

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

“AISLAMIENTO DE RNAm Y
CLONACIÓN DEL cDNA DE LA ENZIMA
DEOXILULOSA FOSFATO SINTASA (DXS)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

KARLA FABIOLA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ



MÉXICO, D.F.,

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias:

A mis papás que me apoyaron todo este tiempo y no me cuestionaron sobre la elección de carrera.

A mis hermanas por estar siempre conmigo y porque compartimos muchos recuerdos.

A mi tía Laura y a mis primos Ale y Milo que pasaron tiempos duros y aún están conmigo.

A mi Amalita que sin importar lo que decida siempre me apoya.

A Gustavo por compartir su vida conmigo, por apoyarme y consolarme.

A mis mejores amigas y paños de lágrimas Iskra e Iliana

A Víctor y Maricela por escucharme en los buenos y malos tiempos.

A todos los amigos de bioquímica de los laboratorios 103, 104, 105, 114 y 116. especialmente a Claudia, Yasmin, Lorena, Natalia, Julieta, Jessica, Martín, Carlos y Edson.

A los QFB's Erika, Marianita, Miryam, Neli, Erick y Rosa (aunque sea Q) con los que pasé mucho tiempo trabajando arduamente.

A los químicos Paola, Gerardo, Hilda, Ces.

A la Dra. Bernal, que siempre me apoyó y que nunca se le cerró el mundo y por supuesto a la Dra. Azpiroz Laurel, Mayte y Maris que también estuvieron presentes para apoyarme moral y técnicamente.

A Pilo, Tavo, Martín y al Dr. Felipe Cruz que además de su amistad me apoyaron técnicamente, les agradezco muchísimo.

A todos los que omití, les aseguro fue por prisas.

Agradecimientos:

Agradezco a la Dra. Irma Bernal Lugo de la Facultad de Química de la UNAM, a la Dra. Susana Azpiroz del INIFAP y a CONACYT-CONAFOR por otorgarme una beca durante la elaboración de la presente tesis y por financiar el proyecto No. 14739 "Producción de Taxol *in vitro* de *Taxus globosa*", así como a la Facultad de Química por financiar el proyecto con número FQ-6290-01.

También agradezco a los técnicos académicos Q. Laurel Fabila, Dr. Martín Pedro Vargas Suárez, Dr. Elpidio García Ramírez.

INDICE

Abreviaturas

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Objetivos	12
4. Metodología.....	13
4.1. Obtención del gen.....	14
4.1.1. Extracción de RNA total de hojas de maíz.....	14
4.1.2. Cuantificación, integridad y pureza de los ácidos nucleicos.....	15
4.1.2.1. Cuantificación y determinación de pureza de RNA por espectrofotometría.....	15
4.1.2.2. Determinación de la integridad del RNA por electroforesis.....	15
4.2. Aislamiento de RNAm.....	16
4.3. Síntesis de la primera cadena de cDNA.....	18
4.4. Amplificación de la secuencia del gen <i>ZmDXS1</i>	18
4.4.1. Capacidad de amplificación del cDNA obtenido.....	18
4.4.2. Diseño de oligonucleótidos para <i>ZmDXS1</i>	21
4.4.3. Optimización de las condiciones de amplificación de <i>ZmDXS1</i>	21
4.4.4. Identificación del producto amplificado.....	23
4.4.5. Purificación del amplificado.....	23
4.5. Obtención de células transformadas.....	25
4.5.1. Formación de células competentes.....	25
4.5.2. Reacción de ligación: plásmido-gen.....	26
4.5.3. Transformación de células competentes.....	27
4.5.4. Selección de células transformadas con el gen <i>ZmDXS1</i>	28
4.5.5. Purificación del DNA plasmídico: Miniprep.....	28
4.5.5.1. Digestión del pGEM- <i>ZmDXS1</i>	30
4.6. Secuenciación del gen clonado	31
4.6.1. Preparación de la muestra: Maxiprep.....	31
4.6.2. Secuenciación del DNA plasmídico.....	33
4.7. Análisis bioinformático.....	34
5. Resultados y discusión	35

5.1. Obtención del gen.....	35
5.1.1. Extracción de RNA total de hojas de maíz.....	35
5.1.2. Determinación de la integridad del RNA por electroforesis y aislamiento de RNAm.....	36
5.2. Diseño de oligo nucleótidos (primers) y establecimiento de condiciones de PCR para <i>ZmDXS1</i>	37
5.2.1. Funcionalidad del cDNA obtenido del RNAm de las hojas de plántulas de maíz.....	38
5.2.2. Amplificación de la secuencia <i>ZmDXS1</i>	39
5.3. Clonación del fragmento <i>ZmDXS1</i>	40
5.4. Secuenciación del gen <i>Zmdxs1</i> clonado	43
5.4.1. Secuenciación del DNA plasmídico.....	43
5.5. Análisis bioinformático de la secuencia teórica de la proteína <i>ZmDXS1</i>	50
5.6. Comparación de tabla de uso de codones de <i>T. x media</i> contra la secuencia <i>ZmDXS1</i>	53
6. Conclusiones.....	56
7. Perspectivas.....	57
Apéndice 1. Preparación de soluciones, geles y medios de cultivo.....	58
• Soluciones y geles para RNA.....	58
• Soluciones y geles para DNA.....	60
• Medios de cultivo y soluciones para competencia y transformación de células.....	61
• Soluciones para Maxiprep.....	63
Apéndice 2. Resultados bioinformáticos.....	65
Apéndice 3. Glosario.....	76
Referencias	79

1. Resumen

El Taxol ha probado ser un eficaz fármaco en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Su producción y costo están limitados por los métodos de obtención actuales, siendo el cultivo de células de *Taxus sp.* en suspensión el método más utilizado. La síntesis del Taxol se lleva a cabo en 2 etapas, la primera involucra la producción de geranyl geranyl bifosfato, GGPP, y la segunda utiliza GGPP como precursor en la síntesis del compuesto tetracíclico que forma el esqueleto del Taxol. Es posible aumentar el rendimiento de producción en un cultivo en suspensión de células de *Taxus* al incrementar la disponibilidad del precursor GGPP de manera que facilita el flujo de la vía en la cual se sintetiza el Taxol. Se sabe que la enzima deoxixilulosa fosfato sintasa, DXS, funciona como un punto de regulación de la vía del metil eritritol fosfato, MEP, responsable de la síntesis de GGPP, por lo que la introducción de un mayor número de copias del gen de esta proteína dentro de las células de *Taxus* permitirá aumentar la cantidad de enzima DXS disminuyendo el paso limitante de velocidad que normalmente representa. Para este efecto, se intentó obtener el gen *dxs* utilizando como fuente tejido de ascúculas jóvenes de *Taxus*. Sin embargo, éste presenta altos contenidos fenólicos que dificultaron su obtención por lo cual se eligió al gen heterólogo *dxs1* procedente de *Zea mays*, cuyo tejido de fácil obtención presenta ventajas en la extracción de ácidos nucleicos más puros y estables mediante el uso de métodos comerciales. Tras una serie de análisis bioinformáticos se determinó que la secuencia del gen *Zmdxs1* aislada en nuestro laboratorio es expresable en un sistema como *Taxus sp.* De éste análisis también se sugiere que la expresión en éste sistema puede ser optimizada al introducir simultáneamente los tRNAs de Thr (ACG) y Pro (CCG), presentes en la secuencia del gen heterólogo *Zmdxs*, cuya abundancia en el sistema de *Taxus sp.* es baja.

2. Introducción

Las plantas adultas sintetizan dos tipos de metabolitos, los primarios y los secundarios. Los primarios satisfacen las funciones normales de crecimiento, desarrollo y reproducción. Mientras que los secundarios son aquellos compuestos que no participan en el metabolismo básico de la planta, pero que le confieren ventajas para establecerse de manera más exitosa en un ecosistema determinado. Estas ventajas se deben a que los metabolitos secundarios presentan actividades muy diversas, como antimicrobianas, antiinsectos, tractoras para la polinización, etc. Incluso algunos de ellos permiten que la planta que los sintetiza compita eficazmente contra otras plantas por espacio y nutrientes (Tholl, 2006).

Durante siglos los metabolitos secundarios han sido de gran interés para el hombre, siendo utilizados como saborizantes, fragancias, plaguicidas y fármacos. Sin embargo, la producción natural de estos compuestos es comúnmente menor al 1% del peso seco de la planta (Oksman-Caldentey e Inzé, 2004) por lo que la industria constantemente busca formas alternas de producción con rendimientos económicamente rentables.

Algunos ejemplos de fármacos derivados directa o indirectamente de productos secundarios de plantas son los anticancerígenos Podofilotoxina y Camptotecina. (Oksman-Caldentey e Inzé, 2004). Otro ejemplo importante es el del fármaco anticancerígeno Paclitaxel, comercialmente conocido como Taxol.

Actualmente el Taxol presenta una creciente demanda debida a su éxito en el tratamiento de tumores de mama, ovario y sarcoma de Kaposi (National Cancer Institute, USA). Este fármaco lleva a cabo su efecto citotóxico deteniendo la mitosis a través de estabilizar los microtúbulos, resultando en apoptosis celular (Marupudi, et al., 2007). A pesar de su efectividad como anticancerígeno, su uso es limitado debido a que las dificultades para su obtención encarecen el precio de este fármaco.

El Taxol es un isoprenoide diterpeno que se obtiene por diferentes métodos. Naturalmente es producido por el árbol de *Taxus sp.*, siendo las especies más utilizadas *T. baccata* en Europa, *T. brevifolia* en EUA y *T. yunnanensis* en China (<http://www.21cecpharm.com/px/>). En México, el Taxol se produce en la especie *T. globosa*, existiendo pocos estudios realizados en esta especie mexicana referentes al Taxol (Soto *et al.*, 2000), En general el rendimiento de extracción de este fármaco es del 0.01% del peso de corteza seca de un árbol maduro, que es la parte del árbol donde presenta mayor acumulación aunque también puede ser extraído de las ascúclas, es decir, de sus hojas (Tabata, 2004). Ambas extracciones son difíciles de realizar por el alto contenido de lípidos y fenoles propios de *Taxus* (Tabata, 2004).

Además de su fuente natural, el Taxol puede ser obtenido a través de síntesis química aunque con un rendimiento bajo debido a la alta complejidad de la molécula, Fig.1,(Arbuck y Blaylock, 1995; Jennewein y Croteau, 2001; Besumbes, 2004).

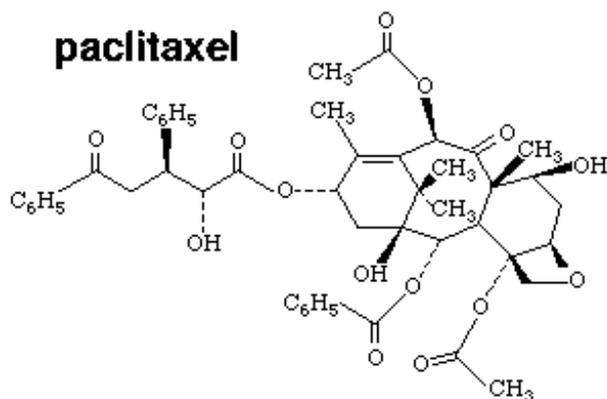


Fig. 1. Estructura química del Taxol o Paclitaxel.

Otro método de obtención de Taxol es la semisíntesis que consiste en modificar químicamente un precursor como por ejemplo 10-deacetilbacatina III o bacatina III (Ketchum and Croteau, 1998). Éste método es más eficiente que el de síntesis por lo que es el más utilizado para la producción comercial del Taxol (Walter, Croteau, 2001). Sin embargo, al igual que en caso del Taxol

mismo, el aislamiento y la purificación de los precursores se dificultan debido a su baja concentración y a la abundancia de fenoles, lípidos y otros contaminantes presentes en las acículas que comúnmente son el tejido utilizado para estos fines (Walter, Croteau, 2001).

Recientemente la FDA de Estados Unidos de Norteamérica (www.fda.gov) ha aprobado el uso de cultivos de células en suspensión de *Taxus sp.* en la producción de Taxol o la de sus precursores. Se espera que esta estrategia contribuya significativamente al futuro abastecimiento del fármaco a un precio más competitivo, por lo que, de ser exitosa, será una fuente sustentable del metabolito (Nims E. et al., 2006). No obstante, los cultivos de células en suspensión aún presentan limitaciones que deben superarse para la obtención comercial de este fármaco (Frense, 2007). Algunos ejemplos son el bajo rendimiento del Taxol en este sistema (Tabla 1), la oxidación del tejido (Fig. 2) y la baja velocidad de división de las células vegetales. Su tiempo de duplicación es de más de 20 días y el período para la duplicación no se ha podido calcular con exactitud debido a que a los 20 días, el callo se debe subcultivar, aunque en la mayoría de los casos no haya duplicado su peso (María Teresa Olivera y Araceli Arandal 2008, Facultad de Química, UNAM, datos no publicados). La Figura 2 muestra la oxidación de un callo de *Taxus* (A) comparada con la de un callo de maíz (B), se aprecia un oscurecimiento mayor en el tejido de callo de *Taxus* que indica gran oxidación.

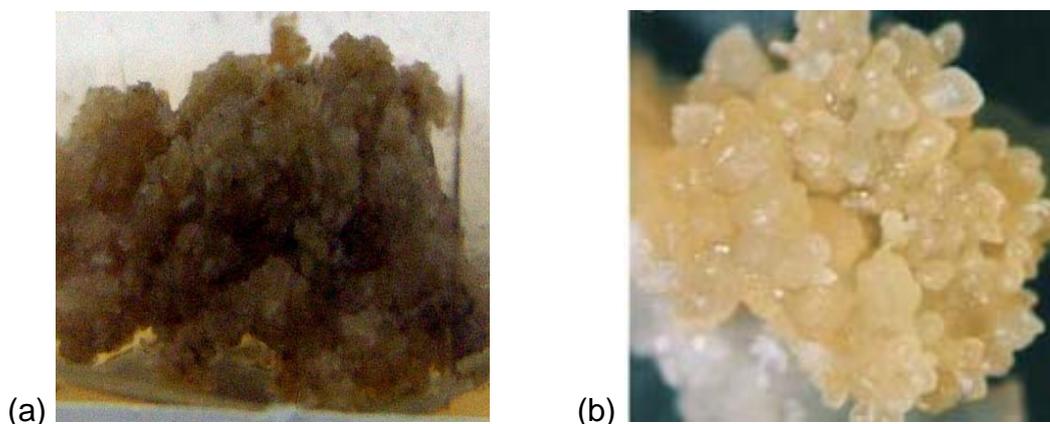


Fig. 2. Comparación de la apariencia de (a) Callo de *Taxus globosa* (a; Olivera y Arandal 2008, Facultad de Química, UNAM, datos no publicados); y (b) callo de maíz (Pereira-Petrillo et al., 2008).

En la Tabla 1 se muestra la producción de células en suspensión provenientes de diversas especies de *Taxus*. Sin embargo, el máximo rendimiento mostrado en esta tabla no es comercialmente atractivo.

Afortunadamente, en otros sistemas tanto de planta completa como de células vegetales en cultivo se ha reportado que la producción de muy diversos metabolitos secundarios puede incrementarse mediante el tratamiento de células indiferenciadas con elicitores como son metil jasmonato, ácido salicílico, quitosan y metales pesados (Oksman-Caldentey, Inzé 2004). Algunos de estos tratamientos se han aplicado a cultivos de células de *Taxus* (Zhong, 2002; Tabata, 2004).

La producción de Taxol en *Taxus* varía de acuerdo a la especie elegida y a la estrategia utilizada. Ésta puede tratarse de un solo tipo de elicitador o pueden combinarse entre sí. Sin embargo, al llevar a cabo el proceso de escalamiento los cultivos suelen comportarse de manera diferente a lo esperado. Algunos factores que afectan el comportamiento son por ejemplo el estrés por el espacio, la composición de gases y el nivel de oxigenación del cultivo. (Tabla 1; Zhong, 2002; Tabata, 2004).

Tabla 1. Producción de Taxol a niveles industriales en varios cultivos celulares de *Taxus* spp. a escala de matraz y biorreactor (Zhong, 2002; Tabata, 2004)

Especies	Productividad (mg·l ⁻¹ ·día ⁻¹)	Estrategia de cultivo	Forma de cultivo	Referencia
<i>T. canadensis</i>	9.75	Elicitación con MJA	Matraz	Ketchum <i>et al.</i> 1999
<i>T. x media</i>	7.86	Elicitación con MJA	Matraz	Yukimune <i>et al.</i> , 1996
<i>T. chinensis</i>	3.64	Medio optimizado, elicitación. Utiliza cultivo de 2 etapas	Matraz	Bringi, V. y Kadkade, P., Patente WO 17121, 1993
<i>T. yunnanensis</i>	0.4	La ³⁺	Matraz	Wu J. <i>et al.</i> , 2001

<i>T. cuspidata</i>	1.1	Estudio cinético	Biorreactor	Pestchanker <i>et al.</i> , 1996
<i>T. x media</i> *	1.06	Cultivo de 2 etapas, elicitado con MJA y adición de etileno	Biorreactor	Cusido <i>et al.</i> , 2002
<i>T. baccata</i>	2.71	Inmovilización en alginato	Biorreactor	Bentebibel <i>et al.</i> , 2004

MJA, metil jasmonato. **Taxus x media* es un híbrido de *T. cuspidata* y *T. baccata* (<http://www.mobot.org/gardeninghelp/PlantFinder>)

Otra alternativa para lograr un incremento en la producción de metabolitos secundarios en células vegetales en cultivo es la ingeniería metabólica. Ésta es una de las áreas de la biotecnología, que al igual que todas las demás de este campo, es multidisciplinaria. Consiste en el uso de la biología molecular para incrementar el flujo a través de la vía metabólica de interés y de esta forma incrementar el producto de dicha vía en un organismo o célula. Lo anterior, sólo puede ser utilizado si conocemos previamente la vía metabólica que sintetiza el producto así como los mecanismos de regulación, la identificación de las enzimas involucradas y los genes que codifican para ellas.

El Taxol se sintetiza en el cloroplasto en dos etapas, síntesis del IPP / DMAPP mediante la vía del MEP y la síntesis del taxadieno (Fig. 3 y 4). En la primera se sintetiza el isopentil difosfato (IPP) y su isómero, el dimetilalil difosfato (DMAPP). Mediante una reacción de polimerización cabeza-cola, el IPP y el DMAPP dan lugar al precursor universal de los diterpenoides, geranylgeranyl difosfato, (GGPP). El GGPP es utilizado como precursor de diversos compuestos de gran importancia en el metabolismo central de la planta como son algunos fitorreguladores (ácido abscísico y ácido giberélico), esteroides, quinonas, carotenoides, clorofilas y tocoferoles pero también es precursor del Taxol (Fig 4), que como antes se mencionó es un producto secundario. Del análisis de las figuras 3 y 4 se puede concluir que para que el GGPP producido en la vía del MEP sea utilizado principalmente en la biosíntesis del Taxol se

requiere que las vías metabólicas colaterales que también utilizan GGPP se encuentren inhibidas y que las enzimas responsables de sintetizar Taxol a partir de GGPP se encuentren activas. Aparentemente, esta condición fue la alcanzada en los cultivos de células vegetales utilizados para generar los datos en la Tabla 1. Sabemos que la síntesis de esteroides, reguladores de crecimiento y quinonas es poco activa porque los cultivos se crecieron en condiciones de oscuridad (refs. en Tabla 1).

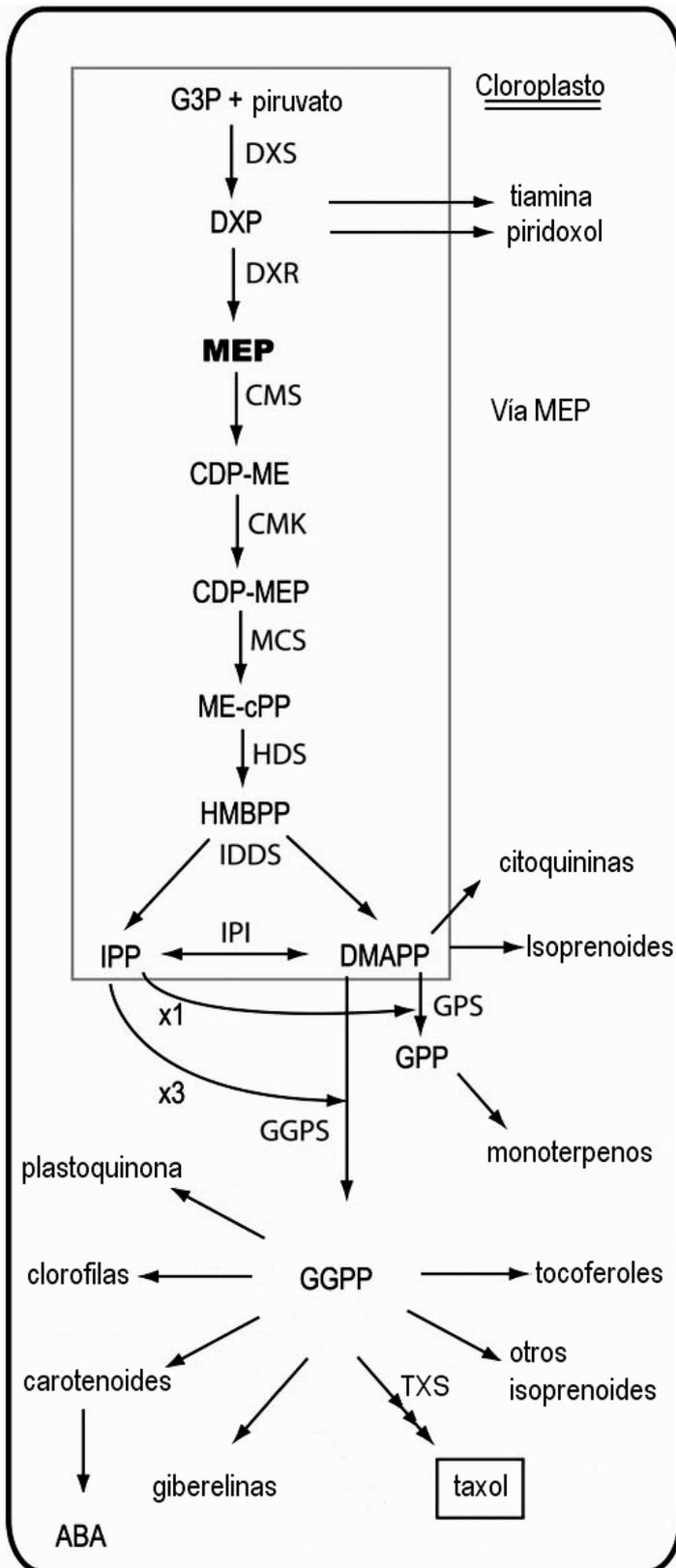


Fig. 3. Vía cloroplástica de biosíntesis de isoprenoides en plantas (Adaptado de Rodríguez-Concepción, et al., 2001; Besumbes, et al., 2004 y Morris, et al., 2006). G3P, gliceraldehido 3-fostato; DXP, 1-deoxi-D-xilulosa 5-fostato; MEP, 2-C-metil-D-eritritol 4-fostato; CDP-ME, 4-(citidina 59-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol; CDP-MEP, 2-fosfo-4-(citidina 59-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol; ME-cPP, 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato; HMBPP, 1-hidroxi-2-(E)-butenil 4-difosfato; IPP, isopentenil difosfato; DMAPP, dimetilalil difosfato; GPP, geranio difosfato; GGPP, geranio geranil difosfato; ABA, ácido absicico; DXS, DXP sintasa; DXR, DXP reductoisomerasa; CMS, CDP-ME sintasa; CMK, CDP-ME cinasa; MCS, ME-cPP sintasa; HDS, HMBPP sintasa; IDDS, IPP/DMAPP sintasa; IPI, IPP isomerasa; GPS, geranil difosfato sintasa; GGPS, geranil geranil difosfato sintasa; TXS, taxadieno sintasa.

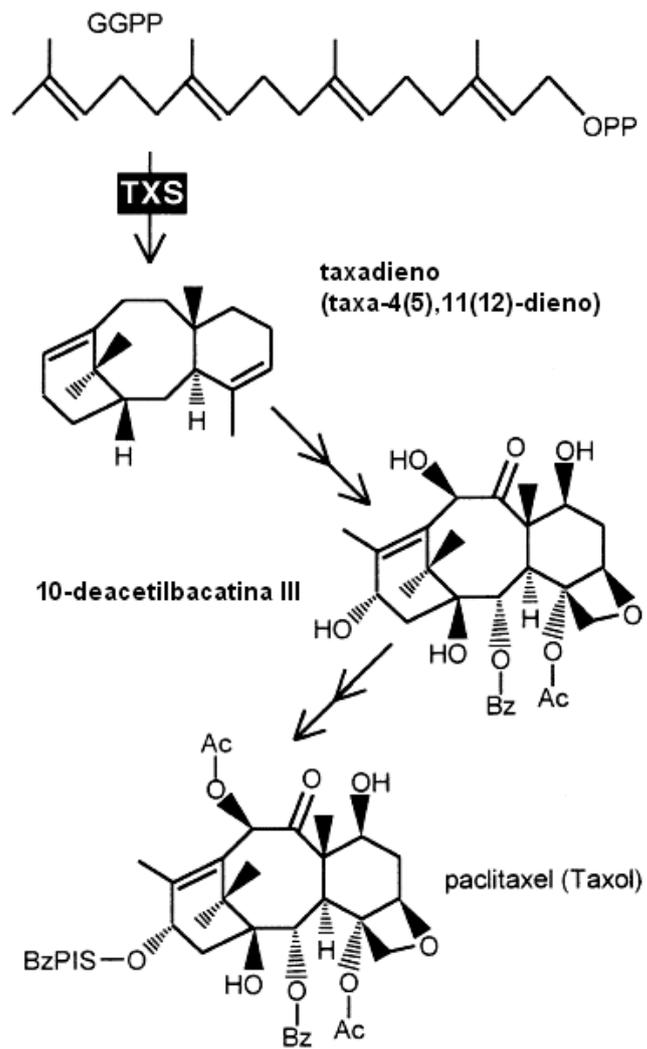


Fig. 4. Vía biosintética del Taxol. TXS, taxadieno sintasa; Ac, grupo acetilo; Bz, grupo benzoilo; BzPIS, cadena lateral N-benzoil-3-fenilisoserina (adaptada de Besumbes, et al, 2004)

Aunque la vía de síntesis del Taxol no está completamente caracterizada, se han elucidado múltiples pasos directamente por métodos de clonación (Nims et al., 2006). Debido a que los métodos biológicos parecen ser los únicos viables en la obtención de Taxol, la manipulación de los pasos lentos en la vía permitiría el desarrollo de nuevas técnicas de producción. Es decir, cuando la velocidad de flujo metabólico de una vía disminuye en un punto, este punto se vuelve limitante por lo que, asegurándonos de que existan precursores suficientes, suponemos que al aumentar la síntesis de estas enzimas mediante la sobreexpresión de sus genes el metabolismo fluirá con más rapidez a través de este punto limitante. Se espera que en células transgénicas, los títulos de producción aumentaran a niveles comercialmente significativos (Walker et al, 2001).

Estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* indican que al introducir los genes *txs* y *dxs* en la planta se obtuvo mayor producción de taxanos en contraste con un leve incremento en otros productos derivados de IPP (Carretero-Paulet et al., 2006). Estos resultados indican que tanto la enzima DXS como la enzima TXS regulan los flujos de los dos segmentos de la vía. Se ha propuesto que la transformación enzimática de los taxanos a Taxol no es limitante ya que se trata de reacciones de hidroxilación y metilación principalmente (Besumbes et al., 2004).

Los resultados anteriores sugieren que la transformación de un cultivo de células en suspensión de *Taxus globosa* con un mayor número de copias de los genes *dxs* y *txs* eliminaría algunas reacciones limitantes en el proceso biosintético del Taxol, aumentando la producción del fármaco y/o alguno(s) de sus precursores. Sin embargo, la gran cantidad de fenoles y lípidos propios de *Taxus* limitan la extracción de sus ácidos nucleicos al igual que la del fármaco y sus precursores.

La vía del MEP ha sido descrita en otros sistemas como son *Arabidopsis thaliana* (Besumbes et al., 2004), *Oryza sativa* (Bo-Ra et al., 2005), *Medicago truncatula* (Walter et al, 2002), *Zea mays* (GeneBank No. Acceso EF507248), por mencionar algunos. En este último, hasta el momento sólo han sido

publicadas las secuencias del gen *dxs* en el Genbank. Estudios preliminares indican que en maíz se presentan 2 formas de *dxs*, *Zmdxs1* y *Zmdxs2*. Siendo *Zmdxs1* más abundante en hoja (Walter *et al.*, 2002).

El maíz presenta gran disponibilidad de tejido, velocidad de crecimiento, además de la existencia de métodos comerciales de extracción de nucleicos para esta planta que favorecen su calidad y rendimiento, por lo que resultó un buen candidato para la extracción del gen *dxs1* a partir de su hoja.

Con la finalidad de obtener células en cultivo sobreproductoras de Taxol, se integró un proyecto general organizado en varias etapas: Obtención y clonación de los genes de interés (*dxs* y *txs*), transformación de células en cultivo, medición y comparación de la cantidad de Taxol entre un cultivo de células en suspensión de *Taxus globosa* transformadas y no transformadas. En la presente tesis se desarrolló lo referente a la obtención, la clonación y el análisis de la secuencia del gen *dxs*.

2. Objetivos

- ✓ Obtención y clonación del gen *dxs1* de *Zea mays*
- ✓ Secuenciación y análisis del gen *Zmdxs1* clonado
- ✓ Análisis bioinformático de la secuencia nucleotídica obtenida y de su posible expresión en *Taxus*.

2. Metodología

La estrategia a seguir se resume en el siguiente diagrama de flujo (Diagrama 1) y se explica detalladamente en los apartados siguientes.

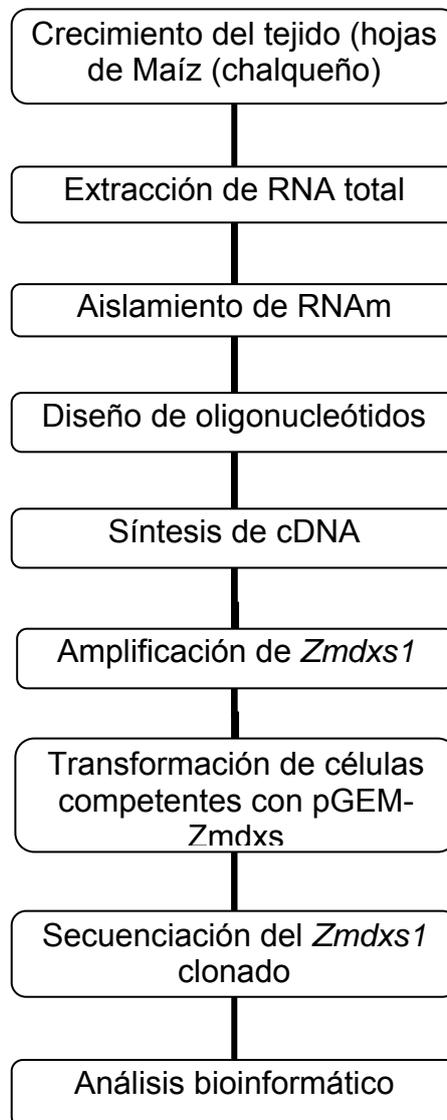


Diagrama 1. Esquema general de la metodología seguida.

2.1. Obtención del gen

2.1.1. Extracción de RNA total de hojas de maíz

Se sembraron semillas de maíz de la raza Chalqueño cosecha 2004 en macetas de 10 cm diámetro a una profundidad 7-10 cm. Se utilizó una mezcla de "Peat moss", agrolita y tierra negra (30:20:50). Ya sembradas las semillas se procedió a dar un riego pesado (a saturación). Posteriormente se efectuaron tres riegos semanales. Las plántulas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero, a una temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Se utilizaron hojas de plántula de *Zea mays* de 6 a 8 días de germinación. Éstas fueron cortadas con tijeras procurando dañarlas lo menos posible. Se agitaron suavemente durante 5 minutos en una solución de cloro comercial al 10% V/V. Se enjuagaron con agua desionizada estéril, hasta eliminar el olor a cloro, se escurrieron y se secaron.

Para extraer el RNA total, se utilizaron dos gramos del tejido, preparado anteriormente. El cual se homogenizó en nitrógeno líquido mediante la ayuda de un mortero. A continuación fue transferido a un tubo de teflón con 10 ml de TRIzol de Invitrogen[®] por cada gramo de muestra, la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que se descongeló (aprox. 7 min.), y luego se incubó durante 5 minutos a la misma temperatura. Se agregaron 4 ml de cloroformo. Se taparon los tubos y se agitaron vigorosamente por 15 seg, posteriormente se incubaron a temperatura ambiente 15 minutos. Las muestras se centrifugaron a $12000 \times g$ (centrífuga Sorvall Super T21, rotor SL-50T) durante 15 minutos a $3-8^{\circ}\text{C}$, quedando separados los residuos celulares sólidos en el fondo del tubo, una fase orgánica y una acuosa.

A continuación, la fase acuosa se transfirió a un tubo de teflón limpio y se agregaron 10 ml de alcohol isopropílico frío, se mezcló suavemente por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La muestra se centrifugó por 10 minutos a $12000 \times g$ (centrífuga Sorvall Super T21, rotor SL-50T) a 2 a 8°C formando la pastilla de RNA de color blanco y de apariencia gelatinosa. El sobrenadante fue eliminado. La pastilla de RNA se lavó con 10 ml etanol al 75%, la muestra se dispersó con el vórtex y se centrifugó a $7500 \times g$ (centrífuga Sorvall Super T21, rotor SL-50T) por 5 minutos a $3-8^{\circ}\text{C}$. Se

decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla al aire durante 10 minutos a temperatura ambiente. El RNA se disolvió en 150 μl H₂O-DEPC. Se agregó inhibidor de RNasa (Invitrogen®) a una concentración final de 1u/ μl , se agitó suavemente por micropipeteo y se almacenó a -70°C .

4.1.2. Cuantificación, integridad y pureza de los ácidos nucleicos

4.1.2.1. Cuantificación y determinación de pureza de RNA por espectrofotometría

En una celda de cuarzo de 1 ml se colocaron 995 μl de agua libre de RNasa (H₂O-DEPC), y se adicionaron 5 μl de RNA total. Se midió su absorbancia a 260 y 280 nm, utilizando como blanco 1 ml de H₂O-DEPC. La cantidad de RNA se calculó considerando que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 μg de RNA. La pureza fue calculada a partir de la relación A_{260}/A_{280} , donde un valor de 1.65 a 1.9 indica una baja contaminación por proteínas, siendo éste un intervalo de pureza adecuado para trabajar la muestra.

4.1.2.2. Determinación de la integridad del RNA por electroforesis

Se preparó un gel desnaturizante para electroforesis de agarosa al 1.5% con una solución amortiguadora de corrida 1X de ácido 3-[N-mofolino] propanosulfónico, MOPS, formaldehído y bromuro de etidio para visualizar los ácidos nucleicos. Debido a que la solución amortiguadora MOPS contiene acetatos, al preparar el gel fue necesario calentar el H₂O-DEPC con la agarosa por separado y posteriormente agregar la solución amortiguadora MOPS 10X, formaldehido y el bromuro de etidio. La muestra fue cargada con una solución amortiguadora de carga desnaturizante 6X, conteniendo formaldehído y formamida. El gel fue corrido en una cámara (gel de 5 x 8 cm) para electroforesis a 90 V hasta separar las bandas de los ácidos nucleicos.

Para una visualización sencilla y rápida de la integridad del RNA total se utilizó un gel no desnaturizante para electroforesis de agarosa al 1.5 % con solución amortiguadora de corrida SB 1X utilizando bromuro de etidio para la visualización de ácidos nucleicos.

4.2 Aislamiento de RNAm

Para el aislamiento del RNAm se utilizó el sistema a pequeña escala "PolyATtract RNAm Isolation System" de Promega siguiendo el protocolo del fabricante:

- Lavado de las partículas paramagnéticas de estreptavidina (SA-PMP)

Se resuspendió un tubo de SA-PMP para aislamiento por pipeteo suave en el fondo del tubo hasta que fuesen completamente dispersadas. Se capturaron las SA-PMP colocando el tubo en la base magnética, incluido en el juego. Se removió el sobrenadante cuidadosamente (sin centrifugar las partículas). Se lavaron las SA-PMP tres veces cada una con 300 μ l de solución de NaCl + Citrato de sodio (PolyATtract RNAm Isolation System, Promega), SSC 0.5X, esta última preparada con SSC 20X. Tras cada lavado se capturaron las SA-PMP utilizando la base magnética y se retiró cuidadosamente el sobrenadante. Se resuspendieron las SA-PMP lavadas en 100 μ l de SSC 0.5X.

- Alineamiento de templado:

En un tubo de microcentrífuga estéril, se tomaron de 0.45 mg de RNA total y se llevó a un volumen final de 500 μ l con agua libre de RNasas. Luego se calentó a 65°C en un block de calentamiento por 10 minutos. Estando aún en el block, se agregaron 3 μ l de Oligo(dT) biotinilado y 13 μ l de SSC 20X (NaCl 3M, citrato de sodio 0.3 M, pH 7). Se mezcló suavemente por inversión y se incubó a temperatura ambiente hasta enfriarse completamente.

- Captura y lavado

Se agregó todo el contenido de la reacción de alineación al tubo con las SA-PMP lavadas. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos mezclando suavemente por inversión cada 1 a 2 minutos. Se capturaron las SA-PMP con la base magnética y cuidadosamente se retiró el sobrenadante. Se lavaron las partículas 4 veces con 300 μ l de SSC 0.1X por lavado, preparada con SSC 20X, pipeteando suavemente el fondo del tubo hasta que todas las partículas estuvieran resuspendidas. Tras el último lavado, se eliminó todo el sobrenadante posible.

- Elución del RNAm

Se resuspendió la pastilla final de SA-PMP en 100 μ l de agua libre de RNAsas y se resuspendieron las partículas por inversión. Se capturaron magnéticamente las SA-PMP y se transfirió la elución de RNAm a un tubo estéril. Se repitió la elución y se recolectó en el mismo tubo de RNAm hasta llegar a un volumen final de 250 μ l. Debido al gran volumen del eluido de RNA, fue necesario liofilizar la muestra en el SpeedBack (2 horas a -50°C , con vacío) y se resuspendió en 10 μ l de $\text{H}_2\text{O-DEPC}$.

Debido a la escasa cantidad de muestra no fue posible cuantificar o verificar la integridad del RNAm. Típicamente del 1 al 5% del RNA total es RNAm (Sambrook J, Russell D., 2001), por lo que se consideró la concentración de RNAm como 1% y el rendimiento del aislamiento $\sim 100\%$. En un ejemplo, si se partió de ~ 45 μg de RNA total se supone que se obtuvieron <450 ng de RNAm al final.

4.3 Síntesis de la primera cadena de cDNA

Nota: Las siguientes condiciones fueron programadas en un termociclador deteniendo la corrida para agregar reactivos, mezclar y/o incubar en hielo.

En un tubo para PCR estéril se preparó la siguiente mezcla: 1 μ l de oligo dT (1 μ g/ μ l), 1 μ l de dNTPs (10mM), 1 ng a 500 ng RNAm (10 μ l en nuestro caso), cbp 13 μ l de H₂O-DEPC (1 μ l en nuestro caso). Esta mezcla fue calentada a 65°C durante 5 minutos. Pasado ese tiempo se enfrió en hielo y se colectó la muestra en el fondo del tubo mediante centrifugación breve.

A continuación en el tubo de reacción se agregaron 4 μ l de solución amortiguadora 5X para la primera cadena (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM) y 2 μ l de DTT 0.1 M. Se incubó a 42°C por 2 minutos. Luego se agregaron 200 U de la enzima SuperScript RT (Invitrogen®). Se mezcló perfectamente por pipeteo y se continuó la incubación a 42°C durante 50 minutos. El volumen final de reacción fue de 20 μ l. Se incubó a 70°C por 15 minutos.

Para eliminar el RNA de la muestra se agregó 1 μ l de RNasa H 2 U/ μ l incubándose a 37°C durante 20 minutos.

4.4 Amplificación de la secuencia del gen *Zmdxs1*

4.4.1 Capacidad de amplificación del cDNA obtenido

Ya que el gen *Zmdxs1* presentó dificultades al amplificar, se determinó la capacidad de amplificación del cDNA obtenido. Para éste fin se amplificaron fragmentos de 2 genes presentes en maíz, ubiquitina y mio-inositol-1-fosfato sintasa (MIPS) cuyo RNAm es abundante y escaso respectivamente. Para el primero se utilizó cDNA obtenido a partir de RNA total, La reacción correspondiente al gen *mips* utilizó cDNA procedente de RNAm. La cantidad de cDNA agregada a cada reacción fue calculada de manera similar al inciso 7.2

del capítulo de Metodología. En las Tablas 2, 3, y 4 se presentan las condiciones utilizadas para la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, de estos genes.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones control positivos de la reacción de PCR. T_m : temperatura de alineamiento del oligonucleótido. Ubi: oligonucleótido para ubiquitina, MIPS: oligonucleótido para *mips*.

Oligo-nucleótido	Secuencia	pb	%GC	T_m (°C)
Ubi F	CACTTGGTGTTGCGTCTCAG	20	55	57.6
Ubi R	CACCTCAAGGGTGATCGTCT	20	55	57.5
MIPS F	GGGTGGGGAGGCAACAACGGG	21	71	66.6
MIPS R	GAGGTGGGCTTTATTCCAGC	20	55	57.4

Se prepararon 2 mezclas madre de amplificación, una que contuvo los oligonucleótidos para fragmento de la secuencia de ubiquitina y otra que contuvo los del fragmento del gen *mips*. Cada mezcla madre incluyó a todos los reactivos excepto el cDNA y se preparó en baño de hielo. A continuación se mezcló suavemente por pipeteo y se repartió el volumen respectivo para cada reacción. Posteriormente se agregó el volumen de cDNA correspondiente o el de H₂O en el caso del control negativo. Luego se incubó 2 minutos a 90°C en el termociclador. Al término de éste tiempo se agregó la enzima TaqPol mezclando suavemente por pipeteo. Éste inicio de reacción se conoce como “Hot Start” y se utiliza para evitar que la polimerasa amplifique con posibles alineamientos inespecíficos.

Tabla 3. Componentes de reacción de PCR para ubiquitina y *mips*. El

amplificado de ubiquitina utilizó cDNA de RNA total y el de *mips* de RNAm.

	Vol/reacción (μl)	
	Ubi	<i>mips</i>
"Master Mix"		
H ₂ O desionizada estéril	16.0	11.8
Solución amortiguadora de PCR 10X sin Mg ²⁺	2.5	1.25
MgCl ₂ 50mM	0.75	1.25
dNTPs 10mM	0.4	1.0
Oligonucleótido Zmdxs1F 10 μM	1.25	0.625
Oligonucleótido Zmdxs1R 10 μM	1.25	0.625
TaqPol 5 U/μl	0.2	0.2
cDNA (origen RNA total)	2.5 (~14μg)	--
cDNA (origen RNAm)	--	5 (~50ng)

Tabla 4. Condiciones utilizadas durante las amplificaciones control positivo de la reacción de PCR. T_{desnat}, temperatura de desnaturalización; T_m, temperatura de alineamiento; T_{ext}, temperatura de extensión.

	Ubiquitina			<i>MIPS</i>		
	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	3'	1	94	5'	1
Desnaturalización	94	40"	30	94	2'	15
Alineamiento	58	40"	30	68	1'	15
Extensión	72	40"	30	72	2	15
Extensión final	72	7'	1	72	5	1

4.4.2 Diseño de oligonucleótidos para *Zmdxs1*

Para amplificar la secuencia completa del gen *Zmdxs1*, se diseñaron oligonucleótidos a partir de la secuencia codificante, cds, completa con número de acceso EF507248 en el GeneBank (Tabla 5). Mediante los programas FastPCR, Biology WorkBench Version 3.2 (<http://workbench.sdsc.edu>) y Oligo Analyzer 3.0 (Integrated DNA Technologies, <http://www.idtdna.com>), se determinaron las características de dichos oligonucleótidos

Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de *Zmdxs1* reportada en GeneBank (EF507248). T_m : temperatura de alineamiento del oligonucleótido.

Oligonucleótido	Secuencia	Pb	%GC	T_m (°C)
Zmdxs1F	ATGGCTCCTGTCGACGTTCTCTG	23	54.5	59.6
Zmdxs1R	AAGTTCTACGCGTTTGGCACTGC	23	52.2	61.2

4.4.3 Optimización de las condiciones de amplificación de *Zmdxs1*

Las condiciones óptimas para la amplificación del gen *Zmdxs1* se muestran en las Tablas 6 y 7. Éstas fueron determinadas tras una serie de experimentos exploratorios, en los que se modificaron la temperatura de alineamiento, la concentración de los reactivos, la concentración del cDNA, el número de ciclos de la amplificación y uso de reactivos como el dimetil sulfóxido, DMSO, para favorecer la apertura de la doble hélice del cDNA.

En un tubo esterilizado de PCR de 200 μ l en baño de hielo, se preparó la mezcla madre para las 2 reacciones con los componentes de la Tabla 6, con excepción del DMSO, el cDNA y los 2 μ l de H₂O del control negativo. Se mezclaron por pipeteo. Luego se taparon los tubos y se centrifugaron brevemente para colectar el contenido en el fondo del tubo. Posteriormente, aún en baño de hielo, se agregó el cDNA o H₂O para el caso del control negativo y al finalizar se agregó el DMSO mezclando suavemente por pipeteo.

Tabla 6. Componentes de reacción de PCR para *Zmdxs1* y su control negativo

sin cDNA.

	Vol. (μ l)	
	Control negativo	<i>Zmdxs1</i>
Mezcla madre:		
H ₂ O desionizada estéril	11.8	11.8
Solución amortiguadora de PCR 10X sin Mg ²⁺	2.0	2.0
MgCl ₂ 50mM	0.6	0.6
dNTPs 10mM	0.4	0.4
Oligonucleótido <i>Zmdxs1F</i> 10 μ M	1.0	1.0
Oligonucleótido <i>Zmdxs1R</i> 10 μ M	1.0	1.0
TaqPol 5 U/ μ l	0.3	0.3
H ₂ O desionizada estéril	2.0	--
cDNA	--	2.0
DMSO 100%	1.0	1.0

La Tabla 7 presenta las condiciones de amplificación utilizadas. Después de la reacción, las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Tabla 7. Condiciones utilizadas durante la amplificación de *Zmdxs1*. T_{desnat} , temperatura de desnaturalización; T_m , temperatura de alineamiento; T_{ext} , temperatura de extensión

	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2'	1
Desnaturalización	95	1'	30
Alineamiento	60	2'	30
Extensión	72	2'	30
Extensión final	72	7'	1

4.4.4 Identificación del producto amplificado

El producto de amplificación se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% utilizando como solución amortiguadora de corrida TAE 1X, como solución amortiguadora de carga de DNA Ficol 6X y fue visualizado por tinción con bromuro de etidio. La identificación del amplificado se realizó comparando visualmente con un marcador de pesos moleculares de 1 kb corrido simultáneamente a 90 V.

4.4.5 Purificación del amplificado

El amplificado fue purificado utilizando el juego “GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit” de GE[®]. A partir del gel para electroforesis utilizado para la identificación del producto, se cortó el trozo de gel que contenía la banda del amplificado mediante el uso de una navaja limpia, cortando la rebanada lo más cercano a la banda y exponiendo el menor tiempo posible a la luz ultravioleta durante su visualización.

Se colocaron de 10 a 300 mg de banda en un tubo de microcentrífuga limpio y estéril. El peso molecular de la banda fue obtenido por diferencia de pesos

entre el peso del tubo vacío y el peso conteniendo la rebanada. Por cada 10 mg de gel se agregaron 10 μ l de solución amortiguadora de captura (contiene acetatos y caótopos, desestabilizante de proteínas). Luego se cerró el tubo y se agitó vigorosamente con un vórtex. Se incubó a 54°C hasta que la agarosa se disolvió completamente, aproximadamente 10 minutos, después fue centrifugado brevemente para coleccionar la muestra líquida en el fondo del tubo.

Posteriormente la muestra fue transferida a una columna GFX (preempaquetadas con una matriz de fibra de vidrio) previamente colocada dentro de un tubo colector y fue incubada a temperatura ambiente durante un minuto. Se centrifugó la muestra a velocidad máxima por 30 segundos (13000 rpm, Eppendorf Centrifuge 5415C) y el volumen recuperado fue descartado vaciando el tubo colector. Se colocó la columna nuevamente dentro del tubo colector y fueron agregados 500 μ l de la solución amortiguadora de lavado con etanol (Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA con EtOH 80% v/v) a la columna. Se centrifugó nuevamente a máxima velocidad (13000 rpm, Eppendorf Centrifuge 5415C) por 30 segundos y se desechó el volumen obtenido. La columna fue colocada en un tubo de microcentrifuga nuevo y estéril. Se agregaron 25 μ l de solución amortiguadora de elución (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, TE pH 8.0) directamente sobre el centro de la columna, se incubó por un minuto a temperatura ambiente y luego se centrifugó a máxima velocidad por un minuto. Se comprobó la pureza del amplificado purificado corriendo 4 μ l en un gel de agarosa al 1% con TAE 1X.

4.5 Obtención de células transformadas

4.5.1 Formación de células competentes

Se tomó una asada de una cepa congelada de *E. coli* DH5 α y se estrió sobre cajas petri con medio Luria-Bertoni, LB, sólido para obtener colonias aisladas. Luego se incubó a 37°C durante ~16 horas.

Con una asada de una colonia aislada, se inocularon 50 ml de medio LB líquido contenidos en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación de 250 rpm.

Se inoculó con 4 ml del cultivo fresco incubado toda la noche en un matraz con 400 mL de medio LB contenido en un matraz Erlenmeyer de 2 L y se dejó crecer a 37°C con agitación de 250 rpm hasta que alcanzó una densidad óptica, D.O., de 0.375 leída a 590 nm. Se consideró como blanco una alícuota de medio LB líquido sin inocular.

Luego se vació el cultivo en 4 botellas estériles para centrifugar de 250 ml y se incubó en hielo de 5 a 10 minutos. A continuación se centrifugó a 700 x g por 5 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante. El botón se resuspendió en 20 ml de una solución de CaCl₂ 60mM, previamente enfriado a 4°C, pipeteando suavemente para no dañar las células, utilizar un punta cortada en el extremo, y se centrifugó nuevamente a 700 x g por 5 minutos a 4°C. El botón se resuspendió suavemente en 80 ml de CaCl₂:glicerol (85:15) (60 mM:glicerol anhidro) enfriado a 4°C. (Centrifuga Sorvall RC5C Plus, Sorvall GSA rotor)

Posteriormente se dejó incubando en hielo durante 30 minutos para luego centrifugar las células a 700 x g por 5 minutos a 4°C. Los botones obtenidos fueron resuspendidos en 5 ml totales de CaCl₂:glicerol (85:15) (60 mM:glicerol anhidro) enfriado a 4°C y luego se almacenó en alícuotas de 100 μ l en tubos de microcentrífuga estériles. Inmediatamente fueron congelados en N₂ líquido y almacenados a -80°C.

4.5.2 Reacción de ligación: plásmido-gen

Para colectar en el fondo del tubo se centrifugaron brevemente los tubos que contenían el vector pGEM-T Easy y el inserto de DNA control.

La reacción de ligación se llevó a cabo en tubos de microcentrífuga de 500 μ l como se indica en la Tabla 8. Antes de usar la solución amortiguadora de ligación rápida 2X se agitó vigorosamente con el vórtex.

Tabla 8. Componentes de las reacciones de ligación entre el vector pGEM-T Easy con el cDNA de *Zmdxs1* y del mismo vector con DNA control del mismo juego (Promega[®])

	Reacción estándar	Control positivo
Solución amortiguadora de ligación rápida 2X para T4 DNA ligasa	5 μ l	5 μ l
Vector pGEM-T Easy (50ng)	1 μ l	1 μ l
Producto amplificado	X μ l	-
Inserto de DNA control	-	2 μ l
DNA T4 ligasa (3 unidades weiss/ μ l)	1 μ l	1 μ l
Agua desionizada	cbp10 μ l	cbp 10 μ l

Cada reacción se mezcló por pipeteo y se incubó a 4°C durante toda la noche para optimizar la ligación.

4.5.3 Transformación de células competentes

Se prepararon las cajas con medio Luria-Bertani con ampiciclina, isopropil- β -D-tio-galactósido, 5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactósido, al que llamaremos LB/Amp/IPTG/X-Gal y se prepara como se describe en el Apéndice 1.

Se descongelaron en hielo 3 alícuotas de células competentes (apartado 7.5.1) durante ~30 minutos. En condiciones asépticas se agregaron 5 μ l de la reacción estándar (Tabla 8), realizada por duplicado, y se agregaron 2 μ l de control positivo respectivamente a los tubos de células competentes, se mezclaron muy suavemente y se incubaron durante 20 minutos.

Pasada la incubación se aplicó un choque térmico por 45 a 50 segundos a exactamente 42°C e inmediatamente se incubaron en hielo durante 2 minutos. Se agregaron 900 μ l de medio de cultivo super óptimo con represión de catabolitos, medio SOC, a temperatura ambiente a cada una de las reacciones de transformación y se incubaron durante 1.5 horas a 37°C con agitación ~250 rpm. Al utilizar el medio SOC que contiene glucosa se promueve la sobrevivencia de las células previamente estresadas durante su competencia para recepción del ácido nucleico.

Para la reacción estándar, se plaquearon 50 μ l de la incubación anterior en una caja con medio LB/Amp/IPTG/X-Gal. El sobrante de la reacción de transformación fue centrifugada a 13000 rpm (microcentrifuga Eppendorf Centrifuge 5415C) y se resuspendió en 100 μ l de medio SOC a temperatura ambiente y plaqueada en otra caja con medio LB/Amp/IPTG/X-Gal. En el caso del control positivo se plaquearon, en cajas con medio LB/Amp/IPTG/X-Gal, 50 μ l de la reacción de transformación y 50 μ l de una dilución 1:10 de la misma reacción con medio SOC a temperatura ambiente. Todas las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

4.5.4 Selección de células probablemente transformadas con el gen *Zmdxs1*

Nota: las centrifugaciones fueron llevadas a cabo en una microcentrífuga Eppendorf Centrifuge 5415C a temperatura ambiente.

Se seleccionaron algunas colonias aisladas blancas de las cajas de reacción estándar y se picó cada una con palillos estériles y se sembraron en 5 ml de medio LB líquido incubando toda la noche a 37°C con agitación a 250 rpm.

Para tener un cultivo madre de la cepa probablemente transformada, en campana de flujo laminar, se tomó una alícuota de 1ml de cultivo fresco de toda la noche en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml estéril y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min, se eliminó el sobrenadante y se agregó 1 ml de LB:Glicerol (85:15) estéril y a temperatura ambiente. Se mezcló suavemente por pipeteo hasta resuspender y se congeló en N₂ líquido para almacenar a -80°C hasta su uso.

Para realizar una prueba preliminar para seleccionar una cepa transformada con el gen *Zmdxs1*, se purificó el DNA plasmídico de cada cultivo y se realizó una digestión del plásmido ligado al gen de interés, pGEM-*Zmdxs1*. Las técnicas se describen a continuación.

4.5.5 Purificación del DNA plasmídico: Miniprep

El DNA plasmídico de cada colonia seleccionada fue purificado utilizando el juego Rapid Plasmid Miniprep de Marligen Biosciences[®], de acuerdo al protocolo del fabricante. Las centrifugaciones fueron realizadas en una microcentrífuga Eppendorf Centrifuge 5415C a temperatura ambiente.

Antes de comenzar se verificó que se haya agregado la RNasa A a una concentración final de 20 mg/ml en la solución amortiguadora de suspensión, G1; que la solución de lisis celular, G2, no esté precipitada. También se precalentó una alícuota de solución Tris-EDTA, TE, de 65 a 70°C y se añadió etanol absoluto a la solución amortiguadora de lavado, G4, de acuerdo al protocolo del fabricante.

A partir del cultivo descrito en el inciso anterior, se concentraron los 4 ml de cultivo restantes en un tubo de microcentrífuga, centrifugando a 13000 rpm durante 1 minuto y desechando el sobrenadante cada vez hasta juntar todo el cultivo en una sola pastilla.

- Suspensión de las células

Se agregaron 250 μ l de la solución amortiguadora de suspensión con RNasa A, G1 (Tris-HCl 50 mM a pH 8.0, EDTA 10 mM, RNasa A 20 mg/ml). Se mezcló suavemente hasta homogenizar.

- Lisis de las células

Luego se añadieron 250 μ l de solución de lisis, G2 (NaOH 200 mM, SDS 1% p/v), mezclando suavemente por inversión 5 veces e incubando a temperatura ambiente 5 minutos.

- Neutralización

Posteriormente se adicionaron 350 μ l de solución amortiguadora de neutralización, M3 (contiene acetato y guanidina-HCl), y se mezcló inmediatamente por inversión 5 veces. La mezcla fue centrifugada a 12000 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos.

- Carga de la muestra en columna

El sobrenadante fue transferido a una columna colocada dentro de un tubo de lavado de 2 ml, incluidos en el juego, y luego se centrifugaron a 12000 rpm a temperatura ambiente por 10 minutos. El sobrenadante fue desechado y la columna fue colocada nuevamente en el tubo de lavado.

- Lavado opcional

Se agregaron 500 μ l de solución amortiguadora de lavado opcional, GX (contiene acetato y guanidina-HCl, EDTA y EtOH), se incubó 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm por 1 minuto. El

sobrenadante fue desechado y nuevamente se colocó la columna en el tubo de lavado.

- Lavado en columna

Se agregaron 700 μ l de solución amortiguadora de lavado, G4 (contiene NaCl, EDTA y Tris-HCl pH 8.0), previamente preparado con etanol, y se centrifugó a 12000 rpm por 1 minuto. Se desechó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones para eliminar la solución amortiguadora residual.

- Elución del plásmido

Nuevamente se desechó el sobrenadante y la columna fue colocada en un tubo colector de 1.5 ml para eluir el plásmido con 75 μ l de solución amortiguadora TE (Tris-HCl 10 mM a pH 8.0, EDTA 0.1 mM) precalentado de 65 a 70°C. La solución amortiguadora TE se colocó directamente en el centro de la columna. Luego se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto. El DNA plasmídico fue guardado a -20°C hasta su uso.

4.5.5.1 Digestión del pGEM-Zmdxs1

Se digirieron 200 ng de pGEM-Zmdxs1 con 1 μ l de EcoR1 (10 U/ μ l) y 0.6 μ l de solución amortiguadora REact 3 10X (Invitrogen®). Se incubó a 37°C por 2 horas.

Se verificó el peso molecular de los fragmentos por electroforesis utilizando un gel para DNA de agarosa al 1% con solución amortiguadora de tris-ácido acético-EDTA 1X, TAE 1X (ver Apéndice 1), en el que se cargaron los 5 μ l de la digestión con 1.5 μ l de solución amortiguadora de carga ficol 6X a 98V. Para comparar los pesos moleculares se utilizó un marcador de pesos moleculares de 1 kb. El gel fue corrido en una cámara (gel de 5 x 8 cm) para electroforesis a 90 V hasta separar las bandas de los ácidos nucleicos.

4.6 Secuenciación del gen clonado

Se determinó por secuenciación la identidad del gen *Zmdxs1* ligado al plásmido pGEM dentro de las células transformadas.

4.6.1 Preparación de la muestra: Maxiprep

Para obtener suficiente pGEM-*Zmdxs1* para realizar la secuenciación, fue necesario obtener una mayor cantidad de éste y para ello se utilizó el método de Maxiprep descrito a continuación.

En condiciones asépticas, se sembró una asada de la cepa transformada con pGEM-*Zmdxs1* en 3 ml de medio LB/Amp líquido y se incubó a 37°C con agitación 250 rpm durante 6 h.

Se adicionó una alícuota de 1 ml del cultivo fresco de 6 horas a 500 ml de medio LB/Amp contenidos en un matraz de 2L y se incubó a 36°C con agitación a 250 rpm durante toda la noche.

Se transfirió el cultivo a 2 botellas para centrifugar limpias y estériles (a partir de este punto no es necesario trabajar en condiciones asépticas). La muestra fue centrifugada a 2800 x *g* por 10 minutos a 4°C (Centrifuga Sorvall RC5C Plus, Rotor Sorvall GSA rotor).

Se desechó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 5 ml de Solución 1 (ver apéndice 1). Luego se agregaron 10 ml de solución de lisis alcalina, solución 2 (ver apéndice 1), preparada en el momento de usarse y se mezcló agitando suavemente hasta que la solución se aclaró.

La muestra fue transferida a un tubo de teflón de 50 ml donde se añadieron 7.5 ml de solución 3. Se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 3 minutos. Posteriormente se centrifugó la muestra a 6300 x *g* por 10 minutos a 4°C.

El sobrenadante fue transferido a un tubo de teflón limpio y estéril y se agregó isopropanol frío hasta llenar el tubo. Se incubó a -20°C durante toda la noche.

A la mañana siguiente la muestra fue centrifugada a $7800 \times g$ a 4°C por 15 minutos y se dejó secar la pastilla al aire durante 15 minutos. Después fue resuspendida en 3 ml de H_2O desionizada estéril y se agregaron 3 ml de LiCl 5 M. Se mezcló por inversión y se centrifugó nuevamente a $7800 \times g$ por 10 minutos a 4°C .

El sobrenadante fue transferido a un tubo de teflón limpio y se agregó un volumen de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a $7800 \times g$ por 10 minutos a 4°C .

Se decantó el sobrenadante y se invirtió el tubo durante un par de minutos para eliminar el mayor volumen de sobrenadante.

La pastilla se resuspendió en $500 \mu\text{l}$ de H_2O desionizada estéril y fue transferida a un tubo de microcentrífuga donde se le agregaron $20 \mu\text{l}$ de RNasa A (10 mg / ml). Se mezcló suavemente y se incubó a 37°C durante 30 min.

A continuación se centrifugó a $13000 \times g$ durante 5 min a 4°C y se resuspendió la pastilla en $500 \mu\text{l}$ de H_2O desionizada estéril. Se agregaron $500 \mu\text{l}$ de PCI (fenol : cloroformo : alcohol isoamílico [50:49:1]) y se agitó en el vórtex por 1 min.

Se centrifugó a 14000 rpm durante 3 minutos en una microcentrífuga y se recuperó la fase acuosa (la fase superior) en un tubo nuevo procurando no tocar el precipitado formado en la interfase.

Posteriormente se agregó 1/3 de volumen de acetato de sodio 10 M. Luego se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C , se mezcló por inversión y se incubó a -20°C por 1.5 h.

Pasada la incubación se centrifugó a 14000 rpm por 15 min a 4°C y la pastilla fue lavada con 1 ml de etanol al 70%, preparado con agua desionizada estéril. Nuevamente se centrifugó a 14000 rpm por 5 min a 4°C.

La pastilla fue liofilizada y resuspendida en 250 µl de agua desionizada estéril.

Se cuantificó por espectrofotometría y se realizó una prueba de identidad preliminar mediante la digestión del plásmido con EcoR1 como se describió en el inciso 7.3.

4.6.2 Secuenciación del DNA plasmídico

La secuenciación fue realizada con DNA plasmídico 200 ng / µl de 1.6 de pureza, mediante la técnica de “primer walking” utilizando los oligonucleótidos universales Promotor T7 y promotor SP6 citados en la Tabla 9.

Tabla 9. Oligonucleótidos universales utilizados en la secuenciación de la construcción pGEM-Zmdxs1

Oligonucleótido	Secuencia	Ubicación en pGEM-T Easy
Promotor T7	TAATACGACTCACTATAGGG	2999-3
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	139-158

4.7 Análisis bioinformático

Para ensamblar las secuencias contiguas (*contigs*) obtenidas en la secuenciación por Genewalking, se utilizó el programa CAP3 Sequence Assembly Program. (Huang and Madan, 1999).

El *contig* generado fue comparado con una base de datos mediante un programa de búsqueda de alineamiento local básico, BLAST, disponible en la página web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> y también mediante el programa Workbench disponible en la página web <http://workbench.sdsc.net>

4. Resultados y discusión

4.1. Obtención del gen

En la actualidad existen diversos métodos mediante los cuales se puede aislar un gen de interés. Todos ellos utilizan técnicas de ingeniería genética y se complementan con bioinformática.

La estrategia adoptada en este trabajo para obtener el gen *dxs* fue amplificar por PCR, con oligonucleótidos específicos, el cDNA sintetizado a partir del RNAm. A su vez, éste fue obtenido del RNA total extraído de tejido de hoja de maíz que expresa dicho gen. A continuación se describen los resultados y su interpretación, en cada una de las etapas experimentales para el logro de dicho propósito.

5.1.1. Extracción de RNA total de hojas de maíz

Inicialmente se buscó aislar el gen *dxs* de ascúculas de *Taxus globosa* procedentes de estacas cultivadas en invernadero. Originalmente, las estacas fueron obtenidas de árboles sanos de *Taxus globosa* ubicados en la reserva ecológica del Parque Nacional “El Chico” en el estado de Hidalgo, México. Las estacas fueron enraizadas y mantenidas en el invernadero del INIFAP-CINED. Sin embargo, debido al lento crecimiento de la planta, al alto contenido de componentes fenólicos propios de la planta madura y el difícil acceso a muestras de ascúculas suficientes para un buen rendimiento y calidad de RNA total, fue necesario utilizar un tejido alternativo para aislar el gen.

Se ha reportado que la enzima DXS se expresa en muchos sistemas de plantas que forman terpenos, como son *Arabidopsis thaliana* (Besumbes et al., 2004), *Oryza sativa* (Bo-Ra et al., 2005), *Medicago truncatula* (Walter et al., 2002), *Lavandula latifolia* (Muñoz-Bertomeu, et. al, 2006), *Zea mays* (GeneBank, No. acceso EF507248), entre muchos otros. En el laboratorio se tiene experiencia en el aislamiento de RNA de hoja de maíz (Escamilla, 2006) y como antes se

mencionó en este sistema también se encuentra expresada la DXS. Otra ventaja de este sistema es que las plántulas son jóvenes lo que limita la cantidad de RNAsa, y presentan rápido crecimiento y gran abundancia del tejido. Por todo lo anterior se utilizaron hojas de maíz de pocos días de germinación como tejido fuente del RNA de la DXS.

5.1.2. Determinación de la integridad del RNA por electroforesis y aislamiento de RNAm

Para realizar exitosamente la reacción en cadena de la polimerasa reversa, RT-PCR, es necesario contar con un RNA íntegro especialmente cuando nos interesa clonar un gen tan grande como es el caso de *dxs*. La Fig. 5 muestra los resultados de electroforesis en gel desnaturizante y no desnaturizante. En ésta, se observan bandas definidas correspondientes a RNA ribosomal 28S y 18S demostrando integridad en el RNA total extraído de las hojas de maíz.

Para realizar la extracción del RNA total se utilizó un método a pequeña escala por lo que la cantidad obtenida fue menor a 500 µg. Esto resultó en un limitado contenido de RNAm aislado contenido en un gran volumen (Metodología 7.2). Se concentró la muestra liofilizando el RNAm mediante centrifugación con vacío y refrigeración a -50°C y posteriormente se resuspendió en un menor volumen de H₂O-DEPC. Se agregó inhibidor de RNAsa para evitar la degradación y mantener la calidad del RNAm. Debido al escaso nucléico obtenido, no se cuantificó el rendimiento de esta fracción.

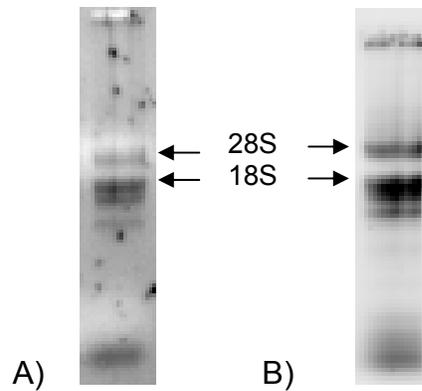


Fig. 5. Integridad de RNA total de maíz. A) Electroforesis en gel desnaturizante de Agarosa 1.5% y solución amortiguadora MOPS. B) Electroforesis en gel no desnaturizante de agarosa al 1.5% y solución amortiguadora SB. En ambos casos se encuentran señalados los pesos de las bandas 28S y 18S.

5.2. Diseño de oligonucleótidos y establecimiento de condiciones de PCR para *Zmdxs1*

Ya que el tejido para la obtención del gen *dxs* fue *Zea mays* raza Chalqueño, se diseñaron los oligonucleótidos a partir de los primeros y últimos nucleótidos presentes en la secuencia reportada para maíz en GeneBank, *dxs1* con No. acceso EF507248. Tratando de que sus temperaturas de fusión, T_m , fuesen lo más similares cercano posible (Tabla 5) y que el contenido de GC fuese del orden del 50 %. En la primera aproximación de condiciones para la amplificación por PCR del gen de la *dxs* fue utilizar como temperatura de alineamiento cinco grados por debajo del promedio de las T_m de los oligonucleótidos, en este caso de 55°C. Bajo estas condiciones no hubo amplificación (datos no mostrados). Dado que el tiempo de desnaturalización en los primeros experimentos fue de 40 seg y el gen era de 2200 pb, se pensó que el resultado negativo del PCR antes mencionado pudo deberse a que el tiempo que la reacción permanecía en condiciones de desnaturalización no era suficiente para abrir las dos cadenas de DNA. Por lo que corrimos otra reacción incrementando la estancia de la reacción en condiciones

desnaturalizantes, de 40 seg a 1 min. Desafortunadamente, estas condiciones tampoco fueron adecuadas. Un resultado típico de esta serie de experimentos se muestra en la Fig. 6.



Fig. 6. Resultado típico antes del establecimiento de condiciones óptimas de amplificación de *ZmDXS1* Electroforesis de DNA en gel de agarosa 1%

5.2.1. Funcionalidad del cDNA obtenido del RNAm de las hojas de plántulas de maíz.

Considerando los inadecuados resultados de amplificación del gen *dxs*, se hipotetizó que este resultado podía deberse a la impureza del cDNA inhibiéndose así la reacción de la *Taq* polimerasa. Para determinar si éste era el caso, se utilizaron como controles de la reacción 2 condiciones de amplificación de 2 genes diferentes, el gen de la proteína ubiquitina y el gen de la enzima mio-inositol-1-fosfato sintasa, *mips*. El RNAm del gen de ubiquitina es abundante en todos los sistemas ya que participa en el marcaje de proteínas a degradar (Voet, Voet, 1992) mientras que *mips* está relacionado con la respuesta a señales externas como estrés osmótico, formación de pared celular y acumulación de fosfato inorgánico en plantas.

Estudios realizados previamente en el laboratorio, indican que el RNAm de *mips* es poco abundante (Escamilla, 2006). Los oligonucleótidos y condiciones de reacción utilizados para amplificar estos genes se enlistaron en Materiales y métodos (Tablas 2, 3 y 4).

Los productos de amplificación pueden ser observados en la Figura 7.

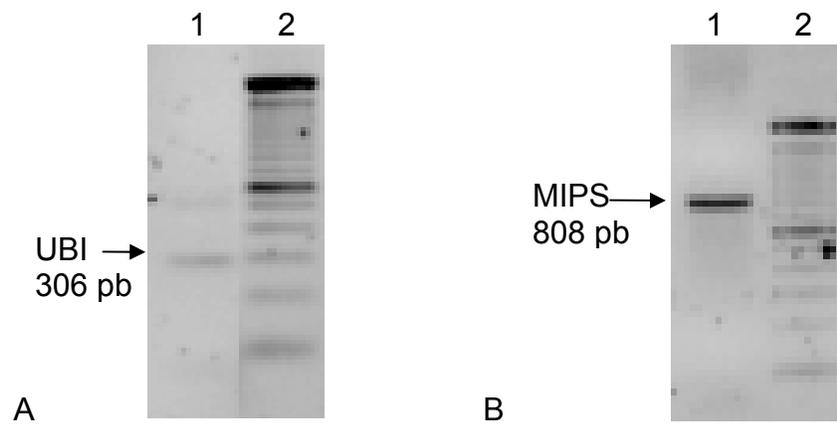


Fig. 7. Productos de los controles positivos de la reacción de PCR. A) carril 1: producto de ubiquitina de aproximadamente 306 pb. B) carril 1: producto de MIPS de aproximadamente 808 pb. En el carril 2 de ambos incisos se presentan los marcadores de pesos moleculares de 100 pb.

La amplificación de ambos genes se realizó de manera exitosa indicando que el cDNA era un buen templado para la amplificación por PCR de diversos genes.

5.2.2. Amplificación de la secuencia *Zmdxs1*

El exitoso resultado de amplificación de otras secuencias nucleotídicas confirmó la buena calidad del RNAm. Esto determinó que no fueron adecuadas las temperaturas de alineación utilizadas anteriormente en el establecimiento de condiciones de PCR pudiendo afectar en la separación de las cadenas de cDNA-

DNA, la alineación de los oligonucleótidos y/o en la lectura del templado. El análisis bioinformático realizado a la secuencia EF507248, realizada mediante el programa FastPCR, muestra que este gen contiene un porcentaje de GC mayor el 65%. Para este tipo de genes, la literatura recomienda incluir un aditivo en la PCR, DMSO, que desestabilice los puentes de hidrogeno disminuyendo así la temperatura de desnaturalización de la doble hebra. El resultado de esta modificación fue la amplificación de un producto de ~2160 pb correspondiente a la secuencia de *Zmdxs1* (Fig. 8). Las condiciones de amplificación así como los oligonucleótidos utilizados y los componentes de reacción pueden ser consultados en las Tablas 5, 6 y 7.

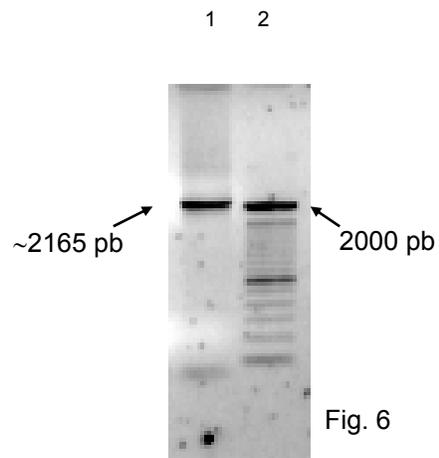


Fig. 8. Electroforesis del producto del amplificado de *ZmDXS1* en al reacción de PCR. Carril 1, amplificado de *ZmDXS1*; carril2, marcador molecular de 1000 pb (Fermentas[®]).

5.3. Clonación del fragmento *Zmdxs1*

Para clonar el amplificado del gen *Zmdxs1* se utilizó el vector de clonación pGEM-T Easy (Promega[®]) que presenta un alto número de copias

En la Figura 9 se observa en el vector pGEM-T Easy la presencia de un gen reportero, *lacZ*. En el interior de la secuencia de *lacZ* se encuentra el sitio de clonación múltiple que está formado por sitios reconocibles por diferentes enzimas de restricción inserción y es entre este sitio donde se permite la inserción de la secuencia de interés. La selección de las bacterias en las que la transformación con el vector que contiene el gen de interés está basada en la activación transcripcional de un promotor específico que permite que colonias blancas características de *E. coli* se tornen azules. Cuando las células transformadas son plaqueadas en un medio sólido con IPTG y X-Gal, el IPTG induce la transcripción del gen reportero β -galactosidasa, *lacZ*, uniéndose e inhibiendo al represor de *lacZ*, *lacI*. A IPTG se le llama inductor gratuito ya que no es degradado por la β -galactosidasa conservando su concentración.

El otro sustrato utilizado para la identificación de las colonias transformadas con la secuencia de interés es el X-gal que es un sustrato de la β -galactosidasa. Al ser hidrolizado, produce un compuesto (indoxil) que en contacto con el aire se transforma en índigo insoluble, el cual presenta un intenso color azul. Es utilizado como indicador de expresión de la β -galactosidasa en colonias bacterianas creciendo en placa. Si las colonias expresan la enzima β -galactosidasa se tornarán de color azul. Al introducir una secuencia de interés en el vector pGEM-T Easy la secuencia de la galactosidasa no puede expresarse pues su secuencia se ve interrumpida y así las colonias presentan un color blanco.

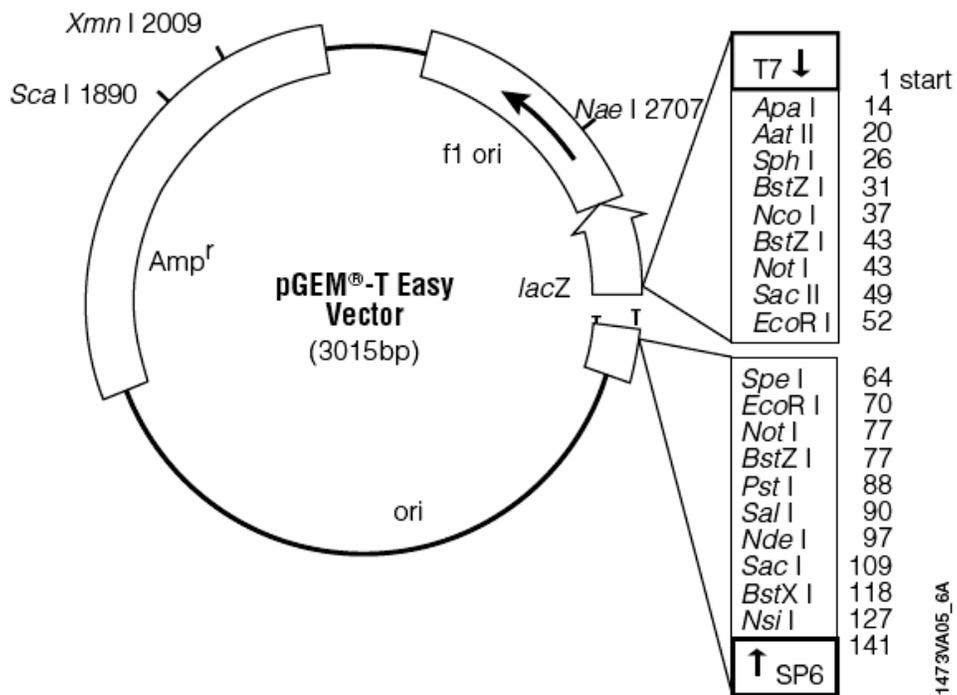


Fig. 9. Mapa circular y puntos de referencia del vector pGEM-T Easy (Promega).

El fragmento de 2160 pb amplificado fue ligado al vector pGEM-T Easy. Con esta construcción (pGEM-Zmdxs) se realizó la transformación de células de *E. coli* DH5- α . Para confirmar la transformación con la construcción pGEM-Zmdxs1, éste se digirió mediante la enzima de restricción EcoR1, tras confirmar mediante el programa FastPCR, que no corta dentro de la secuencia *Zmdxs1* reportada en el GeneBank., con lo cual fueron generados 2 fragmentos de DNA, correspondientes al vector de clonación y al gen de la enzima, 3015 y 2165 pb respectivamente (Fig. 10)

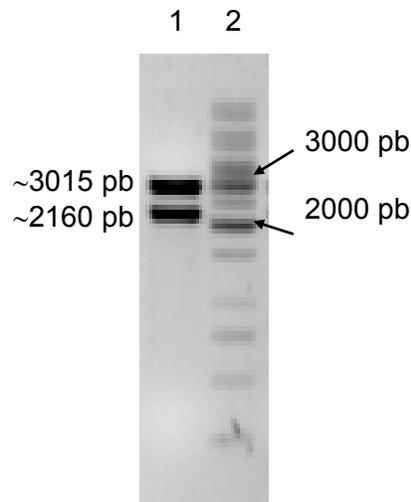


Fig. 10. Digestión de la construcción pGEM-*Zmdxs1* clonada en *E. coli* DH5- α . Carril 1: Se presentan 2 fragmentos de DNA, ~3015 pb y ~160 pb. Carril 2: marcador de pesos moleculares de 1 kb (Fermentas[®]).

5.4. Secuenciación del gen *Zmdxs1* clonado

5.4.1. Secuenciación del DNA plasmídico

Dada la longitud del gen se utilizó la estrategia de secuenciación por “Primer Walking” (técnica llevada a cabo por MacroGen Sequencing System, Korea; <http://dna.macrogen.com>), la cual consiste en secuenciar fragmentos más cortos del gen que se traslapan entre sí, lo que permite obtener la secuencia completa del gen (Fig. 11). Se utilizaron los oligonucleótidos universales SP6 y T7 (Tabla 9) para la secuencia en el sentido 5' y 3' respectivamente. Los oligonucleótidos internos para la secuenciación fueron diseñados por la misma compañía por lo cual no se cuenta con sus respectivas secuencias. Para ensamblar las secuencias contiguas resultantes de la secuenciación (obtención del “contig”), se utilizó el programa CAP3 Sequence Assembly Program (Huang y Madan, 1999) disponible en la página web <http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>. Tanto las secuencias parciales del gen como la secuencia completa, obtenidas en este trabajo, se compararon

con la secuencia EF507248 y su traducción teórica fue analizada mediante el programa SIXFRAME de Biology Workbench 3.2. Como se observa en la Tabla 10, tanto las secuencias parciales como la total presentaron entre un 89 a 99 %, así como 2 espacios, como máximo, en algunos de los fragmentos. A pesar de estas pequeñas inconsistencias, el valor cero de la probabilidad de que las dos secuencias fueran semejantes al azar, expectativa, indicó que el inserto era el gen *dxs1* de maíz (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis del “BLAST” de los fragmentos de secuencia y la secuencia completa clonada contra la secuencia del gen *ZmDXS1* del Genebank. 1F y 1R, oligonucleótidos internos diseñados por MacroGen® para realizar la secuenciación completa del gen. SP6 y T7, oligonucleótidos universales, utilizados para la secuenciación. T7a y T7b, utiliza el mismo oligonucleótido universal T7, a y b son usados para distinguir entre las 2 diferentes reacciones de secuenciación.

Oligonucleótido utilizado	Identidad	Expectativa	Espacios	Sentido
1F	818/829 (89%)	0.0	0	+/+
SP6	769/784 (98%)	0.0	1/784 (0%)	+/-
1R	833/843 (98%)	0.0	0/808 (0%)	+/+
T7a	801/808 (99%)	0.0	2/801 (0%)	+/+
T7b	794/810 (98%)	0.0	2/810 (0%)	+/+
<i>contig</i>	2144/2165 (99%)	0.0	0	---

	M A L S T F S V P R G F L G V P A Q D S	
1	atggctctgtcgcgacgttctctgtcccaaggggattcctcgggtgtgcccggctcaggactcc	60
	H F A S A V E L H V N K L L Q A R P I N	
61	catttcgcttcggcgggtcgagctccatgtcaacaagctgctccaggccaggcctatcaat	120
	L K P R R R P A C V S A S L S S E R E A	
121	ctcaagcctcggcggaggccggcatgcgtgtcggcgtcgtgtcgtcggagcgcgaggcg	180
	E Y Y S Q R P P T P L L D T I N Y P V H	
181	gagtactactcgcagcggccgcccacgcccgtgctggacaccatcaactaccccgtccac	240
	M K N L S V K E L R Q L A D E L R S D V	
241	atgaagaacctgtccgtgaaggagctgcggcagctggccgacgagctccgggtccgacgtc	300
	I F H V S K T G G H L G S S L G V V E L	
301	atcttccacgtctccaagaccggcggccacctcgggtccagcctcggcgtggtggagctc	360
	T V A L H Y V F N A P Q D R I L W D V G	
361	accgtcgcgctgcactacgtcttcaacgcgcccgcaggaccgcacccctctgggacgtcggc	420
	H Q S Y P H K I L T G R R D K M P T M R	
421	caccagtcgtacccgcacaagatcctgacggggcgggcgcgacaagatgccgacgatgcgg	480

Fig. 11. Secuencia del gen *Zmdxs1* obtenida mediante la secuenciación por “Primer Walking” empalmada y alineada con la secuencia teórica de aminoácidos para la que codifica (primera parte).

Q T N G L A G F T K R A E S E Y D S F G
 481 cagaccaacggcctggcgggcttcaccaagcgcgccgagagcgagtacgacagcttcggc 540
 T G H S S T T I S A A L G M A V G R D L
 541 acgggccacagctccaccaccatctccgcggcgctcgggatggcgggtgggcccgggacctc 600
 K G G K N N V V A V I G D G A M T A G Q
 601 aagggcggcaagaacaacgtggtcgcggtgatcggcgacggcgccatgacggcccgggcag 660
 A Y E A M N N A G Y L D S D M I V I L N
 661 gcgtacgaggccatgaacaacgccgggtacctggactccgacatgatcgatcctcaac 720
 D N K Q V S L P T A T L D G P V P P V G
 721 gacaacaagcaagtgtccttgcccaccgcgacgctcgacgggcccgggtgccgcccgtgggc 780
 A L S S A L S K L Q S S R P L R E L R E
 781 gcgctcagcagcgcctcagcaagctgcagtcaagcaggccgctcaggagctcaggag 840
 V A K G V T R Q I G G S V H E L A A K V
 841 gtggccaagggagtgacgaggcagatcgggtggctcagtgacgagctggcggcgaaggtg 900
 D E Y A R G M I S G P G S S L F E E L G
 901 gacgagtacgcccgcggcatgatcagcgggcccggctcctcgctcttcgaggagctcgg 960

Fig. 11. Secuencia del gen *Zmdxs1* obtenida mediante la secuenciación por “Primer Walking” empalmada y alineada con la secuencia teórica de aminoácidos para la que codifica (segunda parte).

L Y Y I G P V D G H N I D D L I T I L N
 961 ctctactacatcggccccgctcgacggccacaacatcgacgacctcatcaccatcctcaac 1020
 D V K S T K T T G P V L I H V V T E K G
 1021 gacgtcaagagcaccaagaccaccggccccgctcctcatccacgctcgtcaccgagaagggc 1080
 R G Y P Y A E R A A D K Y H G V A K F D
 1081 cgcggctaccctacgcccagcgcgagccgcccagacaagtaccacggtgtcgccaagtttgat 1140
 P A T G K Q F K S P A K T L S Y T N Y F
 1141 ccggcgaccgggaagcagttcaagtcccccgccaagacgctgtcctacaccaactacttc 1200
 A E A L I A E A E Q D S K I V A I H A A
 1201 gccgaggcgctcatcgccgaggcggagcaggacagcaagatcgtggccatccacgcggcc 1260
 M G G G T G L N Y F L R R F P N R C F D
 1261 atgggcgggcggcacggggctcaactacttcctccgcccgttcccgaaccggtgcttcgac 1320
 V G I A E Q H A V T F A A G L A C E G L
 1321 gtcgggatcgcggagcaacacgcccgtcacgttcgcggccggcctggcctgcgaaggcctc 1380
 K P F C A I Y S S F L Q R G Y D Q V V H
 1381 aagcccttctgcgccatctactcgtctttcctgcagcgcggctacgaccaggctcgtgcac 1440

Fig. 11. Secuencia del gen *Zmdxs1* obtenida mediante la secuenciación por “Primer Walking” empalmada y alineada con la secuencia teórica de aminoácidos para la que codifica (tercera parte).

D V D L Q K L P V R F A M D R A G L V G
 1441 gacgtcgatctgcagaagctaccggttaaggttcgccatggacagggccgggctggtcggc 1500
 A D G P T H C G A F D V A Y M A C L P N
 1501 gcggacgggcccgcaccactgcggggcgttcgacgtcgcgtacatggcctgcctgcccac 1560
 M V V M A P S D E A E L C H M V A T A A
 1561 atggtcgtcatggccccgtccgacgaggccgagctctgccacatggtcgccaccgcccgcg 1620
 A I D D R P S C F R Y P R G N G V G V P
 1621 gcaatcgacgaccgcccgtcctgcttccgctacccgagaggcaacggcgttggcgctcccg 1680
 L P P N Y K G T P L E V G K G R I L L E
 1681 ttgccgcccactacaaaggcactcccctcgaggctcggcaaaggcaggatcctgctggag 1740
 G D R V A L L G Y G S A V Q Y C L T A A
 1741 ggcgaccgggtggcgctgctggggtaggggtcggcagtgacgtactgcctgaccgcccgcg 1800
 S L V Q R H G L K V T V A D A R F C K P
 1801 tccctggtgcagcgcaccggcctcaaggctaccgctcggcgacgcgaggttctgcaagccg 1860
 L D H A L I R S L A K S H E V L I T V E
 1861 ctggaccacgccctgatcaggagcctggccaagtcccacgaggtgctcatcaccgtggag 1920

Fig. 11. Secuencia del gen *Zmdxs1* obtenida mediante la secuenciación por “Primer Walking” empalmada y alineada con la secuencia teórica de aminoácidos para la que codifica (cuarta parte).

```

      E G S I G G F G S H V A Q F M A L D G L
1921 gaaggctccatcggaggggttcggctcgcacgctcgcccagttcatggccctggacggcctt 1980
      L D G K L K W R P L V L P D R Y I D H G
1981 cttgacggcaaactcaagtggcgaccgctgggtgcttcttgacaggtacatcgaccatgga 2040
      S P A D Q L A E A G L T P S H I A A S V
2041 tcgccggccgatcagctggccgaggctgggctgacgccgtcacacatcgccgcgctcggtg 2100
      F N I L G Q N R E A L A I M A V P N A *
2101 ttcaacatcctggggcagaacagggaggctcttgccatcatggcagtgccaaacgcgtag 2160

```

Fig. 11. Secuencia del gen *Zmdxs1* obtenida mediante la secuenciación por “Primer Walking” empalmada y alineada con la secuencia teórica de aminoácidos para la que codifica (quinta parte).

5.5. Análisis bioinformático de la secuencia teórica de la proteína ZmDXS1

Se comparó la secuencia proteica derivada de la secuencia nucleotídica obtenida en este trabajo contra una base de datos de secuencias nucleotídicas traducidas, TBLASTX con el programa Biology Workbench 3.2, produciendo un alineamiento significativo contra la proteína ABP88134.1 ZmDXS1 con una E=0.0 (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis del “BLAST” entre la secuencia de aminoácidos teóricos de ZmDXS1 que generamos y la de la proteína teórica reportada en Genbank con número de acceso ABP88134.

Identidad	Similitud	Espacios	Expectativa
716/719 (99%)	719/719 (100%)	0/179 (0%)	0.0

Como se indica en la literatura, en diversas plantas, la proteína DXS es de origen citoplasmático pero su función la desempeña en el cloroplasto por lo que en su secuencia primaria posee un “péptido de tránsito a cloroplasto” (chloroplast Transit Peptide, cTP) que le permite migrar al cloroplasto (Walter *et al*, 2002). Las proteínas que contienen esta secuencia son reconocidas por un receptor de membrana y muchas son maduras mediante un corte del cTP realizado por la proteasa de procesamiento de tilacoide (Thylakoid Processing Protease, TPP) (Granel and Keegstra, 1996). En el gen *Zmdxs*, también se predijo una secuencia de péptido de tránsito a cloroplasto (cTP) con el programa ChloroP v1.1 de la Universidad Técnica de Dinamarca (Technical University of Denmark), <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/> (Tabla 12).

Tabla 12. Longitud de cTP de ZmDXS1 secuenciada de acuerdo al programa Chlorop v1.1.

Tipo de secuencia	Longitud cTP
Nucleotídica	153 pb
Peptídico	51 aa

De la tabla anterior suponemos que la proteína madura deberá contener solo 658 aminoácidos.

En general, los parámetros calculados para la proteína teórica ZmDXS1 son muy cercanos a los de ZmDXS1 madura (sin considerar el residuo para cTP) debido a que únicamente difieren en 17 aminoácidos.

Los parámetros fisicoquímicos de una proteína nos dan información útil que nos permite planear las siguientes etapas para la sobreexpresión de la enzima DXS en un cultivo de *E. coli* o en el cultivo en suspensión de células de *Taxus sp.* El coeficiente de extinción necesario permite calcular concentraciones de la proteína purificada, el punto isoeléctrico (pI) es útil en el análisis de 2 dimensiones (peso molecular y pI) (Tabla 13 y 14).

Se calcularon algunos parámetros físicos y químicos de la secuencia teórica de la proteína ZmDXS1, mediante el programa ProtParam, <http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam>.

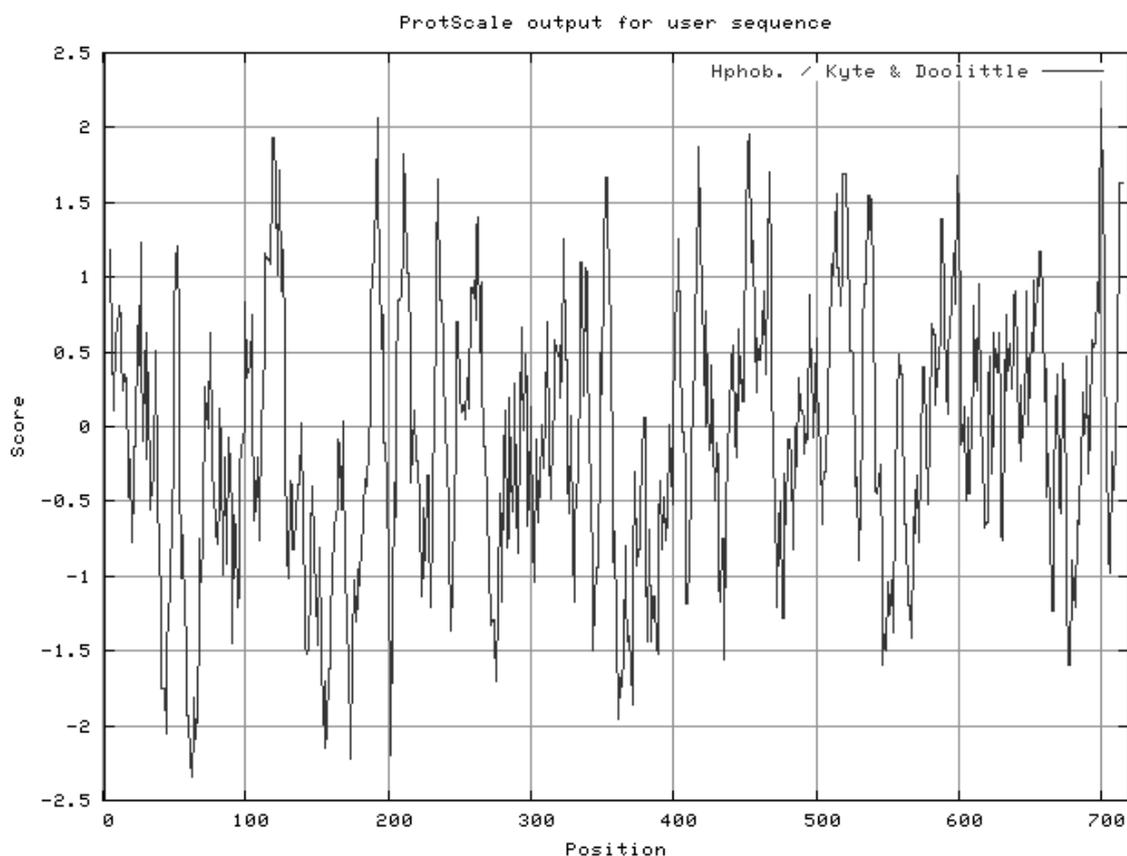
Tabla 13. Algunos parámetros calculados para la secuencia teórica de ZmDXS1

Número de aminoácidos	719
Peso molecular	77.2673 kDa
pI teórico	7.11
Número total de residuos cargados negativamente (Asp + Glu)	72
Número total de residuos cargados positivamente (Arg + Lys)	71
Promedio total de hidropaticidad (GRAVY)	-0.072

Tabla 14. Coeficiente de extinción de las proteínas teóricas ZmDXS1 y ZmDXS1 madura medido a 280 nm medido en agua ($M^{-1} cm^{-1}$)

	ZmDXS1	ZmDXS1 madura
Coef. de extinción	48875	48875
Abs 0.1% (=1 g/l) (Asumiendo TODOS los residuos Cys aparecen como "half cystines")	0.633	0.647
Coef. de extinción	48250	48250
Abs 0.1% (=1 g/l) (Asumiendo que NO todos los residuos de Cys aparecen como "half cystines")	0.624	0.639

Otro análisis realizado con ProtScale, (<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>), permitió representar el perfil de la ZmDXS1 de acuerdo a las características hidrofílicas e hidrofóbicas de la secuencia de aminoácidos que la conforman. La Gráfica 1 nos indica la proteína teórica contiene aproximadamente un 50% de aminoácidos hidrofóbicos y 50% hidrofílicos.



Gráfica 1. Representación de las características hidrofóbicas de la secuencia de aminoácidos que conforman a la proteína teórica de la secuencia ZmDXS1 obtenida en el laboratorio.

5.6 Comparación de tabla de uso de codones de *T. x media* contra la secuencia nucleotídica de *Zmdxs1*

Frecuentemente las proteínas son difíciles de expresar fuera de su contexto original ya sea porque sus secuencias pueden contener codones que son raramente utilizados en el hospedero deseado, o porque provienen de organismos que utilizan códigos no-canónicos o que contienen elementos de regulación limitantes de la expresión dentro de su secuencia codificante. Esta dificultad se explica ya que cada organismo utiliza preferencialmente ciertos codones de los múltiples que codifican para un mismo aminoácido (Voet, Voet, 1992) y por tanto la abundancia de tRNA análogos disponibles en la célula hospedera puede ser diferente de la que utilizaría la expresión de la proteína heteróloga. Dado que la expresión de la enzima ZmDXS en células de *T. globosa* constituye un sistema de expresión heterólogo, se procedió a analizar bioinformáticamente la adaptabilidad relativa (ver definición en glosario). Este análisis fue realizado mediante el programa “Graphical Codon Usage, versión 2.0” (<http://gcu.schoedl.de>). Desafortunadamente en GeneBank solo se reportan dos secuencias de *T. globosa* lo que no permite predecir el uso de codones en este organismo. Pero para otra especie del mismo género, *T. x media* existen 38 secuencias reportadas. Por lo cual la elaboración de la tabla de uso de codones para esta especie será representativa del género. Para reafirmar lo anterior, primero se compararon las tablas de uso de codones de *T. globosa* contra *T. x media* (Apéndice 2, Gráfica 2). Se observó que para la mayoría de los codones en ambas especies presentan adaptabilidades relativas similares, no así para algunos casos como el codón de terminación, atribuibles a la escasa cantidad de información con la que cuenta *T. globosa*. Estas tablas fueron obtenidas a partir de la página “Codon Data Base” disponible en www.kazusa.or.jp. ([datos no mostrados](#)). La compilación de la secuencia nucleotídica de *Zmdxs1* en una tabla de usos de codón se llevó a

cabo con el programa “Countcodon Program” perteneciente a la misma página. Del análisis anterior se deduce que sólo los codones citados en la Tabla 15 se encuentran en una proporción baja más no limitante de acuerdo con Gustafsson *et al.* 2004, quien indica que la secuencia heteróloga debe presentar por lo menos el 10% de la frecuencia para todos sus codones en el organismo hospedero. De lo anterior se concluye que el gen *Zmdxs1* se expresará en el *T. globosa*. Esta expresión puede ser mejorada sobreexpresando los genes que codifican para los tRNAs poco abundantes que lean los codones de la Tabla 15, enfoque utilizado en diversos laboratorios (Kane, JF. 1995), así como introduciendo una señal de terminación en el vector de expresión en el que sean clonados.

Tabla 15. Codones presentes en la secuencia *Zmdxs1* con adaptabilidad relativa menor o igual al 20% en el uso de codones de *T. x media*

Codón	Aminoácido	Adaptabilidad Relativa (%)
ACG	Thr	20
CCG	Pro	19
TAG	Terminación	17

Otra estrategia para mejorar la expresión de esta proteína sería alterar los codones raros en el gen blanco, de forma que sean lo más cercanamente reflejados en el uso de codones del hospedero, sin modificar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificante. Las técnicas para lograrlo van desde pasos mutagénicos sitio-dirigidos a la resíntesis del gen completo (mencionado en Gustafsson *et al.* 2004). Sin embargo, la primera no es factible debido a que los codones raros se encuentran dispersos a lo largo del gen (Apéndice 2, Gráfica 3), y en el caso de la segunda representaría un costo económico muy elevado para nuestro gen *dxs* que cuenta con más de 2 kb.

5. Conclusiones

- ✓ Se obtuvo el gen *dxs1* a partir de *Zea mays*.
- ✓ Se produjo una cepa que contiene el gen *Zmdxs1* en un vector de clonación.
- ✓ Se confirmó la identidad del gen a través de su secuenciación y análisis bioinformático.
- ✓ De acuerdo a los criterios de análisis bioinformáticos, la secuencia nucleotídica de *Zmdxs1* puede ser expresada dentro de un sistema del género de *Taxus*.

6. Perspectivas:

- Realizar la construcción de un vector de expresión que contenga una secuencia promotora fuerte, por ejemplo el del virus del mosaico de tabaco, e introducir la secuencia del gen *Zmdxs1* y en un vector separado o en la misma construcción incluir la secuencia de tRNA para Thr y Pro.
- Transformar un cultivo de células en suspensión de *Taxus* con la construcción mencionada.
- Probar diferentes sustancias en el medio de cultivo, bajo condiciones de oscuridad que favorezcan la dirección de precursores hacia la sobreproducción de Taxol.

Apéndice 1. Preparación de soluciones, geles y medios de cultivo

• Soluciones y geles para RNA:

Para preparar las soluciones se utiliza H₂O-DEPC. Una vez esterilizadas las soluciones y reactivos, se utilizará siempre material esterilizado. El material es esterilizado en autoclave a 1.2 kg/cm² durante 30 min al trabajar con RNA. No es necesario trabajar en condiciones asépticas, el material es esterilizado únicamente con la finalidad de degradar posibles nucleasas presentes.

H₂O-DEPC: DEPC 0.005% v/v
Agitar toda la noche y esterilizar

MOPS 10X: Acetato de sodio 50 mM
EDTA 10 mM
MOPS 0.2 M
Esterilizar por filtración y almacenar en matraz estéril

SB 20X: NaOH 200 mM
Ajustar el pH a 8 con ácido bórico

Solución amortiguadora de carga para RNA no desnaturizante 5X (RNA loading buffer, RLB):

Glicerol 50 %
EDTA pH 8.0 1.0 mM
Azul de bromofenol una punta de espátula
Ciano-xileno una punta de espátula
H₂O- DEPC cbp 1.0 ml

RLB 4X (solución amortiguadora de carga desnaturizante para RNA) (1ml):

			Conc. final
Glicerol al 80%	100	1	8.0 %
Formamida desionizada	550	1	55.0 %
Formaldehído al 37%	200	1	7.4 %
MOPS 10X	125	1	1.25 X
Azul de bromofenol	una punta de espátula		
Ciano-xileno	una punta de espátula		
H ₂ O-DEPC	cbp 1.0 ml		

Gel desnaturizante para RNA al 1.5% (30 ml):

			Conc. final
Agarosa (grado BM). 0.45 g	1.5 %		
Formaldehído al 37%	2.4 ml	3.0 %	
MOPS 10X	3.0 ml		1 X

- **Medios de cultivo y soluciones para competencia y transformación de células**

Importante: Una vez esterilizados los medios y las soluciones a 1.2 kg/cm^2 durante 15 min en autoclave, únicamente deben ser abiertos en condiciones asépticas para evitar la contaminación de los cultivos.

Solución madre de IPTG (100 mM) para 25 ml:

IPTG	0.6 g	
	H ₂ O bidestilada	25 ml

Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C.

Solución madre X-Gal (2 ml):

5-bromo-4-cloro-3-indolil- -D-galactosidasa	100 mg
--	--------

Disolver en 2 ml de N,N'-dimetil-formamida. Cubrir con papel aluminio y almacenar a –20°C.

Solución madre Ampicilina 100 mg/ml (1 ml):

Ampicilina ionizada	100 mg
H ₂ O bidestilada estéril	cbp 1 ml

Esterilizar por filtración y almacenar a -20°C.

Medio LB líquido (1L):

Peptona	10 g	
	NaCl	5 g
	Extracto de levadura	5 g
	H ₂ O	cbp 1 L

Medio LB/Amp líquido (1L):

Medio LB líquido	1 L	
	Ampicilina 100 mg / ml	1 ml

Esterilizar el medio LB por separado y agregar la Ampicilina cuando el medio esté tibio o a temperatura ambiente.

Medio LB sólido (1L):	Agar	15 g
	Medio LB líquido	1 L

Esterilizar en autoclave, dejar enfriar a ~50°C. Vaciar de 30-35 ml de medio en cajas petri desechables de 85 mm. Permitir endurecer el contenido. Almacenar a 4°C hasta por un mes o a temperatura ambiente por una semana.

Medio LB/Amp sólido (1L):	Agar	15 g
	Medio LB líquido	1 L

Esterilizar en autoclave, dejar enfriar a ~50°C antes de agregar la ampicilina a una concentración final de 100 g / ml. Vaciar de 30-35 ml de medio en cajas petri desechables de 85 mm. Permitir la solidificación del contenido. Almacenar a 4°C hasta por un mes o a temperatura ambiente por una semana.

Medio LB/Amp/IPTG/X-Gal sólido:

Hacer las cajas de LB con ampicilina como se indica anteriormente. Suplementar con 100 μ l de IPTG 100 mM y 20 μ l de X-Gal 50mg / ml, extender sobre toda la superficie de la caja y permitir absorberlos por 30 minutos a 37°C antes de usarse.

Medio SOC (100 ml):	Medio LB líquido	60 ml
---------------------	------------------	-------

Glucosa 0.5 M 40 ml

Se prepara la glucosa por separado esterilizar por filtración.

- **Soluciones para Maxiprep**

Solución 1: Glucosa 50 mM
 EDTA 10 mM
 Tris-HCl pH 8.0 25 mM

Solución 2 (solución de lisis alcalina) (50 ml): Preparar la solución en el momento

NaOH 10 N 1 ml
SDS 10% 5 ml
H₂O desionizada estéril cbp 50 ml

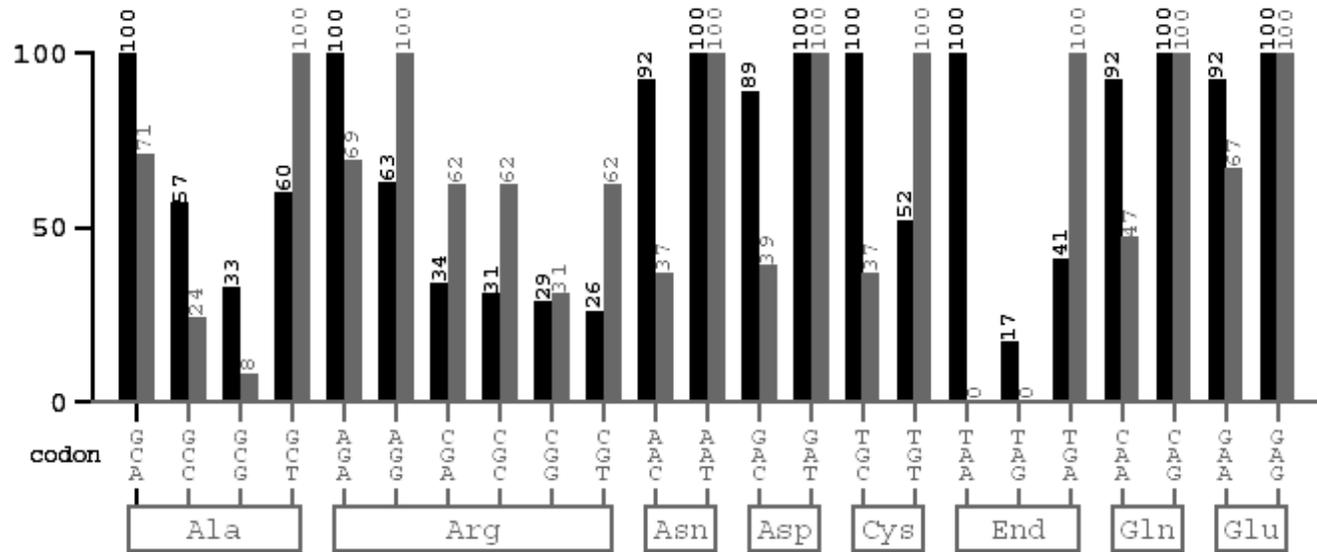
Solución 3: 1) CH₃COO⁻Na⁺·3H₂O 3 M (pH 5.0)

2) NaCl 1.6 M + PEG 13% p/v

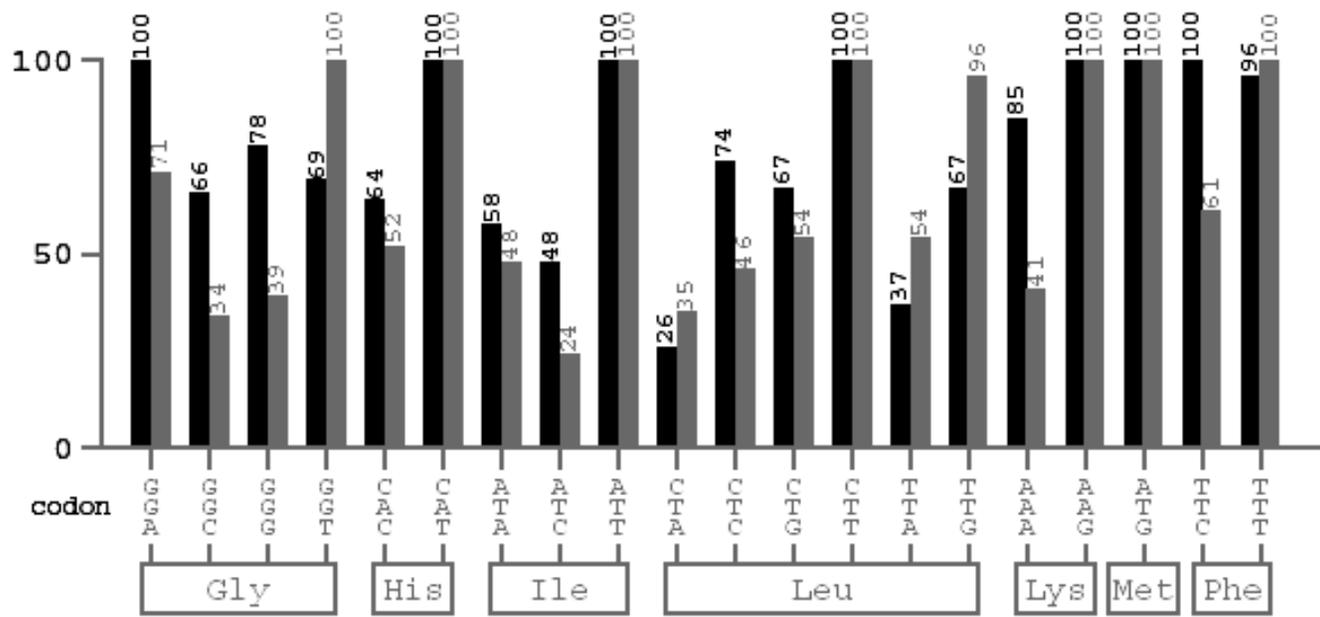
Estas 2 soluciones se prepararon por separado y solo fueron mezcladas de acuerdo al protocolo indicado en metodología (7.5.5) hasta el momento de su uso.

PCI: Fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1). Se utilizó fenol equilibrado preparado de acuerdo al protocolo del proveedor (Invitrogen[®]) y alcohol isoamílico anhidro.

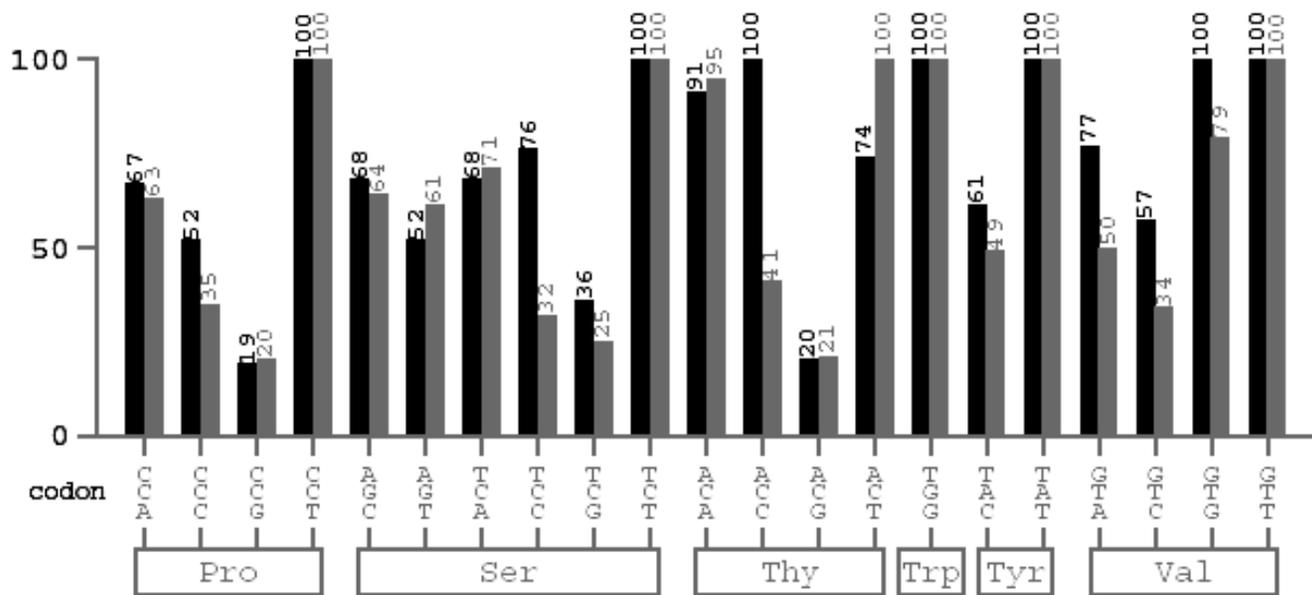
Apéndice 2. Resultados bioinformáticos



Gráfica 2. Representación gráfica de la fracción de cada codón utilizado en *T. x media* comparado con la fracción del mismo codón en otro *T. globosa* en términos de adaptabilidad relativa (ver Apéndice 3). En negro se representa la fracción correspondiente a la tabla de uso de codones de *T. x media* y en gris la correspondiente a la tabla de uso de codones en *T. globosa*.



Gráfica 2. (continuación)



Gráfica 2. (continuación)

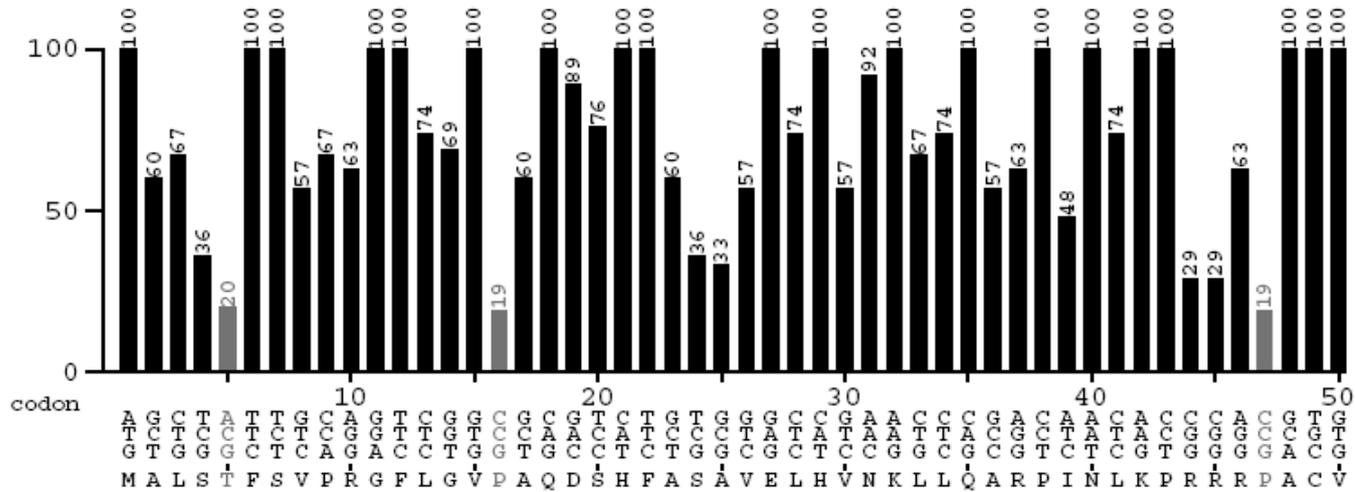
Nota: las tablas de uso de codones obtenidas para realizar la gráfica fueron las siguientes:

Tabla de codones de *Taxus x media* (negro):

<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=85957&aa=1&style=N>

Tabla de codones de *Taxus globosa* (gris):

<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=156271&aa=1&style=N>



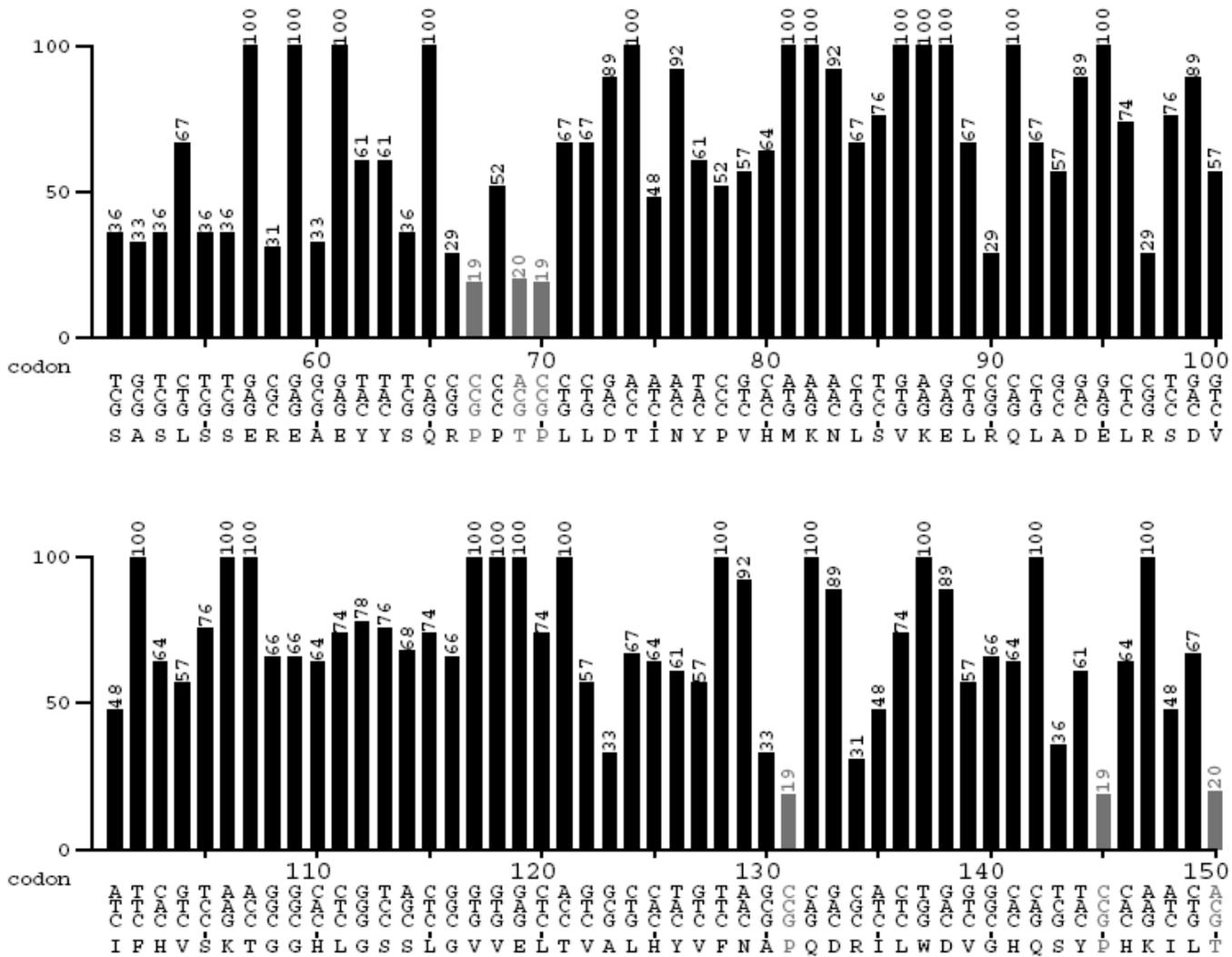
Gráfica 3. Representación gráfica de la fracción de cada codón comparado con la fracción del mismo codón en otro organismo en términos de adaptabilidad relativa (ver Apéndice 3). En gris se observan los porcentajes de adaptabilidad relativa menores o igual a 20.

Nota: la tabla de uso de codones obtenidas para realizar la gráfica fueron las siguientes:
 Tabla de codones de Taxus x media (negro):

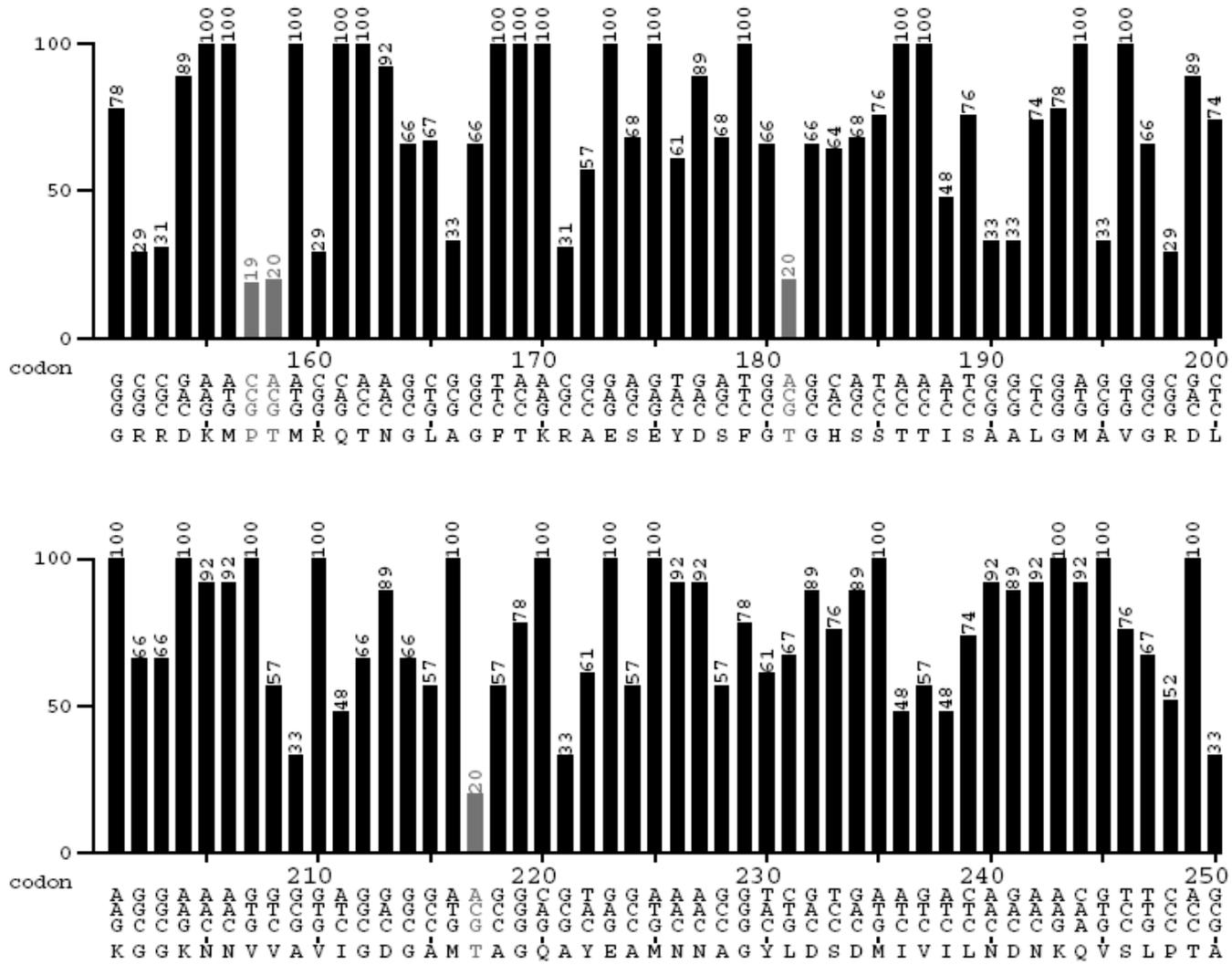
<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=85957&aa=1&style=N>

Tabla de codones del gen Zmdxs1 clonado: generada mediante el programa

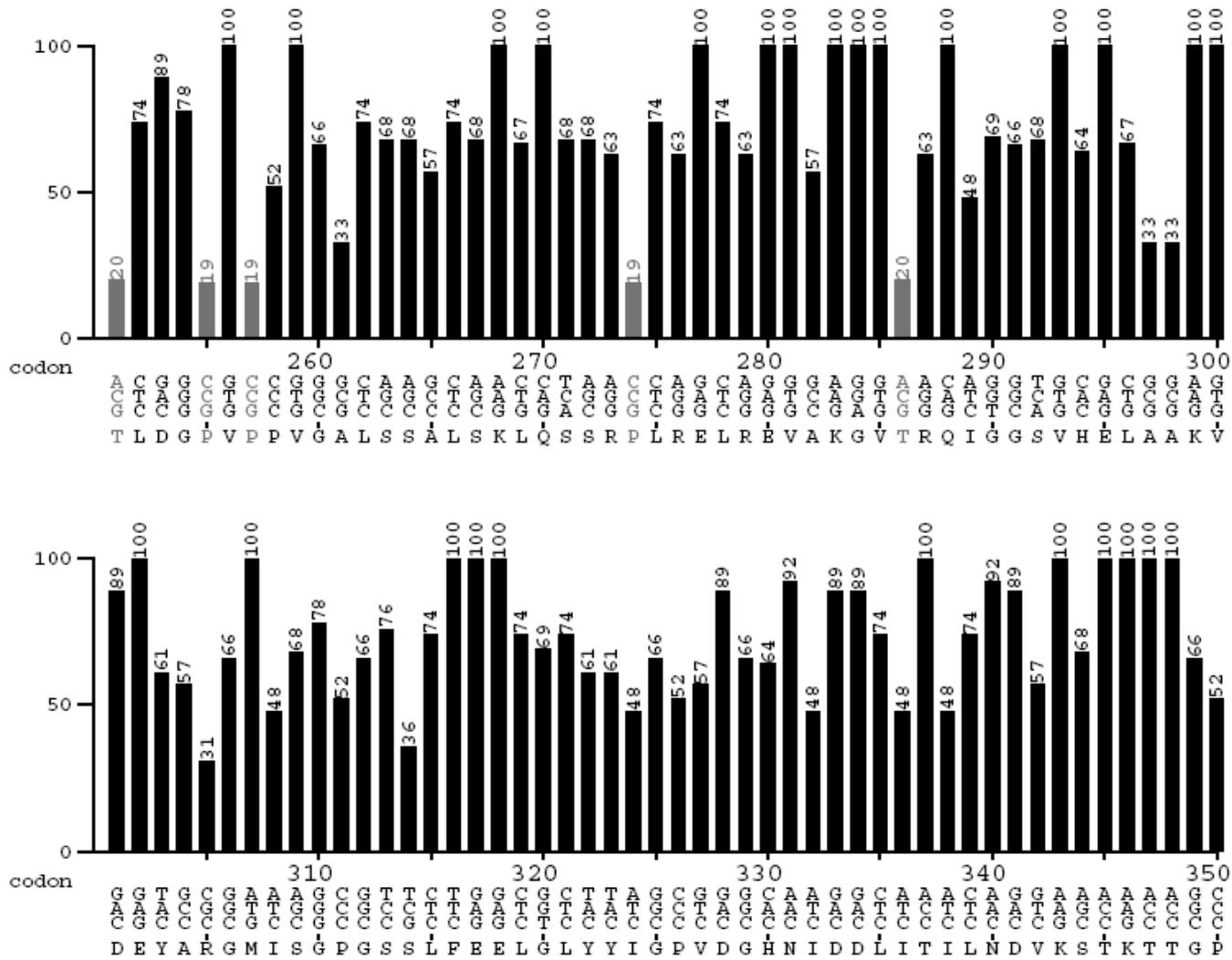
“Countcodon program” disponible en <http://www.kazusa.or.jp/codon/>



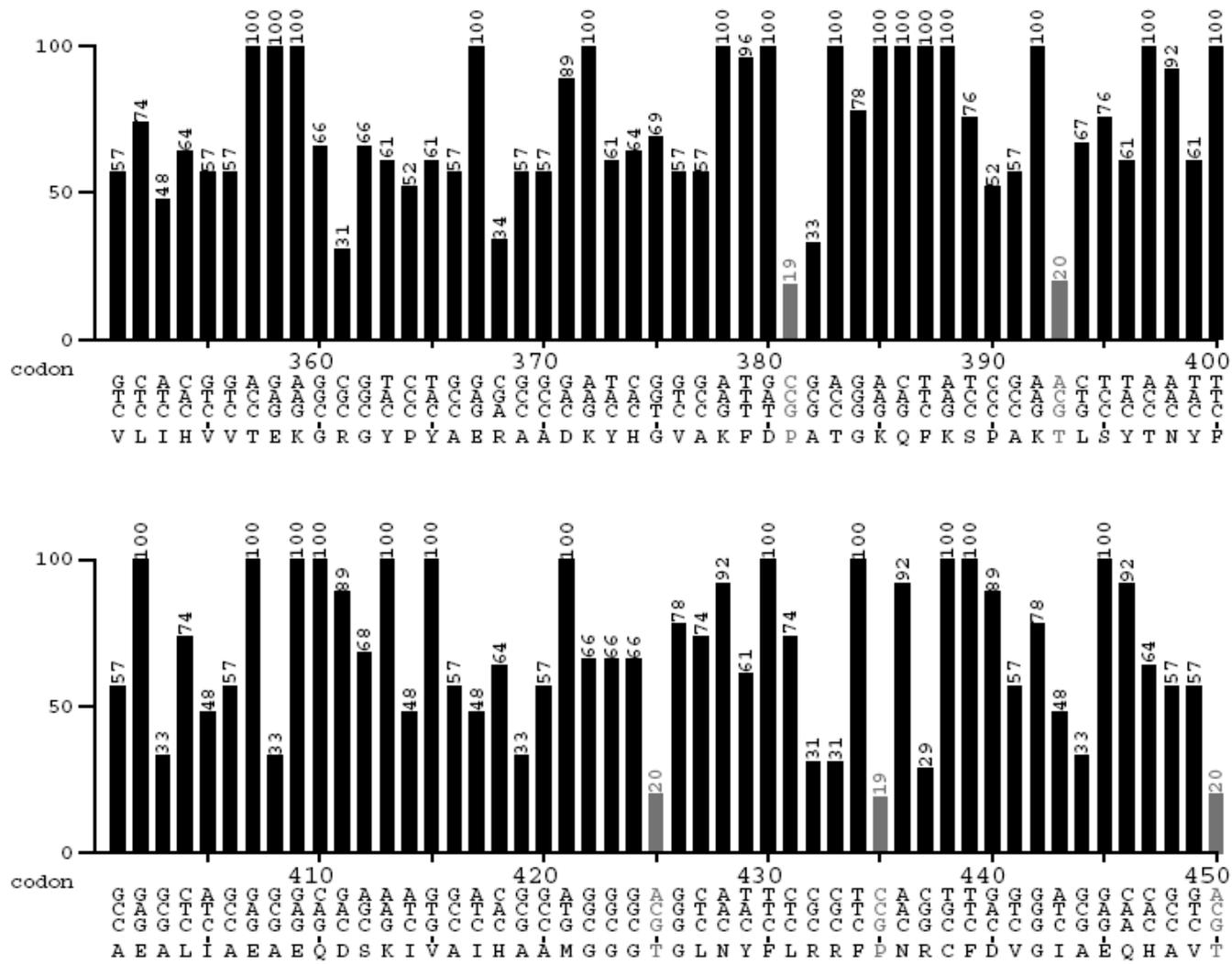
Gráfica 3 (continuación)

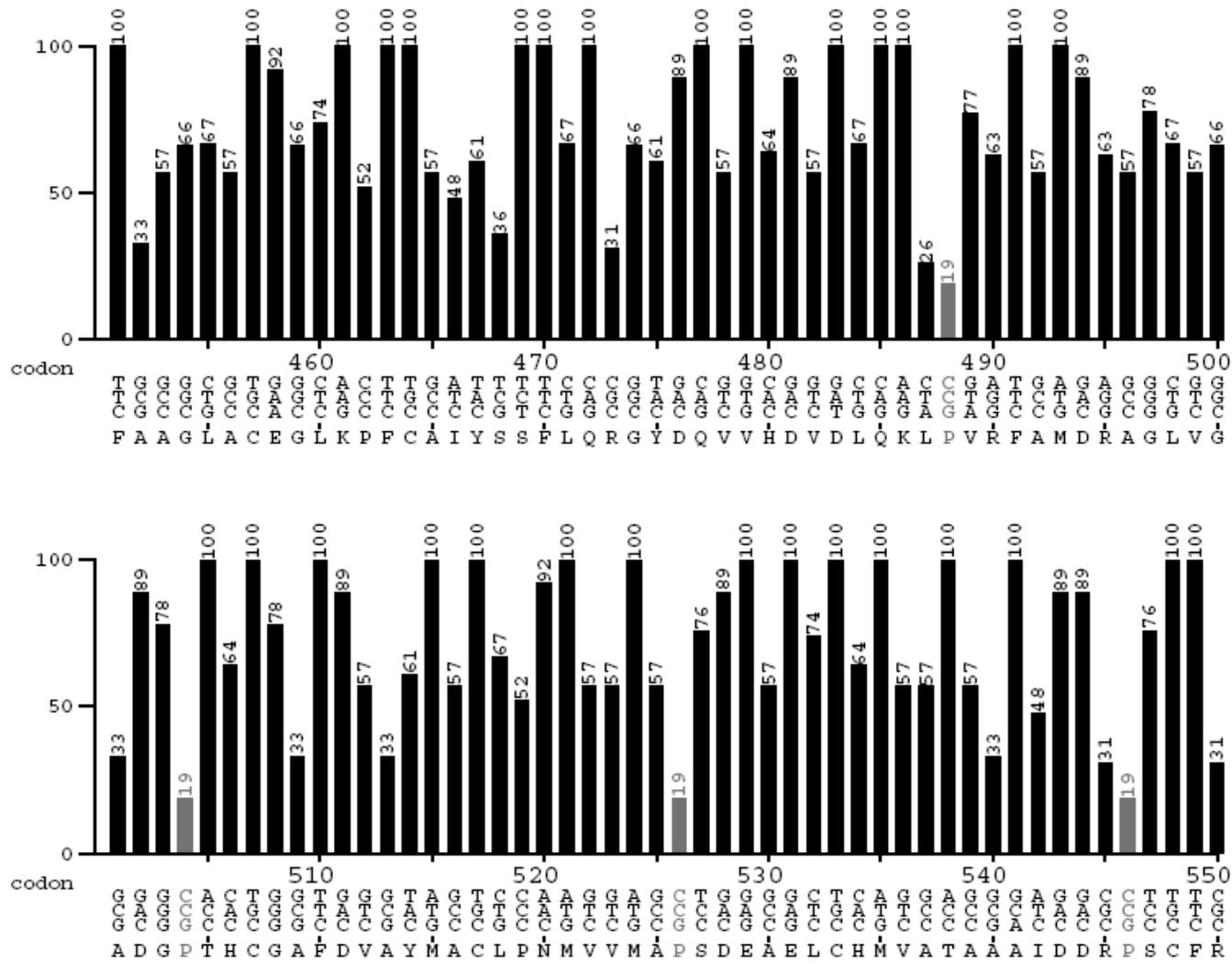


Gráfica 3 (continuación)

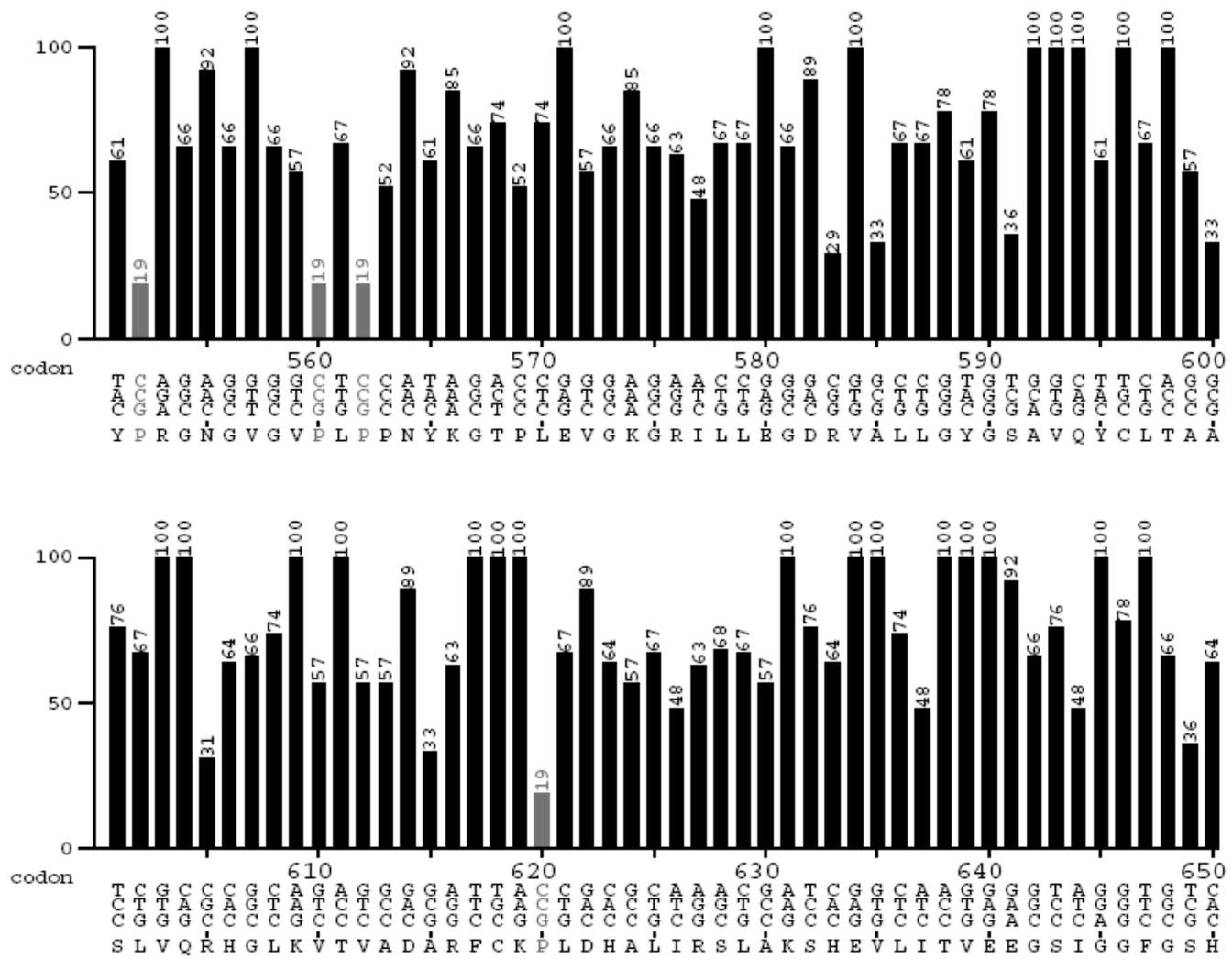


Gráfica 3 (continuación)

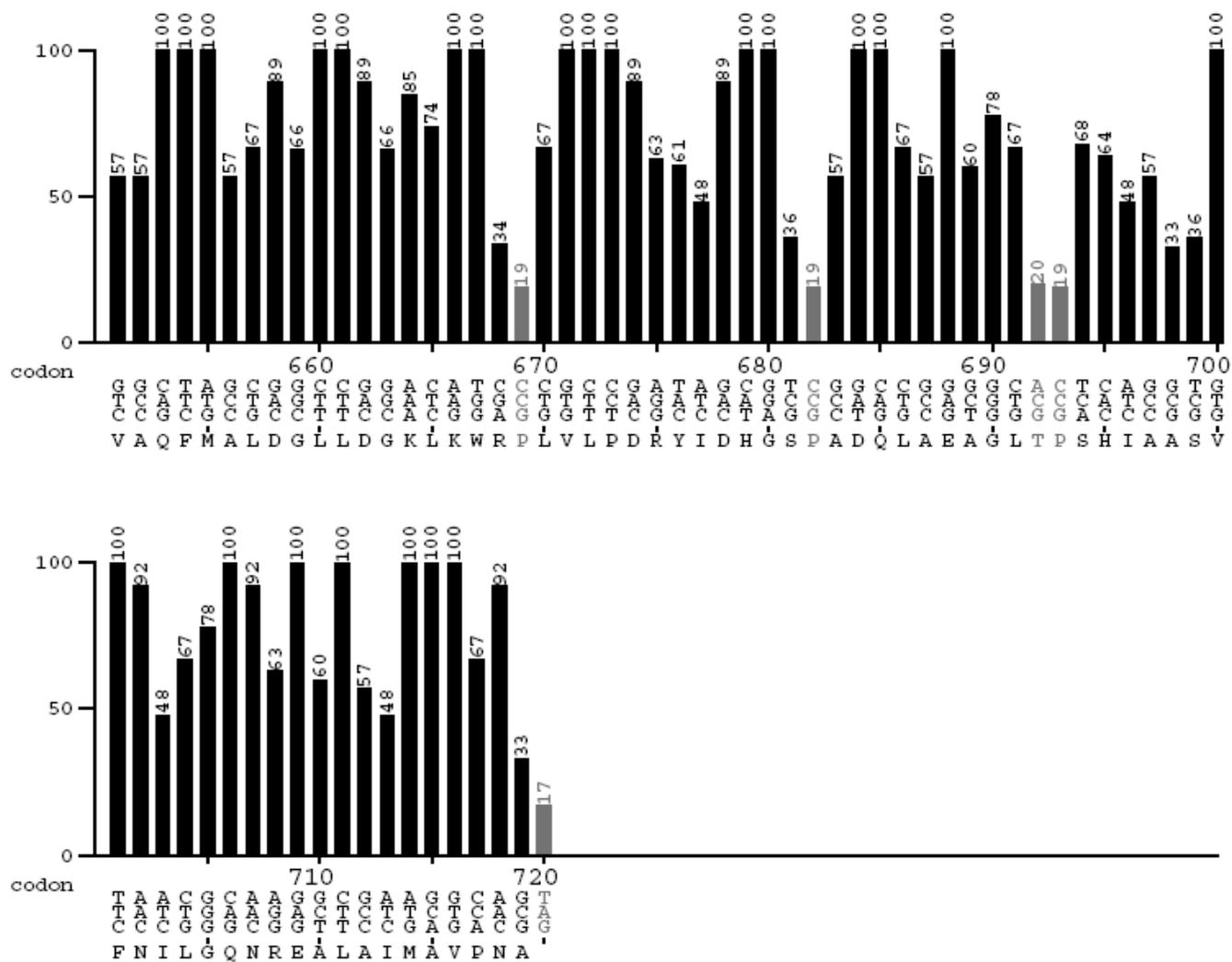




Gráfica 3 (continuación)



Gráfica 3 (continuación)



Gráfica 3 (continuación)

Apéndice 3. Glosario

Coefficiente de extinción (epsilon, ϵ) es el coeficiente de absorptividad dependiente de longitud de onda con unidades $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Indica la cantidad de luz que cierta proteína puede absorber en determinada longitud de onda (generalmente 280 nm). Durante la purificación de una proteína, ésta puede ser seguida mediante el método espectrofotométrico.

Dos valores de coeficientes de extinción pueden ser calculados con ProtParam, el primero asume que todos los residuos de cisteínas pueden aparecer como medias cisteínas, mientras que el segundo asume que ninguna cisteína aparece como media cisteína. El cómputo ha sido demostrado para proteínas que contienen residuos de Trp, pero para aquéllas sin Trp puede existir más de 10% de error.

<http://www.yeastgenome.org/help/proteinProperties.html>

Índice alifático: indica el volumen relativo de una proteína que es ocupado por cadenas alifáticas laterales (aliphatic side chains) (alanina, isoleucina, leucina y valina) y contribuyen al aumento de termoestabilidad observado para proteínas globulares. <http://www.yeastgenome.org/help/proteinProperties.html>

Índice de inestabilidad: indica la presencia de ciertos dipéptidos que ocurren con diferente frecuencia significativa entre proteínas estables e inestables. El peso del valor de la inestabilidad del péptido (dipeptide instability weight value, DIWV) menor a 40 predice que la proteína es estable, mayor a 40 inestable. <http://www.yeastgenome.org/help/proteinProperties.html>

Promedio total de hidropaticidad (Grand Average of Hydropathy, GRAVY): es la suma de valores de hidropaticidad de todos los aminoácidos, dividido entre el número de residuos en la secuencia. Indica la solubilidad de la proteína en agua. Los valores positivos indican hidrofobicidad y los negativos hidrofiliidad.

<http://www.expasy.ch/tools/protparam-doc.html>

http://www.biochem oulu.fi/proteomics/ymp/window_cbigravvy.html

PROT SCALE: A cada residuo de aminoácidos se le asigna un valor de acuerdo con la escala de hidropaticidad de Kyte y Doolittle. Para consultar los

valores asignados a cada aminoácido consultar la página:

<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/docs/UsersGuide/midas/hydrophob.html>

(Kyte and Doolittle, 1982).

Punto isoeléctrico (pI): pH al cual las proteínas tienen una carga neta de cero. Útil para la identificación de proteínas en 2 dimensiones (pI y peso molecular)

http://www.steadyhealth.com/encyclopedia/Isoelectric_point

Tiempo estimado de vida media: Es la predicción del tiempo requerido para que la mitad del total sintetizado de una proteína sea recambiada tanto *in vivo* como *in vitro*. Este valor es calculado en base a la “regla del N-terminal” de Varshavsky, la cual predice la vida media de la proteína basada en la identificación del residuo N-terminal de una proteína teniendo una función importante en la estabilidad en vivo de la proteína.

<http://www.yeastgenome.org/help/proteinProperties.html>

Adaptabilidad relativa:

La calidad de codones de las secuencias codificantes puede valorarse en dos formas distintas. La más sencilla es graficar la frecuencia de uso de codones que puede ser encontrada en tablas comunes de uso de codón. Una manera más elaborada de valorar la calidad de codón es convertir la frecuencia de uso de codones en valores de adaptabilidad relativa. A diferencia de la primera, la adaptabilidad relativa toma en cuenta el número de codones que codifican para el aminoácido respectivo. Para cada aminoácido, el codón con la mayor frecuencia establece el 100% de adaptabilidad relativa. Todos los otros codones para el mismo aminoácido se escalan de acuerdo al 100%. Ej. Para el aminoácido Treonina en la tabla de uso de codones en *Taxus x media*:

Codón	Número	/1000	Fracción	Adaptabilidad Relativa (%)
ACA	262	18.6	0.32	91
ACC	294	20.8	0.35	100
ACG	57	4.0	0.07	20
ACU	218	15.4	0.26	74

Abreviaturas

A: absorbancia

A_{260} : absorbancia a 260 nm. Longitud de onda a la que se cuantifica RNA y DNA

A_{280} : absorbancia a 280 nm. Longitud de onda a la que se cuantifican las proteínas

A_{260}/A_{280} : relación de pureza de ácidos nucleicos respecto a la cantidad de proteínas

Agarosa b.m.: agarosa grado biología molecular

BLAST: herramienta o programa de búsqueda de alineamiento local básico.

Basic Local Alignment Search Tool

cbp: cuanto baste para

cDNA: copy DNA, DNA copiado

cds: secuencia codificante, coding sequence

cTP: péptido de tránsito a cloroplasto, Chloroplast Transit Peptide

DNA: ácido desoxirribonucleico

DEPC: dietil pirocarbonato

DMSO: dimetil sulfóxido

IPTG: isopropil- β -D-tio-galactósido

LB: Luria-Bertani (medio de cultivo)

MIPS: mio-Inositol-1-fosfato sintasa.

MOPS: ácido 3-[N-mopolino] propanosulfónico

RNA_m: RNA mensajero

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEG: polietilenglicol

pI: punto isoeléctrico

RNA: ácido ribonucleico

SA-PMP: partículas paramagnéticas de estreptavidina

SOC: medio de cultivo super óptimo con represión de catabolitos (super optimal broth with [catabolite](#) repression).

SSC: solución de NaCl + Citrato de sodio (PolyATtract RNA_m Isolation System, Promega)

T_a : temperatura de alineamiento del oligonucleótido con la hebra molde de DNA

TE: tris-EDTA

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galctósido

Zmdxs1: gen de la enzima deoxi-xilulosa fosfato sintasa 1 de *Zea mays*

ZmDXS1: proteína de la enzima deoxi-xilulosa fosfato sintasa 1 de *Zea mays*

Referencias

- Bentebibel S, Moyano E, Palazón J, Cusidó RM, Bonfill M, Eibl R, Piñol MT. Effects of immobilization by entrapment in alginate and scale-up on Paclitaxel and Baccatin III production in cell suspension cultures of *Taxus baccata*. [Biotechnol Bioeng](#) 2005; 89:647.
- Besumbes O, Sauret-Güeto S, Phillips MA, Imperial S, Rodríguez-Concepción M. Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis* for the production of taxadiene, the first committed precursor of Taxol. *Biotechnol Bioeng* 2004; 88:168.
- Brinkmann U, Mattes RE, Buckel P. High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene* 1989; 85:109.
- Carretero-Paulet L, Cairó A, Botella-Pavía P, Besumbes O, Campos N, Boronat A, Rodríguez-Concepción M. Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Mol Biol* 2006; 62:683.
- Cusidó RM, Palazón J, Bonfill M, Navia-Osorio A, Morales C, Piñol MT. Improved Paclitaxel and Baccatin III production in suspension cultures of *Taxus media*. *Biotechnol Prog* 2002; 18:418.
- Escamilla EE. Selección de tejido para la clonación del transcrito de mio-inositol 1-fosfato sintasa. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 2006.
- Estévez JM, Cantero A, Reindl A, Reichler S, León P. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J Biol Chem* 2001; 276:22901.
- Frense D. Taxanes: perspectives for biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 73:1233.
- Hefner J, Ketchum R, Croteau R. Cloning and functional expression of a cDNA encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Taxus*

canadensis and assessment of the role of this prenyltransferase in cells induced for Taxol production. Arch Biochem Biophys 1998;360:62.

- Ivanov BN. Cooperation of photosystem I with the plastoquinone pool in oxygen reduction in higher plant chloroplasts. Biochemistry (Moscow) 2008; 73: 112.
- Kane, JF. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol 1995; 6:494.
- Kyte J, Doolittle RF, A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. J Mol Biol 1982; 157:105 .
- Kim BR, Kim SU, Chang YJ. Differential expression of three 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase genes in rice. Biotechnol Lett 2005; 27:997.
- Marupudi NI, Han JE, Li KW, Renard VM, Tyler BM, Brem H. Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. Expert Opin Drug Saf 2007; 6:609.
- Muñoz-Bertomeu J, Arrillaga I, Ros R, Segura J. Up regulation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender. Plant Physiol 2006; 142:890.
- Nims E, Dubois CP, Roberts SC, Walker EL. Expression profiling of genes involved in Paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. Metab Eng 2006; 8:385.
- Oksman-Caldentey KM, Inzé D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designed secondary metabolites. Trends Plant Sci 2004; 9:433.
- Pereira-Petrillo C, Portilho-Carneiro N, Corsetti-Purcino AA, Siqueira-Carvalho CH, Donizeti-Alves J, Almeida-Carneiro A. Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines. Pesq agropec bras 2008; 43:371.
- Pestchanker LJ, Roberts SC, Shuler ML. Kinetics of Taxol production and nutrient use in suspension cultures of *Taxus cuspidata* in shake flasks and a Wilson-type bioreactor. Enzyme Microb Technol 1996; 19:256.

- Sambrook, J. and Russell, D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. (2001).
- Sharp PM, Cowe E, Higgins DG, Shields DC, Wolfe KH, Wright F. Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within-species diversity. *Nucleic Acids Res* 1988;16:8207.
- Soto M, Sanjurjo M, González MT, Cruz D, Giral F. El Tejo Mexicano *Taxus globosa* Sch., Potencial de su aprovechamiento en Taxol. *Ciencia Ergo Sum* 2000; 7:277.
- Tabata H. Paclitaxel production by plant-cell-culture technology. *Adv. Biochem Eng Biotechnol* 2004; 87:1.
- Tholl D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr Opin Plant Biol* 2006; 9:297.
- Tranel PJ, Keegstra K. A novel, bipartite transit peptide targets OEP75 to the outer membrane of the chloroplastic envelope. [Plant Cell](#) 1996 ;8:2093.
- Voet, Voet. *Bioquímica*. Ediciones Omega, Barcelona 1992, pp 958-964.
- Walker K, Croteau R. Taxol biosynthetic genes. *Phytochemistry* 2001; 58:1.
- Walter MH, Hans J, Strack D. Two distantly related genes encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. *Plant J* 2002; 31:243.
- Wu J, Wang C, Mei X. Stimulation of Taxol production and excretion in *Taxus* spp cell cultures by rare earth chemical lanthanum. [J Biotechnol](#) 2001; 85:67.
- Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, Hara Y. Methyl jasmonate-induced overproduction of Paclitaxel and Baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nat Biotechnol* 1996; 14:1129.
- Zhong JJ. Plant cell culture for production of Paclitaxel and other taxanes. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2001; 72:1.

Referencias electrónicas:

- <http://www.21cecpharm.com/px/>
- Helsinki University, FastPCR.
<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/history.htm>
- http://www.biochem.oulu.fi/proteomics/ymp/window_cbigravy.html
- http://www.bio.vu.nl/geomicrob/protocols/DNA_isolation/pGem-T-manual.pdf
- National Cancer Institute, USA
(<http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/Paclitaxel> ; Posted: 10/05/2006 Updated: 11/26/2007)
- <http://www.expasy.ch/tools/protparam-doc.html>
- <http://www.mobot.org/gardeninghelp/PlantFinder>
- <http://www.molecularstation.com/protein/western-blot/>
- http://www.steadyhealth.com/encyclopedia/Isoelectric_point
- <http://www.yeastgenome.org/help/proteinProperties.html><http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/docs/UsersGuide/midas/hydrophob.html>