero, la misma mutación puede aparecer varias veces. Entonces, las mutaciones provenientes de eventos independientes no podrían ser distinguidas de las copias de un evento inicial. En realidad, el sistema del vector pSP189 es una población de plásmidos, y cada uno contiene una "secuencia firma" de 8 pb. Esta secuencia le confiere una etiqueta de identificación única a cada plásmido, y permite identificar plásmidos individuales por una firma distintiva. Este plásmido (Figura 1) se deriva del pMS189 descrito por Seetharam y Seidman, (1991). Contiene la secuencia codificante del antígeno T y el origen de replicación SV40, un gen de resistencia a ampicilina (Ap^R) y el origen de replicación de pBR327. También contiene el gen *supF* de *E. coli* como un marcador de mutagénesis, que consiste en una secuencia codificante del tRNA de 84 nucleótidos, un

terminador de la transcripción de 44 pb (Young, 1979) y un fragmento de 28 pb que contiene la secuencia firma de 8 pb. La secuencia firma proporciona un máximo de $2(4^8) = 131,072$ posibles combinaciones dentro de la población de plásmidos. (Parris y Seidman, 1992).

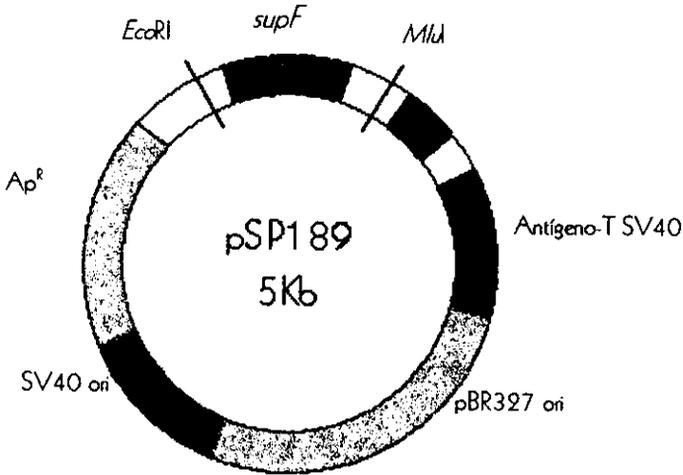


Figura 1. Representación esquemática del plásmido pSP189.

IV. EL GEN REPORTERO *supF* DE pSP189

El gen del tRNA supresor de la mutación ámbar de tirosina de *E. coli*, llamado *supF* (Figura 2), también identificado como *Su3⁺* o *tyrT*, ha sido utilizado como un blanco mutagénico en los shuttle vectors pZ189 (Seidman *et al.*, 1987; Seetharam *et al.*, 1987; Bredberg *et al.*, 1987 y Yang *et al.*, 1988), p3AC (Sarkar *et al.*, 1984; Glazer *et al.*, 1986; Yang *et al.*, 1987) y pSP189 (Burcham y Harkin, 1999; Jeong *et al.*, 1999; Tobi *et al.*, 1999; Tretyakova *et al.*, 2000; Routledge, 2000;

bacterias se cultivan en agar con IPTG, un inductor no metabolizable del gen *lacZ*, y X-gal, un sustrato cromogénico no inductor de β -galactosidasa. Así, las colonias resultantes de la transformación con un *supF* funcional serán azules, mientras que aquellas que contienen el gen inactivo o parcialmente activo serán blancas o azul claro (Kraemer, 1989).

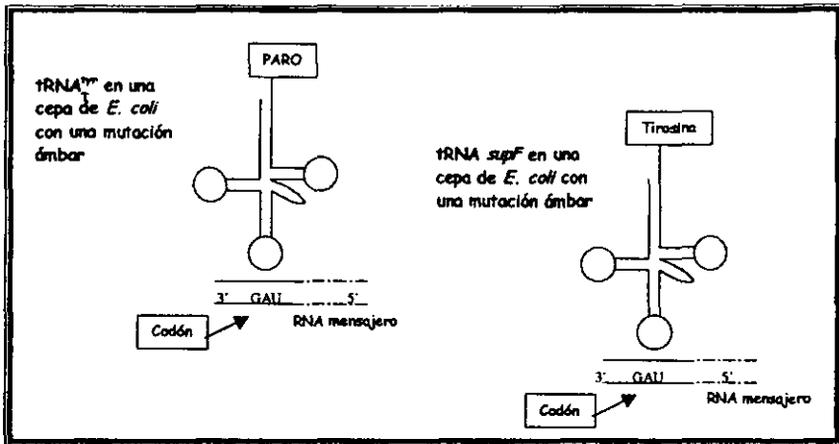


Figura 3. Supresión de mutaciones ámbar por medio de *supF*. El tRNA *supF* introduce una tirosina en el codón sin sentido UAG debido a la mutación que tiene en el anticodón.

V. SECUENCIAS VNTR

El DNA áltamente repetitivo se caracteriza por su rápida tasa de renaturalización. Consiste en secuencias cortas que están repetidas en copias idénticas o similares dentro del genoma (Kokoska, 1999). Debido a la pequeña unidad de los repetidos, a veces se le conoce como DNA minisatélite. Este tipo de componente se presenta en casi todos los genomas de eucariontes superiores, pero su composición es extremadamente variable. En

genomas de mamífero se presenta aproximadamente en un 10%, pero, por ejemplo en *Drosophila virilis*, se presenta alrededor del 50%. En *E. coli* (Levinson y Gutman, 1987), en *Saccharomyces cerevisiae* (Henderson y Petes, 1992), y en mamíferos (Weber y Wong, 1993) los fragmentos simples de DNA repetitivo son inestables, alterando su tamaño por adiciones o eliminaciones de pequeños números de unidades repetidas.

Los estudios sobre la estabilidad de los minisatélites en bacterias y levaduras (revisado por Sia *et al.*, 1997) y los análisis de mutaciones generadas durante la replicación *in vitro* (revisado por Kunkel, 1992), muestran que los cambios en el número de repetidos son consecuencia del desprendimiento de la polimerasa. De acuerdo a este modelo, durante la duplicación del fragmento repetido se da una disociación transitoria entre la cadena del iniciador y la del molde, permitiendo una reasociación mal alineada de las dos cadenas (Kokoska, 1999). Debido a esto, los minisatélites son altamente variables.

La repetición en tándem de una secuencia corta de DNA comúnmente crea una fracción con propiedades físicas particulares, que algunos investigadores han utilizado para aislarla. En algunos casos, la secuencia repetitiva tiene una composición de bases distinta a la del genoma en general; lo que permite que se separe una fracción debido a su densidad. Una fracción de este tipo es llamada DNA satélite (Lewin, 1997).

Los loci de repetidos en tándem de número variable (VNTR) son marcadores genéticos de mucha utilidad en los que sus alelos difieren en longitud debido a diferencias en el número de unidades de una secuencia corta (secuencia núcleo) arregladas en tándem (de manera adyacente una de otra). Por esta razón y debido a la presencia de cambios sutiles en la secuencia núcleo de un individuo a otro, los loci de VNTR comúnmente tienen altos niveles de heterocigosis y un gran número de alelos; estas características los hacen ser

marcadores genéticos informativos y herramientas de utilidad en la ciencia forense (Shriver *et al.*, 1993) y en el mapeo genético (Nakamura *et al.*, 1987; Silver, 1992). A pesar de la utilidad de los loci de VNTR, aún existen muchas preguntas sin respuesta acerca de sus mecanismos mutacionales y sus dinámicas de población. Las distribuciones de las frecuencias alélicas de los VNTR pueden estar afectadas por fuerzas poblacionales y fuerzas de nivel molecular (Shriver *et al.*, 1993).

Ya que las secuencias de repetidos están propensas a errores en los alineamientos durante el apareamiento de los cromosomas, las agrupaciones de repetidos tienden a ser altamente polimórficas y con amplias variaciones de tamaño entre los individuos. De hecho, agrupaciones menores de estas secuencias pueden ser utilizadas para caracterizar genomas individuales por medio de la técnica de "DNA fingerprinting" (huella digital del DNA). Las comparaciones de las regiones correspondientes de secuencias simples del DNA entre organismos de la misma especie y entre diferentes especies dan información sobre los mecanismos involucrados en la manipulación de las secuencias de DNA a través de la evolución. (Lewin, 1997).

Las secuencias de algunos VNTR tienen una frecuencia mutacional muy alta, al contrario de las secuencias codificantes (Ogheri *et al.*, 1997). Esto se debe, por un lado, a la composición de bases de los repetidos y por otra parte, tal vez a que las secuencias codificantes estén más protegidas por los mecanismos de reparación que las secuencias de repetidos que comúnmente no codifican, ya que estas últimas no son indispensables para la sobrevivencia de los organismos.

VI. VNTR 33.15

Jeffreys y colaboradores (1985a) describieron un minisatélite corto que comprende cuatro repetidos en tandem de una secuencia de 33 pb en un intrón del gen humano de la mioglobina. Mostraron que una sonda dirigida contra el repetido de mioglobina de 33 pb es capaz de detectar otros minisatélites humanos. Estas regiones comparten una secuencia núcleo (core) común en cada unidad repetida, la cual proporciona una sonda poderosa para detectar las regiones hipervariables (Jeffreys, 1985b). Por medio de esta sonda encontraron una secuencia VNTR nombrada 33.15 la cual tiene 29 repetidos de la secuencia núcleo. La secuencia reportada por Jeffreys tiene algunos cambios de bases y dos eliminaciones, pero tiene la secuencia núcleo casi perfecta (Jeffreys *et al.*, 1985a). Esta secuencia puede variar en tamaño y composición nucleotídica de individuo a individuo (Jeffreys' *et al.*, 1985a, 1985b y 1988).

VII. RADIACIÓN ULTRA VIOLETA

El espectro luminoso abarca desde 100 a 800 nm. Entre los 100 y los 400 nm se encuentra la luz ultravioleta que se divide en tres zonas: UV-A, denominada también ultravioleta de onda larga, de 320 a 400 nm. En condiciones de exposición normal, esta radiación raramente produce eritema y, en cambio, activa la melanogénesis. La zona UV-B,

también conocida como radiación ultravioleta de onda media, con una longitud de onda de 290 a 320 nm, es la radiación característica propia de los efectos solares sobre la piel. La zona UV-C de 100 a 290 nm, también denominada de onda corta o radiación germicida, es totalmente fotoactiva. Es muy eritemógena y perjudicial sobre el tejido vivo, no representa un riesgo para la población ya que se filtra casi totalmente por la capa atmosférica de ozono, aunque la progresiva desaparición de dicha capa a inquietado a algunos investigadores por las graves lesiones cutáneas que esta radiación puede producir (Mallol, 1987; García-Patos, 1989; Wehner y Horneck, 1995).

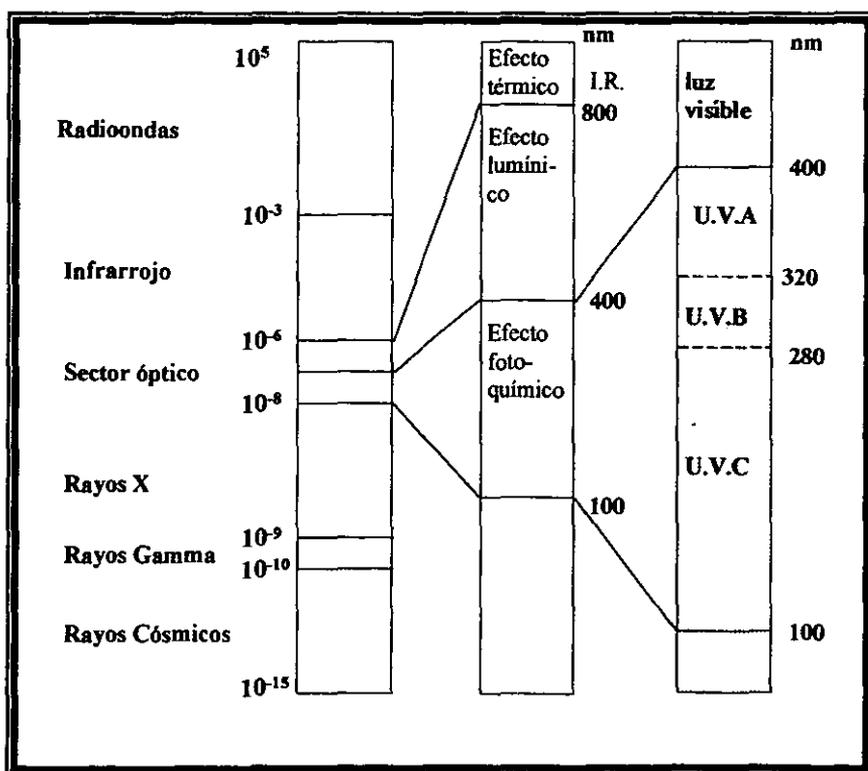


Figura 4. Localización de las radiaciones ultravioleta dentro del espectro luminoso.

VIII. MUTAGÉNESIS

Se han hecho muchos trabajos sobre la especificidad mutagénica de la luz ultravioleta sobre diferentes secuencias de DNA, para este tipo de trabajos la longitud de onda más utilizada es de 254 nm debido a su alta actividad mutagénica (Moshinsky y Wogan, 2000; Englander y Howard, 1997; Okaichi *et al.*, 1992; Protic-Sabljić y Kraemer, 1986; Protic-Sabljić *et al.*, 1986a).

Wehner y Horneck (1995) irradiaron al plásmido pUC19 de *E. coli* con lámparas de 160 y 254 nm. El plásmido pZ189 también ha sido utilizado para trabajos de mutaciones con luz UV-C a 254 nm (Seetharam, *et al.*, 1989; Moriwaki, *et al.*, 1994). Lebkowski *et al.* (1985) compararon la especificidad mutagénica con luz UV-C en células bacterianas (*E. coli*) y de humano. En los últimos años se han realizado un gran número de experimentos con luz UV. Podemos mencionar algunos, como por ejemplo: Sung-Lim Yu *et al.* (2001) estudiaron la manera en que la polimerasa desvía los dímeros cis-syn de timina causados por la luz UV, encontrando principalmente transiciones C→T. Myrand *et al.* (1996) transformaron células de *Xeroderma pigmentosum* con un minigen capaz de reestablecer los mecanismos de reparación del DNA dañado con luz UV. Gentil *et al.* (1996) encontraron las frecuencias de mutaciones de fotoproductos causados por luz UV. Hattori *et al.* (1996) encontraron que el producto 8-Hidroxi-2'-deoxiguanosina se incrementa después de la exposición crónica a la luz UV. Muchos de estos experimentos han sido realizados con el fin de comprender la manera en que la luz UV induce los cambios en las bases y la manera en que estos son reparados. McGregor *et al.* (1999)

encontraron diferentes tipos de mutaciones inducidas con luz UV, entre células deficientes en reparación y células normales. Lehmann (2000) estudió la replicación del DNA dañado con luz UV encontrando una relación entre las DNA polimerasas, la mutagénesis y la enfermedad de *Xeroderma pigmentosum*.

Con base en los antecedentes anteriores, surge la necesidad de contar con un método que permita identificar fácil y rápidamente las mutaciones producidas sobre una secuencia VNTR por diversos agentes medioambientales, ya que de esta forma se podrán hacer estudios comparativos con las alteraciones sobre diversas secuencias codificantes.

OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo tiene como objetivo central la generación de un modelo que permita la detección de mutaciones en una secuencia no codificante tipo VNTR del genoma humano.

Para ello se pretenden alcanzar los siguientes objetivos particulares:

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislamiento del VNTR 33.15 del genoma humano.
- Construcción de un modelo molecular mediante la inserción de la secuencia VNTR 33.15 en el "shuttle vector" pSP189.
- Demostración de la eficiencia del modelo mediante ensayos de mutagénesis por exposición a luz ultravioleta tipo C.

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se describen las técnicas utilizadas en el presente trabajo. Algunas metodologías están basadas en el protocolo descrito por el fabricante, aquí se describen incluyendo las modificaciones hechas en el laboratorio. Cabe resaltar que los reactivos fueron en su mayoría de Sigma o de Merck, los solventes fueron de Baker y las enzimas de restricción y de modificación fueron de Gibco-BRL, a menos que se indique lo contrario. La preparación de las soluciones se encuentra en el apéndice I.

I. PLÁSMIDO Y CEPAS BACTERIANAS

Tabla 2. Características relevantes de las cepas y el plásmido utilizados.

CEPAS DE <i>E. coli</i>	GENOTIPO	REFERENCIA
DH5 α	F ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>endA1 recA1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) deoR thi-1</i> <i>phoA supE44 λ⁻ gyr A96 relA1</i>	Focus (1986) 8:2,9 citado en: GENOME Products Catalogue and Guide, 1999. Life Technologies, E.U.A.
MBM7070	F ⁻ <i>lacZ(A_m)CA7020 lacY1, hsdR⁻, hsdM⁺, araD139, Δ (araABC-leu)7679, galJ, galK, rpsL, thi</i> . Deriva de MC1061.	Seidman <i>et al.</i> (1985).
PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	REFERENCIA
ρ SP189	<i>EcoRI</i> , <i>supF</i> tRNA, secuencia firma, ρ BR327 ori, SV40 T-antigen, SV40 ori, Ap ^R . Deriva de ρ MS189.	Parris y Seidman (1992).

II. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS

A. MAXIPREPARACIÓN POR QIAGEN

1. Picar una colonia fresca de una caja selectiva y con ella inocular un cultivo de 2 a 5 ml de medio LB con el antibiótico apropiado (Ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$). Incubar por ~ 8 hrs. a 37°C en agitación vigorosa ($\sim 300\text{rpm}$).
2. Diluir el cultivo inicial en 300 ml de medio LB selectivo para plásmidos con bajo número de copias (como pSP189). Cultivar a 37°C por 12 a 16 horas con agitación vigorosa. El cultivo debe alcanzar una densidad aproximada de 1×10^9 células por ml ($\text{DO}_{600}=4$).
3. Empastillar las células bacterianas por centrifugación a 6000 rpm en rotores Sorval GSA o GS3 o Beckman JA10 por 15 min. a 4°C . Desechar todo el sobrenadante invirtiendo el tubo de centrifuga hasta que todo el medio haya terminado de drenar.
4. Resuspender la pastilla en 12 ml de Buffer P1.
5. Agregar 12 ml de Buffer de lisis P2, mezclar suavemente por inversión de 4-6 veces, e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. No utilizar vortex, ya que podrían romperse las cadenas de DNA. Durante la lisis, el líquido se vuelve viscoso. No permitir que la reacción de lisis proceda por más de 5 min.
6. Agregar 12 ml de Buffer de neutralización P3 enfriado previamente, mezclar inmediatamente por inversión de 4-6 veces, e incubar en hielo por 15 min.

Después de agregar el Buffer P3 se observa un precipitado viscoso que contiene DNA genómico, proteínas, SDS, y restos de células.

7. Centrifugar a 13,000 rpm en un rotor Sorvall SS-34 o Beckman JA20 por 30 min. a 4°C. Retirar rápidamente y conservar el sobrenadante que contiene al DNA plasmídico. La centrifugación debe hacerse en tubos que no sean de vidrio. Después de la centrifugación el sobrenadante debe ser transparente.
8. Volver a centrifugar el sobrenadante a 13,000 rpm en un rotor Sorvall SS-34 por 15 min. a 4°C. Quitar rápidamente y conservar el sobrenadante que contiene el DNA plasmídico. Alternativamente, la muestra puede ser pasada a través de un papel filtro plegado y previamente humedecido. Esta segunda centrifugación debe realizarse para evitar que el DNA lleve partículas suspendidas que puedan tapar la columna de QIAGEN.
9. Equilibrar la columna QIAGEN-tip 100 con 4 ml de Buffer QBT, y dejar que fluya por la columna por gravedad.
10. Agregar 12 ml del sobrenadante del paso 8 a la columna y permitir que entre a la resina por gravedad.
11. Lavar la columna con 10 ml de Buffer QC dos veces.
12. Eluir el DNA con 5 ml de Buffer QF. Colectar la elución en un tubo de microcentrífuga.
13. Volver a lavar la columna con 10 ml de QC y repetir desde el paso 9 dos veces más para pasar todo el sobrenadante.
14. Precipitar el DNA agregando 0.7 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente. Mezclar y centrifugar inmediatamente a 9,500 rpm en un rotor Sorvall

SS-34 por 30 min a 4°C. Decantar el sobrenadante cuidadosamente. La pastilla tiene un aspecto vidrioso y es posible que no se vea, así es que se tiene que marcar el tubo del lado donde quedara la pastilla, antes de centrifugar.

15. Lavar la pastilla de DNA con 2 ml de etanol al 70%, y centrifugar a 11,000 rpm en un rotor Sorvall SS-34 por 10 min. Decantar el sobrenadante con cuidado de no resuspender la pastilla. El etanol remueve las sales precipitadas y hace que el DNA sea más fácil de disolver. Un segundo lavado con etanol al 70% puede mejorar los resultados para aplicaciones más sensibles como secuenciación o transfección.
16. Dejar secar la pastilla por 5-10 min. y redissolver el DNA en el volumen conveniente de buffer (TE, pH 8.0, o Tris-Cl, pH 8.5) o agua de ampoyeta.

B. MINIPREP CON TS-ELT

1. Inocular una colonia de bacterias *E. coli* que contienen el plásmido en 4 ml de medio LB con Ampicilina (100 µg/ml). Incubar a 37°C en agitación toda la noche.
2. Centrifugar el cultivo que está en fase estacionaria, en una microcentrifuga Eppendorf a 12,000 rpm por 5 min.
3. Retirar el sobrenadante con una trampa de vacío con cuidado de no absorber la pastilla.
4. Resuspender la pastilla en 200 µl de Buffer TS usando vortex.
5. Agregar 200 µl de solución ELT y agitar suavemente.

6. Dejar 5 min. a temperatura ambiente.
7. Incubar 15 min. a 70°C.
8. Centrifugar 30 min. a 12,000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf, a temperatura ambiente.
9. Desechar la pastilla, retirándola con un palillo estéril y agregar al sobrenadante un volumen de la solución PEG/NaCl.
10. Mezclar suavemente por inversión e incubar 20 min. a temperatura ambiente.
11. Centrifugar no más de 3 min. a 12,000 rpm en microcentrífuga Eppendorf a temperatura ambiente.
12. Eliminar el sobrenadante utilizando una trampa de vacío, teniendo cuidado de no absorber la pastilla de DNA.
13. Volver a centrifugar 10 segundos a 12,000 rpm y aspirar hasta la última gota del sobrenadante, esta vez con una pipeta Pasteur con la punta adelgazada.
14. Resuspender la pastilla en 50 μ l de H₂O de ampoyeta o TE, agregar 50 μ l de cloroformo y agitar vigorosamente en vortex por 15 segundos.
15. Centrifugar 5 min a 12,000 rpm.
16. Recuperar la fase acuosa (superior) y guardar a 4°C.

III. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

1. Preparar agarosa en buffer TAE 1X a la concentración deseada, dependiendo del tamaño de los fragmentos que se deseen resolver. En el presente trabajo se utilizaron geles al 1%, al 1.2% y al 1.5% (p/v).

2. Agregar 10 μ l de Bromuro de Etidio (10 mg/ml) por cada 100 ml de agarosa y mezclar.
3. Disolver la agarosa calentando en una parrilla o en un horno de microondas y agitando frecuentemente hasta que se solubilice y quede transparente.
4. Vertir la agarosa en un carro para electroforesis que contenga el peine con el número de pozos requeridos.
5. Al solidificar la agarosa, retirar el peine y colocar el gel en la cámara de electroforesis asegurando que los pozos queden del lado del ánodo.
6. Una vez solidificada la agarosa, colocar Buffer TAE 1X, de manera que cubra todo el gel.
7. Mezclar las muestras con el Buffer de carga (2 μ l por cada 10 μ l de muestra).
8. Colocar las muestras en los pozos y aplicar de 70 a 100 V., dependiendo de la concentración del gel.

IV. RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA DE pSP189

A. CORTE CON *Hind*III

1. Colocar 1 μ g de pSP189 aislado por miniprep TS-ELT.
2. Agregar 1 μ l de 10X Buffer de reacción 2 de GIBCO-BRL.
3. Agregar 1 μ l de enzima *Hind*III (10 U/ μ l) de GIBCO-BRL.
4. Ajustar con H₂O de ampoyeta a 10 μ l.
5. Incubar por dos horas a 37°C en un termoblock.

2. Agregar 10 μl de Bromuro de Etidio (10 mg/ml) por cada 100 ml de agarosa y mezclar.
3. Disolver la agarosa calentando en una parrilla o en un horno de microondas y agitando frecuentemente hasta que se solubilice y quede transparente.
4. Vertir la agarosa en un carro para electroforesis que contenga el peine con el número de pozos requeridos.
5. Al solidificar la agarosa, retirar el peine y colocar el gel en la cámara de electroforesis asegurando que los pozos queden del lado del ánodo.
6. Una vez solidificada la agarosa, colocar Buffer TAE 1X, de manera que cubra todo el gel.
7. Mezclar las muestras con el Buffer de carga (2 μl por cada 10 μl de muestra).
8. Colocar las muestras en los pozos y aplicar de 70 a 100 V., dependiendo de la concentración del gel.

IV. RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA DE pSP189

A. CORTE CON *Hind*III

1. Colocar 1 μg de pSP189 aislado por miniprep TS-ELT.
2. Agregar 1 μl de 10X Buffer de reacción 2 de GIBCO-BRL.
3. Agregar 1 μl de enzima *Hind*III (10 U/ μl) de GIBCO-BRL.
4. Ajustar con H_2O de ampoyeta a 10 μl .
5. Incubar por dos horas a 37°C en un termoblock.

6. Observar mediante electroforesis en gel de agarosa o guardar a 4°C.

B. CORTE CON *EcoRI*

1. Colocar 1 µg de DNA aislado por miniprep TS-ELT.
2. Agregar 1 µl de 10X Buffer de reacción 3 de GIBCO-BRL.
3. Agregar 1 µl de enzima *EcoRI* (10 U/µl) de GIBCO-BRL.
4. Ajustar con H₂O de ampoyeta a 10 µl.
5. Incubar por dos horas a 37°C en un termoblock.
6. Observar mediante electroforesis en gel de agarosa o guardar a 4°C.

C. CORTE CON *MluI*

1. Colocar 5 µg de pSP189 aislado por Maxiprep QIAGEN.
2. Agregar 1 µl de 10X Buffer de reacción 3 de GIBCO-BRL.
3. Agregar 1 µl de enzima *MluI* (10 U/µl) de GIBCO-BRL.
4. Ajustar con H₂O de ampoyeta a 20 µl.
5. Incubar por dos horas a 37°C en un termoblock.
6. Observar mediante electroforesis en gel de agarosa o guardar a 4°C.

V. DESFOSFORILACIÓN

Para evitar que el plásmido pSP189 cortado con *Mlu* se vuelva a religar, se tienen que eliminar los fosfatos de los extremos 5'.

1. Digerir el DNA (10-20 μg) con *Mlu* como se indicó anteriormente.
2. Cuando la digestión esté completa, extraer la muestra con fenol-cloroformo:
 - i) Agregar un volumen de una solución de 1:1 fenol-cloroformo.
 - ii) Centrifugar 5 min a 12,000 rpm y recuperar el sobrenadante cuidadosamente.
 - iii) Precipitar el DNA con 0.6 volúmenes de isopropanol.
3. Precipitar el DNA con tres volúmenes de EtOH (95-100%) por 15 min. a 0°C. Recuperar el DNA por centrifugación a 12,000 X g por 10 min. a 4°C en una microfuga convencional. Lavar dos veces la pastilla con EtOH al 70% y redissolver en 90 μl de Tris 10mM, pH 8.3. Separar una alícuota de DNA (200 ng) y guardar a -20°C.
4. Al resto de DNA adicionar el Buffer 10X CIAP, agua y 1 μl de Fosfatasa Alcalina (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase 1U/100 pmol de fosfatos). Incubar por 30 min a 37°C.
5. Al terminar el periodo de incubación adicionar 300 μl de CIAP Stop Buffer y mezclar bien.
6. Inactivar la CIAP por calentamiento a 65°C por una hora (o 10 min a 75°C) en presencia de 5 mM EDTA, pH 8.

7. Purificar el DNA desfosforilado por extracción con Fenol-Cloroformo (ver arriba).
8. Adicionar 0.1 volúmenes de 3 M de Acetato de Sodio, pH 5.2 y 2.5 volúmenes de EtOH absoluto y mezclar bien. Guardar 0°C por 15 minutos y recuperar el DNA por centrifugación a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C en una microfuga convencional.
9. Lavar la pastilla con EtOH al 70% a 4°C.
10. Redisolver el DNA precipitado en TE, pH 7.6 a una concentración de 100 µl/ml. Guardar alícuotas a -20°C.

Nota: Las cantidades de CIAP requeridas y las condiciones de incubación varían dependiendo del tipo de extremos dejados por la enzima de restricción. Para la terminación protuberante se requiere 30 minutos a 37°C para su incubación. Para la terminación lisa se requiere 1U/2pM y se incuba 15 minutos a 37°C, posteriormente se adiciona otra alícuota de CIP y se vuelve a incubar por 45 minutos a 55°C.

VI. CORTE DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN CON *Mlu*

Se siguió el mismo protocolo que al cortar pSP189, pero en este caso se dejó la muestra cortando con 1 µl de *Mlu* durante 16 hrs. a 37°C. A las 16 hrs. se agregó 1 µl más de *Mlu* y la muestra se quedó a 37°C hasta cumplir las 24 hrs., pues aún cuando a los iniciadores se les agregaron 3 bases más en los extremos, el corte con *Mlu* es poco eficiente (alrededor de un 50% de acuerdo con el fabricante).

7. Purificar el DNA desfosforilado por extracción con Fenol-Cloroformo (ver arriba).
8. Adicionar 0.1 volúmenes de 3 M de Acetato de Sodio, pH 5.2 y 2.5 volúmenes de EtOH absoluto y mezclar bien. Guardar 0°C por 15 minutos y recuperar el DNA por centrifugación a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C en una microfuga convencional.
9. Lavar la pastilla con EtOH al 70% a 4°C.
10. Redisolver el DNA precipitado en TE, pH 7.6 a una concentración de 100 µl/ml. Guardar alícuotas a -20°C.

Nota: Las cantidades de CIAP requeridas y las condiciones de incubación varían dependiendo del tipo de extremos dejados por la enzima de restricción. Para la terminación protuberante se requiere 30 minutos a 37°C para su incubación. Para la terminación lisa se requiere 1U/2pM y se incuba 15 minutos a 37°C, posteriormente se adiciona otra alícuota de CIP y se vuelve a incubar por 45 minutos a 55°C.

VI. CORTE DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN CON *Mlu*

Se siguió el mismo protocolo que al cortar pSP189, pero en este caso se dejó la muestra cortando con 1 µl de *Mlu* durante 16 hrs. a 37°C. A las 16 hrs. se agregó 1 µl más de *Mlu* y la muestra se quedó a 37°C hasta cumplir las 24 hrs., pues aún cuando a los iniciadores se les agregaron 3 bases más en los extremos, el corte con *Mlu* es poco eficiente (alrededor de un 50% de acuerdo con el fabricante).

VII. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN

Se empleó el kit de purificación QIAquick (QIAGEN). Este kit sirve para fragmentos de cadena sencilla o doble. Todos los pasos de centrifugación fueron a 13,000 rpm en una microcentrífuga convencional.

1. Agregar 5 volúmenes de Buffer PB por un volumen de reacción de PCR y mezclar.
2. Colocar una columna de spin de QIAquick en un tubo para colectar de 2 ml.
3. Para unir el DNA, aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar por 30-60 seg.
4. Desechar el líquido que pasó a través de la columna y volver a colocar la columna en el mismo tubo.
5. Para lavar, agregar 0.75 ml. de Buffer PE sobre la columna QIAquick y centrifugar por 30-60 seg.
6. Desechar el líquido que salió y volver a colocar la columna en el mismo tubo. Para desechar el completamente el EtOH del Buffer PE, centrifugar la columna por un minuto adicional a máxima velocidad.
7. Colocar la columna dentro de un tubo para centrífuga de 1.5 ml.
8. Para eluir el DNA, agregar 50 μ l de Buffer EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna por 1 min. Alternativamente, para incrementar la concentración de DNA agregar 30 μ l del Buffer EB al centro de la membrana de QIAquick, dejar reposar la columna por 1 min. y después centrifugar 1 min.

Nota: La eficiencia de la elución depende del pH. La máxima eficiencia de elución se da entre pH 7.0 y 8.5. El DNA purificado también puede eluirse con agua, pero hay que asegurarse de que el pH esté en este rango; o con TE pero el EDTA puede inhibir reacciones enzimáticas subsecuentes. El DNA debe almacenarse a -20°C ya que se degrada en ausencia de buffer.

VIII. LIGACIÓN

Para la ligación se tienen que tomar en cuenta los siguientes controles:

- ▲ Vector sin inserto, cortado y desfosforilado.
- ▲ Vector sin inserto, cortado y desfosforilado, más ligasa.
- ▲ Vector superenrollado (sin cortar).

Y el problema:

- ▲ Vector cortado y desfosforilado, más inserto, más ligasa.

Fue necesario diluir el plásmido a $100\text{ ng}/\mu\text{l}$ y para la ligación se tomó $1\ \mu\text{l}$. Del fragmento se obtuvieron $27\ \mu\text{l}$ de la purificación, aproximadamente $5\ \text{ng}$. Como era muy poco se utilizaron los $27\ \mu\text{l}$.

Nota: La eficiencia de la elución depende del pH. La máxima eficiencia de elución se da entre pH 7.0 y 8.5. El DNA purificado también puede eluirse con agua, pero hay que asegurarse de que el pH esté en este rango, o con TE pero el EDTA puede inhibir reacciones enzimáticas subsecuentes. El DNA debe almacenarse a -20°C ya que se degrada en ausencia de buffer.

VIII. LIGACIÓN

Para la ligación se tienen que tomar en cuenta los siguientes controles:

- ▲ Vector sin inserto, cortado y desfosforilado.
- ▲ Vector sin inserto, cortado y desfosforilado, más ligasa.
- ▲ Vector superenrollado (sin cortar).

Y el problema:

- ▲ Vector cortado y desfosforilado, más inserto, más ligasa.

Fue necesario diluir el plásmido a $100\text{ ng}/\mu\text{l}$ y para la ligación se tomó $1\ \mu\text{l}$. Del fragmento se obtuvieron $27\ \mu\text{l}$ de la purificación, aproximadamente 5 ng . Como era muy poco se utilizaron los $27\ \mu\text{l}$.

pSP189/Mlu/CIAP (100 ng/ μ l)	1 μ l
Inserto de DNA/Mlu	27 μ l
Buffer de ligación 5X	7 μ l
T4 DNA ligasa (2.5U/ μ l de DNA)	1 μ l
Agua a	36 μ l

La ligación se deja toda la noche, aproximadamente 16 hrs. a 4°C.

IX. CONSERVACIÓN DE CEPAS EN GLICEROL A -70°C

1. Sembrar la clona bacteriana que se desea conservar en 2 ml de medio LB con 100 μ g/ml de ampicilina y dejar crecer toda la noche en agitación a 37°C.
2. Colocar 200 μ l de glicerol estéril al 30% en medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) y 800 μ l del cultivo bacteriano.
3. Mezclar en vortex.
4. Colocar rápidamente en nitrógeno líquido o en hielo seco con alcohol.
5. Almacenar a -70°C, en un ultracongelador, o en nitrógeno líquido.

Nota: para recuperar las cepas conservadas en glicerol, simplemente se introduce el asa de siembra al rojo vivo en el vial todavía congelado y lo que se extraiga se estría sobre una caja de LB con el antibiótico apropiado. El vial puede regresarse inmediatamente a la ultracongelación después de usado.

pSP189/Mlu/CIAP (100 ng/ μ l)	1 μ l
Inserto de DNA/Mlu	27 μ l
Buffer de ligación 5X	7 μ l
T4 DNA ligasa (2.5U/ μ l de DNA)	1 μ l
Agua a	36 μ l

La ligación se deja toda la noche, aproximadamente 16 hrs. a 4°C.

IX. CONSERVACIÓN DE CEPAS EN GLICEROL A -70°C

1. Sembrar la clona bacteriana que se desea conservar en 2 ml de medio LB con 100 μ g/ml de ampicilina y dejar crecer toda la noche en agitación a 37°C.
2. Colocar 200 μ l de glicerol estéril al 30% en medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) y 800 μ l del cultivo bacteriano.
3. Mezclar en vortex.
4. Colocar rápidamente en nitrógeno líquido o en hielo seco con alcohol.
5. Almacenar a -70°C, en un ultracongelador, o en nitrógeno líquido.

Nota: para recuperar las cepas conservadas en glicerol, simplemente se introduce el asa de siembra al rojo vivo en el vial todavía congelado y lo que se extraiga se estría sobre una caja de LB con el antibiótico apropiado. El vial puede regresarse inmediatamente a la ultracongelación después de usado.

X. PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

1. Cultivar por toda la noche la cepa a transformar en medio SOB complementado con MgSO_4 10 mM.
2. Inocular 500 μl de este precultivo en 50 ml de medio SOB complementado con MgSO_4 10 mM.
3. Incubar a 37°C en agitación moderada hasta alcanzar una $\text{DO}_{550} = 0.3$.
4. Transferir el cultivo a tubos estériles Falcon (fríos) y dejar 10 min. en hielo.
5. Centrifugar a 2,500 rpm en rotor Sorval SS-34 por 12 min a 4°C .
6. Eliminar cuidadosamente el sobrenadante volteando el tubo sobre un papel hasta que drene bien.
7. Resuspender cuidadosamente la pastilla en 16 ml de buffer RF1 e incubar en hielo 15 min.
8. Centrifugar a 2,500rpm en rotor Sorval SS-34 por 12 min a 4°C .
9. Eliminar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 4 ml de buffer RF2.
10. Distribuir en volúmenes de 200 μl – 1 ml en tubos estériles pre-enfriados.
11. Utilizar ántes de 24 horas conservando a 4°C o congelar a -80°C .

XI. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

1. Colocar 200 μl de bacterias competentes con 1 μl de plásmido diluido (de 1-10ng de DNA) en un tubo Eppendorf estéril. Esto se hace en hielo y se enfría por 20 min.
2. Incubar a 42°C por un minuto y medio.
3. Incubar en hielo por 5 min.
4. Agregar 800 μl de medio SOC e incubar en agitación a 37°C durante 45 min.
5. Espatular 50 μl en una caja de LB con antibiótico (Ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).
6. Centrifugar a 12,000 rpm, durante 10 seg. Decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla en el poco medio que queda en el tubo (50-100 μl). Espatular como se indicó.
7. Colocar las cajas en una incubadora a 37°C por toda la noche (aproximadamente 16 hrs.) y después ponerlas a 4°C para evitar que las clonas crezcan demasiado.

XII. EXTRACCIÓN DE DNA DE UN GEL DE AGAROSA

El kit de GENECLEAN (Bio101) sirve para purificar DNA de una banda específica de un gel de agarosa con buffer TAE.

1. Cortar la banda del gel de agarosa con una navaja. Esto tiene que hacerse sobre un transluminador de luz UV. Deben usarse lentes especiales para proteger los ojos

y debe hacerse lo más rápido posible para evitar daños por la luz UV y de preferencia utilizar luz UV de onda larga.

2. Agregar 3 volúmenes de solución NaI e incubar a 55°C hasta derretir el gel.
3. Agregar 15 μ l de suspensión de perlas de vidrio Glassmilk.
4. Incubar a 4°C por 20 min.
5. Empastillar el complejo DNA-Glassmilk (10,000 rpm, 5 seg).
6. Desechar el sobrenadante.
7. Agregar 1 ml de buffer de lavado New Wash.
8. Centrifugar como antes y desechar el sobrenadante.
9. Repetir pasos 7 y 8.
10. Resuspender en 20 μ l de H₂O de ampolleta o TE para eluir el DNA.
11. Centrifugar 5 seg y rescatar el sobrenadante con mucho cuidado de no traer consigo las perlas. Se pueden repetir los pasos 10 y 11 para recuperar una mayor cantidad del fragmento purificado.

Nota: Las perlas Glassmilk tienen la capacidad de unir 1. mg de DNA/ml de Glassmilk. El Buffer New Wash pH 7.0-8.0 remueve las sales de la pastilla de DNA y Glassmilk sin desprender al DNA. Se pierde menos del 1% del DNA en los pasos de lavado.

XIII. MUTAGÉNESIS CON LUZ ULTRA VIOLETA

y debe hacerse lo más rápido posible para evitar daños por la luz UV y de preferencia utilizar luz UV de onda larga.

2. Agregar 3 volúmenes de solución NaI e incubar a 55°C hasta derretir el gel.
3. Agregar 15 μ l de suspensión de perlas de vidrio Glassmilk.
4. Incubar a 4°C por 20 min.
5. Empastillar el complejo DNA-Glassmilk (10,000 rpm, 5 seg).
6. Desechar el sobrenadante.
7. Agregar 1 ml de buffer de lavado New Wash.
8. Centrifugar como antes y desechar el sobrenadante.
9. Repetir pasos 7 y 8.
10. Resuspender en 20 μ l de H₂O de ampollita o TE para eluir el DNA.
11. Centrifugar 5 seg y rescatar el sobrenadante con mucho cuidado de no traer consigo las perlas. Se pueden repetir los pasos 10 y 11 para recuperar una mayor cantidad del fragmento purificado.

Nota: Las perlas Glassmilk tienen la capacidad de unir 1. mg de DNA/ml de Glassmilk. El Buffer New Wash pH 7.0-8.0 remueve las sales de la pastilla de DNA y Glassmilk sin desprender al DNA. Se pierde menos del 1% del DNA en los pasos de lavado.

XIII. MUTAGÉNESIS CON LUZ ULTRA VIOLETA

Antes de llevar a cabo esta técnica se tiene que hacer una curva patrón irradiando a diferentes intensidades para encontrar la más adecuada.

1. Colocar en un pequeño plato de plástico 50 μl del DNA ($\sim 0.3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) que será mutagenizado. El plato debe estar sobre una cama de hielo.
2. Colocar el DNA dentro del Crosslinker, que es una cámara con luz UV regulable.
3. Irradiar a la intensidad elegida, durante el tiempo predeterminado.
4. Después de irradiar el DNA, transformar bacterias competentes MBM7070.
5. Espatular en las cajas de LB/Ap¹⁰⁰/IPTG/X-Gal. Incubar toda la noche a 37°C.
6. Al día siguiente, analizar las cajas en busca de transformantes.

XIV. SECUENCIACIÓN

Para la secuenciación se utilizó el kit ABI Prism BigDye Terminator (Applied Biosystems). Para la purificación del DNA que se va a secuenciar se utilizaron columnas CENTRI-SEP (Princeton Separations).

A. REACCIÓN CON "BIG-DYE TERMINATOR"

El Kit de Big Dye contiene la enzima para secuenciar DNA polimerasa AmpliTaq FS. Esta enzima es una variante de la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* que contiene una mutación puntual en el sitio activo. Esta mutación permite una menor discriminación contra los dideoxinucleótidos, lo que conduce a una mejor intensidad de los picos. Esta enzima también tiene otra mutación que elimina la actividad de nucleasa de 5' \rightarrow 3'. La

Antes de llevar a cabo esta técnica se tiene que hacer una curva patrón irradiando a diferentes intensidades para encontrar la más adecuada.

1. Colocar en un pequeño plato de plástico 50 μl del DNA ($\sim 0.3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) que será mutagenizado. El plato debe estar sobre una cama de hielo.
2. Colocar el DNA dentro del Crosslinker, que es una cámara con luz UV regulable.
3. Irradiar a la intensidad elegida, durante el tiempo predeterminado.
4. Después de irradiar el DNA, transformar bacterias competentes MBM7070.
5. Espatular en las cajas de LB/Ap¹⁰⁰/IPTG/X-Gal. Incubar toda la noche a 37°C.
6. Al día siguiente, analizar las cajas en busca de transformantes.

XIV. SECUENCIACIÓN

Para la secuenciación se utilizó el kit ABI Prism BigDye Terminator (Applied Biosystems). Para la purificación del DNA que se va a secuenciar se utilizaron columnas CENTRI-SEP (Princeton Separations).

A. REACCIÓN CON "BIG-DYE TERMINATOR"

El Kit de Big Dye contiene la enzima para secuenciar DNA polimerasa AmpliTaq FS. Esta enzima es una variante de la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* que contiene una mutación puntual en el sitio activo. Esta mutación permite una menor discriminación contra los dideoxinucléotidos, lo que conduce a una mejor intensidad de los picos. Esta enzima también tiene otra mutación que elimina la actividad de nucleasa de 5' \rightarrow 3'. La

técnica consiste en una reacción de PCR con nucleótidos marcados con Rodaminas que al ser leídos por el instrumento de secuenciación ABI Prism 310 Genetic Analyzer se excitan con un laser de iones de argón y después son interpretados como picos de diferentes colores dependiendo el nucleótido.

Se recomiendan las siguientes cantidades y los siguientes ciclos pero estos pueden variar dependiendo del tipo de secuencia. Se colocan 50 - 100 ng de DNA, 1 μ l de primer (100 ng/ μ l), 8 μ l de Big Dye Terminator Reaction (que contiene todos los componentes necesarios, incluyendo a la enzima) y se ajusta con agua a 20 μ l. Después se lleva a cabo la siguiente reacción de PCR:

1 Ciclo	96°C	2 min.
25 Ciclos	{	96°C 10 seg.
		50°C 5 seg.
		60°C 4 min.
1 Ciclo	60°C	4 min.

B. PURIFICACIÓN POR COLUMNAS DE "CENTRI-SEP"

1. Dar pequeños golpes a la columna para asegurar que el gel seco se deposite en la parte de abajo.

2. Quitar la tapa de arriba y agregar 800 μl de H_2O inyectable y dejar reposar a la columna colocada verticalmente por lo menos 2 horas ántes de procesar la muestra.
3. Quitar las burbujas del gel de la columna invirtiéndola o dándole pequeños golpes. Dejar la columna reposar hasta que se asiente el gel.
4. Después de que el gel esté asentado y libre de burbujas hay que quitar la tapa de abajo.
5. Dejar que drene el exceso de fluido por gravedad (aproximadamente 200-250 μl). Si el líquido no fluye hay que aplicar un poco de presión con un bulbo de latex para pipeta pasteur. Cuando termine de fluir se desecha el líquido.
6. Centrifugar la columna adentro de un tubo de 2 ml a 750 X g (Microcentrífuga Sorvall a 2,700 rpm) por 2 min. Es muy importante marcar la orientación para posteriormente volver a centrifugar la columna con la misma orientación.
7. Aproximadamente se recuperarán 300 μl , éstos deben desecharse al igual que el tubo. El gel no debe secarse, así es que la muestra se tiene que procesar en los siguientes minutos.
8. Sujetar la columna a contra luz. Transferir los 20 μl de la reacción de PCR con el Big Dye Terminator a la parte de arriba del gel. Con mucho cuidado la muestra tiene que colocarse exactamente en el centro de la columna y sin tocar la superficie del gel.
9. Colocar la columna en un tubo eppendorf para coleccionar la muestra y colocarlos en la microcentrífuga. Mantener la misma orientación que en la centrifugación anterior. El punto más elevado del gel tiene que colocarse hacia afuera. Centrifugar 2 min. a la misma velocidad. Desechar la columna.

10. La muestra colectada en el eppendorf se seca en una centrifuga con vacío (speed-vac).
11. Procesar la muestra en el aparato de ABI Prism para secuenciar.

XV. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA

A continuación se muestra la técnica con las modificaciones hechas a las técnicas descritas por Miller (1972) y Sambrook *et al.* (1989) con las cuales se obtuvieron resultados positivos.

1. Cultivar las bacterias en medio LB/Ap¹⁰⁰ e IPTG 2 mM. Cultivar un control con antibiótico sin IPTG. Dejar en incubadora a 37°C toda la noche.
2. Diluir el cultivo 1:50 en el mismo medio con antibiótico e IPTG. El control se diluye en medio sin IPTG. Incubar aproximadamente 3 hrs. (OD₆₀₀ 0.3–0.7) para que las células estén en fase exponencial.
3. Colocar en hielo. Mezclar 0.5 ml del cultivo celular con 0.5 ml de buffer Z. Agregar 2 gotas de cloroformo y una gota de SDS al 0.1%. Agitar en vortex por 10 seg. e incubar a 28°C por 5 min.
4. Agregar 0.2 ml de ONPG en medio A (4 mg/ml) al cultivo preparado en el paso anterior. Agitar y dejar reposar. Tomar el tiempo de reacción desde que se

10. La muestra colectada en el eppendorf se seca en una centrifuga con vacío (speed-vac).
11. Procesar la muestra en el aparato de ABI Prism para secuenciar.

XV. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA

A continuación se muestra la técnica con las modificaciones hechas a las técnicas descritas por Miller (1972) y Sambrook *et al.* (1989) con las cuales se obtuvieron resultados positivos.

1. Cultivar las bacterias en medio LB/Ap¹⁰⁰ e IPTG 2 mM. Cultivar un control con antibiótico sin IPTG. Dejar en incubadora a 37°C toda la noche.
2. Diluir el cultivo 1:50 en el mismo medio con antibiótico e IPTG. El control se diluye en medio sin IPTG. Incubar aproximadamente 3 hrs. (OD₆₀₀ 0.3–0.7) para que las células estén en fase exponencial.
3. Colocar en hielo. Mezclar 0.5 ml del cultivo celular con 0.5 ml de buffer Z. Agregar 2 gotas de cloroformo y una gota de SDS al 0.1%. Agitar en vortex por 10 seg. e incubar a 28°C por 5 min.
4. Agregar 0.2 ml de ONPG en medio A (4 mg/ml) al cultivo preparado en el paso anterior. Agitar y dejar reposar. Tomar el tiempo de reacción desde que se

agrega el ONPG hasta que aparezca un color amarillo. Detener la reacción agregando 0.5 ml de Na_2CO_3 1 M.

5. Después de parar la reacción, determinar la absorbancia de los cultivos a 600 nm. Posteriormente leer la densidad óptica a 420 nm y a 550 nm. La lectura a 550 nm es para corregir el ruido ocasionado por las partículas de las células que fueron lisadas.
6. Posteriormente se calculan las unidades de β -galactosidasa empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades de } \beta\text{-galactosidasa} = 1000 \times \frac{\text{OD}_{420} - (1.75 \times \text{OD}_{550})}{t \times v \times \text{OD}_{600}}$$

OD_{420} y OD_{550} , se miden en la mezcla de reacción.

OD_{600} , densidad del cultivo antes del ensayo.

t, tiempo de reacción en minutos

v, volumen del cultivo utilizado en el ensayo (0.5 ml en este caso).

1.75, factor de corrección.

XVI. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LA ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA

A) ANÁLISIS DE VARIANZA

agrega el ONPG hasta que aparezca un color amarillo. Detener la reacción agregando 0.5 ml de Na_2CO_3 1 M.

5. Después de parar la reacción, determinar la absorbancia de los cultivos a 600 nm. Posteriormente leer la densidad óptica a 420 nm y a 550 nm. La lectura a 550 nm es para corregir el ruido ocasionado por las partículas de las células que fueron lisadas.
6. Posteriormente se calculan las unidades de β -galactosidasa empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades de } \beta\text{-galactosidasa} = 1000 \times \frac{\text{OD}_{420} - (1.75 \times \text{OD}_{550})}{t \times v \times \text{OD}_{600}}$$

OD_{420} y OD_{550} , se miden en la mezcla de reacción.

OD_{600} , densidad del cultivo antes del ensayo.

t, tiempo de reacción en minutos

v, volumen del cultivo utilizado en el ensayo (0.5 ml en este caso).

1.75, factor de corrección.

XVI. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LA ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA

A) ANÁLISIS DE VARIANZA

Para comprobar si hubo diferencias significativas en los ensayos de actividad de β -galactosidasa se realizó una prueba de hipótesis llamada Análisis de Varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 0.05 (Neter. *et. al.*, 1996). Las pruebas de hipótesis requieren de una hipótesis nula (H_0) y una hipótesis alterna (H_1). Estas pruebas también requieren un estadístico de prueba, en base al cual se podrá decidir si se rechaza la hipótesis nula (se acepta la hipótesis alterna) o si no se tiene suficiente evidencia para rechazarla.

Hipótesis:

H_0 : No existen diferencias en cuanto a la actividad de β -galactosidasa entre las 8 muestras experimentales.

H_1 : Existen diferencias en cuanto a la actividad de β -galactosidasa entre las 8 muestras experimentales.

H_0 : $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_8$

H_1 : Al menos un par de medias son diferentes.

Tabla 3. Datos utilizados en el análisis de varianza.

	33.15	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	Sin IPTG	Σ
T_j	117.3 9	10.82	15.09	7.7	2.6	10.94	21.3	4.21	190.05
n_j	3	3	3	3	3	3	3	3	24
\bar{x}_j	39.69	3.61	5.03	2.57	0.89	3.64	7.11	1.06	

Donde: n_j = tamaño de la muestra en el estrato j .

T_j = total en el estrato j .

x_j = media muestral en el estrato j .

($j = 33.15, 2.1, 2.2, \dots, \text{sin IPTG}$).

El estadístico de prueba que se utilizó fue la F de Fisher.

Tabla 4. Tabla de Análisis de Varianza (ANOVA)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Fo
Tratamientos (entre)	K-1	$\sum_j n_j (\bar{x}_j - \bar{X})^2$	S.C. trats/K-1	$\frac{CM.Trats}{CM. Error}$
Error (dentro)	N-K	S.C. Total - S.C. Trats.	S. C. Error/N-K	
Total	N-1	$\sum_i \sum_j (X_{ij} - \bar{X})^2$		

Con un nivel de significancia de 0.05. La Tabla de ANOVA que se obtuvo usando datos y fórmulas fue la siguiente:

Tabla 5. ANOVA realizado para encontrar diferencias en la actividad de β -galactosidasa.

F.V.	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fo	F ^{0.05} _{7,17}
Tratamiento	7	3422.48	488.9269	1596.39	2.62
Error	17	5.206	0.30627		
Total	23	3427.69			

Valor crítico y regla de decisión:

Con una confianza del 95% y una F con (K-1) (N-K) grados de libertad, se obtiene:

$$F_{(7,17)}^{0.05} = 2.62. \text{ Se rechaza } H_0 \text{ si } F_0 > F_{K-1, N-K}^{\alpha}$$

Decisión:

Como $F_0 < F_{(7,17)}^{0.05} \rightarrow$ Al menos un par de medias son diferentes.

B) DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA REAL

Así que se realizó la prueba de Diferencia Mínima Significativa Real (DMSR) propuesta por Tukey (Neter. *et. al.*, 1996):

$$DMSR = q_{K, N-K}^{\alpha} \sqrt{\frac{CME}{n \text{ común}}}$$

Donde q son los valores de distribución de q

A = nivel de significancia

K = # de medias a comparar

N-K = grados de libertad del error

n común = # de unidades experimentales comunes a cada tratamiento.

A continuación se muestra una semimatriz de menor a mayor con las diferencias en valor absoluto:

Tabla 6. Semimatriz que muestra las diferencias reales de la actividad de β -galactosidasa entre los candidatos.

	Muestras							
(-)	2.4 0.89	-IPTG 1.06	2.3 2.57	2.1 3.61	2.5 3.64	2.2 5.03	2.6 7.11	33.15 39.69
2.4 0.89	-	0.17	1.68*	2.72*	2.75*	4.14*	6.22	38.8*
Sin IPTG 1.06	-	-	1.51	2.55*	2.58*	3.97*	6.05*	38.63*
2.3 2.57	-	-	-	1.04	1.07	2.46*	4.54*	37.12*
2.1 3.61	-	-	-	-	0.03	1.42	3.5*	36.8*
2.5 3.64	-	-	-	-	-	1.39	3.47*	36.05*
2.2 5.03	-	-	-	-	-	-	2.08*	34.66*
2.6 7.11	-	-	-	-	-	-	-	32.58*
33.15 39.69	-	-	-	-	-	-	-	-

* Son diferentes significativamente porque rebasan la DMSR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pAR33.15.

De manera general, la construcción del plásmido se llevó a cabo siguiendo la siguiente estrategia: se purificó el plásmido pSP189, en el cual se insertaría la secuencia 33.15. Después se hizo un análisis de restricción en busca de una enzima que cortara en un sólo sitio del plásmido para poder insertar ahí la secuencia. Este corte no debía afectar a ninguno de los genes del plásmido. Además esta enzima no debería cortar dentro de la secuencia 33.15. La enzima que cumplió con estas características fue *Mlu*.

Por otra parte, se buscó la secuencia 33.15 en el GenBank. Debido a que en las bases de datos no se encuentra la secuencia completa, se tuvieron que buscar en la bibliografía las regiones flanqueantes, sobre las que se diseñarían los iniciadores que serían empleados en la reacción de PCR. Los iniciadores se diseñaron con un sitio de corte de *Mlu* (Figura 5) para que después de hacer una amplificación por PCR, la secuencia quedara flanqueada por sitios de corte de *Mlu*.

Tanto el plásmido como el producto de amplificación fueron cortados con *Mlu*. Después se ligaron, para de esta manera obtener la construcción pAR33.15.

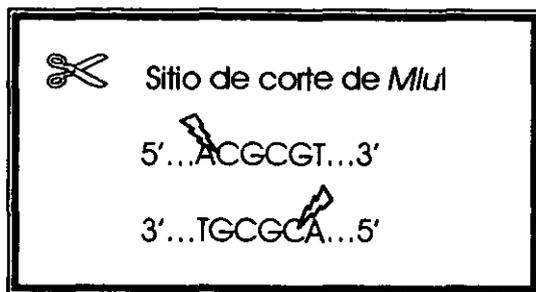


Figura 5. Secuencia de reconocimiento para la enzima *MluI*.

II. PREPARACIÓN DEL VECTOR

Mediante una maxi-preparación se purificó el plásmido pSP189 y, con objeto de verificar su identidad, se le cortó con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI*. Posteriormente se corrieron las muestras en una electroforesis. La muestra sin cortar (Figura 6, carril 2) mostró tres bandas, esto es debido a la presencia de moléculas de plásmido circular superenrollado (forma I), circular relajado (forma II) y lineal (forma III; Sambrook *et al.*, 1989). En el carril 3 de la Figura 6 se observan tres bandas después del corte con *HindIII*, dichas bandas coinciden con los tamaños esperados pues *HindIII* corta a pSP189 en tres sitios correspondientes a las bases 1,869, 2,395 y 3,564 de la secuencia de pSP189 (GenBank número de acceso: U14594), liberando así tres fragmentos de 3,257 pb, 1,169 pb y 526 pb. Por su parte, *EcoRI* sólo corta a pSP189 en un sitio y lo lineariza, por lo que se observó una banda del tamaño esperado, de aproximadamente 4,952 pb (Figura 6, carril 4). De esta manera se verificó el material de trabajo.

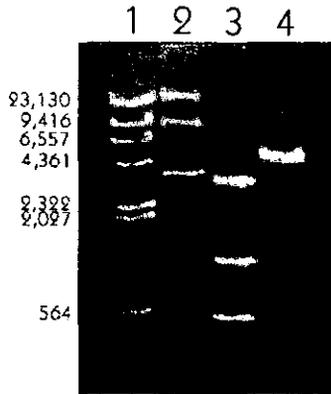


Figura 6. Electroforesis del pSP189 cortado con *Hind*III y *Eco*RI. 1: DNA λ /*Hind*III, 2: pSP189, 3: pSP189/*Hind*III, 4: pSP189/*Eco*RI.

Posteriormente, una porción del plásmido purificado se linearizó con la enzima *Mlu* y se le eliminaron los fosfatos libres en sus extremos 5' (para detalles ver Materiales y métodos). De esta manera el vector quedó listo para recibir el fragmento conteniendo la secuencia minisatélite (VNTR) 33.15.

III. AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA 33.15

A. Diseño de los iniciadores.

En virtud de que la enzima *Taq* DNA polimerasa extiende una cadena de DNA en dirección 5' a 3', los iniciadores (en inglés "primers") deben ser complementarios a ambos extremos 3' de la secuencia blanco. Estos iniciadores deben ser específicos para la

secuencia deseada. En el caso de la secuencia 33.15, los iniciadores no podían diseñarse sobre la secuencia del minisatélite debido a que está formada de secuencias núcleo que se repiten una tras otra y así, un iniciador diseñado sobre un repetido aparearía en diferentes sitios de la misma secuencia. Por ello, primero se buscaron las regiones que flanquean a este VNTR. A ambos lados de la secuencia 33.15 existen secuencias no repetitivas (Figura 7; Jeffreys *et al.*, 1985a). Sobre estas secuencias flanqueantes se aplicó el diseño de los iniciadores mediante el programa de cómputo OLIGO 4.1 (National Biosciences Inc.). Para ello se tomó en consideración que aún en las secuencias flanqueantes a la secuencia 33.15 hay fragmentos muy parecidos entre sí que favorecen la inespecificidad, además de que las temperaturas de alineamiento de ambos iniciadores tenían que ser semejantes y menores a la temperatura de extensión de la polimerasa.

A fin de incrementar la señal específica de amplificación de la secuencia 33.15 con respecto al fondo de otras secuencias no deseadas, los iniciadores debían ser, por un lado, lo suficientemente grandes para permitir un reconocimiento preciso de la secuencia blanco y, por otra parte, lo suficientemente pequeños para garantizar un rápido alineamiento (hibridización) con el DNA molde. Observaciones empíricas han demostrado que iniciadores de aproximadamente 27 nucleótidos cumplen esos requerimientos.

```

5'GGTGGTTTTC AAGAAAGCGT TTCATGCAAT TTGCTTTAAA TGTTAGGAAA
▼GGCAGGTGGA GA GTGGGCA GGTGGAGA TG TGGGCAGGTG GAGAGGTGG
CAGGTGGAGA GGTGGGCAGG TGGAGAGGTG GGCAGGTGGA GAGGTGGGCA
GGTGGAGAGG TGGGCAGGTG GAGAGGTGG CAGGTGGAGA GTGGGCGAGG
TGGAGAGGTG GGCAGGTGGA GAGGTGGGCA GGTGGAGAGG GCAGGTGGAG
AGTGGGCGAG GTGGAGGT AGGCAGGTGG AGAGGTGGG CAGGTGGGAG
GTGGGCAGGT GGAGAGGTGC GCAGGTGGAG AGGTGGGCAG GTGGAGAGGT
GGGCAGGTGG AGAGGTGGC AGGTGGAGA GTGGGCAGGT GGAGAGGTGG
GCAGGTGGAG AGGTGGGCAG GTGGAGAGG CAGGTGGAGA GGTGGGCGAGG
TGGAGAGGTG GGCAGGTGGA GAGGTGGGCA GGTGGAGAGG TGGGCAGGT
GAAATACCTA CAGATGAGGT GTGTGCTTAT TCTCTGTGCA AGATTCAGA
GT 3'

```

Figura 7. Secuencia 33.15 con regiones flanqueantes (Jeffreys *et. al.*, 1985a).

Con letras cursivas se indican las regiones flanqueantes, las secuencias núcleo se alternan en letras claras y oscuras, las diferencias respecto a la secuencia núcleo están señaladas en letras blancas y las eliminaciones con un triángulo negro.

Después de haber diseñado los oligonucleótidos iniciadores siguiendo esos criterios, se les agregó la secuencia de reconocimiento de la enzima *Mlu*, así como tres nucleótidos adicionales en el extremo 5' para hacer más eficiente la restricción una vez obtenido el producto. Después de esto, los iniciadores se volvieron a analizar empleando el programa OLIGO 4.0. Se cuidó que sus temperaturas de alineamiento (T_m) fueran lo más similares posible y que no formaran apareamientos estables entre sí ni consigo mismos. Posteriormente se realizó un escrutinio de los bancos de secuencias de humano disponibles en GenBank para tratar de asegurar que los iniciadores no aparearían con otras secuencias no deseadas. Cabe señalar que al momento de hacer este análisis, todavía no había sido dada a conocer la totalidad de la secuencia del genoma humano, por lo que este análisis fue incompleto. Por

último, y una vez que se hubo cumplido con todos los requisitos, los iniciadores se mandaron sintetizar a la empresa Life-Technologies (Rockville, Maryland, EUA). La síntesis fue satisfactoria pues la empresa aseguró el 99% de fidelidad. La secuencia de los iniciadores "directo" y "reverso" se muestra a continuación. En cursivas se muestran los sitios de corte de *Mlu*I y los tres nucleótidos adicionales se encuentran subrayados.

Directo:

5' -ATT*ACGCGT*TAAAGCGTTTCATGCAATT-3'

Reverso:

3' -TACTCCACACACGAATAT*TGCGCA*ATA-5'

De acuerdo a la secuencia del minisatélite 33.15 reportada (Figura 7), empleando estos iniciadores se obtendría la amplificación de un producto de 534 pb.

B. Ensayo de amplificación.

Empleando los iniciadores anteriores, se realizó un ensayo de PCR. Como fuente de DNA molde se empleó DNA total de humano de sexo femenino (CLONTECH # 6550-1) y una DNA polimerasa de alta fidelidad que no introdujera mutaciones durante la amplificación (PLATINUM® *Taq* DNA pol High Fidelity, Gibco-BRL # 11304-029). A fin de obtener la mayor cantidad del producto específico, se variaron los parámetros de amplificación (ver Tablas 7 y 8). En la Figura 8 se muestra el producto amplificado por PCR (carril 2) en donde se observa una banda más abundante ligeramente mayor a 500 pb, pero también se observan otras bandas mayores y menores, aunque no muy bien diferenciadas. Esto es algo hasta cierto punto esperado debido a que el genoma

humano es tan grande (alrededor de 3×10^9 pb), que existe la posibilidad de apareamientos de los iniciadores en otros sitios del genoma. A pesar del cuidado que se tuvo al diseñar los iniciadores y a las variaciones en los parámetros de amplificación, no fue posible eliminar completamente el fondo de inespecificidad. En los carriles 3 y 4 de la Figura 8 se muestran los controles positivo y negativo, respectivamente. El control positivo contenía la misma mezcla utilizada para la muestra, pero con otros iniciadores diseñados para la β -globina de los cuales se tenía la certeza de que amplificaban sobre el DNA molde empleado.

Tabla 7. Ensayo de amplificación básico para el VNTR 33.15.

Componente	Cantidad	Concentración final
Buffer de PCR 10X, sin Mg	5 μ l	1X
Mezcla de dNTPs 10 mM	1 μ l	0.2 mM cada uno
MgCl ₂ 50 mM	1.5 μ l	1.5 mM
Mezcla de iniciadores (10 μ M cada uno)	1 μ l	0.2 μ M
DNA molde (10 ng/ μ l)	10 μ l	100 ng
Platinum H.F. Taq DNA Pol	0.5 μ l	2.5 unidades
Agua de ampoyeta	a 50 μ l	

Tabla 8. Parámetros de amplificación para la secuencia 33.15.

No. de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	5 min
30	94°C	1 min
	48°C	1 min
	72°C	1 min
1	72°C	10 min
1	4°C	Hold

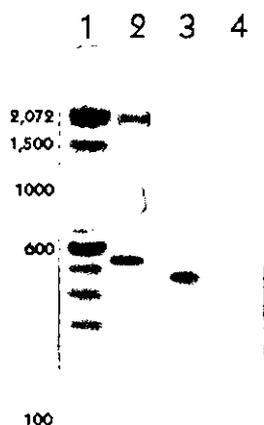


Figura 8. Electroforesis del producto amplificado por PCR. 1: Marcador de 100 pb. 2: productos de amplificación por PCR. 3: control positivo, amplificación con iniciadores para β -globina. 4: control negativo, amplificación sin DNA molde.

A pesar de que se obtuvieron varias bandas se decidió trabajar con esa amplificación porque la banda mayoritaria correspondía al tamaño esperado.

IV. INSERCIÓN DEL VNTR 33.15 EN EL pSP189.

En vista de que en la amplificación del VNTR 33.15 no generó un producto único, se siguieron dos estrategias para su clonación en el pSP189. En la primera de ellas, la banda de DNA > 500 pb se extrajo de un gel preparativo de agarosa y se purificó por GeneClean (ver Materiales y métodos), se cortó con *Mlu* como ya se había hecho con el plásmido, se ligaron ambos fragmentos de DNA y con el producto de esta ligación se transformaron células *E. coli* DH5 α competentes. El análisis de la secuencia del inserto de uno de los transformantes arrojó el siguiente resultado:

```
CTTCACCACC CTTGTTATGC TTGTGCTCTA TATAGTTATG TCGTGCTGAA
ATGTTGTCTC ATGCCTAGTC ATCCATGCCT TATTCGACAT ATTATGGCCA
TCATGGCTTA TGATAGTCAA GGCACGTTCC CAGCGGCATT CCTGTACGTC
GTACGCTATC AGGAATTATA TACTTGCCTT GTTTGAGACA TTCTTGATGT
GCTTCTGGTA TGTAGCCTTC CATGCCTGCA TGCTAGTGGG TTGTCAACAA
GCTCAAAGTG TATGCGCTAT GCCTCCAGGG GGCTTACGAT AACTTTGGC
TAGTGTCTAT GTACCGACGT AGTCGGACTG TGGCCGATCC GGAAGGCCTG
CAGAGAGCAC ATTTCGATGCT GAAATATACC TATGCGAAGA GCCATGTGAC
TAGTTCAGGA CTGGCTTGGG CTCTTAAGAA CGGAAGCCCT TCTATTGTGA
ATATGGCTGT GTGCTGTTGC TGAAACATCA TTACAGACGG TACTAATTGA
AGCATCTCAT CCAAGGGCGT AAGTATAAGG TGTGTGCTTA TC
```

Figura 9. Secuencia parcial del inserto > 500 pb purificado por GeneClean e introducido en pSP189. La secuencia está en dirección 5' a 3' y fue obtenida a partir del electroferograma A (ver apéndice II).

A pesar de que se obtuvieron varias bandas se decidió trabajar con esa amplificación porque la banda mayoritaria correspondía al tamaño esperado.

IV. INSERCIÓN DEL VNTR 33.15 EN EL pSP189.

En vista de que en la amplificación del VNTR 33.15 no generó un producto único, se siguieron dos estrategias para su clonación en el pSP189. En la primera de ellas, la banda de DNA > 500 pb se extrajo de un gel preparativo de agarosa y se purificó por GeneClean (ver Materiales y métodos), se cortó con *Mlu* como ya se había hecho con el plásmido, se ligaron ambos fragmentos de DNA y con el producto de esta ligación se transformaron células *E. coli* DH5 α competentes. El análisis de la secuencia del inserto de uno de los transformantes arrojó el siguiente resultado:

```
CTTCACCACC CTTGTTATGC TTGTGCTCTA TATAGTTATG TCGTGCTGAA
ATGTTGTCTC ATGCCTAGTC ATCCATGCCT TATTCGACAT ATTATGGCCA
TCATGGCTTA TGATAGTCAA GGCACGTTCC CAGCGGCATT CCTGTACGTC
GTACGCTATC AGGAATTATA TACTTGCCTT GTTTGAGACA TTCTTGATGT
GCTTCTGGTA TGTAGCCTTC CATGCCTGCA TGCTAGTGGG TTGTCAACAA
GCTCAAAGTG TATGCGCTAT GCCTCCAGGG GGCTTACGAT AACTTTGGC
TAGTGTCTAT GTACCGACGT AGTCGGACTG TGGCCGATCC GGAAGGCCTG
CAGAGAGCAC ATTTCGATGCT GAAATATACC TATGCGAAGA GCCATGTGAC
TAGTTCAGGA CTGGCTTGGA CTCTTAAGAA CGGAAGCCCT TCTATTGTGA
ATATGGCTGT GTGCTGTTGC TGAACATCA TTACAGACGG TACTAATTGA
AGCATCTCAT CCAAGGGCGT AAGTATAAGG TGTGTGCTTA TC
```

Figura 9. Secuencia parcial del inserto > 500 pb purificado por GeneClean e introducido en pSP189. La secuencia está en dirección 5' a 3' y fue obtenida a partir del electroferograma A (ver apéndice II).

A pesar de que se obtuvieron varias bandas se decidió trabajar con esa amplificación porque la banda mayoritaria correspondía al tamaño esperado.

IV. INSERCIÓN DEL VNTR 33.15 EN EL pSP189.

En vista de que en la amplificación del VNTR 33.15 no generó un producto único, se siguieron dos estrategias para su clonación en el pSP189. En la primera de ellas, la banda de DNA > 500 pb se extrajo de un gel preparativo de agarosa y se purificó por GeneClean (ver Materiales y métodos), se cortó con *Mlu* como ya se había hecho con el plásmido, se ligaron ambos fragmentos de DNA y con el producto de esta ligación se transformaron células *E. coli* DH5 α competentes. El análisis de la secuencia del inserto de uno de los transformantes arrojó el siguiente resultado:

```
CTTCACCACC CTTGTTATGC TTGTGCTCTA TATAGTTATG TCGTGCTGAA
ATGTTGTCTC ATGCCTAGTC ATCCATGCCT TATTCGACAT ATTATGGCCA
TCATGGCTTA TGATAGTCAA GGCACGTTCC CAGCGGCATT CCTGTACGTC
GTACGCTATC AGGAATTATA TACTTGCCTT GTTTGAGACA TTCTTGATGT
GCTTCTGGTA TGTAGCCTTC CATGCCTGCA TGCTAGTGGG TTGTCAACAA
GCTCAAAGTG TATGCGCTAT GCCTCCAGGG GGCTTACGAT AACTTTGGC
TAGTGTCTAT GTACCGACGT AGTCGGACTG TGGCCGATCC GGAAGGCCTG
CAGAGAGCAC ATTCGATGCT GAAATATACC TATGCGAAGA GCCATGTGAC
TAGTTCAGGA CTGGCTTGGA CTCTTAAGAA CGGAAGCCCT TCTATTGTGA
ATATGGCTGT GTGCTGTTGC TGAACATCA TTACAGACGG TACTAATTGA
AGCATCTCAT CCAAGGGCGT AAGTATAAGG TGTGTGCTTA TC
```

Figura 9. Secuencia parcial del inserto > 500 pb purificado por GeneClean e introducido en pSP189. La secuencia está en dirección 5' a 3' y fue obtenida a partir del electroferograma A (ver apéndice II).

Esta secuencia no coincide con la reportada para el VNTR 33.15 y sin embargo tiene un tamaño similar. Posiblemente se trate de una amplificación espúria de los iniciadores empleados. Con esta secuencia se realizó un análisis tipo BLAST sobre el GenBank (RID: 987264842-7434-6240). Se encontró que sólo pequeñas porciones (alrededor de 20 nucleótidos) de esta secuencia, tienen homología con diversas secuencias del genoma humano reportadas, pero en todos los casos se trata de secuencias no codificantes ubicadas en los intrones o en regiones intercistricas de otros genes.

En vista de que mediante esta estrategia no fue posible la inserción del minisatélite 33.15, se optó por una segunda alternativa de clonación: la mezcla de amplificación conteniendo el producto de > 500 pb y otros de diferente peso molecular, se purificó mediante QIAGEN y se cortó con *Mlu* como se describe en Materiales y métodos. En la Figura 10 (carril 2) se muestra al vector (pSP189 cortado con *Mlu* y desfosforilado). Se observa una única banda muy saturada debido a que la concentración de plásmido que se extrajo fue muy elevada, alrededor de 300 ng/ μ l, (cuantificada por espectrofotometría) al contrario de la concentración del producto de amplificación (carril 3) que fue de 0.18 ng/ μ l. A pesar de que era muy poco DNA fue suficiente para la ligación con el pSP189 ya que se tenían 27 μ l (5 ng).

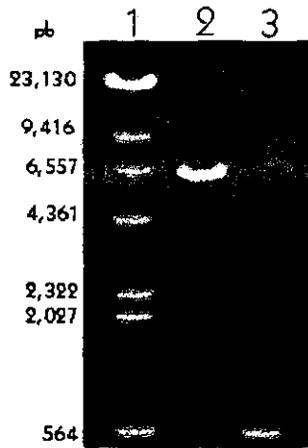


Figura 10. Electroforesis de la restricción con *Mlu* de pSP189 y del producto amplificado.
 1: DNA λ /*Hind*III. 2: pSP189/*Mlu*/CIAP. 3: producto amplificado/*Mlu*.

Primeramente se había realizado un ensayo para probar la calidad de la enzima T4-DNA ligasa: la Figura 11 muestra al DNA del fago λ cortado con *Hind*III y re-ligado con la T4-DNA ligasa. Se puede observar que funciona bastante bien porque los fragmentos de bajo peso molecular desaparecieron para dar lugar a uno de alto peso molecular. Posteriormente se ligó la mezcla de amplificación con el vector y con esta mezcla de ligación se transformaron bacterias competentes *E. coli* DH5 α (ver Materiales y métodos).



Figura 11. Electroforesis de DNA λ /*Hind*III + T4 DNA ligasa. 1: DNA λ /*Hind*III. 2: DNA λ /*Hind*III + T4 DNA ligasa.

Las cajas donde se sembraron las bacterias transformadas contenían ampicilina, así es que las bacterias transformadas con el plásmido serían resistentes a este antibiótico. La tabla 9 muestra los resultados de la transformación. Se obtuvieron 70 colonias en total. De acuerdo a lo esperado, el control negativo que contenía solamente al vector (pSP189 cortado y desfosforilado) y a la enzima T4 DNA ligasa, que en teoría no debía religarse, no produjo ninguna transformante. En otro control negativo, pSP189 cortado con *Mlu* y sin ligasa, tampoco se esperaba crecimiento debido a la baja eficiencia de transformación bacteriana con plásmido linearizado. Aquí sólo se encontró una colonia, esto pudo deberse a que no todas las moléculas de plásmido fueron cortadas con *Mlu*. De cualquier manera,

se consideró que este fondo de transformación (70 vs 1) no era significativo. Un tercer control de la ligación que se utilizó fue el plásmido cortado, no desfosforilado y religado. En este caso se concluyó que la defosforilación había sido eficiente ya que se obtuvieron 100 colonias. Por último, para estimar la eficiencia de transformación, se utilizó 1 ng del plásmido superenrollado. En este caso se observaron más de 100 colonias, lo que implica una eficiencia de transformación $> 1 \times 10^8$ UFC/mg de DNA.

Tabla 9. Resultados de la transformación de bacterias DH5 α competentes con la ligación del fragmento y el plásmido pSP189 y sus controles.

Cajas	No. de Colonias
pSP189/Mlu/CIAP + fragmento + T4 DNA ligasa	70
pSP189/Mlu/CIAP + T4 DNA ligasa	0
pSP189/Mlu	1
pSP189/Mlu + T4 DNA ligasa	100
pSP189 superenrollado	> 100

V. SELECCIÓN DE CANDIDATOS

Mediante "minipreps" se purificó el DNA plasmídico de 20 de los 70 candidatos obtenidos. Estas muestras se cortaron con *Hind*III. Como ya se había demostrado (ver Figura 6), el pSP189 cortado con *Hind*III libera tres fragmentos: de

3,257 pb, 1,169 pb y 526 pb. La clona que hubiera recibido el inserto de 534 pb debería liberar también tres fragmentos, pero ahora de 3,791 pb, 1,169 pb y 526 pb.

En las Figuras 12 y 13 se muestra el DNA plasmídico de algunos candidatos cortados con *Hind*III. Los candidatos que aparentan tener un fragmento del tamaño esperado son 1, 2, 4 y 9 (Figura 12, carriles 5, 6, 8 y 13 respectivamente). Los demás candidatos parecen tener fragmentos mucho más grandes como el candidato 3 (Figura 12, carril 7) o incluso parecen haber perdido un fragmento como el candidato 6 (Figura 12, carril 10). El candidato 38 (Figura 13, carril 7) muestra una cuarta banda como si hubiera ganado un sitio *Hind*III.



Figura 12. Patrón de restricción con *Hind*III de los candidatos 1-14. Carril 1: DNA λ /BstEII; carril 2: pSP189; carril 3: pSP189/*Hind*III; carril 4: candidato # 3 sin restricción; carriles 5 al 18: candidatos 1 a 14 respectivamente, cortados con *Hind*III.

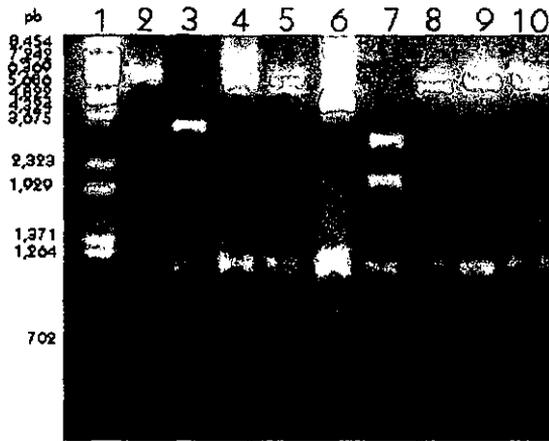


Figura 13. Patrón de restricción con *Hind*III de los candidatos 35-41. Carril 1: DNA λ /*Bst*Ell; carril 2: candidato # 35 sin restricción; carril 3: pSP189/*Hind*III; carriles 4 a 10: candidatos 35 a 41 respectivamente, cortados con *Hind*III.

Para observar el tamaño de los fragmentos se realizó un PCR a cada uno de los candidatos seleccionados (1, 2, 4, 9 y 38). Con las condiciones de amplificación empleadas, ninguna de las clonas parecía tener un fragmento de 534 pb (Figura 14). Se amplificaron fragmentos de diferente tamaño. Esto podría indicar una de tres posibilidades: 1) que ninguno de los candidatos tuviera la secuencia deseada, 2) que se hubiera insertado la secuencia 33.15 junto con otra secuencia, o 3), que en el DNA genómico que se utilizó, la secuencia 33.15 tuviera una variación de tamaño. Esto último no sería raro dado el polimorfismo entre individuos (Shriver *et al.*, 1993).

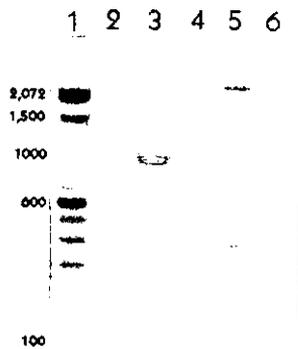


Figura 14. Electroforesis de los PCR de los candidatos seleccionados. Carril 1: marcador de 100 pb; carriles 2 a 6, productos de amplificación de los candidatos 1, 2, 4, 9 y 38, respectivamente.

Se procedió a secuenciar las clonas 1 y 2 conteniendo fragmentos de alrededor de 350 y 1,000 pb respectivamente. La secuenciación del 2 se muestra en el electroferograma B del Apéndice II. El aparato de secuenciación empleado tiene un detector que, dependiendo del cromóforo asociado al dideoxinucleótido incorporado, escribe la inicial del nucleótido secuenciado. Este detector suele producir lecturas erróneas así es que cada secuenciación tiene que analizarse para asegurar que cada pico del electroferograma tenga la letra correspondiente correctamente asignada. Los electroferogramas mostrados en el Apéndice II tienen algunos errores, de manera que cada secuencia se analizó y se reescribió en esta sección. En el electroferograma B (ver apéndice II) se alcanza a ver claramente hasta la base 153 y la secuencia interpretada es la siguiente:

TGCTTTAAAT GTTGGAAAGG CAGGTGGAGA TGTGGGCAGG TGGAGATGTG
GGCAGGTGGA GAGGTGGGCA GGTGGAGAGG TGGGCAGGTG GAGAGGTGGG
CAGGTGGAGA GGTGGGCAGG TGGAGAGGTG GGCAGGTGGA GAGGT

Figura 15. Secuencia parcial del inserto del candidato 2 obtenida empleando el iniciador "directo". La secuencia nucleotídica se muestra en dirección 5' → 3'. En cursivas se muestra parte de la secuencia flanqueante. La secuencia se interpretó a partir del electroferograma B.

En esta, la secuencia núcleo del VNTR 33.15 se encuentra repetida 7 veces y media. Había dos opciones no excluyentes: 1) que en efecto se trate de la secuencia 33.15 reportada, pero que la secuencia obtenida esté incompleta; o 2) que la secuencia que fue clonada sea más pequeña de lo esperado. Como en el extremo 3' no se detecta la secuencia complementaria al iniciador "reverso" y dado que el inserto que se amplificó sobre esta clona es de aproximadamente 1,000 pb (Figura 14), es probable que se trate de la primera alternativa. Esta clona (la número 2) se continuó analizando.

VI. SECUENCIACIÓN DEL VNTR 33.15

Los VNTR, como el 33.15, presentan dificultades para su secuenciación debido a que tienen una capacidad de renaturalización muy alta (Jeffreys, 1985b). En las siguientes secuenciaciones se cambiaron las condiciones de amplificación para obtener mejores resultados; por ejemplo, se incrementaron los tiempos y la temperatura de desnaturalización del DNA.

En una posterior secuenciación del candidato # 2 con el iniciador "directo" se aumentó la temperatura de desnaturalización en 2°C. Esta secuencia salió muy mal (Electroferograma C) y no fue posible analizarla. Por recomendación del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA), se agregó 1 mM MgCl₂, 5% DMSO y 5% de glicerol; además de que se incrementó el tiempo de desnaturalización a 10 minutos a 96°C (Tabla 10). Con estas condiciones se hizo otra secuenciación con el iniciador "directo".

Tabla. 10. Parámetros utilizados para la secuenciación de el candidato 2.

No. de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	96°C	10 min
25 Ciclos	98°C	10 seg
	50°C	5 seg
	63°C	4 min
Post PCR	60°C	4 min
	4°C	∞

La secuencia deducida a partir del electroferograma D es la siguiente:

TGCTTTAATG *TTAGGAAAGG* **CAGGTGGAGA** *TGTGGGCAGG* **TGGAGATGTG**
GGCAGGTGGA *GAGGTGGGCA* *GGTGGAGAGG* **TGGGCAGGTG** *GAGAGGTGGG*
CAGGTGGAGA **GGTGGGCAGG** *TGGAGAGGTG* *GGCAGGTGGA* **GAGGTAGGGC**
AGGTGGAGAG *GTGGGCAGGT* *GGAGAGGTGG* **GCAGGTGGAG** *AGGTGGGCAG*
GTGGAGAGGG **GCAGGTGGAG** *AGGTGGGCAA* *GTGGAGAGGT* **GGGCAGTGGG**
GAGTGGGCAG *TGGA*

Figura 16. Secuencia parcial del inserto del candidato # 2 variando las condiciones de amplificación. En cursivas se indica la secuencia flanqueante del extremo 5'. La secuencia fue obtenida a partir del electroferograma D y en ella se señalan las unidades "núcleo" alternando letras en negritas.

Aquí se encontró la secuencia 33.15 más completa. Se localizó la secuencia flanqueante del extremo 5' y 16 repetidos de la secuencia núcleo. Se hizo una última secuenciación de esta clona con las mismas condiciones de reacción que en la anterior pero ahora se eliminó la temperatura de alineamiento para no dar tiempo a una renaturalización (Tabla 11).

Tabla. 11. Ciclos de PCR sin temperatura de alineamiento.

No. de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	96°C	8 min
25 Ciclos	98°C	10 seg
	55°C	4 min
Post PCR	55°C	4 min
	4°C	∞

En el Apéndice II se presenta el electroferograma E y en la Figura 17 la interpretación de dicha secuencia. Ahora sí se encontró la secuencia 33.15 completa con las dos secuencias flanqueantes donde se diseñaron los iniciadores. Esta secuencia solamente tiene 17 repetidos en vez de los 29 reportados por Jeffereys *et al.* (1985a). Como ya se ha dicho, esto es normal debido a que estas secuencias son altamente polimórficas y es poco frecuente encontrar una secuencia VNTR exactamente igual en dos individuos. La secuencia clonada difiere de la reportada no sólo en el número de repetidos, sino que hay algunas bases diferentes resaltadas en la figura 17. Resumidamente, las diferencias entre la secuencia reportada por Jeffereys y esta secuencia son:

3 transiciones: 2 de A → G y una de G → A

1 transversión: T → G

1 inserción de una G

```
TGCTTTAAAT GTTAGGAAAG GCAGGTGGAG ATGTGGGCAG GTGGAGATGT
GGGCAGGTGG AGAGGTGGGC AGGTGGAGAG GTGGGCAGGT GGAGAGGTGG
GCAGGTGGAG AGGTGGGCAG GTGGAGAGGT GGGCAGGTGG AGAGGTAGGC
AGGTGGAGAT GTGGGCAGGT GGAGAGGTGG GCAGGTGGAG AGGTGGGCAG
GTGGAGAGGG GAGGTGGAG AGGTGGGCAG GTGGAGAGGT GGGCAGGTGG
AGAGGTGGGC AGGTGGAGAG GTGGGCAGGT AGAAATACCT ACAGATGAGG
TG
```

Figura 17. Secuencia parcial del inserto del candidato 2 obtenida con el iniciador "directo". El VNTR 33.15 está flanqueado por secuencias no repetitivas (señaladas en cursivas). Con sombreado se indican las bases que son diferentes respecto a la secuencia reportada (Jeffreys *et al.*, 1985a). Esta secuencia fue obtenida del electroferograma E.

Se realizó un análisis tipo BLAST de esta secuencia para ver si apareaba con alguna otra reportada en el GenBank. Se encontró que aparece del nucleótido 20 al 302 con los nucleótidos 229,711-229,429 del segmento de DNA genómico humano etiquetado en el GenBank como: NT_007741, que se localiza en el cromosoma 7. La secuencia 33.15 reportada por Jeffreys también aparece con este fragmento en sus bases 240 a 552. Es decir, la secuencia encontrada en este trabajo corresponde a una parte de la secuencia reportada por Jeffreys.

La posibilidad de que solamente se hubiera secuenciado sólo una parte del minisatélite 33.15 parecía descartada, puesto que se obtuvo la secuencia de los fragmentos flanqueantes que corresponden a las secuencias que flanquean la secuencia obtenida por Jeffreys. Se concluyó que el VNTR 33.15 aislado a partir del DNA

empleado como molde es polimórfico respecto al reportado, no sólo en el número de repetidos, sino que presentó algunos cambios en la secuencia nucleotídica.

No obstante, quedaba por explicar la longitud aparente del inserto (alrededor de 1,000 pb). Existía la posibilidad de que junto al VNTR 33.15 se hubiera insertado otra secuencia. A fin de corroborar este punto, se procedió a secuenciar la otra cadena del inserto empleando el iniciador "reverso". El resultado de esta secuencia es muy claro (electroferograma F y Figura 18) pero de manera sorprendente no se encontró la secuencia complementaria al VNTR 33.15 mostrada en la Figura 17, sino una secuencia completamente diferente:

```

ACATATTTTG GTAATGATAT CCTCATATAC ATTGGGGATC CTATGAGATT
ATAATACTGT ATTTTACTAT ACTTTTTCTA TATTTAGACA TGTTTAGATA
CACAAATATT TACCATTGTG TTACGGTTGC CTACACCAAT CAGTATGGTA
ACATTCTGTA TAACTTTGTA ACCTAGGAGC AATGGGTTAT ACCATCTAGC
ATAGGTGTGT AGTTTGTTTT AGCATCTAGG TTTGCGTAAG TATACGTTAT
GATGTTTGCA CAACAACCAA GTTGCCTAAA TAAACCTGTC ATTAAGTGAC
ACATGACTGA ATTTAATCTC TCAACCCCTC TCTGTTTCAT AGCACTTCT
ATATCCTCAT ATTACAGTGT ACAAATATT GTGCTATGCT TTTCCATAAT
AAACCCAAAG CCTTTTTGTA GTGCTTAATA ATAACTATT ATAAAGTGTG
AGGTTTNCAG GATGATATAT GCATGGTCTA TATAGTTAGC ATATA

```

Figura 18. Secuencia parcial inserto de la clona # 2 obtenida con el iniciador "reverso". Esta secuencia fue deducida a partir del electroferograma F.

La clona 2 tiene un inserto de 1,000 pb aproximadamente y 302 de ellos corresponden al VNTR 33.15. La secuencia obtenida con el iniciador "reverso" (Figura 18) es completamente diferente; por lo tanto, se buscó esta última dentro del plásmido para saber si durante la secuenciación, el iniciador había apareado en otra parte. Esta secuencia no se encontró dentro del plásmido, así es que se hizo un análisis tipo "BLAST" contra el GenBank. Se encontró que 491 nucleótidos (de 495) de esta secuencia

aparean con los nucleótidos 93,298 a 93,793 del fragmento etiquetado como NT_023519, que al igual que 33.15, pertenece al cromosoma 7 pero se encuentra un poco más cercano al centrómero; mientras que la secuencia CCTGTC ATTAAGTGAC ACATGACTGA ATTTAA, ubicada en las bases 285 a 316, aparece con 31 secuencias reportadas del genoma humano.

De tal manera que en la construcción pAR33.15 se tiene al pSP189 con dos secuencias insertadas: el VNTR 33.15 que contiene una secuencia núcleo que se repite y la secuencia NT_023519 que no la tiene. Se propuso estudiar la respuesta de ambas secuencias después del ensayo de mutagénesis para comparar su comportamiento.

VII. ENSAYO DE MUTAGÉNESIS

Una vez obtenida y caracterizada la construcción pAR33.15, se prosiguió con el ensayo de mutagénesis. Dicho plásmido fue introducido en células competentes MBM7070 como se describe en Materiales y métodos. Primeramente se hizo un ensayo de dosis-respuesta para seleccionar la intensidad a la que debía realizarse el ensayo.

El experimento se realizó directamente sobre el pSP189 en un crosslinker UV mod. HL2000 a 254 nm, variando la intensidad (j/m^2). Después se transformaron bacterias con el plásmido irradiado y se cultivaron sobre cajas con agar de medio LB con ampicilina, IPTG y X-gal. Las mutantes fueron seleccionadas de manera indirecta por el cambio de coloración debido a mutaciones en el gen *supF*. Los resultados de ésta curva se muestran en la Tabla 12 y en la Figura 19 se observan de una manera gráfica.

aparean con los nucleótidos 93,298 a 93,793 del fragmento etiquetado como NT_023519, que al igual que 33.15, pertenece al cromosoma 7 pero se encuentra un poco más cercano al centrómero; mientras que la secuencia CCTGTC ATTAAGTGAC ACATGACTGA ATTTAA, ubicada en las bases 285 a 316, aparece con 31 secuencias reportadas del genoma humano.

De tal manera que en la construcción pAR33.15 se tiene al pSP189 con dos secuencias insertadas: el VNTR 33.15 que contiene una secuencia núcleo que se repite y la secuencia NT_023519 que no la tiene. Se propuso estudiar la respuesta de ambas secuencias después del ensayo de mutagénesis para comparar su comportamiento.

VII. ENSAYO DE MUTAGÉNESIS

Una vez obtenida y caracterizada la construcción pAR33.15, se prosiguió con el ensayo de mutagénesis. Dicho plásmido fue introducido en células competentes MBM7070 como se describe en Materiales y métodos. Primeramente se hizo un ensayo de dosis-respuesta para seleccionar la intensidad a la que debía realizarse el ensayo.

El experimento se realizó directamente sobre el pSP189 en un crosslinker UV mod. HL2000 a 254 nm, variando la intensidad (j/m^2). Después se transformaron bacterias con el plásmido irradiado y se cultivaron sobre cajas con agar de medio LB con ampicilina, IPTG y X-gal. Las mutantes fueron seleccionadas de manera indirecta por el cambio de coloración debido a mutaciones en el gen *supF*. Los resultados de ésta curva se muestran en la Tabla 12 y en la Figura 19 se observan de una manera gráfica.

Tabla 12. Número de transformantes MBM7070 al exponer pSP189 a diferentes intensidades de luz UV-C (254 nm).

Intensidad j/m ²	No. de colonias				Porcentaje
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Media	
0	79,200	100,000	70,500	83,233	100
600	9,920	9,750	10,423	10,031	12.05
1,200	9,240	8,900	8,350	8,830	10.61
2,400	860	756	930	849	1.02
4,800	888	650	710	749	0.9
9,600	44	30	61	45	0.05
19,200	11	8	6	8	0.01
38,400	0	0	0	0	0

Aquellas clonas que no sobrevivieron pudieron haber mutado en el origen de replicación o en el gen de la resistencia a ampicilina contenidos en el plásmido.

De esta manera, después de realizar los ensayos de mutagénesis como se detalla en la sección de Materiales y métodos, se encontraron seis candidatos, cuatro color azul muy claro y dos blancos. Estos candidatos fueron nombrados 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 y 2.6.

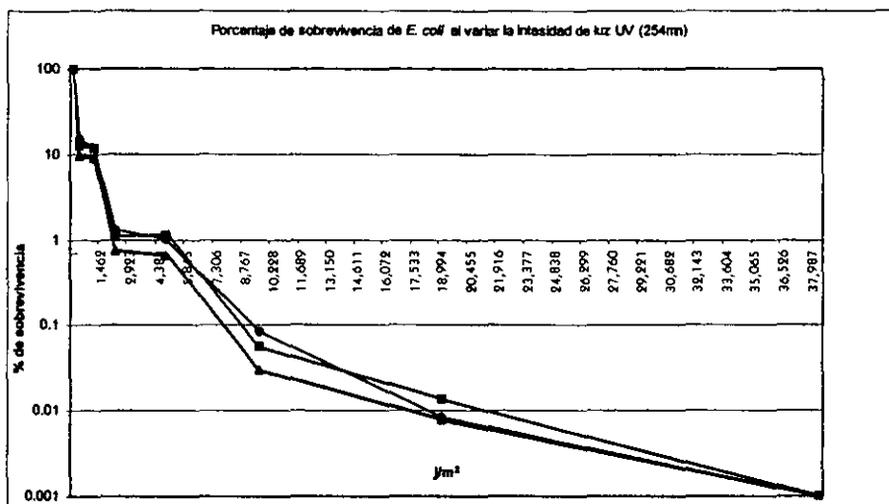


Figura. 19. Porcentaje de sobrevivencia de transformantes MBM7070 de tres diferentes ensayos al exponer pSP189 a diferentes intensidades de luz UV-C (254 nm).

VIII. ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA.

Para cerciorarnos de que en realidad el cambio de color implicaba que el gen *supF* había mutado y que ya no podía revertir la acción de la mutación ámbar, se hizo el ensayo de β -galactosidasa. Se midió la actividad de β -galactosidasa de las clonas 2.1- 2.6 junto con la de un control negativo (sin IPTG) y uno positivo (pAR33.15). En la Figura 20 se muestra la medición de la actividad a tres diferentes tiempos. La fórmula utilizada para estos cálculos se muestra en la sección de Materiales y métodos. La absorbancia se divide entre el

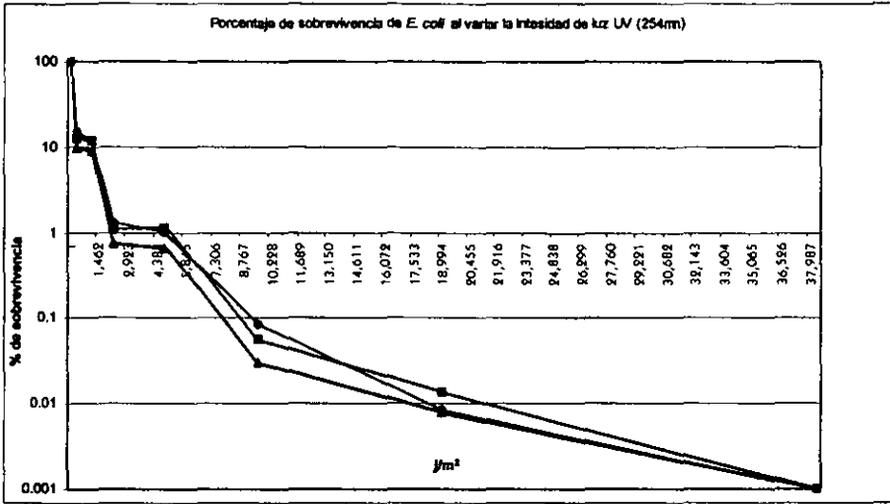


Figura. 19. Porcentaje de sobrevivencia de transformantes MBM7070 de tres diferentes ensayos al exponer pSP189 a diferentes intensidades de luz UV-C (254 nm).

VIII. ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA.

Para cerciorarnos de que en realidad el cambio de color implicaba que el gen *supF* había mutado y que ya no podía revertir la acción de la mutación ámbar, se hizo el ensayo de β -galactosidasa. Se midió la actividad de β -galactosidasa de las clonas 2.1- 2.6 junto con la de un control negativo (sin IPTG) y uno positivo (pAR33.15). En la Figura 20 se muestra la medición de la actividad a tres diferentes tiempos. La fórmula utilizada para estos cálculos se muestra en la sección de Materiales y métodos. La absorbancia se divide entre el

tiempo, es por eso que se ve la misma actividad en diferentes tiempos a pesar de que conforme avanza el tiempo se observa un color más intenso.

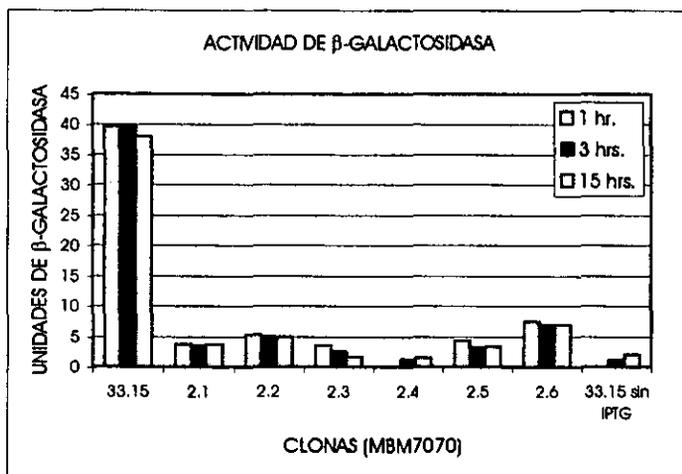


Figura 20. Cinética de actividad de β-galactosidasa a diferentes horas en bacterias MBM7070 con el pSP189 normal y mutagenizado, conteniendo la secuencia 33.15 (33.15, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 y 2.6). También se utilizó un control negativo sin inductor (IPTG).

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

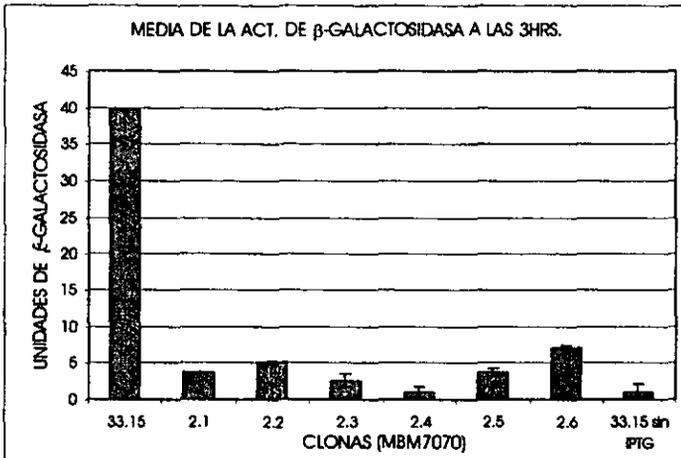


Figura 21. Actividad de β-galactosidasa a las tres horas. Muestra la media y desviación estándar de tres ensayos en bacterias *E.coli* MBM7070 con el plásmido pSP189 normal y mutagenizado conteniendo la secuencia 33.15. También se incluye un control negativo sin inductor (IPTG).

En la Figura 21 se muestran las desviaciones estándar que fueron mínimas. Para ver si hubo diferencias significativas entre los candidatos se hizo un ANOVA (ver Materiales y métodos) con un nivel de confianza del 95%, donde se obtuvo una $F_0 < F_{(7,17)}^{0.05}$ lo que significa que al menos un par de medias son diferentes. Así que se realizó una prueba de DMSR. Dicha prueba mostró que todas las clonas fueron diferentes a la clona no mutagenizada. La mayor diferencia entre las clonas mutadas fue de 6.22 mientras que la menor diferencia entre el control positivo (clona no mutagenizada) y las demás clonas fue de 32.58. Esto quiere decir que realmente disminuyó la actividad de β-galactosidasa en las

clonas mutagenizadas e incluso en algunas quedó totalmente anulada, como en las clonas 2.3 y 2.6 que son iguales al control negativo.

IX. ANÁLISIS DE MUTACIONES.

A los seis candidatos obtenidos se les extrajo el plásmido y se realizó la secuenciación de su inserto empleando las condiciones descritas en la tabla 13 y aumentando la concentración de $MgCl_2$ 1 mM, 5% de glicerol y 5% de DMSO.

Tabla 13. Ciclos de PCR para secuenciación de las subclonas # 2 sin temperatura de alineamiento.

No. de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	96°C	8 min
25 Ciclos	98°C	10 seg
	55°C	4 min
Post PCR	55°C	4 min
	4°C	∞

En cuatro de las seis clonas se encontraron cambios con respecto a la secuencia VNTR 33.15 originalmente insertada. Únicamente las clonas 2.4 y 2.6 no tuvieron mutaciones en el VNTR 33.15 insertado, mientras que las clonas 2.1, 2.2, 2.3 y 2.5 presentaron entre todas 10 cambios. La totalidad de estos 10 cambios observados fueron algún tipo de transversión. Las secuencias obtenidas con el iniciador directo y deducidas a

clonas mutagenizadas e incluso en algunas quedó totalmente anulada, como en las clonas 2.3 y 2.6 que son iguales al control negativo.

IX. ANÁLISIS DE MUTACIONES.

A los seis candidatos obtenidos se les extrajo el plásmido y se realizó la secuenciación de su inserto empleando las condiciones descritas en la tabla 13 y aumentando la concentración de $MgCl_2$ 1mM, 5% de glicerol y 5% de DMSO.

Tabla 13. Ciclos de PCR para secuenciación de las subclonas # 2 sin temperatura de alineamiento.

No. de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	96°C	8 min
25 Ciclos	98°C 55°C	10 seg 4 min
Post PCR	55°C 4°C	4 min ∞

En cuatro de las seis clonas se encontraron cambios con respecto a la secuencia VNTR 33.15 originalmente insertada. Únicamente las clonas 2.4 y 2.6 no tuvieron mutaciones en el VNTR 33.15 insertado, mientras que las clonas 2.1, 2.2, 2.3 y 2.5 presentaron entre todas 10 cambios. La totalidad de estos 10 cambios observados fueron algún tipo de transversión. Las secuencias obtenidas con el iniciador directo y deducidas a

partir de los electroferogramas se muestran a continuación. Las mutaciones están resaltadas

con diferentes tonos: **G→T** **A→T** **G→C**

TCCTTTAAAT GTTAGGAAAG GCAGGTGGAG ATGTGGGCAG GTGGAGATGT
GGGCAGGTGG AGAGGTGGGC AGGTGGAGAG GTGGGCAGGT GGAGAGGTGG
GCAGGTGGAG AGGTGGGCAG GTGGAGAGGT GGGCAGGTGG AGAGGTAGGC
ATGTG**T**AGAT **GTGG****T**CAGGT GGAGAGGT

Figura 22. Secuencia del VNTR 33.15 de la clona 2.1 obtenida con el iniciador directo, deducida a partir del electroferograma G. En cursivas se indica la secuencia flanqueante y los cambios respecto a la secuencia original se encuentran marcados con un recuadro.

TCCTTTAAAT GTTAGGAAAG GCAGGTGGAG ATGTGGGCAG GTGGAGATGT
GGGCAGGTGG AGAGGTGGGC AGGTGGAGAG GTGGGCAGGT GGAGAGGTGG
GCAGGTGGAG AGGTGGGCAG GTGGAGAGGT GGGCAGGTGG AGAGGTAGGC
AT**T**GTGGAGAT **GTGGGC****T**GGT GGAGAGGTGG GCAGGTGGAG **AGGTGGGC****A**
 GTGGAGAGGG **GCA****T**GT

Figura 23. Secuencia del VNTR 33.15 de la clona 2.2 obtenida con el iniciador directo, deducida a partir del electroferograma H. En cursivas se indica la secuencia flanqueante y los cambios respecto a la secuencia original se encuentran marcados con un recuadro.

TGCTTTAAAT GTTAGGAAAG GCAGGTGGAG ATGTGGGCAG GTGGAGATGT
 GGGCAGGTGG AGAGGTGGGC AGGTGGAGAG GTGGGCAGGT GGAGAGGTGG
 GCAGGTGGAG AGGTGGGCAG GTGGAGAGGT GGGCAGGTGG AGAGGTAGGC
 AGGTGGAGAT GTGGGCAGGT GGAGAGGTGG GCAGGTGGAG AGGTGGGCAG
 GTGTAGAGGG GCAGGTGGAG AGGT

Figura 24. Secuencia del VNTR 33.15 de la clona 2.3 obtenida con el iniciador directo, deducida a partir del electroferograma I. En cursivas se indica la secuencia flanqueante y los cambios respecto a la secuencia original se encuentran marcados con un recuadro.

TGCTTTAAAT GTTAGGAAAG GCAGGTGGAG ATGTGGGCAG GTGGAGATGT
 GGGCAGGTGG AGAGGTGGGC AGGTGGAGAG GTGGGCAGGT GGAGAGGTGG
 GCAGGTGGAG AGGTGGGCAG GTGGAGAGGT GGGCAGGTGG AGAGGTAGGC
 AGGTGGAGAT GTGGGCAGGT GGAGAGGTGG GCAGGTGGAG AGGTGGGCAG
 GTGGAGAGGG GCAGGTGGAG AGGTGGGCAG GTGGAGAGGT GGGCAGGTGG
 AGAGGTGGGC AGGTGGAGAG GTGGGCAGGT AGAAATACCT ACAGATGAGG
 TG

Figura 25. Secuencia del VNTR 33.15 de la clona 2.4 obtenida con el iniciador directo, deducida a partir del electroferograma J. En cursivas se indica la secuencia flanqueante.

TGCTTTAAAT GTTAGGAAAG GCAGGTGGAG ATGTGGGCAG GTGGAGATGT
 GGGCAGGTGG AGAGGTGGGC AGGTGGAGAG GTGGGCAGGT GGAGAGGTGG
 GCAGGTGGTGG GAGGC

Figura 26. Secuencia del VNTR 33.15 de la clona 2.5 obtenida con el iniciador directo, deducida a partir del electroferograma K. En cursivas se indica la secuencia flanqueante y los cambios respecto a la secuencia original se encuentran marcados con un recuadro.

TGCTTTAAAT GTTAGGAAAG GCAGGTGGAG ATGTGGGCAG GTGGAGATGT
 GGGCAGGTGG AGAGGTGGGC AGGTGGAGAG GTGGGCAGGT GGAGAGGTGG
 GCAGGTGGAG AGGTGGGCAG GTGGAGAGGT GGGCAGGTGG AGAGGTAGGC
 AGGTGGAGAT GTGGGCAGGT GGAGAGGTGG GCAGGTGGAG AGGTGGGCAG
 GTGGAGAGGG GCAGGTGGAG AGGTGGGCAA GTGGAGAGGT GGGCAGGTGG
 AGAGGTGGGC AGGTGGAGAG GTGGGCAGGT AGAAATACCT ACAGATGAGG
 TG

Figura 27. Secuencia del VNTR 33.15 de la dona 2.6 obtenida con el iniciador directo, deducida a partir del electroferograma L. En cursivas se indica la secuencia flanqueante.

Con el objeto de comparar estas mutaciones sobre la secuencia 33.15 con aquellas que se pudieron haber generado sobre aquella que no es un VNTR (NT_023519), también se obtuvieron las secuencias empleando el iniciador "reverso". La secuencia de las donas 2.1, 2.2 y 2.3 (ver electroferogramas M, N y O en el Apéndice II) se muestra en las Figura 28. En ninguna de estas secuencias se encontraron mutaciones. Dado el bajo número de muestras analizadas, no se puede concluir categóricamente, pero los datos sugieren y apoyan la hipótesis de que las secuencias de repetidos son más propensas a ser mutadas.

```

ACATATTTTG GTAATGATAT CCTCATATAC ATTGGGGATC CTATGAGATT
ATAATACTGT ATTTTACTAT ACTTTTCTA TATTTAGACA TGTTTAGATA
CACAAATATT TACCATTGTG TTACGGTTGC CTACACCAAT CAGTATGGTA
ACATTCTGTA TAACTTTGTA ACCTAGGAGC AATGGGTTAT ACCATCTAGC
ATAGGTGTGT AGTTTGTFFF AGCATCTAGG FTTGCGTAAG TATACGTTAT
GATGTTTGCA CAACAACCAA GTTGCCTAAA TAAACCTGTC ATTAAGTGAC
ACATGACTGA ATTTAATCTC TCAACCCCTC TCTGTTTCAT AGCACTTCT
ATATCCTCAT ATTACAGTGT ACAAATATT GTGCTATGCT TTTCCATAAT
AAACCCAAAG CCTTTTGTGTA GTGCTTAATA ATAACTATT ATAAAGTGTG
AGGTTTNCAG GATGATATAT GCATGGTCTA TATAGTTAGC ATATA

```

Figura 28. Secuencia de del inserto de las clonas 2.1, 2.2 y 2.3 obtenida con el iniciador "reverso", interpretada a partir de los electroferogramas M, N y O.

La radiación ultravioleta a 254 nm, longitud de onda absorbida por las bases púricas y pirimídicas del DNA, es la más conveniente para la inducción de lesiones genéticas. Los dímeros de pirimidina son el principal fotoproducto de la luz UV, sobre todo los di-adtos de timinas, sin embargo al irradiar con luz ultravioleta se han encontrado todo tipo de mutaciones: transiciones, transversiones y corrimiento del marco de lectura. La mayoría de los autores reportan un mayor número de transiciones. Por ejemplo, Yu *et al.* (2001), indujeron mutaciones con luz UV en levadura y células de humano favoreciendo la formación de dímeros de ciclobutano y fotoproductos (6-4), y encontraron principalmente transiciones de C → T. Por su parte, You *et al.* (2000), mencionan que la principal lesión inducida por luz UV en el DNA son los dímeros de ciclobutano-pirimidinas que se forman en las posiciones donde hay pirimidinas cercanas. Myrand *et al.* (1996), irradiaron a pSP189 con luz UV y encontraron que la mayoría de las mutaciones en el gen *supF* fueron mutaciones puntuales y que éstas fueron predominantemente

transiciones G:C → A:T. Por su parte, Kanjilal *et al.* (1995), encontraron que las mutaciones del gen *p53* en células de cabeza y cuello con cáncer de piel eran el 30% transiciones C → T, el 47% transiciones T → C y el 12% transversiones de G → T y sugieren que otros factores desconocidos puedan estar interviniendo. Doyle y Strike (1995), encontraron que la mayoría de las mutaciones producidas por la luz UV eran transiciones A:T → G:C. De Marini *et al.* (1995), probaron los efectos de la luz solar, la luz fluorescente y la luz de las lámparas para broncear en bacterias del género *Salmonella*, encontraron la misma proporción de transiciones y de transversiones en los tres tipos de luz: aproximadamente 80% de transiciones y 20% de transversiones. Yuan *et al.* (1995), reportaron también que la mayoría de las mutaciones inducidas por luz UV fueron transiciones.

Okaichi *et al.* (1992), trataron al "Shuttle vector" pZ189 con luz UV-B. Al secuenciar el gen *supF* encontraron el 69% de transiciones G:C → A:T y el 31% fueron transversiones de diferente tipo. Yagi *et al.* (1992), también encontraron una frecuencia menor de transversiones que de transiciones al irradiar al mismo plásmido con luz UV. Okaichi *et al.* (1992), recopilaron datos de cinco ensayos diferentes encontrando el siguiente patrón mutacional:

Tabla. 14. Porcentaje de mutaciones sobre *supF* al irradiar pZ189 con luz UV-B y transfectorlo en diferentes tipos celulares. *XP* significa *Xeroderma pigmentosum*. Modificado de Okaichi *et al.* (1992).

Porcentaje de mutaciones					
	310 nm <i>E. coli</i>	254 nm Mono	254 nm Humano <i>XP</i>	254 nm Humano normal	313 nm Mono
Transiciones					
G:C → A:T	69	61	93	73	62
A:T → G:C	0	7	1	2	3
Transversiones					
G:C → T:A	8	13	0	10	17
G:C → C:G	10	5	1	6	11
A:T → T:A	13	9	4	8	6
A:T → C:G	0	4	0	1	1

Wehner y Horneck (1995) encontraron un patrón mutacional muy parecido en el gen *lacZ* al irradiar al vacío el plásmido pUC19:

Tabla. 15. Porcentaje de mutaciones sobre *lac Z* encontrado al irradiar pUC19 con luz UV al vacío. Modificado de Wehner y Horneck, 1995.

Porcentaje de mutaciones		
	160 nm	254 nm
Transiciones		
G:C → A:T	61.2	47.3
A:T → G:C	10.4	12.7
Transversiones		
G:C → T:A	4.5	1.8
G:C → C:G	1.5	5.5
A:T → T:A	14.9	9.1
A:T → C:G	0	0

Parris y Kramer (1992) también reportaron un patrón muy similar: alrededor del 70% son transiciones y cerca del 30% son transversiones. Las transversiones G:C → T:A se encuentran entre el 4 y el 18% en la mayoría de los casos, las de G:C → C:G alrededor del 8% y las de A:T → T:A tienen un rango muy variado desde 0% hasta 13%.

A pesar de que este es el patrón más común, también hay autores que reportan un número similar de transiciones que de transversiones, o incluso un número mayor de transversiones. Las mutaciones encontradas en el gen *p53* de células basales de pacientes

con cáncer de piel fueron básicamente transiciones G:C → A:T en las áreas de mayor exposición al sol y en las áreas de menor exposición solar la mayoría (75%) fueron transversiones. Matsumura *et al.* (1996), lo atribuyen a que debe haber otros factores aparte de la irradiación UV en las áreas de menor exposición solar.

A diferencia de los trabajos citados arriba, en el presente estudio se encontraron únicamente transversiones sobre la secuencia 33.15 al irradiar con luz UV-C el plásmido donde se encuentra insertada y posteriormente transformar células de *E. coli*. Es posible que estas mutaciones hayan sido las únicas que se generaron a partir de los aductos producidos por la radiación no ionizante aplicada. De ser así, no sólo es sorprendente el tipo de mutación (100% transversiones), sino también su frecuencia (67% de las clonas analizadas tuvieron al menos alguna alteración y se detectaron diez mutaciones en total en las cuatro clonas con alteraciones en 33.15); mientras que en la secuencia NT_023519 donada junto al minisatélite, no se presentó ningún tipo de cambio. Es posible que la diferente composición nucleotídica de una y otra secuencias (63% de G:C en el VNTR 33.15 vs 32% en la secuencia NT_023519) haya afectado la frecuencia mutacional. Sin embargo, también es posible que otros eventos posteriores se hayan conjugado para dar lugar a las mutaciones que fueron detectadas. Estos eventos pueden ser, por ejemplo, diferencias en la reparación de daños sobre una y otra secuencia una vez que fue insertada la construcción en las células MBM7070. A pesar de que se tiene el control negativo que no se irradió con luz UV y que también fue transformado antes de secuenciar, pudo haber mutaciones espontáneas al momento de transformar a las bacterias. Para descartar esta posibilidad, podrían hacerse secuenciaciones antes y después de transformar.

Xeroderma pigmentosum (*XP*) es una enfermedad genética caracterizada por cambios en la pigmentación inducidos por la luz solar. En los individuos que la padecen, hay un incremento de 2,000 veces aproximadamente de la incidencia de cáncer de piel. La mayoría de las personas que la padecen tienen alteraciones en los genes involucrados en la reparación de fotoproductos de UV por excisión de nucleótidos. La mayoría de las mutaciones encontradas en estos pacientes son transiciones C:G \rightarrow T:A y la mayoría de las mutaciones encontradas en células provenientes de *XP*, que son deficientes en la reparación post-replicativa, son transversiones C \rightarrow A y G \rightarrow T (Lehmann, 2000) como la mayoría de las mutaciones encontradas en las secuencias de las clonas 2.1, 2.2 y 2.3. Nowicka *et al.* (1994) observaron que en células de *XP* con genes deficientes en la reparación del DNA disminuyó la cantidad de transiciones, mientras la cantidad de transversiones no se vio afectada. Waters *et al.* (1993) también encontraron una mayor cantidad de transversiones en células de *XP*. Analizando 38 epitelios de partes del cuerpo expuestas al sol con cáncer de piel, Moles *et al.* (1993) encontraron tres transiciones C \rightarrow T y cuatro transversiones C \rightarrow G. Keohavong (1991) irradió con UV a 254 nm al gen HPRT y encontró 3 transiciones y 2 transversiones A:T \rightarrow C:G. Yang *et al.* (1992) mencionan que la irradiación UV induce todo tipo de sustituciones de bases y que entre ellas encontraron el 57% de transversiones. Otros fotoproductos encontrados son los dímeros de timina cis-syn y los dímeros de timina-timina (6-4) pirimidina-pirimidona. Con estos últimos se ha encontrado una gran variedad de mutaciones, la mayoría transversiones G \rightarrow T (Gentil *et al.*, 1996) como las que encontramos en la secuencia 33.15. Negishi y Hao (1992) analizaron la mutagénesis potencial de la luz solar en la región *lac Z* alfa del DNA de cadena sencilla del fago M13mp2 y también encontraron que la mayoría de las mutaciones

fueron transversiones de Guanina, $G \rightarrow C$ y $G \rightarrow T$. Ellos sugieren que estas transversiones pueden ser causadas por daños en los sitios de pirimidinas distales a las guaninas. En la secuencia 33.15 encontramos mutaciones de guaninas en los sitios TGGGC, TGGAGAT, CAGGT y TGGAGGC. Todos estos sitios tienen pirimidinas distales.

Nishigori *et al.* (1994) encontraron mutaciones en células de tumores de piel de ratón inducidos con luz UV. Utilizaron 22 líneas de ratón, de las cuales 15 contenían secuencias de repetidos. Una de estas mutaciones fue $GGC \rightarrow GTC$, esta mutación también la encontramos en la secuencia de la clona 2.1. Ellos mismos reportan que los dímeros de pirimidinas y los fotoproductos de pirimidina (6.4) pirimidona son la causa principal de los cánceres de piel y que el cambio de bases ocurre principalmente en los pares de bases G:C, predominando las transversiones. McGregor *et al.* (1999) utilizaron células de *XP* que pueden reparar errores de manera normal pero que tienen una replicación lenta de DNA con fotoproductos de UV. El 45% de las sustituciones involucraron a una timina y la mayoría fueron transversiones. En la secuencia 33.15 se obtuvieron únicamente transversiones y el 80% de éstas involucraron a una timina.

La luz UV ocasiona la dimerización de las timinas apiladas en el DNA de doble hélice. La replicación del DNA no se puede llevar a cabo correctamente en presencia de dímeros de timina, probablemente debido a que los dímeros causan una distorsión de la cadena. Por consiguiente, es indispensable la remoción de los dímeros de timinas. Los dímeros de timina son reparados en todos los organismos procariontes y eucariontes por una variedad de procesos similares. El proceso más sencillo de reparación es la fotoreactivación, en la cual una enzima que se conoce como la enzima de fotoreactivación se fija a la doble

hélice distorsionada en el sitio del dímero de timina. A medida que el complejo de DNA-enzima absorbe la luz visible, se invierte la reacción de dimerización. La enzima de fotoreactivación se disocia entonces del DNA reparado y se vuelven a formar pares de bases normales A:T (Stansfield, 1992). En este proyecto, las células se mantuvieron bajo condiciones normales, es decir, no se les privó de la luz. Como las transiciones son la principal consecuencia de los dímeros de timina (Lebkowski *et al.*, 1985) en el ensayo de mutagénesis tuvieron oportunidad de repararse, tal vez esa sea la causa de no haber encontrado dichas mutaciones. Si así fuera, esto indicaría un punto más a favor del modelo, ya que aún con la reparación de algunas mutaciones fue posible encontrar cambios en la secuencia. Drobetsky *et al.* (1987) indujeron mutaciones con luz UV en células de mamífero. Encontraron que las mutaciones de transición G:C → AT y A:T → G:C fueron reparadas, sin embargo las transversiones G:C → T:A (que fueron la mayoría de las mutaciones encontradas en nuestras clonas) no pudieron ser reparadas. En base a estos resultados podemos sugerir que sí hubo reparación de las clonas y que las transversiones encontradas no pudieron repararse.

En este trabajo no se puede establecer un patrón mutacional debido al limitado número de las muestras analizadas. No se secuenciaron más colonias en parte porque el objetivo de este trabajo no era encontrar un patrón de mutaciones sino probar el modelo para encontrarlas y en parte porque las secuencias son muy costosas.

CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo fue posible el aislamiento, a partir de DNA genómico humano, de una secuencia minisatélite con las características del VNTR 33.15 reportado previamente (GenBank NT_007741). La obtención de esta secuencia fue por medio de la reacción en cadena de la polimerasa empleando iniciadores dirigidos a las regiones flanqueantes del minisatélite. Cabe señalar que la reacción no fue del todo específica pues junto con el minisatélite se amplificaron otras secuencias no deseadas.
2. La secuencia 33.15 obtenida consta de 17 unidades núcleo repetidas en tándem. Difiere en longitud de la reportada, que está formada por 29 repetidos, y en algunos cambios puntuales en la secuencia nucleotídica. Esto corrobora la alta variabilidad de este tipo de secuencias entre individuos de la misma especie.
3. Se construyó el plásmido pAR33.15 mediante la inserción de la secuencia VNTR 33.15 en el "shuttle vector" pSP189. Debido al procedimiento metodológico empleado, la secuencia 33.15 entró acompañada de otro fragmento genómico no codificante pero con características distintas a las de un minisatélite, al parecer proveniente del cromosoma 7.
4. La construcción pAR33.15 fue empleada en un ensayo para probar el efecto de la radiación no ionizante UV-C sobre una secuencia no codificante tipo VNTR. La construcción pAR33.15 también podría ser empleada en ensayos de mutagénesis *in*

vitro pero con otros compuestos; o en ensayos *in vivo*, ya sea empleando para ello bacterias *E. coli* o líneas celulares de humano.

5. El 67% de las clonas mutantes en *supF* obtenidas (medidas como deficientes en actividad de β -galactosidasa) también mostraron algún tipo de alteración en el VNTR 33.15, pero ninguna mutación pudo ser detectada en la secuencia no minisatélite que lo acompaña. Lo cual sugiere que por su naturaleza, las secuencias VNTR tienden a acumular mayor número de mutaciones, o que en ellas las lesiones se reparan con una menor eficiencia; sin embargo es necesario analizar un número mayor de datos al respecto.
6. A diferencia de lo reportado por otros autores en sistemas similares, en el presente trabajo la totalidad de las mutaciones observadas sobre el VNTR 33.15 fueron transversiones. Esto podría explicarse si los dímeros de pirimidinas que ocasionan las transiciones fueron reparadas eficientemente, ya que a las bacterias no se les privó de la luz y esta es necesaria para activar los mecanismos de reparación de estos aductos.
7. El modelo propuesto en el presente trabajo parece adecuado para estudiar el efecto de algunos mutágenos sobre secuencias para las que no existe un método de selección de las clonas mutantes, como lo es una secuencia minisatélite no codificante del genoma humano.

APÉNDICE I. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

I. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS

A. MAXIPREPARACIÓN POR QIAGEN

Medio Luria Bertani (LB)

10 g/l Bacto-triptona

5 g/l Bacto-extracto de levadura

10 g/l NaCl

ajustar el pH a 7.0 con NaOH

aforar y esterilizar en autoclave

Buffer de suspensión P1

50 mM Tris-HCl, pH 8.0

10 mM EDTA

100 μ g/ml RNasa A

almacenar a 4°C

Buffer de lisis P2

200 mM NaOH

1% SDS

almacenar a temperatura ambiente

Buffer de neutralización P3

3.0 M acetato de potasio

ajustar pH a 5.5

almacenar a temperatura ambiente o a 4°C

Buffer QBT para equilibrar

750 mM NaCl

50 mM MOPS, pH 7.0

15% Etanol

0.15% Tritón X-100

almacenar a temperatura ambiente

Buffer de lavado QC

1.0 M NaCl

50 mM MOPS, pH 7.0

15% Etanol

almacenar a temperatura ambiente

Buffer de elución QF

1.25 M NaCl

50 mM Tris-HCl, pH 8.5

15% Etanol

almacenar a temperatura ambiente

Buffer TE, pH 8.0

10 mM Tris-HCl, pH 8.0

1 mM EDTA

almacenar a temperatura ambiente

B. MINIPREP CON TS-ELT

Medio Luria Bertani (LB, ver inciso I.A)

Buffer Tris-Sacarosa (TS)

50 mM Tris-HCl, pH 7.5

25% Sacarosa

Esterilizar por filtración y almacenar a -20°C

Solución ELT

100 mM EDTA, pH 8.0

2 mg/ml de lisozima

0.1% Tritón X-100

Esterilizar por filtración y almacenar a -20°C

PEG/NaCl

20% PEG 6000

1M NaCl

1 mM EDTA, pH 8.0

10 mM Tris-HCl, pH 8.0

Buffer TE, pH 8.0

10 mM Tris-HCl, pH 8.0

1 mM EDTA

almacenar a temperatura ambiente

II. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Buffer TAE 50X

24.2 g Tris Base

5.71 ml Ácido acético

10 ml EDTA 0.5 M, pH 8.0

Aforar a 100 ml con H₂O destilada

Colorante

0.25% Xylen-Cianol

0.25% Azul de Bromofenol

30% Glicerol

III. DESFOSFORILACIÓN

Buffer CIAP 10X (GIBCO)

500 mM Tris, pH 8.5

1 mM EDTA

CIAP Stop Buffer

100 mM Tris, pH 7.5

1 mM EDTA

200 mM NaCl

0.5% SDS

Buffer TE, pH 8.0 (ver inciso I.B)

IV. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN

Buffer PB

(Buffer comercial de QIAGEN)

Buffer PE

(Buffer comercial de QIAGEN)

Buffer EB

(Buffer comercial de QIAGEN)

Buffer TE, pH 8.0 (ver arriba)

V. CONSERVACIÓN DE CEPAS EN GLICEROL A -70°C

Medio Luria Bertani (LB, ver inciso I.A)

Glicerol estéril al 30% (v/v) en LB

VI. BACTERIAS COMPETENTES

Medio SOB (con $MgSO_4$)

20 g/l Bactotripton

5 g/l Extracto de levadura

0.5 g/l NaCl

10 ml/l de una solución 250 mM KCl

Ajustar a pH 7.0 con NaOH

Aforar a un litro con H_2O destilada

Esterilizar en autoclave

Adicionar 5 ml de solución estéril 2 M $MgCl_2$

Almacenar a 4°C

Buffer EB

(Buffer comercial de QIAGEN)

Buffer TE, pH 8.0 (ver arriba)

V. CONSERVACIÓN DE CEPAS EN GLICEROL A -70°C

Medio Luria Bertani (LB, ver inciso I.A)

Glicerol estéril al 30% (v/v) en LB

VI. BACTERIAS COMPETENTES

Medio SOB (con $MgSO_4$)

20 g/l Bactotripton

5 g/l Extracto de levadura

0.5 g/l NaCl

10 ml/l de una solución 250 mM KCl

Ajustar a pH 7.0 con NaOH

Aforar a un litro con H_2O destilada

Esterilizar en autoclave

Adicionar 5 ml de solución estéril 2 M $MgCl_2$

Almacenar a 4°C

Buffer RF1

30 mM Acetato de potasio

100 mM RbCl

10 mM CaCl_2

50 mM MnCl_2

15% Glicerol

Ajustar pH a 5.8 con ácido acético 0.2 M

Buffer RF2

10 mM MOPS

10 mM RbCl

54 mM CaCl_2

15% glicerol

Ajustar pH a 6.5 con KOH 5M

VII. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

Medio SOC

5 ml medio SOB (ver inciso VI)

50 μl glucosa al 40%

50 μl MgSO_4

Cajas Petri con medio LB

10 g/l Bactotripton

5 g/l Bacto-extracto de levadura

10 g/l NaCl

Bactoagar 2% (20g/l)

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH

Aforar y esterilizar en autoclave

Si se requiere, agregar el antibiótico cuando la temperatura sea de 65°C
aproximadamente

Vaciar en cajas petri

VIII. EXTRACCIÓN DE DNA DE UN GEL DE AGAROSA

Buffer TE, pH 8.0 (ver inciso VI)

6 M NaI, pH 7.0 - 7.4

Buffer comercial de Bio101

Glassmilk

Preparación comercial (Bio101) de perlas de vidrio

Buffer New Wash

Buffer comercial de Bio101

IX. MUTAGÉNESIS CON LUZ ULTRA VIOLETA

Cajas con LB, IPTG y X-gal

Preparar cajas con medio LB (ver arriba)

Espatularles 8 μ l de IPTG (100 mg/ml)

Espatularles 8 μ l de X-Gal (10 mg/ml)

Almacenarlas 4 días a 4°C antes de utilizarlas

X. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA

Medio Luria Bertani (LB ver inciso I.A)

Buffer Z

60 mM Na_2HPO_4

40 mM NaH_2PO_4

10 mM KCl

1 mM MgSO_4

50 mM β -Mercaptoetanol

Ajustar pH a 7.0, no esterilizar en autoclave

Medio A

10.5 g K_2HPO_4

4.5 g KH_2PO_4

1.0 g $(NH_4)_2SO_4$

0.5 g citrato de sodio

Aforar a un litro con agua destilada.

ONPG comercial (SIGMA)

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. (1989) Molecular Biology of the cell. Ed. Garland publishing. 2ª ed. NY, EUA. pp 220-223.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G. y Smith, J. A. (1992) Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons. 4ª ed. 15.1-15.16.
- Bredberg, A. y Nachmansson, N. (1987) Psoralen adducts in a shuttle vector plasmid propagated in primate cells: high mutagenicity of DNA cross-links. *Carcinogenesis*. 8:1923-1927.
- Brock, T. D., Smith, D. W. y Madigan, M. T. (1987) Microbiología. Prentice Hall Hispanoamericana. México pp. 906.
- Budowle, B., Chakraborty, R., Giusti, A. M., Eisenberg, A. J. y Allen, R. C. (1991) Analysis of the VNTR Locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am. J. Hum. Genet.* 48:137-144.
- Burcham, P. C. y Harkin, L. A. (1999) Mutations at G:C base pairs predominate after replication of peroxy radical-damaged pSP189 plasmids in human cells. *Mutagenesis*. 14:135-140.
- Calos, M. P., Lebkowski, J. S. y Botchan, M. R. (1983) High mutation frequency in DNA transfected into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3015-3019.

- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. y Prasher, D. C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263:802-805.
- Deka, R., DeCruz, S., Jin, L., McGarvey, S. T., Rothhammer, F., Ferrell, R. E. y Chakraborty, R. (1994) Population Genetic Characteristics of the D1S80 locus in seven human populations. *Hum. Genet.* 94:252-258
- DeMarini D. M., Shelton, M. L. y Stankowski L. F. (1995) Mutation spectra in *Salmonella* of sunlight, white fluorescent light, and light from tanning salon beds: induction of tandem mutations and role of DNA repair. *Mutat. Res.* 327:131-149.
- Doyle, N. y Strike P. (1995) The spectra of base substitutions induced by the *impCAB*, *mucAB* and *umuDC* error-prone DNA repair operons differ following exposure to methyl methanesulfonate. *Mol. Gen. Genet.* 247(6):735-741.
- Drobetsky, E. A., Grosovsky, A. J. y Glickman, B. W. (1987) The specificity of UV-induced mutations at an endogenous locus in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84(24):9103-9107.
- Englander, E. W. y Howard, B. H. (1997) Alu-mediated detection of DNA damage in the human genome. *Mutat. Res.* 385:31-39
- García-Patos, V. (1989) Efectos cutáneos de las radiaciones ultravioleta A. *Piel.* 4:443-449.
- Gentil A., Le Page, F., Margot, A., Lawrence, C. W., Borden, A. y Sarasin, A. (1996) Mutagenicity of a unique thymine-thymine dimer or thymine-thymine pyrimidine pyrimidone (6-4) photoproduct in mammalian cells. *Nud. Acids Res.* 24:1837-1840

- Glazer, P. M., Sarkar, S. N. y Summers, W. C. (1986) Detection and analysis of UV-induced mutations in mammalian cell DNA using a lambda phage shuttle vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:1041-1044.
- Hattori, Y., Nixhigori, C., Tanaka, T., Uchida, K., Nikaido, O., Osawa, T., Hiai, H., Imamura, S. y Toyokuni, S. (1996) 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J. Invest. Dermatol.* 107(5):733-737.
- Henderson, S. T. y Petes, T. D. (1992) Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 12:2749-2757.
- Hsia, C. H., Lebkowski, J. S., Leong, P. M., Calos, M., y Miller, J. H. (1989) Comparison of ultraviolet irradiation induced mutagenesis of the *lacI* gene in *E. coli* and in human cells. *J. Mol. Biol.* 205:103-113.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. y Thein, S. L. (1985a) Hyper variable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 314:67-73.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. y Thein, S. L. (1985b) Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature.* 316:76-79.
- Jeffreys, A. J., Royle, N. J., Wilson, V. y Wong, Z. (1988) Spontaneous mutation rated to new lenght alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature.* 332:278-281.
- Jeong, J. K., Wogan, G. N., Lau, S. S. y Monks, T. J. (1999) Quinol-glutathione conjugate-induced mutation spectra in the *supF* gene replicated in human AD293 cells and bacterial MBL50 cells. *Cancer Res.* 59(15):3641-3645.

- Joseph, P., Klein-Szanto, A. J. y Jaiswal, A. K. (1998) Hydroquinones cause specific mutations and lead to cellular transformation and in vivo tumorigenesis. *Br. J. Cancer*. 78:312-20.
- Kain, S. R., Adams, M., Kondepudi, A., Yang, T. T., Ward, W. W., y Kitts, P. (1995) Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. *Biotechniques* 19:650-655.
- Kanjilal, S., Strom, S. S., Clayman, G. L., Weber, R. S., el-Naggar A. K., Kapur V., Cummings, K. K., Hill, L. A., Spitz, M. R., Kripke, M. L. (1995) p53 mutations in nonmelanoma skin cancer of the head and neck: molecular evidence for field cancerization. *Cancer Res*. 55:3604-3609.
- Keohavong, P. I., Liu, V. F. Y Thilly, W. G. (1991) Analysis of point mutations induced by ultraviolet light in human cells. *Mutat. Res*. 249:147-159.
- Koska, R. J., Stefanovic, L., Buermeyer, A. B., Liskay, R. M. y Petes, T. D. (1999) A mutation of the yeast gene encoding PCNA destabilizes both microsatellite and minisatellite DNA sequences. *Genetics*. 151:511-519.
- Kraemer, K. H., y Seidman, M. M. (1989) Use of the *supF*, an *Escherichia coli* tyrosine suppressor tRNA gene, as a mutagenic target in shuttle-vector plasmids. *Mutat. Res*. 220:61-72.
- Kunkel, T. A. (1992) Biological asymmetries and the fidelity of eukaryotic DNA replication. *J. Genet*. 49:264-285.
- Lebkowski, J. S., DuBridge, R. B., Antell, E. A., Greisen, K. S., y Calos, M. P. (1984) Transfected DNA is mutated in monkey mouse, and human cell lines. *Mol. Cell. Biol*. 4:1951-1960.

- Lebkowski, J. S., Clancy, S., Miller, J. H., y Calos, M. P. (1985) The *lacI* shuttle: Rapid analysis of mutational specificity of ultraviolet light in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8606-8610.
- Lehmann, A. R. (2000) Replication of UV-damaged DNA: new insights into links between DNA polymerases, mutagenesis and human disease. *Gene*. 253:1-12.
- Levinson, G. y Gutman, G. A. (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 4:203-221.
- Lewin, B. (1997) *Genes* VI. Ed. Oxford University. pp.480
- Lusky, M., y Botchan, M. (1981) Inhibition of SV40 replication in simian cells by specific pBR322 DNA sequences. *Nature* 293:79-81.
- Maher, V. M. y McCormick, J. J. (1996) The HPRT gene as a model system for mutation analysis. En: *Technologies for Detection for DNA damage and mutations* (Pfeifer, G. P. ed.) Plenum Press, New York. pp. 381-391
- Mallol, S. (1987) Filtros Solares. *Piel.* 2:226-230.
- Matsumura, Y., Nishigori, C., Yagi, T., Imamura, S. y Takebe, H. (1996) Characterization of p53 gene mutations in basal-cell carcinomas: comparison between sun-exposed and less-exposed skin areas. *Int. J. Cancer.* 65:778-780.
- McGregor, G. W., Wei, D., Maher, V. M. y McCormick, J. J. (1999) Abnormal, error-prone bypass of photoproducts by *Xeroderma pigmentosum* variant cell extracts results in extreme strand bias for the kinds of mutations induced by UV lighth. *Molecular and Cellular Biology.* 19:147-154.
- Menck, C. F. M., Sarasin, A. y James, M. R. (1987) SV40 based *E. coli* shuttle vectors infectious for monkey cells. *Gene* 53:21-29.

- Miller, J. H. (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor. USA. pp. 352-355.
- Moles, J. P., Moyret, C., Guillot, B., Jeanteur, P., Guilhou, J. J., Theillet, C. y Basset-Seguin, N. (1993) p53 gene mutations in human epithelial skin cancers. *Oncogene*. 8:583-588.
- Moriwaki, S., Tarone, R. E. y Kraemer, K. H. (1994) A potential laboratory test for dysplastic nevus syndrome: ultraviolet hypermutability of a shuttle vector plasmid. *J. Invest. Dermatol.* 103:7-12.
- Moshinsky, D. J. y Wogan, G. N. (2000) UV-induced mutagenesis of human p53: analysis using a double-selection method in yeast. *Environ. Mol. Mut.* 35:31-38.
- Myrand, S. P., Topping, R. S. y States, J. C. (1996) Stable transformation of *Xeroderma pigmentosum* group A cells with an XPA minigene restores normal DNA repair and mutagenesis of UV-treated plasmids. *Carcinogenesis*. 17:1909-1917
- Nagao, M., Sugimura, T. y Matsushima, T. (1978) Environmental mutagens and carcinogens. *Ann. Rev. Genet.* 12:117-159.
- Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E. y White, R. (1987) Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*. 235:1616-1622.
- Negishi, K. y Hao, W. (1992) Spectrum of mutations in single-stranded DNA phage M13mp2 exposed to sunlight: predominance of G-to-C transversion. *Carcinogenesis*. 13:1615-1618.

- Nishigori, C., Wang, S., Miyakoshi, J., Sato, M., Tsukada, T., Yagi, T., Imamura, S. y Takebe, H. (1994) Mutations in ras genes in cells cultured from mouse skin tumors induced by ultraviolet irradiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:7189-7193.
- Neter, J., Kutner, M. H., Nachtsheim, C. J., Wasserman, W. (1996) Applied linear statistical models 4^a ed. Mc. Graw-Hill. pp.663-729
- Nowicka, A., Kanabus, M., Sledziewska-Gojska, E. y Ciesla, Z. (1994) Different muC requirements for generation of different kinds of UV- induced mutations in *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 243:584-592.
- Ogheri, S., Bruna, V., Cera, F., Favaretto, S., Cherubini, R. y Celotti, L. (1997) Mutant frequency at the hprt locus and in minisatellite sequences in Chinese hamster V79 cells irradiated with low-energy protons (31 keV/ μm) and ultraviolet light (254 nm). Radiat. Res. 148:203-208.
- Okaichi, K., Nagashima, K., Nozu, K. y Ohnishi, T. (1992) Mutagenic specificity in DNA base sequence by irradiation of health lamp light (UV-B) in *Escherichia coli*. Mutat. Res. 282:183-190.
- Page, J. E., Pataki, J., Harvey, R. G. y Dipple, A. (1996) Mutational specificity of the syn 1,2-dihydrodiol 3,4-epoxide of 5-methylchrysene. Cancer Lett, 110 (1-2)249-52.
- Parris, C. N. y Kraemer, K. H. (1992) Ultraviolet mutagenesis in human lymphocytes: the effect of cellular transformation. Exp. Cell Res. 201:462-469.
- Parris, C. N. y Seidman M. M. (1992) A signature element distinguishes sibling and independent mutations in a shuttle vector plasmid. Gene. 117:1-5.

- Peden, K. W. C., Pipas, J. M., Pearson-White, S. y Nathans, D. (1980) Isolation of mutants of an animal virus in bacteria. *Science* 209:1392-1396.
- Protic-Sabljić, M., y Kraemer, K. (1986) Reduced repair of non-dimer photoproducts in a gene transfected into *Xeroderma pigmentosum* cells. *Photochem. Photobiol.* 43:509-513
- Protic-Sabljić, M., Tuteja, N., Munson, P. J., Hauser, J., Kraemer, K. H. y Dixon, K. (1986a) UV light-induced cyclobutane pyrimidine dimers are mutagenic in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 6:3349-3356.
- Protic-Sabljić, M., Seetharam, S., Seidman, M. M. Y Kraemer, K. H. (1986b) An SV40-transformed *Xeroderma pigmentosum* group D cell line: Establishment, ultraviolet sensitivity, transfection efficiency and plasmid mutation induction. *Mutat. Res.* 166:287-294.
- Ramel (1989) The nature of spontaneous mutations. *Mutat. Res.* 212:33-42.
- Razzaque, A. S., Mizusawa, H., y Seidman, M. M. (1983). Rearrangement and mutagenesis of a shuttle vector plasmid after passage in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3010-3014.
- Routledge, M.N. (2000) Mutations induced by reactive nitrogen oxide species in the *supF* forward mutation assay. *Mutat Res.* 450:95-105.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2^o ed. USA.
- Sarkar, S., Dasgupta, U. B., y Summers, W. C. (1984) Error prone mutagenesis detected in mammalian cells by a shuttle vector containing the *supF* gene of *E. Coli*. *Mol. Cell. Biol.* 4:2227-2230.

- Seetharam, S., Protic-Sabljic, M. Seidman, M. M. y Kraemer, K. H. (1987) Abnormal mutagenic spectrum in plasmid DNA replicated in cultured fibroblasts from a patient with the skin cancer-prone disease, *K*, *J. Clin. Invest.* 80:1613-1617.
- Seetharam, S., Waters, H. L., Seidman, M. M. y Kraemer, K. H. (1989) Ultraviolet mutagenesis in a plasmid vector replicated in lymphoid cells from a patient with melanoma-prone disorder dysplastic nevus syndrome. *Cancer Res.* 49:5918-5921.
- Seetharam, S. y Seidman, M. M. (1991) Modulation of an ultraviolet mutational hotspot in a shuttle vector in xeroderma cells. *Nud. Acids Res.* 19:1601-1604.
- Seidman, M. M. (1996) Detection and characterization of mutations in mammalian cells with the pSP189 shuttle vector system. En: *Technologies for detection of DNA damage and mutations* (Pfeifer, G. P. ed.) Plenum Press, New York. pp. 373-379.
- Seidman, M. M., Bredberg, A., Seetharam, S. y Kraemer, K. H. (1987) Multiple point mutations in a shuttle vector propagated in human cell: Evidence for an error-prone DNA polymerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:4944-4948.
- Seidman, M. M., Dixon, K., Razzaque, A., Zagursky, R.J., y Berman, M. L. (1985) A shuttle vector plasmid for studying carcinogen-induced point mutations in mammalian cells. *Gene* 38:233-237.
- Shriver, M. D., Jin, L., Chakraborty, R. y Boerwinkle, E. (1993) VNTR Allele Frequency Distributions Under the Stepwise Mutation Model: A Computer Simulation Approach. *Genetics.* 134:983-993

- Sia, E. A., Jinks-Robertson, S. y Petes, T. D. (1997) Genetic control of microsatellite stability. *Mutat. Res.* 383:61-70.
- Silver, L. M. (1992) Bouncing off microsatellites. *Nature Genetics.* 2:8-9.
- Smith, J. D. (1972) Genetics of transfer RNA. *Annu. Rev. Genet.* 6:235-255.
- Smith, J. D. (1976) Transcription and processing of transfer RNA precursors. *Progr. Nud. Acid Res. Mol. Biol.* 16:25-73
- Stansfield W.D (1992) *Genética*. McGraw Hill. 3ª ed., México. pag 61
- Taylor, C. (1990) Photoaging/photodamage and photoprotection. *J. Am. Acad. Dermatol.* 22:1-15.
- Tobi, S. E., Levy, D. D., Seidman, M. M. y Kraemer, K. H. (1999) Sequence-dependent mutations in a shuttle vector plasmid replicated in a mismatch repair deficient human cell line. *Carcinogenesis.* 20:1293-301.
- Tretyakova, N. Y., Burney, S., Pamir, B., Wishnok, J. S., Dedon, P. C., Wogan, G. N. y Tannenbaum, S. R. (2000) Peroxynitrite-induced DNA damage in the *supf* gene: correlation with the mutational spectrum. *Mutat Res.* 447:287-303.
- Tsou, T. C., Lin, R. J. y Yang, J. L. (1997) Mutational spectrum induced by chromium(III) in shuttle vectors replicated in human cells: relationship to Cr(III)-DNA interactions. *Chem. Res. Toxicol.* 10:962-70.
- Voitkun, V., Zhitkovich, A. y Costa, M. (1998) Cr(III)-mediated crosslinks of glutathione or amino acids to the DNA phosphate backbone are mutagenic in human cells. *Nud. Acids Res.* 26:2024-30.

- Vrieling H., Zhang, L. H., van Zeeland, A. A. y Zdzienicka, M. Z. (1992) UV-induced HPRT mutations in a UV-sensitive hamster cell line from complementation group 3 are biased towards the transcribed strand. *Mutat. Res.* 274:147-55.
- Weber, J.L. y Wong, C. (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet* 2(8):1123-1128
- Waters, H. L., Seetharam, S., Seidman, M. M. y Kraemer, K. H. (1993) Ultraviolet hypermutability of a shuttle vector propagated in *Xeroderma pigmentosum* variant cells. *J. Invest. Dermatol.* 101:744-748.
- Wehner, J. y Horneck, G. (1995) Effects of vacuum UV and UV-C radiation on dry *Escherichia coli* plasmid pUC19 II. Mutational specificity at the lacZ gene. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 30:171-177.
- Yagi, T., Sato, M., Tatsumi-Miyajima, J. y Takebe, H. (1992) UV-induced base substitution mutations in a shuttle vector plasmid propagated in group C xeroderma pigmentosum cells. *Mutat. Res.* 273:213-220.
- Yang, J. L., Chen, M. F., Wu, C. W. y Lee, T. C. (1992) Posttreatment with sodium arsenite alters the mutational spectrum induced by ultraviolet light irradiation in Chinese hamster ovary cells. *Environm. Mol. Mutagen.* 20:156-64.
- Yang, J. L., Maher, V. M. y McCormick, J. J. (1987) Kinds of mutations formed when a shuttle vector containing adducts of benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide replicates in COS7 cells. *Mol. Cell. Biol.* 7:1267-1270.
- Yang, J. L. Maher, V. M. y McCormick, J. J. (1988) Kinds of mutations formed when a shuttle vector containing adducts of 1-nitrosopyrene replicates in human cells. *Mol. Cell. Biol.* 8:3364-3372.

- You, Y-H., Szabó, P.E y Pfeifer, G.P. (2000) Cyclobutane pyrimidine dimers form preferentially at the major p53 mutational hot spots in Uvb-induced mouse skin tumors. *Genetics*. 154:503-512.
- Young, R. A. (1979) Transcription termination in the *Escherichia coli* ribosomal RNA operon *rnc*. *J. Biol. Chem.* 254:12725-12731.
- Yu, S-L., Johnson, R. E., Prakash, S. y Prakash, L. (2001) Requirement of DNA Polymerase β for Error-Free Bypass of UV-Induced CC and TC Photoproducts. *Molecular and Cellular Biology*. 21(1):185-188.
- Yuan, J., Yeasky, T. M., Thee, M. C. y Glazer, P. M. (1995) Frequent T:A→G:C transversions in X-irradiated mouse cells. *Carcinogenesis*. 16(1):83-88.
- Zhitkovich, A., Song, Y., Quiévryn, G. y Voitkun V. (2001) Non-oxidative mechanisms are responsible for the induction of mutagenesis by reduction of Cr(VI) with cysteine: role of ternary DNA adducts in Cr(III)-dependent mutagenesis. *Biochemistry*. 40(2):549-560.