



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Aislamiento y caracterización de clones genómicos codificantes para proteínas de reserva del maíz (*Zea mays* L.)

Manuel Reina del Pozo



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOLOGIA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CLONES GENOMICOS
 CODIFICANTES PARA PROTEINAS DE RESERVA DEL MAIZ (Zea mays L.)

Memoria presentada por MANUEL REINA DEL POZO
para aspirar al grado de Doctor en Biología.
Trabajo realizado en el Departamento de
Biología Molecular y Agrobiología del Centro
de Investigación y Desarrollo del C.S.I.C.,
bajo la dirección del Dr. JAUME PALAU ALBET.

Visto bueno del :

Director : Dr. Jaume Palau Albet



Ponente : Dr. Senén Vilaró Coma



Autor : Manuel Reina del Pozo



BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700183131

AGRADECIMIENTOS

Una vez finalizado este trabajo he de reconocer la participación en él de mucha gente sin la cual probablemente no se hubiera llevado a cabo, por ello quiero expresarles mi agradecimiento.

He de reconocer la estima que me merece el Dr. Jaume Palau, Profesor de Investigación del C.S.I.C. por acogerme en su grupo de investigación, por su dirección y estímulo así como por la corrección del presente trabajo.

Quiero agradecer asimismo al Dr. Albert Boronat por su ayuda en el inicio de este trabajo, así como por sus comentarios y estímulo, y al Dr. Natale DiFonzo, del "Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura" de Bérgamo, Italia, por su apoyo, y su intensa colaboración científica.

Al Dr. Senén Vilaró, de la Unidad de Biología Celular (BQF), por ser el ponente de esta Tesis, así como por ser un inestimable compañero.

A la Dr. Mercé Durfort por aceptarme en su unidad, permitiendo, en un ambiente de tranquilidad y estudio, que pudiera llevar a cabo la redacción de esta memoria.

A todos los compañeros de los Departamentos de Biología Molecular y Agrobiología y de Genética Molecular del C.I.D., tantos que sería muy largo citarlos a todos, con los que tantos ratos buenos y malos he pasado, y a los de la Unidad de Biología Celular (BQF) que me han apoyado en la fase final de la redacción.

Finalmente a mis padres, Diego y María, por su apoyo incondicional, y muy especialmente a Begoña por todo aquello que, aparte del trabajo científico, ha hecho posible este trabajo.

A Begoña, por tantísimas cosas...

0. INDICES

0. INDICES

1. INTRODUCCION	1
1.1 LA FORMACION DE LA SEMILLA EN EL MAIZ	2
1.2 EL ENDOSPERMO, TEJIDO DE RESERVA	5
1.3 PROTEINAS DEL ENDOSPERMO: PROTEINAS DE RESERVA	7
1.4 LAS PROTEINAS DE RESERVA EN MONOCOTILEDONEAS : PROLAMINAS	11
1.4.1 Prolaminas de Triticeae	11
1.4.1.1 Prolaminas ricas en azufre	13
1.4.1.2 Prolaminas pobres en azufre	17
1.4.1.3 Prolaminas de alto peso molecular	19
1.4.1.4 Relaciones de las prolaminas de Triticeae con otras proteínas	20
1.4.1.5 Organización genómica de las prolaminas del trigo	21
1.4.1.6 Aspectos de la organización estructural de los genes de prolaminas	24
1.4.2 Prolaminas del maíz	27
1.4.2.1 Zeinas clásicas	28
1.4.2.2 Glutelinas	43
1.4.2.3 Regulación de la expresión de los genes de proteínas de reserva	48
1.4.2.3.1 Regulación transcripcional	49
1.4.2.3.2 Regulación traduccional	51
1.4.2.3.3 Señales de poliadenilación	54
1.4.2.3.4 Regulación genética	55
1.4.2.4 Síntesis y deposición de las proteínas de reserva	59
1.5 PRELIMINARES	63
1.6 OBJETIVOS	69
2. MATERIALES Y METODOS	71
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	71
2.1.1 Maíz	71
2.1.2 Cepas bacterianas, vectores de clonaje	71
2.2 PREPARACION DEL MATERIAL. NORMAS DE ESTERILIDAD	78
2.2.1 Material de vidrio y plástico	78
2.2.2 Reactivos empleados	78
2.2.3 Enzimas y Kits	80
2.2.4 Soluciones stock más usuales	82

2.3 AISLAMIENTO DE DNA Y RNA	86
2.3.1 Purificación de DNA genómico	86
2.3.2 Purificación de RNA total	89
2.3.3. Purificación de DNA plasmídico	91
2.3.3.1 Purificación de DNA plasmídico en gran escala : amplificaciones	92
2.3.3.2 Purificación de DNA plasmídico en pequeña escala : minipreparaciones	96
2.3.3.3 Preparación de la forma replicativa (RF) de M13	98
2.3.4 Purificación de DNA de bacteriófagos	99
2.3.4.1 Purificación a pequeña escala de DNA de lambda: minipreparaciones	100
2.3.4.2 Purificación a gran escala de DNA de lambda	103
2.4 DIGESTION DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	108
2.4.1 Digestión de DNA con un solo enzima de restricción.	109
2.4.2 Digestión de DNA con más de un enzima de restricción.	109
2.4.3 Construcción de mapas de restricción	115
2.4.4 Digestión de DNA genómico con enzimas de restricción	115
2.5 ELECTROFORESIS DE DNA	116
2.5.1 Geles de agarosa	117
2.5.1.1 Geles de agarosa nativos	117
2.5.1.2 Geles de agarosa alcalinos	120
2.5.2 Geles de acrilamida	122
2.5.3 Geles de secuencia de DNA	123
2.6 ELECTROFORESIS DE RNA	129
2.6.1 Geles de agarosa- formaldehído	129
2.7 PREPARACION DE DNA A PARTIR DE GELES	131
2.7.1 Electroelución de fragmentos de DNA	131
2.7.1.1 Geles de acrilamida	131
2.7.1.2 Geles de agarosa	132
2.7.2 Método del papel DEAE celulosa	134
2.7.3 Purificación a partir de geles de agarosa LMP	136
2.7.4 Elución por columna	137
2.8 TRANSFERENCIA DE DNA Y RNA A FILTROS DE NITROCELULOSA O NYLON	139
2.8.1 Transferencia de fragmentos de restricción de DNA	139
2.8.1.1 Transferencia rápida	139
2.8.1.2 Transferencia lenta	140
2.8.2 Transferencia de DNA a nylon : transferencia alcalina	143
2.8.3 Transferencia de RNA a nylon ("Northern blot")	143

2.8.4 "Dot blot" de DNA	145
2.8.5 Réplica de placas de bacteriófago	145
2.8.6 Réplica de colonias de bacterias	147
2.9 MARCAJE RADIOACTIVO DE DNA	149
2.9.1 Marcaje de DNA por "nick translation"	149
2.9.2 Marcaje de DNA por "random primer"	154
2.9.3 Marcaje terminal de DNA	156
2.9.3.1 Marcaje de extremos 5' con $\alpha^{32}\text{P}$ ATP y polinucleótido kinasa	157
2.9.3.2 Marcaje en 3' con $\alpha^{32}\text{P}$ dNTP y DNA polimerasa I	160
2.9.3.3 Marcaje en 3' con terminal transferasa y $\alpha^{32}\text{P}$ dATP	162
2.10 HIBRIDACION DE SONDAS DNA	164
2.10.1 Hibridaciones de DNA sobre fragmentos de restricción	168
2.10.2 Hibridaciones de DNA sobre DNA genómico	169
2.10.3 Hibridaciones de DNA sobre colonias	171
2.10.4 Hibridaciones de DNA sobre placas de bacteriófago	172
2.10.5 Hibridaciones de DNA sobre filtros de RNA ("Northern")	174
2.11 PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACION	175
2.11.1 Método del CaCl_2	175
2.11.2 Método del $\text{RbCl} / \text{CaCl}_2$	176
2.11.3 Transformación	179
2.12 CLONAJE EN PLASMIDOS Y BACTERIOFAGOS	181
2.12.1 Preparación del vector	187
2.12.2 Preparación del DNA	187
2.12.3 Ligación	188
2.12.4 Clonaje en el bacteriófago lambda	189
2.12.4.1 Preparación de los extractos de empaquetamiento	190
2.12.4.1.1 Lisado por congelación descongelación de BHB2688	191
2.12.4.1.2 Lisado por sonicación de BHB2690	193
2.12.4.2 Ligación y encapsidamiento 'in vitro'	193
2.12.4.2.1 Ligación	193
2.12.4.2.2 Encapsidamiento 'in vitro'	195
2.13 METODO DE SECUENCIACION DE SANGER	197
2.13.1 Preparación del molde : DNA de cadena sencilla de M13	197
2.13.2 Reacciones de secuencia	199

3. RESULTADOS	203
3.1 BUSQUEDA DE CLONES GENOMICOS HOMOLOGOS A LAS DISTINTAS SONDAS DISPONIBLES	203
3.1.1 Primera búsqueda : 200000 u.f.p. (0.5 x genoma)	204
3.1.1.1 Búsqueda	205
3.1.1.2 Caracterización de los aislamientos	208
3.1.1.3 Caracterización aislamientos #3 y #6	210
3.1.2 Segunda búsqueda : 470000 u.f.p. (1.2 x genoma)	213
3.1.3 Tercera búsqueda : 360000 u.f.p. (0.9 x genoma)	214
3.1.3.1 Búsqueda	214
3.1.3.2 Caracterización aislamientos #261 a #304	214
3.1.3.3 Determinación de la secuencia nucleotídica del inserto p268C.	230
3.1.4 Cuarta búsqueda : 300000 u.f.p. (0.75 x genoma)	238
3.1.5 Quinta búsqueda : 300000 u.f.p. (0.75 x genoma)	238
3.2 ESTUDIO DE LA ORGANIZACION GENOMICA DE LOS GENES CORRESPONDIENTES A PME119 Y PME177	242
3.2.1 Preparación de DNA genómico	243
3.2.2 "Southern" genómico	243
3.3 CONTROL DE CALIDAD DE LA GENOTECA EMPLEADA	247
3.3.1 Preparación de DNA de la genoteca	249
3.3.2 "Southern"	250
3.3.3 Análisis de los resultados	250
3.4 PREPARACION DE UNA GENOTECA ENRIQUECIDA EN UN FRAGMENTO DE RESTRICCION GENOMICO	254
3.4.1 Fundamento	254
3.4.2 Preparación del fragmento de restricción	260
3.4.3 Primera aproximación : clonaje en plásmido	261
3.4.3.1 Diseño del clonaje	262
3.4.3.2 Construcción de la genoteca en el plásmido pUC18	262
3.4.4 Segunda aproximación : clonaje en bacteriófago	264
3.4.4.1 Diseño del clonaje	265
3.4.4.2 Preparación de DNA del vector	265
3.4.4.3 Construcción de la genoteca enriquecida en lambda NM1150	266
3.5 BUSQUEDA DEL FRAGMENTO GENOMICO HOMOLOGO AL CLON CDNA PME177	270
3.5.1 Búsqueda	270
3.5.2 Caracterización de los clones positivos	270
3.5.3 Secuencia del inserto del plásmido pZ3	274
3.6 DETERMINACION DEL NUMERO DE COPIAS DE LOS GENES CORRESPONDIENTES A PME119 Y PME177	280
3.6.1 Fundamento	280
3.6.2 Reconstrucción génica	280

3.7 LOCALIZACION CROMOSOMICA DE LOS GENES CORRESPONDIENTES A PME119 Y PME177	283
3.7.1 Fundamento	283
3.7.2 Preparación del DNA genómico y "Southern"	286
3.8 ESTUDIO DE LAS SECUENCIAS	292
3.8.1 Secuencia genómica de Zc2	292
3.8.2 Secuencia genómica de Zc1	296
3.8.3 Comparación de las secuencias de los genes Zc1 y Zc2	296
3.8.5 Comparación de las secuencias de las proteínas y los genes Zc1 y Zc2 con otras proteínas de reserva descritas en plantas	311
4. DISCUSION	317
5. CONCLUSIONES	353
6. BIBLIOGRAFIA	357

INDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1.1</u> : Esquema de la hipótesis de generación de los genes de prolaminas de las Triticeae	22
<u>Figura 1.2</u> : Modelo de empaquetamiento de zeínas-I en el interior del cuerpo proteico	32
<u>Figura 1.3</u> : Localización de los loci génicos conocidos de las proteínas de reserva en el maíz	37
<u>Figura 1.4</u> : Estructuras en la región 3' no traducida de algunos clones de zeínas	56
<u>Figura 1.5</u> : Proyecto de Biología Molecular	64
<u>Figura 1.6</u> : Construcción de una genoteca de DNA de maíz de la variedad W64A de 20 días después de la polinización en el vector lambda Charon 35	66
<u>Figura 2.1</u> : Mapa de restricción del bacteriófago lambda cI857	74
<u>Figura 2.2</u> : Mapa de restricción del bacteriófago lambda Charon 35	76
<u>Figura 2.3</u> : Mapa de restricción del bacteriófago lambda NM1150	76
<u>Figura 2.4</u> : Transferencia rápida de DNA a papel de nitrocelulosa	142
<u>Figura 2.5</u> : Transferencia lenta de DNA a papel de nitrocelulosa	142
<u>Figura 2.6</u> : Bacteriófago M13mp18	182
<u>Figura 2.7</u> : Plásmido pUC19	184
<u>Figura 3.1</u> : Esquema del procedimiento de aislamiento de clones genómicos de una genoteca empenado una sonda homóloga	206
<u>Figura 3.2</u> : Aislamiento lambda ZG-1	208
<u>Figura 3.3</u> : Aislamiento #6	211
<u>Figura 3.4</u> : Aislamiento #262	216
<u>Figura 3.5</u> : Aislamiento #264	216
<u>Figura 3.6</u> : Aislamiento #268	218
<u>Figura 3.7</u> : Aislamiento #269	218
<u>Figura 3.8</u> : Aislamiento #289	220
<u>Figura 3.9</u> : Aislamiento #302	220
<u>Figura 3.10</u> : Localización de los fragmentos de restricción EcoRI+HindIII de los diferentes aislamientos genómicos que contienen secuencias del vector lambda Charon 35	222
<u>Figura 3.11</u> : Alineamiento de los insertos de los aislamientos de las clases 262, 264, 269, 270, 271 y 287	224
<u>Figura 3.12</u> : Alineamiento de los insertos de los aislamientos de las clases 268, 289 y 302	226
<u>Figura 3.13</u> : Alineamiento de los insertos de los aislamientos de las clases 268, 289, 302 y del clon genómico lambda ZG-1	228
<u>Figura 3.14</u> : Mapa de restricción del inserto del plásmido p268C	230

<u>Figura 3.15</u> : Estrategia de secuencia del inserto del plásmido p268C	232
<u>Figura 3.16</u> : Secuencia nucleotídica del inserto del plásmido p268C	234
<u>Figura 3.17</u> : Comparación de la secuencia de nucleótidos de los clones cDNA pME119 y pME177	237
<u>Figura 3.18</u> : Determinación de los fragmentos de restricción HindIII-EcoRI que contienen el gen Zc2	240
<u>Figura 3.19</u> : Fragmentos de restricción genómicos que comprenden los genes Zc1 y Zc2	244
<u>Figura 3.20</u> : Esquema del método de Phillips y col. (1985) para determinar la calidad de la genoteca	248
<u>Figura 3.21</u> : Experimento de control del estado de la genoteca de DNA de endospermo de maíz de W64 A en lambda Charon 35	252
<u>Figura 3.22</u> : Estimación del porcentaje de genoma de maíz comprendido en cada clase de tamaños después de restricción HindIII	258
<u>Figura 3.23</u> : Estrategia de construcción de una genoteca enriquecida en plásmido pUC18	262
<u>Figura 3.24</u> : Estrategia de construcción de una genoteca enriquecida en lambda NM1150	267
<u>Figura 3.25</u> : Construcción de una genoteca de maíz W64A enriquecida en los fragmentos que contienen el gen Zc2 en la diana HindIII del vector lambda NM1150	268
<u>Figura 3.26</u> : Caracterización de los aislamientos Z2, Z3, Z9, Z12 y Z14	271
<u>Figura 3.27</u> : Mapa de restricción del inserto del plásmido pZ3	272
<u>Figura 3.28</u> : Estrategia de secuencia del inserto del plásmido pZ3	274
<u>Figura 3.29</u> : Secuencia del inserto del plásmido pZ3	276
<u>Figura 3.30</u> : Reconstrucción genómica de los genes correspondientes a los clones cDNA pME119 y pME177	282
<u>Figura 3.31</u> : Localización cromosómica de los genes Zc1 y Zc2	288
<u>Figura 3.32</u> : Alineación de las secuencias conocidas de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2)	295
<u>Figura 3.33</u> : Comparación de las secuencias flanqueantes 5' de los genes Zc1 y Zc2	298
<u>Figura 3.34</u> : Comparación de las secuencias flanqueantes 3' de los genes Zc1 y Zc2	300
<u>Figura 3.35</u> : Perfiles de riqueza en nucleótidos A+T de las secuencias de los genes Zc1, Zc2, Zd1, Zd2 y Zb	302
<u>Figura 3.36</u> : Localización de los elementos de secuencia posiblemente implicados en la regulación de la expresión de los genes Zc1 y Zc2	306
<u>Figura 3.37</u> : Dendrograma de clasificación de las proteínas de reserva conocidas del maíz, así como otras de cebada, centeno y trigo	315

<u>Figura 4.1</u> : Estructura comparativa de las gliadinas, B-hordeínas, secalinas y glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) y zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1)	320
<u>Figura 4.2</u> : Posición de los elementos reguladores potenciales en zeínas	343
<u>Figura 4.3</u> : Nomenclatura de las zeínas	350
<u>Figura 4.4</u> : Electroforesis en poliacrilamida de las proteínas contenidas en los cuerpos proteicos de endospermo de maíz purificados por HPLC	350
<u>Figura 4.5</u> : Péptido señal de las diferentes clases de zeínas	351

INDICE DE TABLAS

<u>Tabla 1.1</u> : Composición parcial de aminoácidos de los grupos mayores de prolaminas de Triticeae	12
<u>Tabla 1.2</u> : Grupos de prolaminas en trigo, centeno y cebada	13
<u>Tabla 1.3</u> : Composición aminoacídica de distintas fracciones proteicas extraídas de endospermo de maíz de la variedad E10	30
<u>Tabla 1.4</u> : Secuencias de inicio de traducción y de zona codificante de los genes de zeínas	52
<u>Tabla 1.5</u> : Señal consenso de poliadenilación en plantas	55
<u>Tabla 1.6</u> : Propiedades de los alelos mutantes de los loci que controlan la deposición de los componentes de las zeínas	58
 <u>Tabla 2.1</u> : Cepas de <i>E. coli</i> empleadas	 72
<u>Tabla 2.2</u> : Vectores plasmídicos y bacteriófagos	74
<u>Tabla 2.3</u> : Densidades de diferentes formas de DNA y RNA en gradientes de cloruro de cesio	92
<u>Tabla 2.4</u> : Condiciones de reacción que inducen actividad "star" en algunos enzimas	112
<u>Tabla 2.5</u> : Condiciones de reacción para los diferentes enzimas de restricción	113
<u>Tabla 2.6</u> : Listado de enzimas sensibles a metilación en A o C con sus dianas	114
<u>Tabla 2.7</u> : Temperaturas de fusión en función del % (C+G) y de las concentraciones de sal	167
<u>Tabla 2.8</u> : Condiciones generales de hibridación	167
<u>Tabla 2.9</u> : Dianas de restricción únicas en el polylinker de pUC18-19 y M13mp18-19. Dianas compatibles.	186
 <u>Tabla 3.1</u> : Características de los plásmidos empleados como sondas en la búsqueda de clones genómicos	 203
<u>Tabla 3.2</u> : Aislamientos en la primera búsqueda	206
<u>Tabla 3.3</u> : Clasificación de los aislamientos positivos a la sonda pME119	222
<u>Tabla 3.4</u> : Lista de variedades de maíz y mutantes cedidas por el Dr. Natale DiFonzo	285
<u>Tabla 3.5</u> : Clones genómicos y cDNA codificantes para proteínas de reserva aislados en el maíz	314

INDICE DE ABREVIATURAS EMPLEADAS

ATP	adenosinatrifosfato
bisacrilamida	N,N' metilén-bisacrilamida
bp	par de bases
BSA	albúmina sérica bovina
CAT	cloramfenicol-acetil-transferasa
c.p.m.	cuentas por minuto
CTP	citiosinatrifosfato
d.d.p.	días después de la polinización
DEAE	dietilaminoetil
DEPC	dietilpirocarbonato
ddNTP	dideoxinucleótidotrifosfato
DNasa	deoxiribonucleasa
dNTP	deoxinucleótidotrifosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EGTA	ácido etileno-glicol-bis-(β -amino-etil éter) N,N,N',N' tetra-acético
g.a.v.	"gravity acceleration velocity"
GTP	guaniosinatrifosfato
GUS	β -glucuronidasa
HEPES	ácido N-2 hidroxietilpiperidina-N'-2 etanosulfónico
IPTG	isopropil- β -D-galactopiranosido
kbp	kilobases (1000 nucleótidos)
kD	kiloDalton
MES	ácido (2[N-morfolino] etanosulfónico)
MOPS	ácido (3[N-morfolino] etanosulfónico)
PEG	polietilenglicol
PIPES	ácido 1,4 piperazin-di-etanosulfónico
POPOP	2,2' p-fenilen-bis-(5-fenil oxazol)
PPO	2,5-difenil-1,3 oxazol
RFLP	"restriction fragment length polimorphism"
RNasa	ribonucleasa
r.p.m.	revoluciones por minuto
SDS	Sodiododecilsulfato
TEMED	N,N,N',N' tetrametiletilenediamida
Tris	tris (hidroximetil)-aminometano
u.f.p.	unidades formadoras de placa
UTP	uridinatrifosfato
XGal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

1. INTRODUCCION

Por razones históricas, el estudio a nivel molecular de los sistemas vegetales se encuentra en la actualidad considerablemente retrasado si se compara con los sistemas animales y bacterianos. Como referencia cabe citar que pocos años atrás en una recopilación de secuencias nucleotídicas (EMBL y GenBank) (Messing, 1984) el espacio total dedicado a los genes de todas las especies de plantas superiores era comparable al de muchas especies animales individuales y, desde luego, muy inferior al dedicado a organismos bien conocidos tales como el ratón (Mus musculus) o la mosca del vinagre (gr. Drosophila). En la actualidad, la cantidad de secuencias de DNA de plantas en los bancos de secuencias crece considerablemente. La pujanza de la Biología Molecular de las plantas era destacada por Fink (Fink, 1989) en un artículo publicado en un número monográfico de la revista "Cell" (Enero, 1989) dedicado a este tema. Como claros indicios de una importancia cada vez mayor este autor hace referencia a la existencia de un "International Congress of Plant Molecular Biology", de una revista especializada ("Plant Molecular Biology"), una 'Gordon Conference' ("Plant Molecular Biology Gordon Conference") y un ICN/UCLA "Plant Molecular Biology Meeting". La causa de este desarrollo hay que buscarla en el gran interés económico subyacente a la adaptación y mejora de especies vegetales de gran valor económico tales como por ejemplo muchos cereales y leguminosas. Un dato que refleja la importancia económica de estos cultivos es la estimación de que las proteínas de reserva de los cereales contribuyen con el 55 % al total de la ingesta humana mundial (Kreis et al., 1985a).

Hay una larga lista de características valiosas para el mejorador de especies vegetales (como la resistencia a enfermedades y herbicidas, el aumento de la capacidad fotosintética y de fijación de nitrógeno, la mejora de las características nutricionales, etc...) que pueden incorporarse a las distintas especies con las nuevas tecnologías hoy día disponibles. Para ello, sin embargo, es necesario conocer la

estructura y regulación de los genes implicados y de los sistemas metabólicos relacionados y este conocimiento es hoy día escaso en la mayor parte de los modelos biológicos. Hay, sin embargo, una excepción, las proteínas de reserva. Sobre la biología de las proteínas de reserva se han realizado importantes avances en los últimos años.

Aunque el rendimiento de los cultivos de cereales por hectárea no ha cesado de aumentar desde principios de siglo con la aplicación de nuevas variedades más productivas y de tecnología agropecuaria avanzada, no se ha conseguido mejorar la calidad nutricional de éstos. La calidad nutricional del grano viene determinada por la idoneidad de su composición en carbohidratos y en aminoácidos en relación con el metabolismo del animal que lo incorpora en su ingesta. Así, por ejemplo, el maíz es un cereal rico en carbohidratos y en proteínas. Sin embargo, la composición de aminoácidos del grano de maíz presenta unos niveles muy bajos de triptófano y de lisina, dos aminoácidos esenciales. Cuando este cereal se emplea en la alimentación del ganado estabulado hay que suplementarlo con soja, pero tanto el maíz como la soja presentan niveles bajos de metionina, y es necesario suplementarlos con este aminoácido. El uso de éste, producido por fermentación, encarece notablemente la alimentación del ganado. En el grano de maíz apenas hay aminoácidos libres, y su abundancia viene determinada por la composición de las proteínas mayoritarias, las denominadas proteínas de reserva. La calidad nutricional del grano queda pues determinada por el control de la expresión de los genes que codifican estas proteínas mayoritarias y no por los genes que afectan a las rutas de síntesis de los aminoácidos.

1.1 LA FORMACION DE LA SEMILLA EN EL MAIZ

Una de las características del maíz que le han llevado a ser un modelo biológico bien conocido genéticamente es la posibilidad

de analizar, con relativamente pocos individuos, una gran cantidad de cruces genéticos, gracias a la disposición en la espiga madura de cientos de granos.

En el maíz los órganos reproductores masculinos y femeninos se localizan sobre el mismo individuo, permitiendo tanto procesos de autofecundación como de fecundación cruzada. Los órganos reproductores masculinos, las anteras, se localizan en la parte apical de la planta. Los órganos femeninos, agrupados en espigas, se desarrollan en las partes bajas del tallo. En cada espiga inmadura se desarrollan centenares de ovarios. Las flores en la espiga se ordenan de la misma forma que los granos en la mazorca. De este modo cada mazorca se podría comparar con una placa de Petri que contuviera centenares de colonias, cada una de ellas con un carácter genético distinto. Como cada planta puede presentar 3 ó 4 espigas, y en cada una de ellas hay centenares de granos, cada individuo puede producir varios miles de descendientes. Así pues, pueden encontrarse acontecimientos genéticos raros (frecuencia de 10^{-7}) dentro de una generación (tres meses). Además, cuando la semilla madura y se deseca se puede conservar viable durante años. De este modo es posible en el maíz realizar experimentos que en modelos animales no serían viables, debido a factores tales como el tiempo de generación y número de descendientes por individuo. Asimismo, por su posición filogenética, el maíz es un modelo más adecuado para el estudio de sistemas eucariotas superiores que, por ejemplo, los hongos.

Las descripciones botánicas del desarrollo del grano de maíz son numerosas (True, 1893; Sargent, 1900; Poindexter, 1903; Miller, 1919; Weatherwax, 1919; 1923; 1930), así como descripciones completas de los aspectos morfológicos del endospermo y de su desarrollo (Lampe, 1931; Randolph, 1936; Brink y Cooper, 1947a,b; Kiesselbach, 1949; Duvick, 1951; 1955; 1963).

El grano en las plantas es el único órgano en el que

conviven 3 tejidos con distintas dotaciones genéticas. Esto es consecuencia del característico proceso de fecundación.

En un ovario en maduración se diferencia una célula, progenitora del saco embrionario, que sufrirá un proceso de meiosis. De las cuatro esporas haploides resultantes solamente una sobrevive. A partir de las divisiones de ésta se forma el metagametófito, formado por células haploides poco diferenciadas entre las cuales destacan dos. La primera es el óvulo, situada en el punto por donde penetrará el tubo polínico, y la segunda es una célula grande con dos núcleos haploides, la denominada célula central. En las anteras se forman las esporas haploides en un proceso de meiosis. Células derivadas de las esporas forman el grano de polen en el que se encuentran dos pequeñas células de cromatina muy condensada, las células espermáticas, y una célula mayor, la célula del tubo polínico, con un núcleo activo.

Cuando un grano de polen cae sobre el estigma de un ovario maduro se desarrolla el tubo polínico que arrastra al interior del ovario a las dos células espermáticas. Una de las células espermáticas se fusiona con el óvulo, los núcleos se funden y se forma una célula diploide que dará lugar al embrión. La segunda célula espermática se fusiona con la célula central, binucleada. En ésta se produce primero la fusión de los dos núcleos haploides originales y después la fusión con el núcleo de la célula espermática. Así se forma una célula triploide que dará lugar al endospermo.

Así, en el grano coincide un tejido diploide procedente de la madre, el pericarpio, con un tejido diploide mezcla de los genomas materno y paterno, el embrión, y un tejido triploide con dos dotaciones cromosómicas maternas y una paterna, el endospermo.

1.2 EL ENDOSPERMO, TEJIDO DE RESERVA

Se ha considerado que todas las células de las plantas presentan actividad secretora debido a que todas ellas sintetizan y descargan las proteínas y carbohidratos que forman la pared celular (Adeli y Altosaar, 1984). Sin embargo las células del endospermo en la semilla producen además durante la embriogénesis una gran cantidad de proteínas especializadas para el propósito específico del almacenamiento (Altschull et al., 1966; Boulter y Derbyshire, 1978).

A lo largo de la maduración de la semilla es en el endospermo donde tiene lugar la mayor parte de la intensa labor biosintética que le permitirá acumular una gran cantidad de azúcares y aminoácidos. Durante la germinación de la semilla los carbohidratos y proteínas almacenados en este tejido son hidrolizados liberándose los azúcares y aminoácidos que harán posible las primeras etapas del desarrollo de la planta joven.

El endospermo del maíz (para una revisión sobre su desarrollo ver Kowles y Phillips, 1988) se describe generalmente como un tejido triploide aunque en realidad esta característica cambia rápidamente en la mayor parte del tejido después de la polinización. De 2 a 4 h después de la polinización se inician las divisiones mitóticas del núcleo triploide que conducirán, ya a los 2 días después de la polinización (d.d.p.) a la formación de un tejido sincitial. Las paredes celulares comienzan a aparecer a los 3 d.d.p. y alrededor del día 4-5 d.d.p. el tejido es completamente celular y uninucleado. La cariocinesis y citocinesis cesan en el interior del tejido alrededor del día 12, aunque se mantienen en la periferia del tejido. El tejido periférico se comporta como un meristemo, suministrando células nuevas hacia la masa central del endospermo. El crecimiento de las células centrales, así como de sus núcleos es excepcionalmente alto. Así, en la línea híbrida AI88 se han

medido aumentos de 34 veces en el volumen nuclear de las células centrales entre los días 4 y 18 d.d.p.

En una serie de trabajos (Swift, 1950, Punnett, 1953, Tschermak-Woess and Ensenberg-Kunz, 1965) se describen incrementos importantes del contenido de DNA en el núcleo de las células centrales del endospermo desde 6 a 384 veces la dotación haploide. Phillips y Kowles (Phillips et al., 1983; 1985; Kowles y Phillips, 1985) han descrito el patrón citogenético del crecimiento del endospermo del maíz, detallando los cambios que tienen lugar en el contenido del DNA nuclear. Se produce un incremento considerable de la cantidad de DNA nuclear alrededor del día 10 a 12 (d.d.p.) después del cese de la actividad mitótica. Los niveles de ploidia conseguidos por las diferentes células de la región central del endospermo varían, especialmente respecto a las periféricas. Sarkar y Coe (1971) proponen que, para un desarrollo correcto, el endospermo precisa ser triploide o múltiplo de ése valor, con un balance equilibrado de 2:1 materno:paterno.

La amplificación del DNA genómico en el endospermo de maíz podía deberse bien a amplificación preferencial de ciertas regiones del genoma o a duplicaciones completas de éste. Phillips et al., 1985; Kowles et al., 1986) empleando como sondas algunos de los genes conocidos del maíz no pudieron detectar procesos de amplificación diferencial. Roninson (1983), empleando una técnica que permite detectar si un fragmento de DNA genómico se encuentra repetido más de 50 veces, no pudo descubrir amplificación diferencial del DNA en el endospermo. Empleando citofluorometría de fluorescencia y como marcadores dos fluorocromos que presentan afinidad diferencial por la heterocromatina (rica en AT) o por la eucromatina (rica GC) se pudo determinar (Kowles y Phillips, 1988) que tanto la heterocromatina como la eucromatina se amplifican por igual. De los resultados anteriores se puede concluir que si se produce algún proceso de amplificación

diferencial, es muy restringido y/o se da a muy pequeña escala.

La función biológica de esta amplificación del DNA en el endospermo es desconocida. Una posibilidad sería la de obtener DNA de almacenamiento en el endospermo para, una vez degradado, suministrar nucleósidos (o nucleótidos) al embrión. El aumento en la cantidad de DNA en las células del endospermo tiene un máximo alrededor del día 18 a 20 d.d.p. A partir de ese día decrece, coincidiendo con un período de crecimiento intenso del embrión (Kowles y Phillips, 1985; Phillips et al., 1985). Una segunda posibilidad sería la de permitir una intensa transcripción que hiciera posible mantener unos procesos biosintéticos muy activos. Hay numerosos ejemplos de relación estrecha entre la amplificación del DNA y la síntesis de sustancias en el endospermo en desarrollo. Hay gran número de referencias que describen un incremento espectacular de actividades en el endospermo entre 10 y 12 d.d.p., coincidiendo con la amplificación del DNA. Este incremento se ha descrito para el peso seco (Brink y Cooper, 1947b; Groszmann and Sprague, 1948), peso fresco (Hadzi-Taskovic Sukalovic, 1986), aparición de gránulos de proteínas (Duvick, 1961; 1963; Khoo y Wolf, 1970), proteínas totales (Ingle et al., 1965; DiFonzo et al., 1977; 1979), mRNA de zeínas (Marks et al., 1983) y acumulación de zeínas (Wilson, 1978; Soave et al., 1981; Lee and Tsai, 1984). Hay numerosas actividades enzimáticas cuya actividad se incrementa notablemente alrededor de 12 d.d.p. (Tsai y Nelson, 1968; Tsai et al., 1970; Burr y Nelson, 1973; Baba et al., 1982). Inclusive la efectividad del cultivo de tejido de endospermo es superior a los 12 d.d.p. Ciertamente el período de 10 a 12 d.d.p. es un período crítico, seguido por una prolífica actividad de desarrollo del endospermo en el maíz.

1.3 PROTEINAS DEL ENDOSPERMO : PROTEINAS DE RESERVA

La primera clasificación que se realizó de las proteínas de

reserva de las semillas se basó en criterios de solubilidad, empleando la técnica de extracción secuencial descrita por Osborne y Mendel (1914) y modificada posteriormente por Landry y Moureaux (1980). En esta clasificación se diferencian cuatro clases de proteínas en la semilla :

1. albúminas : solubles en agua.
2. globulinas : solubles en soluciones salinas.
3. prolaminas : solubles en soluciones alcohólicas.
4. glutelinas : solubles en soluciones alcalinas o ácidas diluidas o en soluciones salinas o alcohólicas que contengan un agente reductor.

En cereales los diferentes grupos de proteínas parecen cumplir diferentes funciones :

- a. función metabólica. El papel metabólico es la función principal de muchas albúminas y globulinas. En algunos casos un enzima concreto puede llegar a presentarse en cantidades elevadas constituyendo una fracción importante del nitrógeno reducido presente en la semilla. La ureasa de la leguminosa Canavalia ensiformis es un ejemplo característico. En el endospermo del maíz la sacarosa sintetasa llega a representar el 2.8 % de la fracción de globulinas (Su y Preiss, 1978).
- b. función estructural. Muchas proteínas presentes en el endospermo son estructurales, por ejemplo las proteínas ribosomales, ciertas proteínas del retículo endoplásmico y las glicoproteínas de las paredes celulares. Estas proteínas no están bien caracterizadas y no se conoce ningún componente que se encuentre en cantidades importantes en la semilla. Muchos péptidos estructurales se extraen en la fracción de glutelinas y contribuyen a la multiplicidad de bandas separadas por electroforesis en geles de acrilamida-

SDS (Wilson et al., 1981a;1981b).

c. función de almacenamiento. Ciertas proteínas de la semilla parecen tener como única función la de formar la reserva de nitrógeno, carbono y generalmente azufre durante el desarrollo de la semilla, suministrando estos nutrientes al embrión en germinación. Se encuentran en cantidades importantes que pueden llegar a ser hasta del 10 % del peso seco de la semilla en cereales y del 25 al 35 % en el caso de las leguminosas. Las proteínas de reserva han sido estudiadas en los cereales y leguminosas que son importantes desde el punto de vista agrícola. En todos los cereales las proteínas de reserva son de tipo prolamina y glutelina con la curiosa excepción de la avena (Avena sativa) en que son globulinas. En las leguminosas y otras dicotiledoneas las proteínas de reserva mayoritarias son de tipo globulina.

Las proteínas de reserva se han definido (Higgins, 1984) como el conjunto de proteínas proteína que se acumulan en cantidades significativas en el proceso de maduración de la semilla y que en la germinación es hidrolizada con rapidez para suministrar el nitrógeno reducido necesario en las primeras etapas del desarrollo de la planta joven. Así pues las proteínas de reserva de las semillas desempeñan una función trófica (Spencer, 1984). A pesar de que las proteínas de reserva típicas no tienen ninguna otra función, existen algunas proteínas que se acumulan en las semillas en cantidades importantes y que tienen funciones enzimáticas durante la maduración (Su y Preiss, 1978) o de protección, al actuar como tóxicos en los animales que las ingieren (Larkins, 1981).

La composición en aminoácidos de las proteínas de reserva mayoritarias está determinada por su función de reserva de nitrógeno (Higgins, 1984). Así, están enriquecidas en aminoácidos como asparragina, glutamina y arginina o prolina. Asimismo, los

niveles de proteínas de reserva están mucho más afectados por la cantidad de nitrógeno reducido disponible por la planta que ningún otro grupo de proteínas en la semilla (Abrol et al., 1971; Derbyshire et al., 1976; Larkins, 1981; Kirkman et al., 1982). Esta desviación en la composición de aminoácidos conlleva una subrepresentación de otros que, en el caso de las leguminosas son cisteína, metionina y triptófano y, en los cereales, lisina y triptófano.

La mayor parte de las proteínas de reserva se encuentran agregadas formando complejos de elevado peso molecular con poca o ninguna solubilidad en agua (Larkins, 1981). Hay, sin embargo, ejemplos de proteínas de reserva pequeñas solubles en agua en el ricino ("castor bean", Ricinus communis) (Youle et al., 1978), el cacahuete ("peanut", Arachis hypogaea L.) (Basha y Pancholy, 1981), el guisante (Pisum sativum) (Murray, 1979) y la judía pinta ("mung bean", Vigna radiata) (Manickam y Carlier, 1980). En las semillas las proteínas de reserva se localizan de modo predominante en orgánulos pequeños (de 1 a 20 μm de diámetro), denominados cuerpos proteicos, rodeados de una membrana simple o tonoplasto que derivan del retículo endoplásmico (Pernollet, 1978; Weber y Neuman, 1980). Al depositarse de modo insoluble en forma de vesículas se retiran del medio una gran cantidad de elementos, osmóticamente activos, que podrían dificultar los procesos de desecado habituales en las etapas finales de la maduración de la semilla y en los que puede llegar a perder el 95% de agua que contiene.

La diversidad de proteínas de reserva en los vegetales, entre especies de Familias distintas, dentro del mismo género e incluso la heterogeneidad dentro de la misma especie, ha dificultado considerablemente su estudio y ha complicado mucho los intentos de clasificación. Basándose en los criterios de solubilidad y de composición global de aminoácidos, se establecieron unas clasificaciones (por ej. la de Osborne antes

citada) que en la actualidad se han superado gracias al conocimiento de las secuencias de muchas proteínas (deducidas de la secuencia nucleotídica de clones cDNA) y de los genes que las codifican.

1. 4 PROTEINAS DE RESERVA DE MONOCOTILEDONEAS : PROLAMINAS

Las proteínas mayoritarias en las monocotiledóneas son prolaminas, aunque presentan bastantes diferencias entre las principales especies estudiadas. Representan la mayor parte de la proteína total en el tejido maduro. Además, se han descrito otras proteínas de reserva, de naturaleza globulina, en la avena (Avena sativa) y en el maíz (Dierks-Ventling, 1982), aunque en esta especie su contribución a la proteína total del endospermo es baja. A continuación se describirán las proteínas de reserva mayoritarias, prolaminas, en las Triticeae y en el maíz, así como los genes, actualmente conocidos que las codifican.

1.4.1 PROLAMINAS DE TRITICEAE

Las especies más estudiadas de esta familia son el trigo (Triticum aestivum), la cebada (Hordeum vulgare) y el centeno (Secale cereale). En estas especies las prolaminas, proteínas mayoritarias en la semilla, se han clasificado en función de su composición en aminoácidos y peso molecular en tres grandes grupos (Mifflin et al, 1983; Shewry et al., 1984d; Shewry y Mifflin, 1985), las denominadas ricas en S, pobres en S y las prolaminas de elevado peso molecular. Cada uno de estos grupos recibe nombres diferentes dependiendo de la especie de que se trate (tabla 1.2).

PROLAMINAS

	ricas en S	pobres en S	alto peso molecular
Glutamina	32 - 42	38 - 53	30 - 39
Prolina	15 - 24	20 - 32	12 - 17
Cisteina + Metionina	2.4 - 3.6	0 - 0.2	0.5 - 1.9
Glicina	1.5 - 3.3	0.4 - 1.2	14 - 20
Fenilalanina	3.7 - 5.6	7.4 - 9.3	0.3 - 1.8
Lisina	0.2 - 0.8	0 - 0.5	0.2 - 1.3

Tabla 1.1 : Composición parcial de aminoácidos (en mol %) de los grupos mayores de prolaminas de Triticeae (tomado de Kreis et al., 1985).

GRUPO DE PROLAMINAS	ESPECIES	NOMBRE DE LA FRACCION	LOCUS ESTRUCTURAL	POSICION DEL LOCUS
Alto peso molecular ("HMW")	Trigo	Subunidades de alto peso molecular de las gluteninas	Glu-1	1AL, 1BL, 1DL
	Centeno	Secalinas de alto peso molecular	Sec-3	1EL
	Cebada	D-hordeínas	Hor-3	5L
Pobres en azufre	Trigo	ω - gliadinas	Gli-1	1AS, 1BS, 1DS
	Centeno	ω - secalinas	Sec-1	1ES
	Cebada	C - hordeínas	Hor-1	5S
Ricas en azufre	Trigo	Υ - gliadinas	Gli-1	1AS, 1BS, 1DS
		gliadinas agregadas		
		Υ - básicas	Gli-1	1AS, 1BS, 1DS
		Υ - ácidas	Glu-2	1BS, 1DS
		α - β gliadinas	Gli-2	6AS, 6BS, 6DS
	Centeno	40 k Υ - secalinas	Sec-1	1ES
75 k Υ - secalinas		Sec-2	(2R ^{cer} /6R ^{***})S	
Cebada	B - hordeína	Hor-2	5S	

Tabla 1.2 : Grupos de prolaminas en trigo, centeno y cebada. Se indica las denominaciones de cada fracción en cada una de las especies, la denominación de los loci estructurales conocidos y su posición en el cromosoma. Según datos de Payne y col. (Payne et al., 1984) y Shewry y col. (Shewry et al., 1983a; 1984a; 1985a). Tomado de Kreis y col. (1985a).

1.4.1.1 Prolaminas ricas en S

Se trata de un conjunto de proteínas que presentan bastante heterogeneidad en sus características de solubilidad. Este hecho afecta notablemente sus propiedades de extracción, que tiene lugar tanto en soluciones de alcoholes en agua (prolaminas I) como en soluciones alcohólicas con agentes reductores (prolaminas II o gluteninas). Forman hasta el 80-90 % de la fracción de proteínas totales de la semilla en condiciones normales de crecimiento, pero se reduce desproporcionadamente en condiciones de carencia de S. Se pueden subdividir en distintos grupos en trigo (Triticum) y centeno (Secale cereale), siendo un grupo único en cebada (Hordeum).

En el trigo las gliadinas (prolaminas I) se clasifican generalmente por su movilidad electroforética a pH ácido en α , β , γ y ω (Kasarda et al., 1976). Las proteínas de mayor movilidad (α , β y δ) se clasifican dentro de gliadinas ricas en azufre. En todos los casos se trata de polipéptidos que no se agregan por medio de puentes disulfuro. Otro grupo de polipéptidos, cuyos componentes, se agregan por puentes disulfuro, se extrae en la fracción de prolaminas II, y ha recibido una serie de nombres confusos tales como 'ethanol-soluble reduced glutenin', 'high molecular weight gliadin' (Bietz y Wail, 1973) o 'low molecular weight glutenin' (Nielsen et al., 1968). Las subunidades presentan una composición similar a la de los polipéptidos de los grupos α , β y γ , y sus pesos moleculares son similares (Shewry y Mifflin, 1985) por lo que Kreis (Kreis et al., 1983) las

denomina gliadinas agregadas.

A partir de la secuencia N-terminal de los péptidos se han diferenciado tres grupos. El primero (tipo α) se encuentra presente en las α , β_5 y γ_1 -gliadinas (Autran et al., 1979)

Las γ -secalinas (prolaminas ricas en azufre del centeno) se pueden dividir entre formas agregadas y no agregadas (Field et al., 1983; Shewry et al., 1983b). A pesar de que sus pesos moleculares difieren notablemente, 75000 y 40000 determinados por SDS-PAGE (Shewry et al., 1982), sus secuencias N-terminales muestran elevada similitud en los primeros 20 residuos (Shewry et al., 1982). Esta secuencia es asimismo homóloga a las γ -gliadinas.

Las prolaminas ricas en azufre de la cebada se denominan B-hordeínas. Se diferencian distintos polipéptidos tanto por digestiones con bromuro de cianógeno y mapado de péptidos (Faulks et al., 1981), hibridación de cDNA y poblaciones de mRNA (Kreis et al., 1983) así como secuenciación de clones cDNA y genómicos (Forde et al., 1983), pero no difieren en sus propiedades de agregación (Field et al., 1983).

Se conocen en la actualidad un buen número de secuencias aminoacídicas de prolaminas de Triticeae (p. ej. Tabla 2 en Kreis et al., 1985a) deducidas en su mayor parte a partir de la secuencia nucleotídica de clones cDNA y genómicos. Las prolaminas ricas en S son las que muestran la organización estructural más compleja. Kreis y col. (Kreis et al., 1983) describen la comparación de las secuencias deducidas para las proteínas A(α)-gliadina (cDNA, Kasarda et al., 1984a), las secuencias C y N terminales de γ -gliadina descritas por Scheets y col. (Scheets et al., 1985) y Okita (Okita, 1984), y la secuencia completa de una gliadina agregada descrita por Okita (Okita, 1985). A partir de su estudio se describen dos dominios en las prolaminas ricas

en S. El primero, N-terminal, rico en prolina, pobre en cisteína no presenta estructura repetitiva. El segundo, C-terminal, pobre en Prolina, rico en Cisteína, tiene estructura repetitiva. Además la proteína es traducida con un péptido señal que es eliminado cotraduccionalmente y no se encuentra presente en el polipéptido maduro. Las secuencias de este péptido señal son homólogas entre las distintas proteínas estudiadas, así como con otras prolaminas. Watson (Watson, 1984) a partir del estudio de 277 secuencias de prolaminas describe la estructura consenso de un péptido señal :

- un aminoácido cargado entre los cinco primeros, que en las prolaminas es una Lisina, presentando una Arginina extra la glutelina-2 (Prat et al., 1985) y una subunidad de las gluteninas de alto peso molecular (Forde et al. 1985c).
- un grupo de 9 aminoácidos hidrofóbicos.
- un aminoácido C-terminal, que suele ser Alanina en todas las prolaminas, con la excepción de la glutelina-2 del maíz en que es una Serina (Prat et al., 1985)

La única diferencia importante respecto al consenso general de la estructura de los péptidos señales es la ausencia de una rotura de la hélice en los residuos polares antes del punto de corte. Únicamente las γ -gliadinas presentan una glicina en esta posición lo cual está de acuerdo con la estructura consenso, aunque no universal, de los péptidos señal. Para una discusión más detallada de la estructura proteica de los polipéptidos conocidos ver Kreis y col. (Kreis et al., 1985a). Este autor extrae las conclusiones siguientes sobre la estructura de estas proteínas y su comparación :

1. El dominio rico en prolina es variable entre los diferentes tipos de prolaminas, tanto en extensión como en el motivo repetido, y también en la presencia o ausencia de regiones degeneradas. Sin embargo, en todos los casos la secuencia base del motivo parece basada en el mismo tetra o

pentapéptido (PQQP o PQQPX). Algunas de las diferencias observadas entre algunos tipos de prolaminas se pueden deber a inserciones y/o deleciones en esta zona.

2. En el dominio pobre en prolina se conservan especialmente 3 regiones denominadas A, B y C (Kreis et al., 1985a), presentándose dos regiones denominadas I1 y I3 donde se localizan la mayor parte de las diferencias.

3. Por comparación de las secuencias de las dos zonas (rica y pobre en prolina), los autores (Kreis et al., 1985a) concluyen que la clasificación de las prolaminas ricas en azufre de las Triticeae se puede hacer considerando las secuencias del dominio rico en prolina, particularmente las regiones intermedias. Basándose en este criterio, dividen este grupo de prolaminas en 3 subgrupos:

a. Las B hordeínas, gliadinas agregadas y las γ -gliadinas descritas por Bartels y Thompson (Bartels y Thompson, 1983) y Okita (Okita, 1984). Comparando los dominios pobres en prolina se encuentra elevada homología y contiene 7 cisteínas.

b. la γ - gliadina de Scheets y col. (Scheets et al., 1985) y las γ -secalinas. Estas proteínas presentan una homología del 70 al 75 % a lo largo del dominio pobre en prolina que contiene 9 cisteínas. Se ha propuesto (Shewry y Mifflin, 1985) que estas corresponden a las prolaminas ricas en S ancestrales codificadas en el cromosoma 1. Sus secuencias N-terminales son las de tipo γ_2/γ_3 - gliadina (Bietz et al., 1977; Autran et al., 1979).

c. Los tipos A y α -gliadinas están más alejados de los grupos anteriores aunque son homólogos entre sí. Ambos tienen secuencias N-terminales de tipo α como han sido descritas por Bietz y col. (Bietz et al., 1977) y Autran y col. (Autran et al., 1979). La divergencia descrita puede deberse a la translocación de sus genes estructurales del cromosoma 1 al 6 tal y como ha

descrito Shepherd (Shepherd, 1968).

1.4.1.2. Prolaminas pobres en azufre

Se caracterizan por carecer de aminoácidos azufrados, una gran proporción de glutamina y prolina y un contenido superior de fenilalanina superior al de otras prolaminas. Estos tres aminoácidos llegan a representar hasta un 80% del total, en proporciones 4 : 3 : 1. Las prolaminas pobres en azufre se localizan casi exclusivamente en la fracción de prolaminas I y forman alrededor del 10-20 % de las prolaminas totales en condiciones normales de crecimiento.

En el trigo, este conjunto de proteínas se han denominado ω -gliadinas. Han sido descritas tres secuencias N-terminales diferentes, aunque relacionadas. En el centeno, se han denominado C-secalinas (Charbonnier et al., 1981) o bien ω -secalinas (Kasarda et al., 1983), y en la cebada C-hordeínas. Las prolaminas pobres en azufre de las diversas especies tienen composiciones de aminoácidos similares y varían en sus pesos moleculares desde 45000 a 80000, determinados por SDS-PAGE (Shewry y Mifflin, 1985).

Aunque se han purificado y caracterizado un cierto número de ω -gliadinas, sólo se conocen en la actualidad unas pocas secuencias N-terminales. Kasarda y col. (Kasarda et al., 1983) reconoce tres tipos básicos que ha denominado ARQ, KEL y SRL, sobre la base de los tres primeros aminoácidos de la secuencia N-terminal.

El tipo ARQ se ha relacionado con las prolaminas pobres en azufre ancestrales pues se han descrito variantes en las C hordeínas, ω -secalinas y ω -gliadinas de trigo diploide, tetraploide y hexaploide. Los tipos KEL y SRL difieren del

anterior en la presencia de una delección o de sustituciones extensas que comprenden los 8 primeros residuos. A pesar de que los primeros 9 residuos son muy variables, se conservan bien los residuos siguientes (10 a 13). El tipo SRL de secuencia es característico de un grupo de ω -gliadinas que están codificadas por el cromosoma 1B y difieren de los otros tipos de prolaminas pobres en azufre en su superior contenido de glutamina (alrededor de 50 %) y menor contenido de prolina (20 %).

La característica estructural más interesante de las secuencias N-terminales es la presencia de bloques repetitivos de cinco residuos que se inician en el residuo 14 en el tipo ARQ y que se repiten al menos 3 veces. Se describen diferentes pentapéptidos aunque el más común es PQQPY.

A partir de las secuencias parciales de clones cDNA (Forde et al, 1985a; Tatham et al., 1985), se ha derivado la secuencia del extremo C-terminal, que presenta una cola de seis residuos (TIWSMV-COOH) precedida por una serie de octapéptidos repetidos (motivo consenso : PQQPFQQ). Dado que la composición de aminoácidos en el octapéptido es similar al de la proteína completa, se postuló que dicho motivo podía extenderse a la mayor parte de aquella.

La presencia de una estructura repetitiva en estas prolaminas, así como en las prolaminas ricas en S, hace pensar en la existencia de una relación entre ellas. Esta posibilidad vendría apoyada, además, por las homologías que describe Kasarda y col. (Kasarda et al., 1984a) entre los primeros 20 residuos N-terminales de una ω -gliadina de Triticum monococcum y una α -gliadina de Triticum aestivum. En este caso se observan 8 cambios que pueden resultar de tan solo 8 mutaciones puntuales en el DNA genómico. Los pentapéptidos N-terminales de las prolaminas pobres en azufre (PQQPY) son similares a los tetra (PQQP) y penta (PQQPX) péptidos que se proponen como las unidades básicas

estructurales de las prolaminas ricas en S. Asimismo el octapéptido motivo de C-hordeínas (PQQPFPQQ) se encuentra también en γ -gliadinas y se encuentran octa y heptapéptidos relacionados en todas las otras prolaminas ricas en azufre, con la excepción de las A gliadinas.

1.4.1.3. Prolaminas de alto peso molecular

Este grupo se caracteriza por un contenido en glicina particularmente alto, así como por un contenido menor en prolina y fenilalanina que las otras prolaminas. Su cantidad varía desde el 2 % en cebada al 10 % en el maíz de las prolaminas totales de la semilla. Sus componentes se encuentran casi exclusivamente formando agregados estabilizados por medio de puentes disulfuro y se extraen en la fracción de prolaminas II. En la cebada a este grupo se le ha denominado D-hordeínas, y se presentan como una banda única en SDS-PAGE de aproximadamente 105000 (Shewry y Mifflin, 1982). En el trigo se han denominado gluteninas de alto peso molecular ("HMW glutenin") y se separan en 4 - 5 bandas por electroforesis en SDS-PAGE con pesos moleculares aparentes entre 95000 y 145000 (Payne et al., 1980). En el centeno homocigoto se diferencian una a dos bandas de secalinas de alto peso molecular con movilidades en geles de acrilamida-SDS similares a las equivalentes del trigo (Shewry et al., 1983b).

No se conocen las secuencias de aminoácidos de las D hordeínas ni de las HMW secalinas. Sin embargo, se han descrito hibridaciones cruzadas de clones cDNA de subunidades de gliadinas de alto peso molecular del trigo (Forde et al, 1983)., indicando un alto grado de homología estructural.

Se han purificado diferentes subunidades (Shewry et al., 1984b), así como clones cDNA parciales (Forde et al., 1983; Thompson et al., 1983) y clones genómicos completos (Forde et

al., 1985a). La secuencia nucleotídica de este último presenta una pauta de lectura abierta que predice una proteína de peso molecular 37000. La secuencia de aminoácidos es homóloga a la descrita como extremo N-terminal previamente. Sin embargo, en el clon genómico descrito se observó que inmediatamente después del codón de paro sigue una pauta de lectura abierta que traducida da una secuencia de aminoácidos homóloga a la descrita previamente como C-terminal. Debido a que no se había encontrado nunca una subunidad de 37000 como peso molecular se concluyó que se trataba de un pseudogén, que no se expresa, posiblemente formado por una mutación de un gen funcional que ha generado la aparición de un codón de paro en la secuencia codificante. Si se ignora el codón de paro la secuencia correspondería a una proteína de 64000, más acorde con los datos de peso molecular aparente determinados por ultracentrifugación en gradiente (Field et al., 1982; Shewry et al., 1984b). Es de destacar que una parte muy importante de la proteína (75%) presenta una estructura repetitiva, con repetidos de diferentes longitudes.

1.4.1.4 Relaciones de las prolaminas de Triticeae con otras proteínas de reserva

A pesar de que los diversos grupos de prolaminas presentan diversas estructuras tienen algunos elementos en común, fundamentalmente el hecho de que tengan al menos dos dominios no relacionados, uno de los cuales está formado por bloques repetidos de aminoácidos. Debido a esta estructura repetitiva y a su distribución restringida, se ha sugerido (Kasarda, 1980) que los genes de las prolaminas tienen un origen evolutivo reciente. Si esto fuera cierto, su alto grado de polimorfismo implicaría que forman uno de los grupos de proteínas conocidos con una evolución más rápida.

Kreis y col. (Kreis et al., 1985b) describen la existencia

de homologías entre los diferentes grupos de prolaminas y los inhibidores de tripsina y de α -amilasa de cereales y las proteínas 2S del nabo (Brassica napus L.) y del ricino (Ricinus communis). Estos resultados sugieren que los genes para las proteínas de reserva tienen un origen dual. En primer lugar, de un gen ancestral presente en el predecesor de mono y dicotiledóneas, y, en segundo lugar, de una serie de repetidos más recientes. Esta hipótesis permitiría explicar el origen evolutivo de algunas proteínas que presentan bastante divergencia en estructura y función respecto a las prolaminas (figura 1.1). Según estos autores, todas estas proteínas formarían parte de una superfamilia de proteínas con una homología de secuencia limitada (por debajo del 50 % en algunos casos). Estas proteínas, confinadas a la semilla aparecen en algunos grupos de angiospermas (mono y dicotiledóneas) que han estado divergiendo alrededor de 200 millones de años (Ramshaw et al., 1972). El gen predecesor de todos los miembros de la superfamilia sería, probablemente, un inhibidor de proteasas con un único dominio estructural. Un esquema global del proceso propuesto por Kreis y col. se presenta en la figura 1.1.

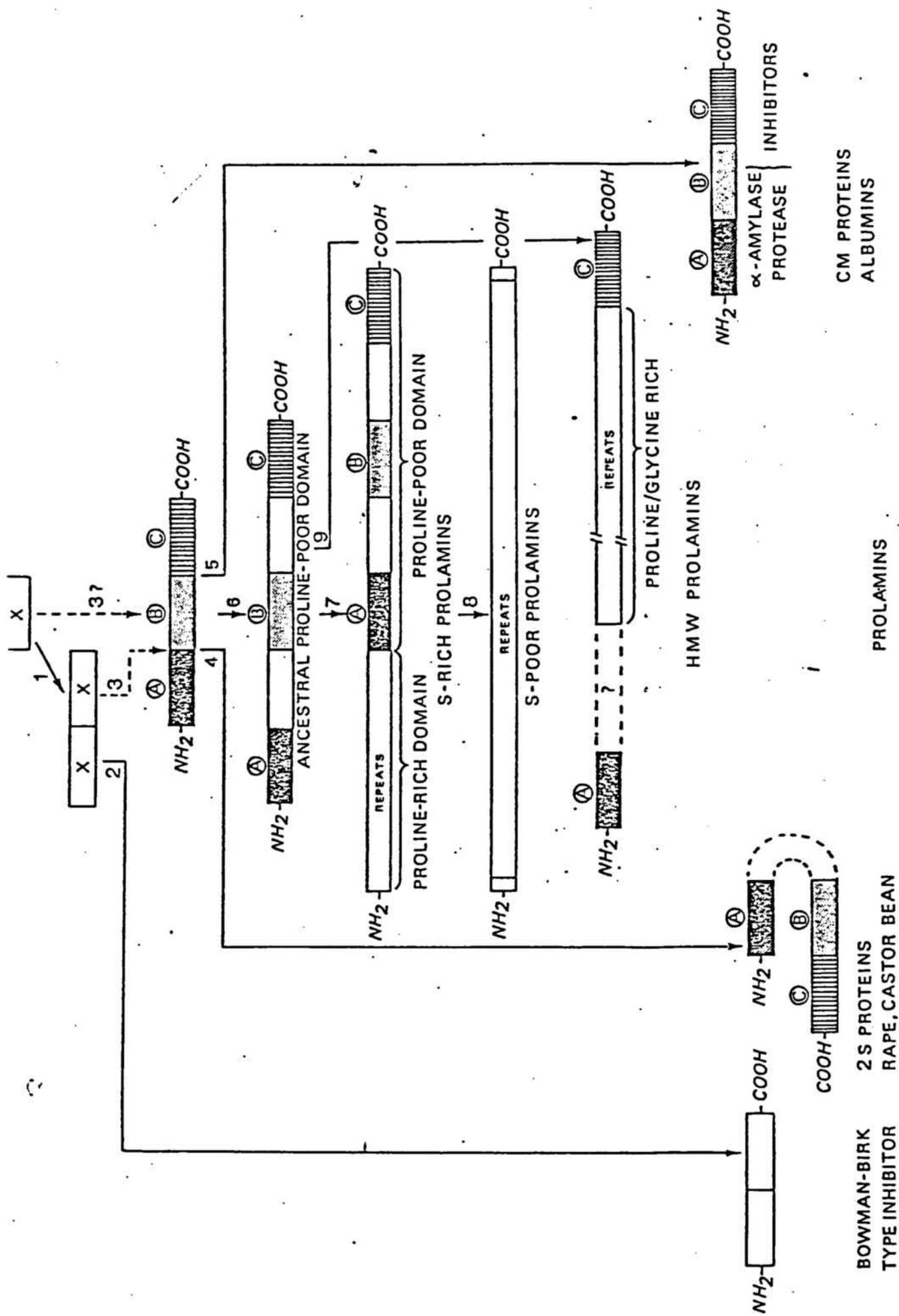
1.4.1.5 Organización genómica de las prolaminas del trigo

Se han localizado los loci cromosómicos de un buen número de polipéptidos extraídos en la fracción prolaminas en las Triticeae. Esto se debe a la gran variabilidad en los patrones de bandas electroforéticas entre las distintas variedades. Los tres cereales más estudiados (trigo, arroz y cebada) presentan diferencias en su ploidía y posibilidades de autofecundación : la cebada es una especie dioica diploide (7 cromosomas), el arroz es monoico diploide (7 cromosomas) y el trigo es dioico alohexaploide (3 dotaciones de 7 cromosomas, genomas A,B y D). Las homologías de los cromosomas entre la cebada y el trigo-arroz se han establecido : 7/1, 2/2, 3/3, 4/4, 5/1, 6/6 y 7/5 (Kreis et

al, 1983), y esto simplifica la comprensión de los mapas genéticos establecidos.

Figura 1.1 : Esquema de la hipótesis de generación de los genes de prolaminas de las Triticeae (tomada de Kreis et al., 1985b). Los fenómenos mayores implicados :

1. duplicación de la proteína ancestral (X) generando una proteína con dos dominios idénticos.
2. divergencia de esta secuencia para dar lugar a las proteínas del grupo de los inhibidores de proteasas Bowman-Birk, por ejemplo en cebada (Joubert, 1984).
3. Triplicación de la proteína ancestral (X) formándose una proteína con 3 dominios idénticos que divergirán dando lugar a las regiones A, B y C.
4. Introducción de un punto de corte entre las regiones A y B para formar las subunidades de las proteínas 2S de ricino (Ricinus communis) y soja (Glicine soja).
5. Divergencia de la secuencia, apareciendo los genes ancestrales de los inhibidores de α -amilasas y de tripsina, así como de proteínas relacionadas.
6. Inserción de secuencias entre las regiones A, B y C para generar la proteína ancestral de la región pobre en prolina de las prolaminas.
7. Inserción de un dominio repetitivo N-terminal, aparición de las prolaminas ricas en azufre.
8. Pérdida de la mayor parte del dominio pobre en prolina, aparición de las prolaminas pobres en azufre.
9. inserción de un dominio repetitivo anterior a la zona C, aparición de las prolaminas de alto peso molecular.



A partir de los estudios de gran cantidad de cruces (Payne et al., 1982a; 1984; Shewry y Mifflin, 1982; 1985; Shewry et al., 1984) se ha localizado la posición de los loci génicos tal como se resumen en la Tabla 1.2 (para revisión ver Kreis et al., 1985a). Todos los loci conocidos se agrupan en unos pocos puntos del genoma que contienen múltiples genes.

1.4.1.6 Aspectos de la organización estructural de los genes de prolaminas

Se han aislado varios clones cDNA y genómicos codificantes para prolaminas en Triticeae. Sin embargo, en ningún caso se han observado clones cDNA de secuencia idéntica a su correspondiente genómico. En cualquier caso, si se comparan las secuencias, se observa una clara homología entre ellos. A partir de estas comparaciones se concluye que no se ha observado ningún gen que contenga intrones.

Kreis y col. (Kreis et al., 1985a) describe un estudio del uso de codones en los diferentes clones descritos en aquel momento para prolaminas ricas en azufre. A partir de este estudio se derivan las siguientes observaciones :

1. No hay evidencia de una abundancia especial de codones que contengan el dinucleótido CG, a diferencia de lo descrito para otros genes de plantas.
2. Hay una fuerte preferencia por el codón CCA para la prolina (68%), una desviación no descrita en otros genes de plantas ni de animales, a excepción del gen de gliadinas de alto peso molecular (Forde et al., 1985c).
3. Como ya se ha descrito en otros genes de plantas hay una fuerte preferencia por el codón CAA de la glutamina (72%) mientras que el codón CAG es el preferido en genes de animales.

4. Si se analizan los datos separando los que proceden de las regiones ricas en prolina de las pobres en prolina, se observa una preferencia superior por el uso del codón CAA en la primera que en la segunda zona (79 % frente a 66 %).
5. Otra propiedad específica de las regiones ricas en prolina es la fuerte preferencia por el uso del codón UUU para fenilalanina (lo contrario a lo que se observa en el dominio pobre en prolina y en otros genes de animales y plantas).
6. En el gen de HMW gliadina se observa una utilización preferencial de uno u otro codón en diferentes posiciones de las secuencias consenso de los repetidos. La significación funcional de estas observaciones no es evidente, aunque es posible que refleje simplemente la situación en los repetidos prototipo antes de que se amplificaran.

Cada vez más hay una fuerte evidencia de que la expresión génica está controlada, al menos parcialmente por la interacción entre moléculas reguladoras (probablemente moléculas que interaccionan específicamente con el DNA) y cortas secuencias presentes en las regiones flanqueantes a 5' de los genes (Davidson et al., 1983; Rendelhuber, 1984). El modelo de Britten y Davidson para la inducción coordinada de genes no ligados predice que las secuencias flanqueantes a estos genes deben presentar cortas secuencias conservadas (Britten y Davidson, 1969). Forde y col. (Forde et al., 1985a) describen una comparación de las regiones 5' de las gliadinas A(α) y las B hordeínas con los genes de las dos clases mayoritarias de zeínas del maíz.

Las A(α)-gliadinas y las B-hordeínas se consideran dos de las más alejadas entre las prolaminas ricas en azufre y se encuentra sólo una homología limitada entre sus regiones flanqueantes 5'. A pesar de ello, se encuentran una serie de cortas regiones de secuencia conservada en una zona hasta -600 desde el codón de inicio (ATG). La primera zona, entre -100 y-

90, presenta conservación de 18 de los 19 residuos y comprende la secuencia TATAAATA, secuencia consenso de la "TATA box" eucariota, conservada en la misma posición aproximada en genes de plantas (Messing et al., 1983) y de animales (Benoist et al., 1980). La siguiente región de homología se localiza alrededor de -300 y tiene una longitud de 34 residuos. De ellos 29 están conservados, incluyendo un bloque de 15 seguidos con la secuencia TGTAAGTGAATAAG. La tercera región de homología se localiza alrededor de -500 y es un repetido imperfecto de la anterior.

Se han descrito otras secuencias conservadas localizadas a 5' de genes que presentan expresión coordinada en plantas (Schoffl et al., 1984; Mauro et al., 1985; Dennis et al., 1985) pero no están presentes en las secuencias 5' de los genes de prolaminas conocidos.

Si se comparan las secuencias 3' no traducidas de una serie de clones cDNA, se observa que las A-gliadinas y γ -secalinas están tan relacionadas con las C-hordeínas como con cualquier otro tipo de prolaminas ricas en azufre. Las secuencias 3' de las C hordeínas presentan asimismo la misma homología con las A-gliadinas y γ -secalinas que con las demás prolaminas ricas en azufre. Esto podría indicar que las prolaminas pobres en azufre llevan el mismo tiempo divergiendo de las prolaminas ricas en azufre como cada una de las subclases de éstas últimas lo lleva haciendo entre sí (Kreis et al., 1985a). Esta suposición supone, sin embargo, que la tasa de mutación en los diferentes genes es similar y que los mecanismos, tales como la convergencia génica no actúan preferentemente para mantener la homología de secuencia entre genes estrechamente ligados.

En las secuencias 3' de los genes conocidos para las prolaminas se encuentran al menos dos copias de una secuencia que se ha descrito como la consenso para la señal de poliadenilación AATAAA (Proudfout y Brownlee, 1976). En el caso de las

prolaminas, como en otros genes de plantas (Lycett et al., 1983) la secuencia más convencional se encuentra a unos 80 nucleótidos de la cola poli(A). En la posición en que se encuentran frecuentemente las señales de poliadenilación para los genes animales (a 25 nucleótidos de la cola poli(A)) se suele encontrar una secuencia compuesta relacionada con la consenso para la señal de poliadenilación. En el gen de B-hordeínas (Forde et al., 1985b) por ejemplo la secuencia es AATAAAATATAAATAAA y secuencias similares se localizan en los mRNAs de gliadinas agregadas (Okita, 1985). El punto preciso de adición de la cola poli(A) varía entre los diferentes genes de prolaminas, en ocasiones aún entre genes que son casi idénticos en sus regiones 3' no traducidas. Por ejemplo, para las A-gliadinas se han descrito diferencias de sólo unos pocos nucleótidos entre los puntos de poliadenilación estrechamente relacionados del cDNA (Rafalski et al., 1984). En el caso de las gliadinas de alto peso molecular (Forde et al., 1983) las diferencias entre los puntos de poliadenilación entre dos cDNAs estrechamente relacionados resultó ser superior a 30 nucleótidos y puede implicar el uso de señales alternativas de poliadenilación. Es posible, aunque no se ha demostrado para estos genes, que los transcritos para un mismo gen de prolaminas puedan ser poliadenilados en dos o más puntos alternativos, generando transcritos heterogéneos en longitud.

1.4.2 PROLAMINAS DEL MAIZ

En el maíz las proteínas de reserva mayoritarias son de naturaleza prolamina. Posteriormente se consideraron también como proteínas de reserva una fracción de proteínas que se aislaba junto con las denominadas glutelinas.

1.4.2.1 Zeínas clásicas

Denominadas clásicamente zeínas, las prolaminas del maíz son las proteínas de reserva mayoritarias en el endospermo representando el 50-60% de la proteína total de este tejido (Salamini y Soave, 1982). Estos polipéptidos son sintetizados en polisomas ligados a membranas como preproteínas que contienen un péptido señal de unos 20 AA de longitud y que, después del procesamiento, se depositan en engrosamientos del retículo endoplasmático a partir de los cuales se forman los cuerpos proteicos (Khoo y Wolf, 1970; Burr y Burr, 1976; Burr et al., 1978; Larkins y Hurkman, 1978; Burr y Burr, 1981). Presentan propiedades en común con las prolaminas de Triticeae, aunque difieren en algunos aspectos (Wilson, 1983; Shewry y Mifflin, 1985). Las diferencias más notables son los pesos moleculares aparentes (menores de 25000) y su superior contenido en leucina (10 a 20 %), alanina (10 - 11 %) y menores contenidos en glutamina y prolina. Son similares a las prolaminas del mijo (Eleusine caracana) y del sorgo (Sorghum bicolor), aunque se dispone de poca información al respecto.

La fracción de zeínas se puede separar por electroforesis en geles de acrilamida-SDS en seis componentes de distinto peso molecular aparente (Soave et al., 1976) : 22-21 kD (Z22-21), 19 kD (Z19), 16 kD (Z16), 15 kD (Z15) y 10 kD (Z10) (figura 4.5); para las que se han propuesto diferentes nomenclaturas. Inicialmente denominadas por su peso molecular aparente esta nomenclatura se ha revelado considerablemente confusa. En la fracción de zeínas-I, extraídas con etanol al 70 %, aparecen las proteínas mayoritarias, en dos grupos de pesos moleculares aparentes alrededor de 22000 y 19000, que inicialmente denominaremos Z22-21 y Z19. La fracción de zeínas II, extraída con etanol al 70 % en presencia de un agente reductor, contiene las zeínas de bajo peso molecular (16, 15 y 10 kD, Z16, Z15 y Z10 respectivamente) y aquellas zeínas de alto peso molecular (Z22-21

y Z19) que no habían sido solubilizadas anteriormente. En esta fracción (zeínas-II) se recupera parte de una fracción proteica, denominada glutelina-2 (ver ap 1.4.2.2).

Las zeínas de 22-21 kD (Z22-21, Zd2) y de 19 kD (Z19, Zd1) representan el 70-80 % del total de zeínas y se separan en 10 a 25 componentes mediante electroforesis en doble dimensión (Kridl et al., 1984). Este resultado es dependiente de la variedad de maíz estudiada (Righetti et al., 1977). Las fracciones de 16 y 15 kD (Z16 y Z15, Zc1 y Zb) por isoelectroenfoque presentan una única banda mientras que la fracción de 10 kD (Z10, Za) se separa en 2 ó 3 componentes distintos.

Las propiedades de solubilidad de las zeínas (proteínas altamente hidrofóbicas) vienen determinadas por su composición aminoacídica. Las zeínas-I se caracterizan por tener un alto contenido en glutamina (20 %), leucina (19 %), alanina (13 %) y prolina (11 %) (ver tabla 1.3) (Ludevid et al., 1985). Por contra, tienen un contenido bajo en los aminoácidos básicos arginina e histidina, y son especialmente pobres en los aminoácidos esenciales lisina y triptófano. Las zeínas de bajo peso molecular tienen una composición aminoacídica similar a la de las zeínas-I pero se diferencian de ellas en que son más ricas en metionina, cisteína y glicina.

La heterogeneidad de carga dentro de la fracción de zeínas I se ha resuelto a nivel de la secuencia de aminoácidos. La secuenciación directa del extremo N-terminal de estas proteínas muestra una elevada conservación de la secuencia en la proteína madura (Bietz et al., 1979). La porción central de estas proteínas se encuentra menos conservada y ha sido imposible la secuenciación directa. A partir del aislamiento de clones cDNA correspondientes a las diferentes fracciones de zeínas (Wienand et al., 1979; Geraghty et al., 1981; Burr et al., 1982; Geraghty et al., 1982; Hu et al., 1982; Marks y Larkins, 1982; Pedersen et

AMINOACIDOS	ZBINAS-I Z22-21 y Z19	ZBINAS-II Z16 y Z15	ZBINAS-II Z16	GLUTELINAS-2 28 kD
<u>No polares</u>				
Ala	13.3	10.0	9.0	5.2
Ile	3.6	2.0	3.1	2.0
Leu	19.1	9.7	10.6	9.4
Met	1.0	4.0	10.4	0.5
Phe	5.6	1.0	3.1	1.2
Pro	10.8	12.6	11.8	25.6
Trp	--	--	--	--
Val	3.5	3.0	3.8	7.1
<u>Poiares</u>				
Asn	(1)	(1)	(1)	(1)
Cys	0.4	5.5	n.d.	6.2
Gln	(2)	(2)	(2)	(2)
Gly	2.0	11.0	9.1	7.0
Ser	6.4	6.5	7.6	4.0
Thr	2.8	3.5	4.5	4.5
Tyr	3.3	5.4	1.8	1.5
<u>Básicos</u>				
Arg	1.0	2.0	1.3	2.1
His	1.0	1.2	2.0	7.2
Lys	0.3	0.7	1.6	Trazas
<u>Acidos</u>				
Asp	(1)	(1)	(1)	(1)
Glu	(2)	(2)	(2)	(2)
(1) Asn+Asp	5.0	2.7	5.6	Trazas
(2) Gln+Glu	20.5	19.0	15.3	16.1

Tabla 1.3 : Composición aminoacídica de distintas fracciones proteicas extraídas de endospermo de maíz de la variedad doble híbrida E10 (según Ludevid et al, 1985).

al., 1982; Viotti et al., 1982; Heidecker y Messing, 1983; Marks et al., 1985) se pudieron deducir las secuencias aminoacídicas completas. La primera secuencia de aminoácidos publicada (Geraghty et al., 1981) revela una estructura muy repetitiva, posteriormente observada en muchas otras proteínas de reserva. No se han detectado homologías entre estas secuencias y las de las prolaminas de trigo y de cebada (Bartels y Thompson, 1983; Rasmussen et al., 1983).

La comparación de las secuencias deducidas de las proteínas de la fracción zeínas-I permite dividir la proteína en cuatro regiones (Spena et al., 1982; Messing et al., 1983). La región 1 contiene el péptido señal, eliminado durante la deposición de la proteína en los cuerpos proteicos (Burr y Burr, 1976; 1981) de una longitud de alrededor de 20 aminoácidos, y las regiones 2 y 4 forman los extremos N (70 a 80 aminoácidos) y C terminales (unos 10 aminoácidos), conservados. La región 3 está formada por una repetición en tándem de alrededor de 20 aminoácidos, precedidos de una serie de glutaminas. La variación de secuencia dentro de la estructura de los repetidos es la causa de la heterogeneidad observada en los geles de isoelectroenfoque, mientras que el número de unidades repetidas determina la longitud de la proteína. Si bien algunos de estos bloques de 20 aminoácidos son anómalos, debido a que poseen delecciones o inserciones de varios aminoácidos, las secuencias repetidas están bastante conservadas y es posible deducir una secuencia consenso (Geraghty et al., 1982) : LLPFNQLAALNPAAYLQQQQ.

A partir de esta estructura básica Argos y col. (Argos et al., 1982) propuso un modelo de empaquetamiento de la proteína que, aunque no es concluyente, podría explicar como se ensamblan las diferentes subunidades en el interior del cuerpo proteico (ver figura 1.2). Según este modelo la cadena peptídica de cada secuencia repetida tendría una estructura de hélice α , que daría lugar a una distribución simétrica de los aminoácidos polares.

Los distintos bloques se hallarían plegados en forma antiparalela, dando lugar a una estructura cilíndrica que quedaría estabilizada por la interacción existente entre los aminoácidos polares de estos bloques. Asimismo, la agregación de los distintos polipéptidos de zeínas estaría mediada por la interacción entre los grupos polares todavía libres. Los residuos

Figura 1.2 : Modelo de empaquetamiento de zeínas-I en el interior del cuerpo proteico, según hipótesis de Argos y col. (tomado de Argos et al., 1982).

1. Disposición de los aminoácidos que componen el bloque repetido de zeínas-I, si adquiere la estructura de hélice α .
2. Posibles interacciones entre aminoácidos polares de distintos bloques repetidos dispuestos de forma antiparalela en la molécula de zeínas-I.
3. Asociación de los nueve (o siete) bloques repetidos que componen las moléculas de zeínas-I. Según el modelo, esta disposición de los bloques da lugar a una estructura cilíndrica. La figura muestra un corte transversal de esta estructura.
4. Asociación de distintas moléculas de zeínas-I mediada por la interacción de aminoácidos polares en los laterales de la estructura cilíndrica y por la interacción de residuos de glutamina (Q) en los extremos de la misma.

de glutamina, concentrados en los extremos del cilindro, también contribuirían al empaquetamiento de las zeínas en el interior del cuerpo proteico. Por el momento, este modelo es hipotético, si bien está apoyado por observaciones de microscopía electrónica en las que las moléculas de zeínas aparecen con forma de bastón (Larkins et al., 1984), y por mediciones de dicroísmo circular en las que se detecta la presencia de estructuras en hélice α en una abundancia consistente con las predicciones del modelo.

Es importante destacar que la naturaleza repetitiva de la porción central de la molécula conduce a la amplificación de ciertos aminoácidos tales como glutamina, leucina, prolina y alanina, resultando una proteína altamente hidrofóbica con un elevado contenido de grupos amino fácilmente accesibles lo que podría ser una forma óptima de almacenamiento para la posterior germinación.

A partir de las secuencias deducidas de los clones cDNA se intentaron establecer relaciones y clasificaciones de los diferentes clones. Estos estudios se basaron fundamentalmente en técnicas de hibridación medidas por la estabilidad térmica del híbrido entre distintos clones, y permitieron definir una serie de subfamilias (Parks y Lewis, 1980; Burr y Burr, 1982; Marks y Larkins, 1982; Viotti et al., 1982). Mientras que en la fracción zeínas-II cada uno de los grupos del mismo peso molecular forma una subfamilia, en el caso de las zeínas I la situación es bastante más compleja, clasificándose proteínas relacionadas en clases diferentes tanto en tamaño como en complejidad. Messing y col. (Messing et al., 1983) describe una clasificación de las diferentes subfamilias conocidas empleando como clones de referencia a los denominados A20, A30, B49 y B59. Posteriormente, Heidecker y Messing (Heidecker y Messing, 1986) denominan a estas subfamilias z1A, z1B, z1C y z1D respectivamente. Los componentes dentro de cada subfamilia tienen una homología, a nivel nucleotídico, de alrededor del 90 %. Entre las subfamilias A20 y

A30 encontramos una homología de secuencia del 80 al 90 %, y entre las subfamilias A20 y B49 ésta tiene un valor aproximado de un 65-85 %. La existencia de homologías entre los distintos genes de zeínas-I parece indicar que todos ellos se han originado a partir de una secuencia precursora común. Las diferencias observadas podrían haber aparecido en la evolución gracias a procesos de duplicación, inserción, delección y sustitución, que habrían afectado principalmente a la zona de secuencias repetidas, y que habrían respetado, sin embargo, la estructura global de la proteína codificada así como su composición global de aminoácidos.

Se han caracterizado diversos clones genómicos que codifican para las zeínas de 19, 22-21 kD (Lewis et al., 1981; Wienand et al., 1981; Spena et al., 1982; Hu et al., 1982; Pintor-Toro et al., 1982; Pedersen et al., 1982; Langridge y Feix, 1983; Spena et al., 1983; Kridl et al., 1984) y para las zeínas de 15 kD (Boston y Larkins, 1986). El análisis de estos clones mediante técnicas de secuenciación del DNA, ha demostrado que los genes de zeínas, al igual que los genes de prolaminas de Triticeae (trigo y cebada), carecen de intrones.

Las zeínas-I están codificadas por una familia de genes compleja. El número de genes estimado depende según los autores entre 30 y 100 (Viotti et al., 1979; Wienand y Feix, 1980; Hagen y Rubinstein, 1981; Burr y Burr, 1982; Pedersen et al., 1982; Viotti et al., 1982). Sin embargo, no todas las secuencias que codifican para zeínas representan genes activos. Algunas de las copias tienen un intervalo de lectura corto, debido a que poseen codones de terminación bastante próximos al lugar de inicio de la traducción y, por esta razón, han sido interpretadas como pseudogenes (Kridl et al., 1984; Spena et al., 1983).

Heidecker y Messing (1986) estiman que la subfamilia mayor es la correspondiente al clon A20, con alrededor de 25 miembros.

Las subfamilias correspondientes a los clones A30 y B49 son menores, con 20 y 15 miembros aproximadamente y la correspondiente al clon B59 es la, menor, con alrededor de 5 miembros. Estos numeros se deben considerar tan solo como aproximaciones pues derivan del empleo de pruebas heterólogas no pudiendo, además, diferenciar genes activos de pseudogenes. Este hecho está en coincidencia con una estima del número de genes presentes por genoma haploide en unos 65, aproximadamente el doble del número total de zeínas que se han llegado a observar por electroforesis en dos dimensiones (Hagen y Rubinstein, 1981), lo que podría sugerir que alrededor de la mitad de los genes no son activos en transcripción. Los valores que se conocen de la fracción de zeínas-II describen sólo la presencia de 6 miembros (Heidecker y Messing, 1986).

A partir del estudio de la herencia de los patrones de bandas de isoelectroenfoque de las diferentes fracciones de zeínas en distintas variedades del maíz, y en cruces entre éstas se han llegado a establecer las localizaciones cromosómicas de unos 30 loci génicos que codifican para estos polipéptidos (Valentini et al., 1979; Soave et al., 1978; Soave y Salamini, 1983) (figura 1.3). Los genes estructurales de la fracción zeínas I se ha localizado sobre tres de los diez cromosomas del maíz mediante estudios de ligamiento genético. Los genes de la subfamilia A20 se localizan en los cromosomas 4, 7 y 10 (Valentini et al., 1979; Soave et al., 1981; 1982). La subfamilia A30 se ha localizado sobre los cromosomas 4 y 7, cerca de los anteriores (Valentini et al., 1979; Soave et al., 1981) y la subfamilia B49 exclusivamente sobre el cromosoma 4 (Soave et al., 1982). Estos resultados coinciden con los obtenidos por técnicas de hibridación 'in situ' por Viotti y col. (Viotti et al., 1980; 1982). A partir de experimentos de "genomic walking" parece ser que estos genes se encuentran agrupados en "clusters", separados por zonas de secuencias repetidas (Spena et al., 1983; Heidecker y Messing, 1986). Esta organización de los genes de las zeínas-I

presenta las características de las familias multigénicas tal como definen Hood y col. (Hood et al., 1975). Una situación similar se observa en los genes de las histonas del maíz (Stout y Kermicle, 1979), las proteínas del corion del gusano de la seda (Bombyx mori, Goldsmith y Basehoar, 1978) y en algunas familias génicas de Drosophila (Spradling et al, 1975).

Esta organización genética es interesante desde varios puntos de vista. En primer lugar destaca el hecho de que en cada zona los genes no están contiguos sino ligeramente dispersados. Una excepción es la tríada Zp20/1, Zp20/2 y Zp20/3, un "cluster" en el cromosoma 7 cuyos miembros están estrictamente ligados y los componentes polipeptídicos correspondientes están siempre o todos presentes o todos ausentes. Sin embargo son variados los ejemplos de clones genómicos aislados que contienen dos o más secuencias polipeptídicas de zeínas. En segundo lugar en cada zona coexisten polipéptidos de zeínas de diferente peso molecular. Por ejemplo en el cromosoma 4, cerca del locus Floury-2 (Fl-2) (ver figura 1.3 y tabla 1.6) se localizan genes que codifican tanto para zeínas de 22-21 kD (Z22-21, Zd2) como para las de 19 kD (Z19, Zd1) y las de 10 kD (Z10, Za) (Soave y Salamini, 1984b). En tercer lugar, en la misma región cromosómica se localizan los loci (Fl2, O2, De-B30 y O7) de los genes que controlan la tasa de acumulación de zeínas (ver ap. 1.4.2.3).

La organización genómica de los genes que codifican para las proteínas de la fracción zeínas II está solo determinada parcialmente, aunque los resultados apuntan a que se encuentran localizados en un único cromosoma y sólo en números de una o dos copias (Marks et al., 1985a). Las diferentes subfracciones que se han analizado no presentan homología con las descritas para las zeínas-I.

La biología molecular de las zeínas está bastante bien conocida en comparación con otros sistemas de vegetales. Como

referencia, Heidecker y Messing (Heidecker y Messing, 1986) citan que en la recopilación de secuencias de GenBank y EMBO de las 57 entradas de DNA de plantas 12 corresponden a clones cDNA o genómicos de zeínas. A partir de estos datos se demuestra una de las características de estas proteínas, pertenecen a la rara clase de genes de organismos eucariotas que no poseen intrones (Hu et al., 1982; Messing et al., 1983; Pedersen et al., 1982).

La organización repetitiva o en "cluster" de los genes de las zeínas se presenta a dos niveles : en su organización cromosómica así como en su estructura con la repetición de secuencias de 20 aminoácidos en tándem. La amplificación interna es probablemente la consecuencia de una duplicación inicial producida por un entrecruzamiento o recombinación desigual. Un modelo de como pudieron haberse generado los genes de las zeínas lo describen Heidecker y Messing (Heidecker y Messing, 1986). Estos mismos autores describen el hecho de que la organización en "clusters" de los genes de zeínas y su elevado número no sería exclusivamente un sistema para producir gran cantidad de proteína sino que también sería necesario para poder mantener en todo momento un cierto número de genes funcionales. Para explicarlo hacen referencia a dos aspectos característicos del sistema de las zeínas :

1. Los genes de las diferentes subfamilias de zeínas presentan bastante heterogenidad entre sí, indicando que la variación entre las diferentes proteínas es tolerada por el sistema, y que los genes son viejos en términos evolutivos. Sin embargo, dentro de una misma subfamilia se mantiene una cierta homogeneidad sugiriendo o bien que hay una cierta selección en la secuencia de las proteínas o bien que han divergido recientemente, o quizás que hay procesos de convergencia génica eficientes capaces de mantener la homogeneidad (Heidecker y Messing, 1986).

2. Los genes de zeínas presentan una elevada proporción de codones (32 %) que pueden mutar dando lugar a un codón de paro con un solo cambio. El contenido elevado de glutamina es el responsable pues los codones CAA y CAG pueden mutar a UAA y UAG, siendo la transición C a U la mutación más frecuente (Li, 1983), y como consecuencia la frecuencia de generación de codones de paro en los genes de zeínas (6.8%) es el doble de la media de muchos otros genes. La introducción de un codón de paro probablemente no limite la síntesis del mRNA ni su traducción, aunque dará lugar a una proteína de menor tamaño si el codón de paro no se suprime. La supresión de este codón es muy poco eficiente y probablemente se reducirá mucho la estabilidad del mRNA de los genes mutados. De ahí que sólo se hubiese aislado un clon de cDNA con una mutación sin sentido, mientras que tres de las cinco secuencias genómicas descritas hasta el año 1986 presentaban este tipo de mutaciones. En dos de ellas se presentaba sólo una mutación sin sentido, en la tercera había cuatro de éstas. Sin embargo en ninguno de los genes que se han descrito se presentan mutaciones que incorporen aminoácidos no característicos de las zeínas, inserciones o deleciones como es propio de otros pseudogenes descritos. Es decir, parece como si los genes inactivados permanecieran sujetos a las mismas presiones selectivas (Heidecker y Messing, 1986).

La recombinación o entrecruzamiento desigual y la convergencia génica son mecanismos que podrían explicar estas peculiaridades. No pueden eliminar completamente la presencia de codones de paro pero pueden proveer de los medios para mantener relativamente constantes la relación entre los genes activos y los inactivos, eliminando la necesidad de amplificación. Estos procesos se han propuesto para explicar el mantenimiento de las familias multigénicas de los genes del RNA ribosómico y de las histonas (Smith, 1973a; Hentschel y Birnstiel, 1981) así como de

las secuencias del DNA satélite (Smith, 1973b). La organización de los genes en "clusters" facilita la recombinación desigual y la convergencia génica y podría ser una característica necesaria del sistema de las zeínas. Las histonas también precisan de una constante comparación de un gen con los otros, en ese caso para mantenerlas todas iguales. A pesar de que la presión selectiva es diferente entre ambos tipos de proteínas un aspecto de su estructura es idéntica : no presentan intrones. Heidecker y Messing (Heidecker y Messing, 1986) proponen que este hecho es un reflejo de las presiones selectivas a que están sometidos ambos sistemas para mantener la colinealidad de genes no equivalentes para facilitar la convergencia génica y evolución coordinada. Dado que las secuencias de los intrones no están sometidas a las mismas presiones evolutivas que las regiones codificantes podrían acumular mutaciones tales como inserciones y deleciones que podrían interferir con la convergencia génica. Sobreimpuesto a la amplificación por recombinación desigual se pueden producir transposiciones de genes únicos de zeínas, como se ha inferido de la estructura de las secuencias invertidas flanqueantes a dos secuencias genómicas (Spena et al., 1982). Sin embargo este proceso conduciría a la aparición de genes de zeínas no organizados en "cluster" o genes "huérfanos" y por tanto sensibles a inactivación por mutación, y debe ser un acontecimiento raro.

Langridge y col. (Langridge et al., 1982) purificaron RNA total a partir de endospermo de maíz y demostraron que esta fracción contenía mRNAs de varios tamaños que codificaban para zeínas-I. Estos autores sugirieron que el RNA de menor tamaño (900 nucleótidos) podría corresponder al mensajero maduro, en tanto que el resto de RNAs (1800, 2800 y 3800 bases) podrían ser moléculas precursoras del primero. Dado que los genes de zeínas no tienen intrones, este resultado podría indicar que dichos genes son transcritos a partir de promotores bastante alejados del ATG de inicio de traducción. Esta posibilidad fue confirmada

por Langridge y Feix (Langridge y Feix, 1983). Estos autores caracterizaron un clon que codifica para una zeína de 22 kD (Z22-21, Zd2) y secuenciaron 1300 bases de la región 5' flanqueante. En esta secuencia se localizaron dos regiones promotoras posibles, una situada en la posición -1070 respecto al inicio de traducción, y la otra en la posición -120. Experimentos de transcripción 'in vitro' en oocitos de Xenopus laevis, combinados con ensayos de mapado con endonucleasa S1 en presencia de mensajeros extraídos del endospermo, permitieron demostrar que ambos promotores son activos 'in vivo' y que la transcripción puede ser iniciada en un total de cuatro puntos distintos. Es probable que la síntesis de zeínas sea controlada 'in vivo' activando o inhibiendo ambos promotores. Este sistema podría formar parte de un complejo mecanismo de regulación de la expresión, empleado para sintetizar zeínas de una forma rápida durante el desarrollo del endospermo.

Algunos de los mensajeros de zeínas presentan secuencias repetidas invertidas de unas 20 bases de longitud, que están situadas en las regiones 5' y 3' no traducidas (Spena et al., 1982). También aparecen secuencias de este tipo en algunos mensajeros de proteínas de otras plantas: α / β gliadinas (prolaminas de trigo), faseolinas (globulinas 7S de alubia), patatina (proteína de reserva de la patata) y actinas de soja. La obtención de artefactos de clonaje en algunos cDNAs de zeínas demuestra que estas secuencias pueden estar apareadas (Spena et al., 1982). De hecho, se ha observado que los mensajeros de zeínas con secuencias invertidas son traducidos 'in vitro' menos eficientemente que aquellos otros en los que la secuencia repetida de la región 3' ha sido deleccionada (Spena et al., 1985). Por esta razón, se ha sugerido que la presencia de secuencias invertidas en los mensajeros de zeínas podría desempeñar una función reguladora durante el proceso de síntesis de estas proteínas.

Se han caracterizado clones cDNA y genómicos que codifican para las zeínas de bajo peso molecular (Marks et al., 1985; Prat et al., 1985; Prat, 1986; Boston y Larkins, 1986; Kirihara et al., 1988). La estructura primaria de la zeína de 16 kD (Z16, Zc1) tiene una gran homología con la de la glutelina de 28 kD (G2, Zc2) (Prat, 1986; Boronat et al., 1986) (ver ap. 1.4.2.2).

La zeína de 15 kD (Z15, Zb) tiene un total de 180 aminoácidos, 20 de los cuales forman parte de un péptido señal situado en el extremo N-terminal de la proteína (Marks et al., 1985; Pedersen et al., 1986). Esta zeína tiene una composición de aminoácidos similar a la de las zeínas-I, pero se diferencia de ellas en que es especialmente rica en aminoácidos sulfurados (tiene un 11.2 % de metionina y un 4.4 % de cisteína). La zeína de 15 kD (Z15, Zb) no presenta secuencias repetidas. No se encuentran homologías entre la estructura primaria de esta proteína y la de las zeínas-I. Existen únicamente 1 ó 2 copias del gen que codifica para la zeína de 15 kD por genoma haploide. Este gen no tiene intrones.

Se han aislado y secuenciado recientemente clones cDNA codificantes para la zeína de 10 kD (Z10, Za) (Kirihara et al., 1988). La proteína tienen 129 aminoácidos, y el clon cDNA codifica, además, para un péptido señal de 21 aminoácidos que no aparece en la proteína madura. Esta proteína se caracteriza por su elevadísimo contenido en metionina (22.5 %). El gen de la zeína de 10 kD (Z10, Za) está representado 1 ó 2 veces por genoma haploide.

1.4.2.2 Glutelinas-2

Cuando se emplean soluciones alcalinas en presencia de un agente reductor se extrae la fracción de glutelinas del

endospermo, que representan el 30-35% del total de proteínas del tejido (Osborne y Mandel, 1914). Esta fracción ha sido menos estudiada que la de zeínas debido a que su análisis se ve dificultado por problemas de agregación y, también, a que está constituida por una mezcla compleja de proteínas. Una dificultad adicional para este estudio ha sido ocasionada por el hecho de que la fracción de glutelinas, la última de las obtenidas en el proceso de extracción secuencial (Landry y Moureaux, 1970) suele estar contaminada por proteínas no solubilizadas anteriormente.

La subfracción de glutelinas-2 (G2) también denominada RSP ("Reduced Soluble Protein") (Vitale et al., 1982) constituye un grupo de polipéptidos bien definidos que representa el 15 % del total de proteínas del endospermo. Esta fracción, analizada por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se separa en dos componentes distintos : uno de 28 kD es soluble en soluciones alcohólicas en presencia de un agente reductor y, por ello, forma parte de la fracción ASG ("Alcohol Soluble Glutelin"), también denominada fracción de zeína-II (Esen et al, 1981). La glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) se separa en un mínimo de 6 componentes distintos mediante electroforesis de doble dimensión (DiFonzo et al., 1977). Esta proteína es muy rica en prolina (26 %), ácido glutámico (16 %) y leucina (9%) (ver tabla 1.3) (Ludevid et al., 1985; Prat et al., 1985). Por el contrario, tiene un contenido bajo en metionina y es especialmente pobre en ácido aspártico, triptófano y lisina.

Las glutelinas-2 se sintetizan en el endospermo de forma paralela a las zeínas, entre los días 15 y 40 después de la polinización (Ludevid et al., 1984). Ambos tipos de proteínas se acumulan en el interior del cuerpo proteico (Vitale et al., 1982) como se ha podido demostrar por técnicas inmunocitoquímicas (Ludevid et al., 1984) y por aislamiento de las proteínas del cuerpo proteico después de su fraccionamiento en gradientes de densidad.

Se han aislado clones de cDNA que codifican para la glutelina de 28 kD (G2, Zc2) (Prat et al., 1985). El análisis de la secuencia nucleotídica correspondiente ha puesto de manifiesto que la glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) es sintetizada con un péptido señal de 19 aminoácidos, que es procesado 'in vivo' y no aparece en la proteína madura (Esen et al., 1982). A partir del estudio de la secuencia nucleotídica deducida, de 204 aminoácidos en la proteína madura (Prat et al., 1985), se puede dividir ésta en 5 regiones diferentes :

1. una región N-terminal de 11 aminoácidos
2. una región constituida por 8 repeticiones del hexapéptido PPPVHL, con una sola substitución del aminoácido leucina por valina en la séptima copia.
3. una región formada por dos repeticiones, y parte de una tercera, del octapéptido QPHP(C/S)PCQ.
4. una región rica en cisteína y en glutamina
5. una región C-terminal rica en glutamina.

El alto contenido en prolina debe influir de forma importante en la conformación de esta proteína, impidiendo que adquiera estructuras tipo hélice α o hoja β . Probablemente la glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) adopta una conformación bastante extendida en condiciones desnaturalizantes. (Wang y Esen, 1986). Es posible que la gran diferencia observada entre el peso molecular real de la proteína (21.8 kD) y el observado en geles de poliacrilamida-SDS (28 kD) sea debido a esta conformación.

A partir del aislamiento y secuenciación de clones genómicos que codifican para esta proteína, glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2), (Boronat et al., 1986; Gallardo et al., 1987) se ha revelado que el gen carece de intrones. Asimismo se han identificado una serie de secuencias de control en las regiones no codificantes a 5' y 3' tipo "TATA-box" y "CAAT-box", situadas en las posiciones -104

y -141 respecto al codón de inicio de la traducción, y secuencias de poliadenilación (tres). En la región 5' no codificante se han encontrado algunas homologías con los genes de zeínas-I. Se interpreta que estas homologías podrían señalar secuencias implicadas en la regulación conjunta de ambos genes durante el desarrollo del endospermo.

Prat y col. (Prat et al., 1985) describen la existencia de homologías de secuencia entre la glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) y las prolaminas de trigo (Triticum) y de cebada (Hordeum). Asimismo, los mensajeros de estas proteínas presentan algunas características comunes, tales como el porcentaje de C+G en la secuencia y la distribución de las señales de poliadenilación en la región 3' no codificante. Por el contrario, las zeínas no tienen homología aparente con las prolaminas de trigo y cebada. Esto podría indicar un origen evolutivo común para la glutelina-2 y las prolaminas de trigo y cebada, independiente del origen de las zeínas. Estas últimas habrían desplazado funcionalmente las glutelinas-2 al convertirse en la principal familia de proteínas de reserva del endospermo de maíz.

La función de reserva que se asigna a las glutelinas-2 por su localización en los cuerpos proteicos se complementa con otra posible función estructural dentro de dichos orgánulos. Aplicando técnicas de inmunocitoquímica para microscopía electrónica (Ludevid et al., 1984; 1988) se encuentra que las glutelinas-2 se encuentran en la periferia del cuerpo proteico, rodeando a las zeínas que ocupan el lumen de estos orgánulos. El contenido en cisteína bastante elevado de la glutelina-2 (14 residuos de un total de 204) permitiría que se establecieran puentes disulfuro intra e intermoleculares que podrían dar lugar a estructuras macromoleculares en forma de red. El entramado de glutelinas-2 podría ayudar a mantener la estructura del cuerpo proteico. Esta hipótesis es apoyada en evidencias experimentales. Si las glutelinas-2 son extraídas de los cuerpos proteicos mediante

tratamiento con un agente reductor, estos orgánulos, normalmente de forma esférica o elipsoide, adquieren una forma irregular, a la vez que su membrana queda aparentemente deteriorada (Ludevid et al., 1984). El análisis de la estructura primaria de la glutelina-2 de 28 kD también argumenta en favor de esta hipótesis (Esen et al., 1982) : el hexapéptido (PPPVHL) que se repite 8 veces de forma casi perfecta. Se han descrito varias proteínas estructurales con secuencias repetidas. La gran conservación de la secuencia repetida en el caso de la glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) podría indicar que desempeña un importante papel en relación a la estructura y/o función de la proteína.

En el laboratorio Ludevid y col. (Ludevid et al., 1984) preparando anticuerpos policlonales contra la proteína glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) observaron que presentaba reacción cruzada, presencia de antígenos comunes, con la zeína de 16 kD (Z16, Zc1). El análisis de la secuencia de aminoácidos deducida de un clon de cDNA (Prat, 1986) confirmó la existencia de homología importante entre los dos polipéptidos. La proteína codificada en este cDNA comienza con un péptido de 19 aminoácidos cuya secuencia es muy similar a la del péptido señal de la glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2). Es muy probable que este segmento inicial actúe también como péptido señal y que la zeína de 16 kD (Z16, Zc1) sea procesada 'in vivo'. La estructura primaria del resto de la zeína de 16 kD (Z16, Zc1) puede dividirse en tres regiones. La región N-terminal, tiene una secuencia casi idéntica a la región 1 de la glutelina-2. La región C-terminal, correspondiente a las regiones 4 y 5 de la glutelina-2, también están muy conservadas. La región central de la zeína de 16 kD (Z16, Zc1) equivaldría a las regiones 2 y 3 de la glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2), y en ésta están prácticamente ausentes las secuencias repetidas, razón por la cual esta proteína es de menor tamaño (ver fig. 3.17). El tamaño de la proteína, 164 aminoácidos sin incluir el péptido señal, determina un peso molecular real de 17.8 kD, siendo el peso molecular aparente en geles de poliacrilamida-SDS de 16 kD,

menor, al contrario de lo que ocurre en el caso de la glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2). De ello se podría deducir que la presencia de regiones repetidas ricas en prolina en la glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) (ausentes en la zeína de 16 kD) afecta de modo importante a la conformación de la proteína y, consecuentemente, a su migración electroforética.

1.4.2.3 Regulación de la expresión de los genes de proteínas de reserva en el maíz

La regulación de la transcripción de las zeínas presenta tres aspectos interesantes :

1. La transcripción es específica de un tejido, produciéndose únicamente en el endospermo. Se ha demostrado (Sánchez-Martínez et al., 1987) la ausencia de síntesis de proteínas de reserva en el embrión de maíz. Existe un período en el desarrollo de la semilla en el cual se produce la síntesis de las zeínas, entre los días 10 y 50 después de la polinización, con un máximo alrededor del día 35 que puede variar ligeramente entre las diferentes subfamilias (Ingle et al., 1965; Marks et al., 1985b). La síntesis tiene lugar exclusivamente en la parte interior del endospermo. Durante el máximo de producción hasta el 85 % de los ribosomas totales de la célula se encuentran asociados con los cuerpos proteicos (Viotti et al., 1975).

2. El nivel de mRNA es modulado durante el desarrollo del endospermo y se correlaciona con un incremento espectacular del contenido de DNA en el núcleo (Kowles y Phillips, 1985).

3. Cualquier cambio que se produzca en el genoma no debe ser necesariamente reversible, a diferencia de la regulación de muchos otros genes, puesto que las células del endospermo

son terminales, en contraste con las del embrión.

El estudio de las señales reguladoras en los genes de plantas se inició a partir de los resultados obtenidos en los genes de animales y de virus que se desarrollan sobre éstos. La determinación de dos secuencias del virus del mosaico de la coliflor (Frank et al., 1980; Gardner et al., 1981) que se expresan en el núcleo vegetal han supuesto una importante contribución al conocimiento de la regulación de los genes en plantas. También, ha sido importante el estudio de las familias multigénicas. Los patrones de divergencia y conservación de los diferentes miembros de la familia aportan información acerca del funcionamiento de la familia completa, y de los genes en general. Rasgos esenciales a todos los miembros de la familia se conservan en cada uno de ellos, presentando divergencia las secuencias no esenciales. Asimismo pequeñas variaciones en las secuencias conservadas pueden permitir elucidar el modo en que operan los distintos mecanismos. A pesar del número limitado de cambios posibles en las secuencias de las poblaciones naturales suministran información valiosa para diseñar los experimentos de mutagénesis que permitirían comprobar las hipótesis sobre la regulación.

Sobre las secuencias flanqueantes en la región 5' de los genes de zeínas se conocía poco en el momento en que se inició el trabajo que se describe en esta memoria (1985). Fundamentalmente se restringía a la comparación de las zonas flanqueantes 5' de los clones cDNA, y a los pocos clones genómicos descritos.

1.4.2.3.1 Regulación transcripcional

El primer requerimiento para la expresión de un gen determinado es que se encuentre en estado "activo". Esta activación depende de factores como la estructura de la cromatina

y el nivel de metilación de su DNA. El DNA de los genes que se transcriben activamente en un determinado tejido está menos protegido por el complejo nucleosomal, algo que se deduce por su sensibilidad preferencial a nucleasas. El grado de metilación parece ser también un factor que acompaña a la expresión de un gen, observándose, en general, que genes que no se expresan presentan un alto grado de metilación.

La transcripción de un gen activado se puede controlar en la etapa de iniciación de la transcripción, por la interacción de la RNA polimerasa con su promotor, en secuencias específicas mediatizada o no por proteínas de función reguladora. Tanto en vegetales como en animales se han identificado secuencias muy conservadas en el DNA, localizadas próximas al gen en la región 5' no codificante. Estas secuencias que se han denominado "TATA box" y "CAAT box" son reconocidas por la RNA polimerasa para el inicio de la transcripción. La secuencia consenso para la "TATA box" y su región circundante obtenida del análisis de 79 secuencias de genes de plantas (Joshi, 1987) es TCACTATATATAG, aunque se observan diferencias con la secuencia consenso derivada de los genes de proteínas de reserva de cereales (12 secuencias analizadas) que es TAACTATAAATAG. Estos cambios en las secuencias consenso en diferentes tipos de genes pueden reflejar una diferente capacidad de respuesta a diferentes estímulos. Un ejemplo de lo anterior corresponde al trabajo de Keith y Chua (Keith y Chua, 1986) que describen el hecho de que el promotor de la subunidad pequeña de la ribulosa di-fosfato carboxilasa en trigo no puede transcribir de modo eficiente en un entorno celular de dicotiledóneas, mientras que el promotor de la subunidad pequeña de la ribulosa difosfato carboxilasa de guisante lo hace muy eficientemente. En este caso se observan claras diferencias en las regiones flanqueantes a las respectivas "TATA box".

Respecto a la secuencia consenso para el lugar de inicio de

50 introducción

la transcripción en los eucariotas, Breatnach y Chambon (Breatnach y Chambon, 1981) proponen PyAPyPy. En plantas se ha descrito la secuencia consenso CTCATCA, presentándose, como en el caso de la "TATA box", variaciones como por ejemplo para los genes de las proteínas de reserva de los cereales : ATCATCA (Joshi, 1987). Las secuencias "leader" (transcritas y no traducidas), de una longitud entre 40 y 80 nucleótidos son regiones muy ricas en A + T, hecho que apoya la hipótesis del "mecanismo de scanning" (Kozak, 1981b) según el cual se formarían de este modo estructuras secundarias más lábiles, que no impedirían el reconocimiento por la RNA polimerasa.

1.4.2.3.2 Regulación traduccional.

Heidecker y Messing (Heidecker y Messing, 1986) describen en la región 5' de los clones cDNA de zeínas la presencia de una secuencia de 11 nucleótidos que se repite hasta 4 veces. Proponen que estos repetidos podrían explicar la eficiencia con la que los mRNAs de zeínas se traducen facilitando el reclutamiento de ribosomas totales o de una fracción específica, como por ejemplo los ligados a membranas.

El codón de inicio en las zeínas en todos los casos es el primer triplete AUG sobre el mRNA tal y como describe Kozak (Kozak, 1981a; 1981b; 1984), y 20 a 21 codones por delante del inicio de la secuencia de la proteína madura, lo cual está de acuerdo con el hecho de la existencia de precursores con un peso molecular 2500 superior (Burr y Burr, 1981). A partir de las secuencias 5' flanqueantes de todos los clones de zeínas descritos (ver tabla 1.4) se ha obtenido la secuencia consenso flanqueante al inicio de traducción PuCAAPyANPyNUANCAACAAUGGCN. Obviamente sería de esperar un grado superior de homología entre los miembros de una familia multigénica que entre genes no relacionados. Las diferencias son pequeñas entre las subfamilias,

CLON	TIPO	SECUCENCIA	REFERENCIA
ZN7	genómico	G C A A C T T C C T A A C A A C A A <u>A T G G C T</u>	Kridl et al, 1984
ZA1	genómico	G C A A C G A C C T A A C A A C A A <u>A T G G C T</u>	Spena et al, 1982
Z22.1	cDNA	G C A A C G A C C T A A C A A C A A <u>A T G G C T</u>	Marks et al, 1982
Z22.3	cDNA	C A A C C T A A C A A C A A <u>A T G G C T</u>	Marks et al, 1982
Z22A1	cDNA	G C A A C G A C C T A A C A C C A A <u>A T G G C T</u>	Marks et al, 1985
pNL1	genómico	G C A A C G A C C T A A C A A C A A <u>A T G G C T</u>	Langridge y Peix, 1983
pcM1	cDNA	G C A A C G A C T T A A C A A C A A <u>A T G G C T</u>	Spena et al, 1982
ZN4	genómico	A C A A T A T T G T A C C A A T A A <u>A T G G C A</u>	Hu et al., 1982
Z19B1	cDNA	A C A A T A G T G T A C C A A C A A <u>A T G G C A</u>	Marks et al, 1985
ZG99	genómico	A C A A T A T T G T A C C A A T A A <u>A T G G C A</u>	Pedersen et al, 1982
Z19.1	cDNA	A C A A T A T T G T A C C A A T A A <u>A T G G C A</u>	Pedersen et al, 1982
ZG7	cDNA	A C A A T A G T G T A C C A A C A A <u>A T G G C A</u>	Heidecker y Messing, 1983
ZG124	cDNA	A C A A T A G T G T A C C A A C A A <u>A T G G C A</u>	Heidecker y Messing, 1983
ZB19	genómico	A C A A T A G T G T A C C A A C A A <u>A T G G C A</u>	Spena et al, 1983
ZB25	genómico	G C A A T A G T G T A G C A A C A A <u>A T G G C A</u>	Spena et al, 1983
Z19D1	cDNA	G C A A C A T C T T A G C A C C A A <u>A T G G C A</u>	Marks et al, 1985
A20	cDNA	G C A A C A A C A G A G C A A C A A <u>A T G G C G</u>	Geraghty et al, 1982
ZG14	cDNA	G C A A C A A T A G A G C A A C A A <u>A T G G C G</u>	en prep.
ZG15	cDNA	G C A A C A A T A G A G C A A C A A <u>A T G G C G</u>	en prep.
Z19C2	cDNA	G C A A C A A T A G A G C A A C A A <u>A T G G C G</u>	Geraghty et al, 1982
Z18C1	cDNA	G C A A C A A C A G A G C A A C A A <u>A T G G C G</u>	Geraghty et al, 1982

consenso PuC A A PyA N PyN T A N C A A C A A A T G G C N

Tabla 1.4 : Secuencias de inicio de traducción, y zona flanqueante de los genes de zeínas. Las zonas 5' no traducidas de los genes de zeínas se han agrupado en tres categorías, definidas por el segundo codón de la secuencia traducida, que en todos los casos corresponde a alanina, pero que puede ser GCT, GCA y GCG (tomada de Heidecker y Messing, 1986).

sin embargo en las posiciones -6, -9 y -11 cada subfamilia muestra diferentes nucleótidos casi exclusivamente. Esto puede deberse a que estas posiciones no juegan ningún papel en el mecanismo de reconocimiento del inicio de traducción o bien a que hay diferentes señales para cada subfamilia, y no se dispone de información sobre la eficiencias de traducción de cada subfamilia de mRNA de zeínas como para diferenciar entre ambas. Asimismo se desconoce si la conservación de posiciones alejadas como -16 es resultado de una conservación de la secuencia restringida a la familia multigénica o bien es característico de la secuencia de reconocimiento. Si comparamos con las secuencias flanqueantes de otros genes de plantas y eucariotas en general, así como con las secuencias descritas por Kozak (Kozak, 1984) la secuencia consenso de iniciación es mucho menos severa : NNNNANA/UNU/AANNNN ANNAUGCU, lo que demuestra unos diferentes requerimientos de secuencia entre animales y plantas. Resultados de unión de oligonucleótidos sintéticos a ribosomas de germen de trigo (Kozak, 1981) apoyan los requerimientos observados en la secuencia consenso de inicio de traducción en plantas.

Heidecker y Messing (Heidecker y Messing, 1986) describen una preferencia por G en la posición +4 y de C en la posición +5 de los genes de plantas, lo que conduce a que las mayor parte de los genes estudiados se incien con el dipéptido metionina-alanina. Este hecho fue observado también en los genes de animales aunque es menos pronunciado (20 %). La frecuencia del dinucleótido GC en genes de plantas y animales es el producto de las frecuencias de los nucleótidos sencillos. Posiblemente la eficiencia y estabilidad con la que el segundo tRNA puede unirse al complejo de traducción es importante para la asociación con la subunidad 60S del ribosoma, y de este modo podría influir en la iniciación y en la eficiencia de traducción. La constante de unión del segundo tRNA será dependiente de la composición del codón y de la concentración del tRNA en la célula. Es de interés señalar que el segundo codón en los genes de zeínas, que en todos

los casos codificaba para alanina, varía en su tercera posición para cada una de las subfamilias. La accesibilidad de cada uno de los distintos tRNA durante el desarrollo podría influir en la expresión de las distintas subfamilias de zeínas.

1.4.2.3.3 Señales de poliadenilación

Las señales de poliadenilación se localizan de 15 a 23 nucleótidos antes del final del mRNA. En muchos genes de plantas se han descrito más de una copia de las señales consenso para poliadenilación (Messing et al., 1983) como alguno de los genes animales conocidos (Setzer et al., 1980). El papel de los múltiples sitios de poliadenilación y el mecanismo que, si existe, controla la elección de uno u otro no se conoce. A pesar de que en los sistemas animales la secuencia consenso está muy conservada (AAUAAA) no es así en las plantas (ver tabla 1.5). Los genes de zeínas presentan hasta tres secuencias diferentes y, en algunos casos, la secuencia variante es la preferida, a pesar de que esté en ocasiones precedida de la secuencia canónica. En muchos casos la segunda secuencia canónica es la reconocida, aunque en los clones cDNA ZG7 y ZG19 de la subfamilia A30 de las zeínas-I la poliadenilación no ignora ninguna secuencia (Heidecker y Messing, 1983). Al comparar estos clones cDNA con otros de la misma subfamilia que emplean la segunda señal de poliadenilación se observan diferencias en la secuencia que afectan a una estructura en "hairpin" que podría formarse potencialmente alrededor de la señal de poliadenilación (ver figura 1.4). En los transcritos de otros genes de plantas se han descrito la existencia de estructuras similares (Goldberg et al., 1983; Lycett et al., 1984; Rafalsky et al., 1984). Se ha propuesto la existencia de una estructura similar en los transcritos tardíos del adenovirus (Le Moullec et al., 1983).

1.4.2.3.4 Regulación genética

Se sabe que la expresión de las zeínas en el endospermo está controlado por una serie de loci que actúan sobre la tasa de acumulación de estas proteínas (Mertz et al., 1964; Salamini et al., 1979; Manzocchi et al., 1980). En los endospermos de tipo

NUCLEOTIDO	VENTANA						
	-3	-2	-1	U	1	2	3
A	21	47	47	-	47	47	28
C	7	-	1	-	-	-	3
G	8	-	-	-	1	-	10
U	12	1	-	-	-	1	7
consenso	A/U 69%	A 98%	A 98%	U -	A 98%	A 98%	Pu 79%

Tabla 1.5 : Señal consenso de poliadenilación en plantas. Deducida de 47 mRNAs de plantas de extremo 3' conocido, de las cuales se alinearon las secuencias de 7 nucleótidos con parecido a la secuencia AAUAAA localizadas entre 15 y 35 nucleótidos antes del extremo 3'. Se midió la frecuencia de distribución de cada nucleótido para cada una de las posiciones. En la secuencia consenso se expresa la frecuencia (en porcentaje) con la que el nucleótido mayoritario se localiza en esa posición (tomado de Heidecker y Messing, 1986).

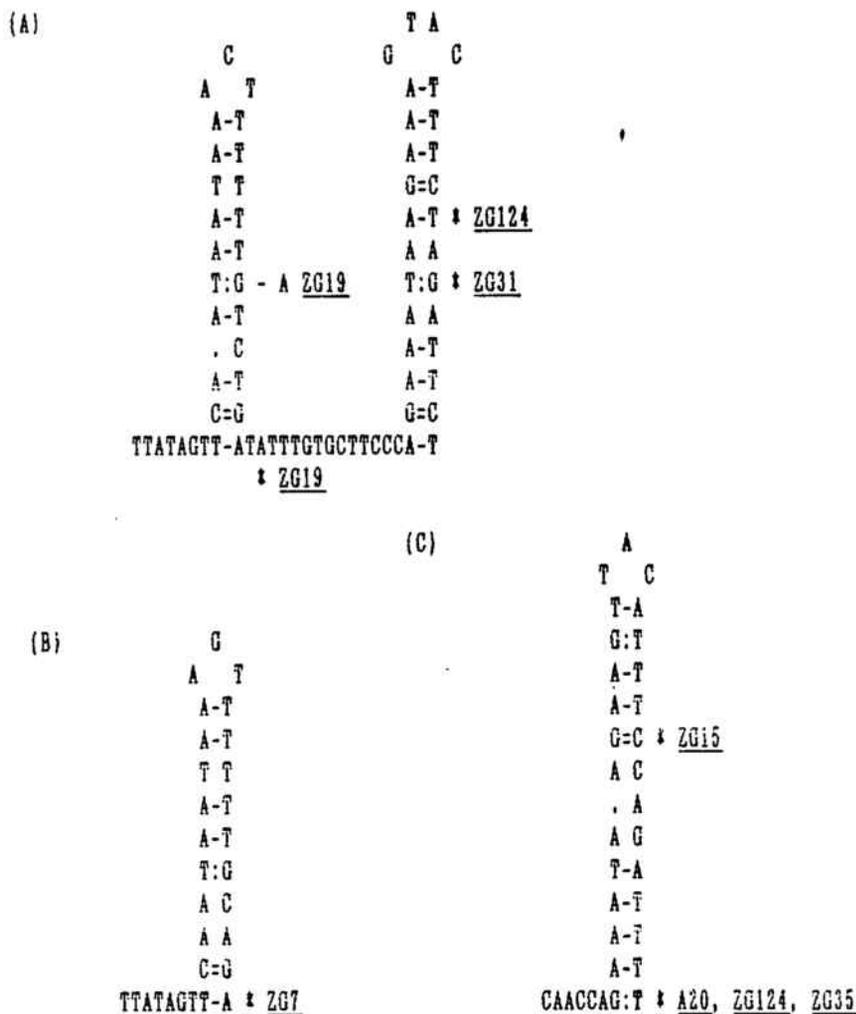


Figura 1.4 : Estructuras secundarias en la región 3' no traducida de algunos clones de zeínas. Las secuencias de poliadenilación se señalan con *. Tomado de Heidecker y Messing (1986).

(A) Estructura secundaria que pueden formar aquellos clones agrupados en la subfamilia A30, con la excepción de ZG7. La estabilidad es de G de +4.0 para A30 y de -1.1 para ZG19. La segunda estructura presenta una estabilidad de -4.8.

(B) Estructura secundaria que pueden formar aquellos clones agrupados en la subfamilia A20. La estabilidad es de G +3.8.

(C) Estructura secundaria que se puede formar en la zona distal 3' de los clones de la subfamilia A20. La estabilidad es -1.1.

salvaje los polipéptidos de las zeínas aparecen simultáneamente alrededor del día 15 después de la polinización, y se acumulan de modo sincrónico. Se conocen mutantes que alteran el momento de inicio de la síntesis y su tasa de acumulación (ver tabla 1.6). Estos mutantes se han clasificado en dos clases en función de que afecten a la totalidad de las zeínas o bien que actúen más específicamente sobre algunos de sus componentes (para una revisión ver Soave y Salamini, 1984b). Todos estos mutantes confieren un fenotipo opaco al grano de maíz. Los loci se han denominado reguladores, en sentido amplio, debido a que, a pesar de no codificar para polipéptidos de zeínas, su mutación afecta los niveles de éstas.

Estos mutantes fueron aislados y estudiados por su superior contenido en lisina, a pesar de que el contenido en proteína total era menor y el rendimiento de los cultivos escaso. Se han caracterizado mutantes altos en lisina en cebada (Ingversen et al., 1973) y sorgo (Axtell, 1975) y en ambos casos se deprimen la síntesis de prolaminas.

El mutante opaco-2 (o2, Mertz et al., 1964) y Endospermo defectivo B30 ("Defective endosperm-B30", De-B30, Salamini et al., 1979) reducen preferencialmente el nivel de las Z22-21. El mutante opaco-7 (o7) reduce especialmente el nivel de las Z19, mientras que los mutantes floury-2 (fl-2, Nelson et al., 1965), Mucronate (Mc, Salamini et al., 1983) y opaco-6 (o6, Ma y Nelson, 1975) suprimen la síntesis de todas las zeínas con la misma efectividad. La producción disminuida de polipéptidos de zeínas en estos mutantes es el resultado de una población disminuida de mRNA de zeínas en los endospermos o2, o7 y fl2 y un nivel inferior de mRNA traducible en o6, Mc y De-B30 y en el doble mutante o2Mc. Se han investigado las interacciones entre algunos de los dobles mutantes sobre la producción de zeínas. Así se observó (Di Fonzo et al., 1980) que o2 y o7 son epistáticos sobre fl2 pero la acción de o2 es independiente de la de o7 ó Mc

(DiFonzo et al., 1979; Fornasari et al., 1982; Salamini et al., 1983). Estos resultados sugieren la existencia de múltiples vías de regulación implicadas en la síntesis de las zeínas. Al menos una de ellas estaría relacionada con la síntesis de las Z22-21 y la otra con la clase Z19, estando los mutantes o2 y o7 implicados en la primera y la segunda respectivamente.

LÓCUS	LOCALIZACION CROMOSOMICA	TIPO DE HEREDENCIA	INHIBICION DE ZEINAS	ESPECIFICIDAD	OTRAS PROPIEDADES
Opaco-5 (O6)	desconocida	recesiva	38.5 %	no específico	ausencia de la proteína b-32
Opaco-7 (O7)	cr. 10 L	recesiva	77.5 %	sobre 22 kD	--
Opaco-2 (O2)	cr. 7 Sh	recesiva	47.0	sobre 19 kD	ausencia de la proteína b-32 - RNasa alta
Floury-2 (F1-2)	cr. 4 Sh	semidominante	34.6	no específico	incrementada la proteína b-70 cuerpos proteicos alterados
Mucronate (Mc)	desconocido	dominante	29.0	no específico	incrementada la proteína b-70
Endospermo defectivo B-30 (De-B30)	cr. 7 Sh	dominante	12.0	sobre 22 kD	Incrementada la proteína b-70

Tabla 1.6 : Propiedades de los alelos mutantes de los loci que controlan la deposición de los componentes de las zeínas (tomado de Soave y Salamini, 1984b).

El mecanismo de acción de estos loci a nivel molecular es desconocido. Sin embargo es muy probable que lo hagan mediante factores difusibles pues controlan genes estructurales de zeínas que se encuentran dispersos en el genoma del maíz (ver figura 1.3).

Resultados muy recientes (Schmidt et al., 1989; DiFonzo et al., 1989) describen el aislamiento de clones cDNA y genómicos del locus o2 en maíz empleando elementos transponibles (Spm y 58 introducción

Ac). La secuencia del gen ha sido descrita (DiFonzo et al., 1989) y a partir de esta se deduce una secuencia aminoacídica de 499 residuos. La traducción "in vitro" del transcrito O2 en un sistema de reticulocito produce un polipéptido con un peso molecular aparente de 58000 en geles de poliacrilamida-SDS. Schmidt y col. (Schmidt et al., 1989) describen el cDNA, que presenta una secuencia no traducida larga con 3 codones AUG que preceden al codón de inicio funcional. Cada uno de ellos está seguido por una secuencia corta que presenta una pauta de lectura abierta y que termina con un codón de paro en fase. Este hecho, unusual, se ha descrito en el gen regulador de la levadura GCN4 y en algunos oncogenes de mamíferos y se desconoce su función.

1.4.2.4 Síntesis y deposición de las proteínas de reserva en el maíz

Las zeínas son sintetizadas en el endospermo de maíz entre los días 12 y 50 después de la polinización (Larkins et al., 1984). Observaciones al microscopio electrónico de endospermos en este periodo muestran un gran desarrollo del retículo endoplasmático rugoso (Larkins, 1981). Los cuerpos proteicos comienzan a aparecer en las células del endospermo alrededor de 12 a 15 d.d.p., y aumentan en número y tamaño a partir de entonces, hasta alcanzar un diámetro de 1 a 2 μm con una forma aproximadamente esférica. Estos orgánulos están rodeados de una membrana que posee gran cantidad de polisomas adosados.

Se ha observado que existe continuidad física entre la membrana del retículo endoplasmático rugoso y la de los cuerpos proteicos en formación (Khoo y Wolf, 1970; Larkins y Hurkman, 1978). Se conoce, a partir de los resultados de estudios de fraccionamiento subcelular y traducción 'in vitro', que las zeínas-1 (Z21-22 y Z19, Zd2 y Zd1) se sintetizan en polisomas unidos a la membrana del retículo endoplasmático rugoso (Larkins y Dalby, 1975; Torrent et al., 1986), como en polisomas unidos a

la membrana de los cuerpos proteicos (Burr y Burr, 1976). El hecho de que los productos de traducción 'in vitro' obtenidos a partir de los dos tipos de polisomas son equivalentes apoyan la idea de que no existe diferenciación funcional entre la membrana del retículo endoplasmático rugoso y la de los cuerpos proteicos (Larkins y Hurkman, 1978). El lugar de síntesis de zeínas y glutelinas en la célula del endospermo de maíz, retículo endoplasmático rugoso, es al mismo tiempo el lugar de deposición. El único paso de transporte intracelular implicado en el proceso de deposición de las proteínas de reserva del maíz es la translocación cotraduccional a través de la membrana del retículo endoplasmático rugoso o del cuerpo proteico (Campos, 1988) . A partir de estos datos se ha concluido que los cuerpos proteicos son simples acúmulos de proteínas de reserva en el interior del retículo endoplasmático rugoso.

Se conoce, del estudio de las secuencias N-terminales y de las secuencias deducidas de los clones cDNA y genómicos, que los productos de traducción primarios correspondientes a estas proteínas son portadores de una secuencia o péptido señal de 21 aminoácidos (Spena et al., 1982). La presencia de un péptido señal en la proteína es un requisito indispensable para que ésta sea dirigida hacia la membrana del retículo endoplasmático rugoso y, para que, a continuación, pueda ser translocada a través de dicha membrana.

Burr y Burr (Burr y Burr, 1981) desarrollaron un sistema de traducción-translocación 'in vitro' para estudiar el procesamiento de las zeínas-I. Formado básicamente por tres elementos : extracto de germen de trigo como medio de traducción, mRNA poliA⁺ que codificaba para zeínas-I y microsomas derivados del retículo endoplasmático rugoso de endospermo de maíz. Estos autores observaron que los productos de traducción obtenidos a partir del mRNA, en ausencia de microsomas, tenían una movilidad electroforética en geles de poliacrilamida-SDS menor que las

zeínas extraídas del grano maduro (Burr et al., 1981). Por contra, en presencia de microsomas los productos de traducción presentaban la misma movilidad electroforética que los extraídos del grano. Estos productos de traducción eran translocados al interior de los microsomas. La combinación en traducción de microsomas tratados con nucleasa (sin polisomas propios) y de mRNA de endospermo de maíz permitió reconstituir el sistema de translocación : parte de los productos de traducción eran translocados al interior de los microsomas y procesados. Estos resultados demostraron que las zeínas-I son translocadas y procesadas en las células de endospermo de maíz. Se pudo concluir, por tanto, que la translocación de zeínas-I a través de la membrana del retículo endoplasmático rugoso o del cuerpo proteico es un paso esencial en el proceso de deposición de estas proteínas.

La biosíntesis de la glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) y de las zeínas de bajo peso molecular no ha sido estudiada por el momento. Estas proteínas poseen un péptido señal en su extremo N-terminal y son almacenadas en los cuerpos proteicos. Sería posible, por tanto, que su síntesis se produjera en polisomas unidos a la membrana del retículo endoplasmático rugoso y que el proceso de almacenamiento de estas proteínas fuera similar al de zeínas-I. Sin embargo, esto no puede ser asumido sin comprobación previa. Alguna de estas proteínas (por ejemplo la glutelina-2 de 28 kD, G2, Zc2) podría ser insertada en la membrana del retículo endoplasmático rugoso, en vez de ser translocada a través de ella. Tampoco se puede descartar la posibilidad de que la glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) o las zeínas de bajo peso molecular sean sintetizadas en polisomas libres, ya que se han descrito casos de proteínas que pueden ser sintetizadas 'in vitro' en ausencia de microsomas e insertadas en la membrana de estas vesículas post-traduccionalmente (Mueckler y Lodish, 1986).

El proceso de deposición de zeínas-I en el endospermo de

maíz parece tener una estrategia sumamente simple. Los péptidos son sintetizados en polisomas unidos a la membrana del retículo endoplasmático rugoso y translocados a través de la bicapa lipídica. La formación de acúmulos de zeínas en el lumen de este orgánulo se corresponde con la aparición de vesículas (cuerpos proteicos) que finalmente se independizan del retículo endoplasmático. La membrana de los cuerpos proteicos conserva sus polisomas unidos y estos continúan sintetizando zeínas. De este modo, el lugar de síntesis de zeínas (membrana del retículo endoplasmático rugoso) es al mismo tiempo el lugar de deposición (retículo endoplasmático rugoso o cuerpos proteicos). No es necesario que estas proteínas de reserva sean transportadas desde el retículo endoplasmático rugoso hasta los cuerpos proteicos, como así ocurre por ejemplo en las leguminosas. Así pues, el transporte intracelular de zeínas-I en la célula del endospermo de maíz se reduce a la mínima expresión : translocación co-traduccionaI a través de la membrana del retículo endoplasmático rugoso.

1.5 PRELIMINARES

El trabajo que se presenta se inscribe en la línea de investigación que sobre proteínas de reserva del maíz se inició en 1982 en el Instituto de Biología de Barcelona y que prosigue actualmente en el Departamento de Biología Molecular y Agrobiología del Centro de Investigación y Desarrollo (figura 1.5).

En el momento de iniciar este trabajo el estudio de las proteínas de reserva a nivel génico en nuestro laboratorio se abordaba por dos vías :

1. Aislamiento de clones cDNA. Se procedía a la búsqueda y caracterización de clones cDNA que codificaran para glutelinas-2 y zeínas 2 de 15 kDa. En el laboratorio S. Prat y J. Cortadas aislaron mediante anticuerpos anti-glutelina-2 sobre un banco de cDNA preparado a partir de RNA-poliA⁺ de la variedad híbrida E10, clones cDNA que correspondían a dos grupos de homología. El primero de ellos, formado por los clones pME119, pME792 y pME125, codificaba para glutelina-2 (Prat et al., 1985). El segundo grupo de clones correspondía, por hibridación-selección, a una zeína-2 de 15 kDa (Prat, 1986). De este segundo grupo sólo se disponía de clones parciales, el más largo de los cuales era pME117. Asimismo se disponía en el laboratorio de otros clones cDNA (A20, A30, B36, B49 y B59) (Messing et al, 1983) (Tabla 1.7), correspondientes a las proteínas de 19-22 kDa, cedidos por el Dr. B. Burr del Brookhaven National Laboratory de Upton, New York.
2. Aislamiento de clones genómicos. El Dr. A. Boronat construyó en el laboratorio una genoteca de DNA de endospermo de maíz, de la variedad pura W64A. La construcción se realizó por digestión parcial del DNA genómico de grano a 21 días

después de la polinización con EcoRI, y posterior clonaje en el vector lambda sep6 lac5 (Maniatis et al., 1982). A partir de 200.000 u.f.p. se aislaron 4 señales positivas a la sonda pME119. El mapa de restricción revela que los cuatro aislamientos son idénticos. Se procedió a la caracterización del aislamiento lambda-ZG1. En el año 1985, fecha de inicio de los trabajos descritos se procedía al subclonaje de algunos fragmentos, mapado fino del inserto positivo a la sonda pME119 y diseño de una estrategia de secuenciación. Los resultados de este trabajo se describen en Boronat et al. (1987).

Con la finalidad de buscar otros genes de proteínas de reserva los Dres. A. Boronat y J. Rigau a lo largo de 1984 construyeron una nueva genoteca de DNA de endospermo de la variedad W64A, por restricción parcial Sau3AI y clonaje en la diana BamHI del vector lambda Charon-35 (Loenen y Blattner, 1983; Gallardo et al. 1988). La gran complejidad del genoma del maíz ($5 \cdot 10^9$ bp, Bennet y Smith, 1976, Pedersen et al., 1980) y la riqueza de secuencias repetidas hacen aconsejable la utilización de un vector que admita fragmentos grandes (15-20 kbp) y que siendo capaz de crecer sobre cepas recA⁻ reduzca la probabilidad de recombinaciones en el inserto. El número de recombinantes necesarios para obtener una genoteca representativa (99% de probabilidad de aislar una secuencia concreta) en estas condiciones es $1 \cdot 10^6$ para el maíz (Maniatis et al, 1982). Se obtuvieron en dos experimentos de empaquetamiento 'in vitro' independientes 1.2×10^6 u.f.p. El procedimiento de construcción de la genoteca se describe en la figura 1.6.

Figura 1.5 : Proyecto de Biología Molecular. Esquema global del proyecto de Biología Molecular de las Proteínas de Reserva del maíz que se desarrolla en el Dept. de Biología Molecular y Agrobiología del Centro de Investigación y Desarrollo del C.S.I.C. en Barcelona, y en el cual (recuadrado) se incluye el trabajo que se presenta.

Figura 1.6 : Construcción de una genoteca de DNA de maíz de la variedad W64A de 20 días después de la polinización, en el vector lambda Charon 35 (Gallardo et al., 1988)

A. Esquema general de construcción de la genoteca.

B.

1. Control del DNA del vector, lambda Charon 35.

a : DNA del bacteriófago lambda cI857

b : DNA del bacteriófago lambda Charon-35

2. Productos de restricción del vector lambda Charon-35.

m : marcador peso molecular lambda cI857 HindIII

a : DNA lambda Charon-35 BamHI

3. Cinética de restricción parcial con Sau3AI del DNA de maíz.

m : marcador peso molecular lambda cI857 HindIII

1 a 4 DNA genómico de maíz digerido con Sau3AI 10, 13, 17 y 20 minutos.

4. Fraccionamiento del DNA genómico de maíz digerido parcialmente con Sau3AI en gradiente de sacarosa del 5 al 20%.

m : marcador peso molecular lambda cI857 HindIII

1 a 15 : fracciones del gradiente 1, 3, 6, ... 42

Se eligieron para la construcción las fracciones desde la 12 (15%) a la 21 (11.25% sacarosa).

5. Fraccionamiento del DNA de lambda Charon-35 BamHI en gradiente de sacarosa del 5 al 20%.

m : marcador peso molecular lambda cI857 HindIII

1 a 15 : fracciones del gradiente 1, 3, 6, ... 42

Se eligieron para la construcción las fracciones desde la 9 (15.6%) a la 15 (12.6% sacarosa).

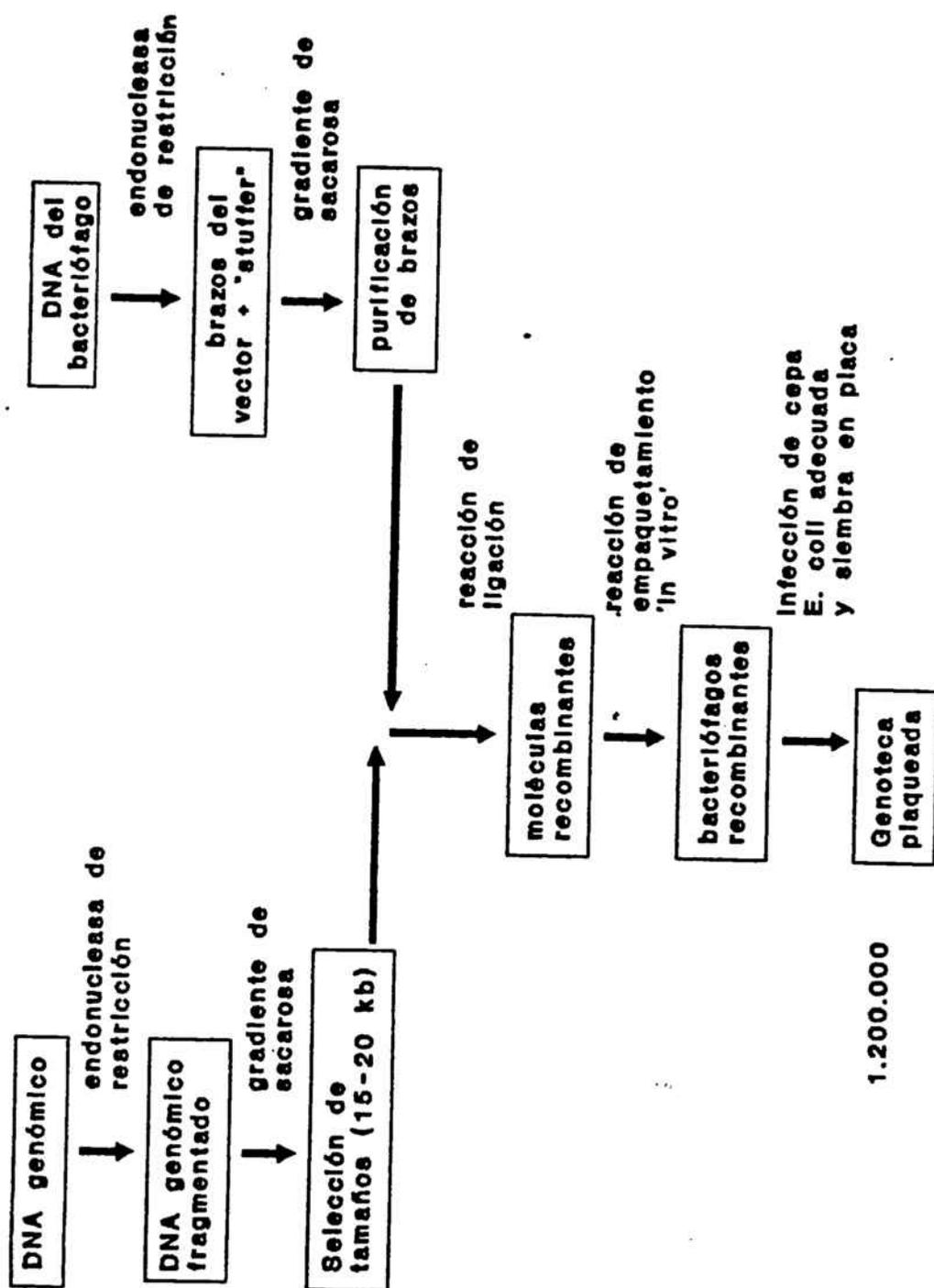
6. Control de ligación, 3 experimentos independientes.

a : DNA del bacteriófago lambda cI857.

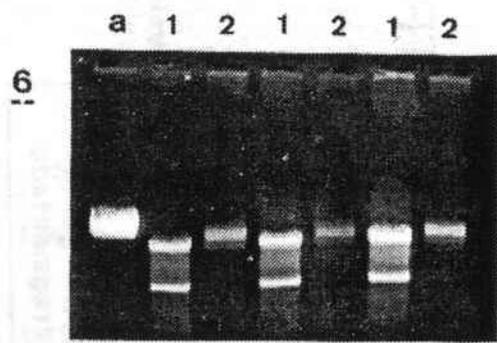
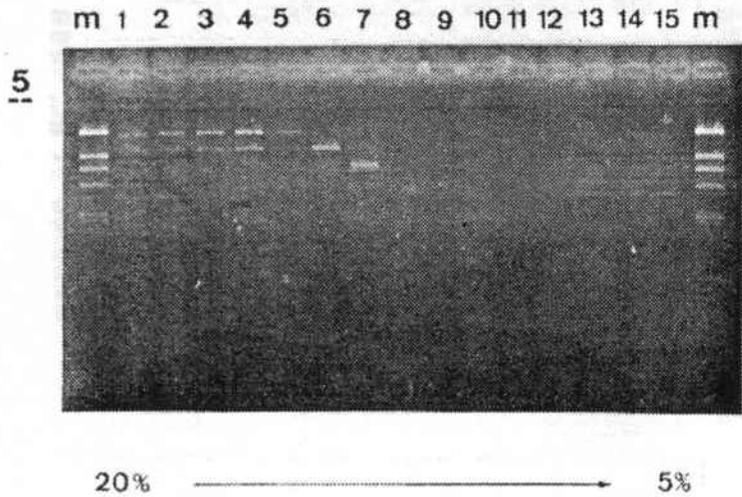
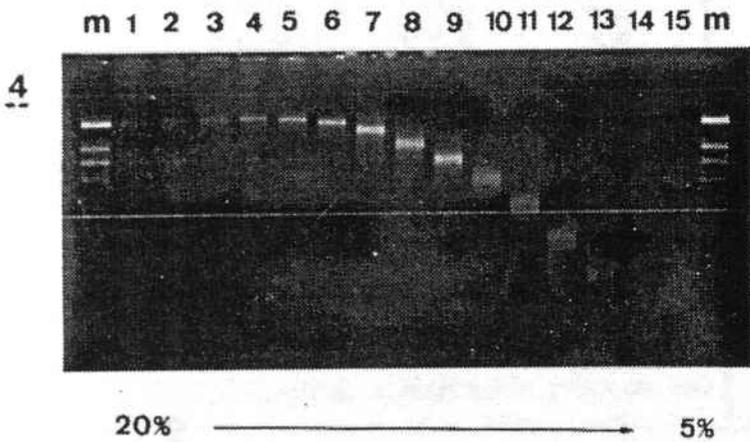
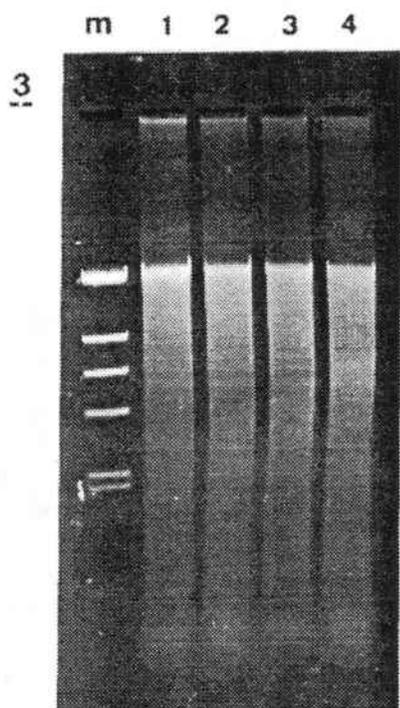
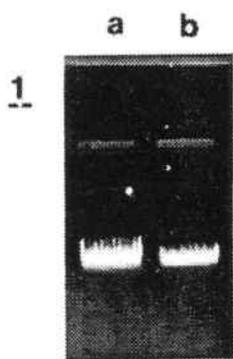
1 : DNA genómico maíz Sau3AI (15 a 20 kbp) + brazos del vector lambda Charon-35, antes de ligar.

2 : DNA genómico maíz Sau3AI (15 a 20 kbp) + brazos del vector lambda Charon-35, después de ligar.

CONSTRUCCION GENOTECA DE DNA DE MAIZ (vector lambda Charon-35)



1.200.000



1.6 OBJETIVOS DE LA TESIS

El objetivo fundamental de esta Tesis ha sido contribuir al conocimiento de la estructura de dos genes de las proteínas de reserva del maíz, así como elucidar elementos cis-putativos en las zonas flanqueantes. Como se ha descrito en la Introducción, el trabajo que se describe en la memoria se incluye en un proyecto global de estudio de la estructura y regulación de los genes de las proteínas de reserva del maíz. En una primera etapa se había procedido al aislamiento de los clones cDNA, y, para abordar la regulación de los genes era conveniente disponer de la mayor extensión posible de zona flanqueante. En este contexto, se fijaron como objetivos de la presente Tesis los siguientes :

1. Aislamiento y caracterización de clones genómicos codificantes para las proteínas zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) y glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2), del maíz, homólogos respectivamente a los clones de cDNA pME117 y pME119.
2. Determinación de características básicas de dichos clones genómicos tales como el posicionamiento dianas flanqueantes en el genoma, el número de copias presentes por genoma haploide y su localización cromosómica.

El estudio de las secuencias de proteínas de reserva del maíz descritas en el momento de iniciar este trabajo permite observar la confusión presente en la nomenclatura y en los criterios que se emplean para la clasificación. Estos criterios basados fundamentalmente en procedimientos técnicos de extracción o purificación no informan de las posibles relaciones evolutivas entre los diferentes grupos de proteínas. Por ello, y a partir de las abundantes descripciones de genes codificantes para este tipo de proteínas que se han descrito los últimos años se plantea el tercer objetivo de la presente Tesis :

3. Establecer una clasificación de las proteínas de reserva del maíz, que tenga en cuenta relaciones de tipo evolutivo entre ellas y con otras proteínas de reserva de cereales, lo cual representa una contribución al establecimiento de superfamilias de proteínas de reserva de cereales.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1 MAÍZ

La especie objeto de este estudio es el maíz (Zea mays L.), planta monocotiledónea del Orden de las Poales, familia Gramineae. Se ha utilizado la variedad W64A, línea pura obtenida por autopolinización manual durante más de 20 generaciones. Dicha variedad es una de las más utilizadas actualmente en estudios de biología básica del maíz disponiéndose de abundante información sobre ella así como de numerosos mutantes. La elección de una línea pura como sistema de estudio se justifica por la necesidad de simplificar al máximo el modelo. Hay que tener en cuenta que las proteínas de reserva mayoritarias en el maíz están codificadas por familias multigénicas de notable complejidad (Hagen y Rubenstein, 1981; Larkins, 1983).

El momento del desarrollo del grano escogido para el estudio ha sido entre 20 y 25 días después de la polinización. Se escogió este período por tres razones primordiales. En primer lugar la síntesis de las proteínas a estudiar se encuentra en una fase muy activa; en segundo lugar, el grano ha alcanzado ya un tamaño suficiente que permite su manipulación; y en tercer lugar, no se ha llegado aún a la fase de degeneración celular del endospermo previa a la desecación del grano. Los núcleos de las células del endospermo son muy activos y de este tejido se puede obtener DNA y RNA con rendimientos elevados.

Las plantas se cultivaron en los campos experimentales de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona fundamentalmente. También se ha empleado material procedente de cultivos realizados en el "Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura" de Bérgamo, Italia. Cuando la flor femenina estaba madura se autopolinizaba manualmente, recogiendo las mazorcas 20 ó 25 días después. Las mazorcas se congelaban inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaban a -70 °C durante largos períodos de tiempo (en algunos casos más de dos años).

Para aislar los endospermos y embriones se desgranaban las mazorcas sobre nieve carbónica, de donde se tomaban para diseccionar, eliminando testa y pericarpio y separando embriones de endospermos. Los endospermos y embriones se conservaban a -70°C hasta ser utilizados. Todo el proceso se realizó siempre evitando en todo momento la descongelación del material y en condiciones de esterilidad a nucleasas (ap.2.2.1).

2.1.2 CEPAS BACTERIANAS, VECTORES DE CLONAJE

El trabajo que se describe a continuación ha consistido

fundamentalmente en una labor de clonaje de fragmentos de DNA y de análisis de éstos, y para ello ha sido necesario emplear una serie de vectores de clonaje (plásmidos y bacteriófagos) y de cepas de la especie Escherichia coli que se describen a continuación.

Cepas receptoras

- E. coli JM103 F⁺ (Yanish-Perron, 1985)
 (lac-pro), thi, rpsL(tra), supE, endA, sbct, hsdE
 / F⁺ : traD36, proA⁺B⁺, lacI⁺, Z M15
- E. coli JM109 F⁺ (Yanish-Perron, 1985)
 recA1, endA1, gyr A96, thi, hsdR17, supE44, relA1,
 lambda⁻, (lac-proAB) [F⁺ traD36, proAB, lacI⁺,
 Z M15]
- E. coli JM83 (Messing y Vieira, 1982)
 lambda⁻, ara, (pro-lac), rpsL, thi, rho, diac,
 Z M15, lambda⁻
- E. coli 555 recA⁻ (Murray et al., 1977)
 F⁻, recA1, hsdR514, (r₁⁻, m₁⁻), supE44, supF58,
 lacY, or (lacI24)6, galE2, galT22, metB1, trpE55,
 lambda⁻
- E. coli T1090 (Young y Davies, 1983)
 lacU163, proA⁺, lon, araD139, strA, supF,
 (trpC22::Tni0), (pMC9)
- E. coli HB101 (Boyer y Roulland-Dussoix, 1969)
 F⁻, leuB6, proA2, recA13, thi1, ara14, lacY1,
 galE2, xyl5, mtl1, rpsL20, lambda⁻, supE44, hsdS20,
 r₁⁻, m₁⁻
- E. coli BHB2688 (Hohn y Murray, 1977; Hohn, 1979)
 W205 recA (lambda imm⁴³⁴, cIts, b2, red3, Bam4,
 Sam7)/lambda
- E. coli BHB2690 (Hohn y Murray, 1977; Hohn, 1979)
 W205 recA (lambda imm⁴³⁴, cIts, b2, red3, Dam15,
 Sam7)/lambda

Tabla 2.1 : Cepas de E. coli empleadas.

Plásmidos

pBE322 (Bolívar et al., 1977)

replicón : pMB1
tamaño : 4.4 kbp
fenotipo seleccionable : Amp^r Tet^r
dianas únicas con inactivación génica : BamHI,
EcoRV, NruI, PstI, PvuI, Sall, Scal,
SphI, XmaI
dianas únicas sin inactivación génica : AatII,
AvaI, BclI, ClaI, EcoRI, HindIII, NdeI,
PvuII, Tth1111

pUC18 - pUC19 (Norrander, 1983)

replicón : pMB1
tamaño : 2.7 kbp
fenotipo seleccionable : Amp^r
marcadores genéticos : lac Z⁺
dianas únicas con inactivación génica :
HindIII, SphI, PstI, Sall, AccI, HincII,
IbaI, BamHI, XmaI, SmaI, EpnI, SacI,
EcoRI

M13 mp18 - M13 mp19 (Norrander, 1983)

replicón : M13
tamaño : 7.2 kbp
fenotipo seleccionable : placas de bacteriófago M13
marcadores genéticos : lac Z⁺
dianas únicas con inactivación génica :
HindIII, SphI, PstI, Sall, AccI, HincII,
IbaI, BamHI, XmaI, SmaI, EpnI, SacI,
EcoRI

Bacteriófagos

lambda cI857

lambda NM1150 (Murray, 1983)

genotipo : lambda-b538, srl-lambda-3⁺, imm⁴³⁴,
srl-lambda-4⁺, shdIII-lambda-6⁺, srl-
lambda-5⁺
tipo - capacidad : inserción - 0 a 8.5 kbp
dianas de clonaje : EcoRI, HindIII

Lambda Charon35 (Loenen y Blattner, 1983)

genotipo : lambda-sbhl-lambda-i⁺, lac5,
srIIacZ (polylinker (EcoRI-BamHI) (E. coli
DNA (15.6 kbp BamHI))polylinker (BamHI-
EcoRI):srI-lambda-3, ⁺WLI13 EH54, nin5,
srIII-lambda-6⁺, srI-lambda-5⁺
tipo - capacidad : sustitución - 9 a 18.6 kbp
dianas de clonaje : BamHI, EcoRI, HindIII, SacI, SalI, XbaI
reconocimiento de recombinantes : no hay
propiedades de los recombinantes : cI⁻, Gam⁻, Int⁻, Rex⁻
cepas especiales : no hay (debe crecer sobre huésped Eca⁺)

Tabla 2.2 : Vectores plasmídicos y bacteriófagos empleados.

Figura 2.1 : Mapa de restricción del bacteriófago lambda cI857.
(Tomado de "Stratagene" Catálogo 1987, modificado de :
Echols y Murialdo (1978), Szybalski y Szybalsky (1979),
Daniels et al. (1980), Sanger et al., (1982). Daniels et al.,
(1983), y Roberts (1986)).

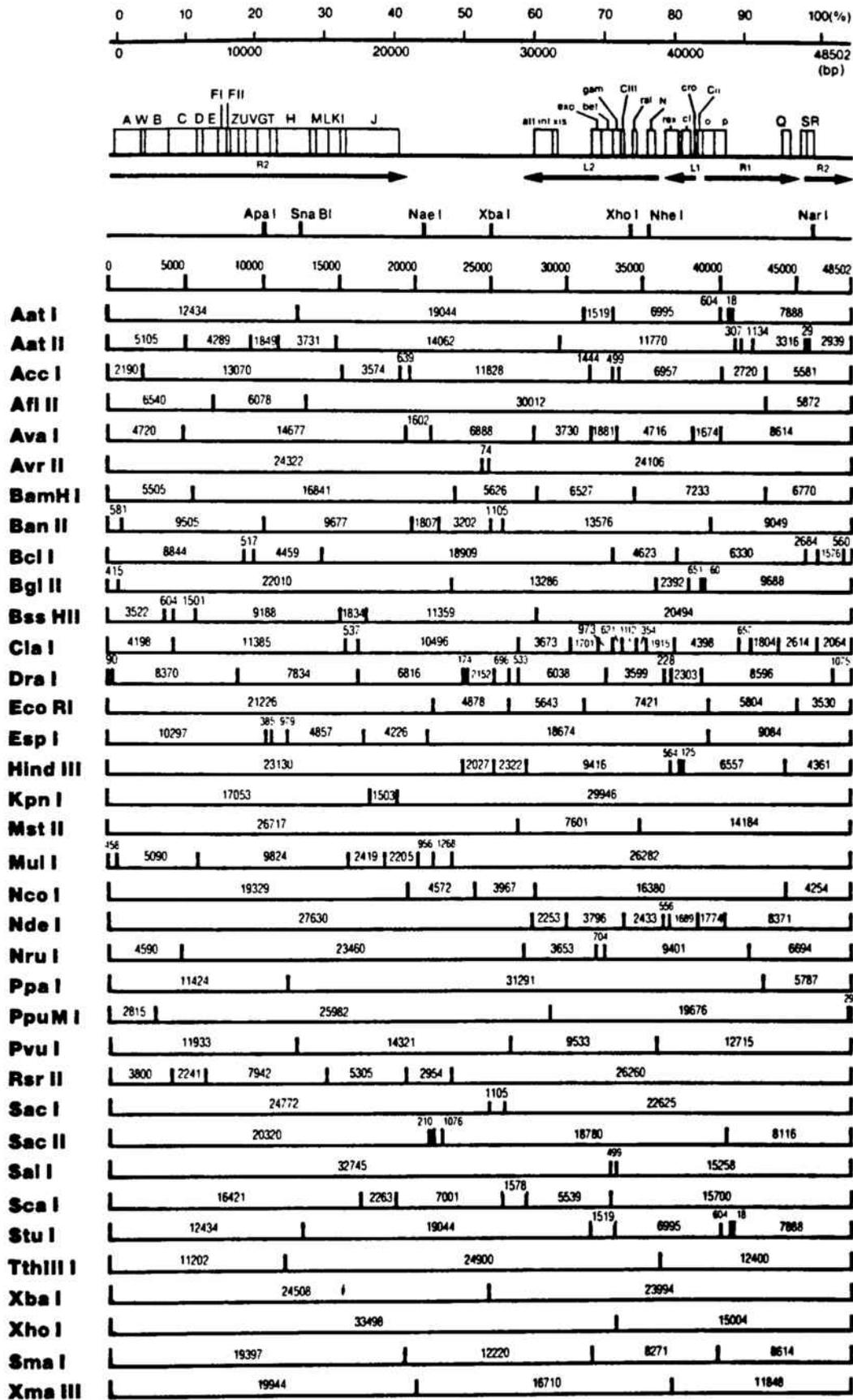
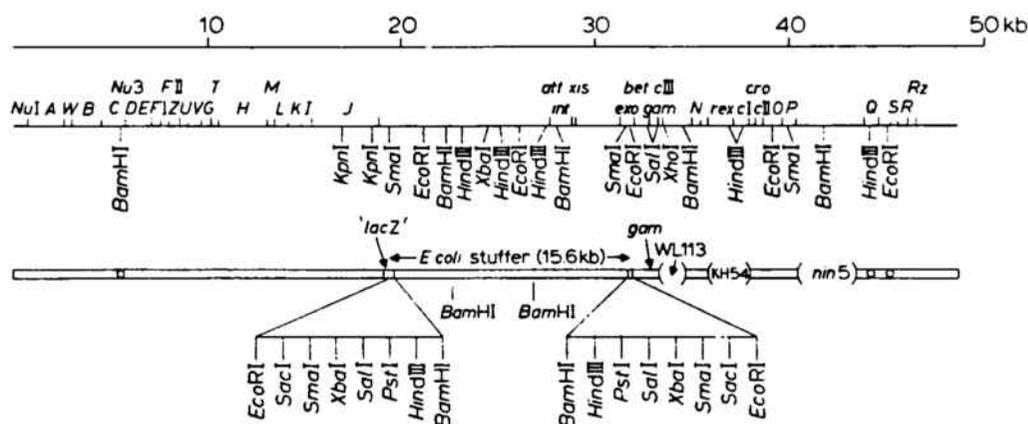


Figura 2.2 : Mapa de restricción del bacteriófago lambda Charon 35. (Pouwels et al., 1985). Se indican las características de su genotipo, dianas de retricción únicas y propiedades de los recombinantes.

Figura 2.3 : Mapa de restricción del bacteriófago lambda NM1150 (Tomado de Pouwels et al., 1985). Se indican las características de su genotipo, dianas de restricción únicas y propiedades de los recombinantes.



GAATTCGAGCTCGCCCGGGGATCGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGATCC
 EcoRI SacI SmaI XbaI SalI PstI HindIII BamHI

Genotype : $\lambda sbh1\lambda 1^0 lac5 sr1 lacZ$ < polylinker (*EcoRI*→*BamHI*) < *E. coli* DNA (15.6 kb, *BamHI*) > polylinker (*BamHI*→*EcoRI*) > *sr1* $\lambda 3 \Delta WL113 KH54 nin5 shndIII\lambda 6^0 sr1\lambda 5^0$

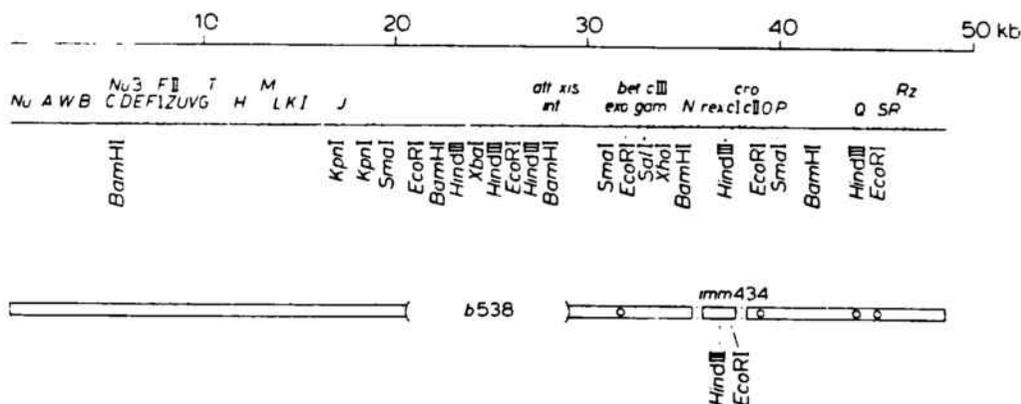
Capacity : 9–18.6 kb

Cloning sites : (*BamHI*), (*EcoRI*), (*HindIII*), (*SacI*), (*SalI*), (*XbaI*)

Recognition of recombinants: none

Properties of recombinants : cl^- , Gam^+ , Int^- , Red^-

Special host strains : none (will grow on $RecA^-$ host)



Genotype : $\lambda b538 sr1\lambda 3^0 imm434 sr1\lambda 4^0 shndIII\lambda 6^0 sr1\lambda 5^0$

Capacity : 0–8.5 kb

Cloning sites : *EcoRI*, *HindIII*

Recognition of recombinants: clear plaques: can be selected on Hfl^- host

Properties of recombinants : cl^- , Int^- , Red^+

Special host strains : NM514 ($hfl^- hsdR_K^-$) allows selection of recombinants (ref. 201)

2.2 PREPARACION DEL MATERIAL. NORMAS DE ESTERILIDAD

2.2.1 MATERIAL DE VIDRIO, Y PLASTICO.

En la mayor parte del trabajo realizado era fundamental mantener la integridad de las moléculas de DNA y/o RNA o la pureza de los cultivos, por ello el material empleado debía ser estéril y/o libre de nucleasas. Se diferencian dos tipos de material según se consiga una esterilidad a microorganismos (y a DNAsas) o también a RNAsas. Hay que destacar que las RNAsas son enzimas ubicuos de una actividad elevada y que resisten condiciones ambientales extremas.

El material de cristal y el de plástico no estéril se esteriliza en autoclave a 121°C o 1 atmósfera de sobrepresión durante 30 min.

El material de cristal libre de RNAsas se prepara manteniéndolo a 200°C durante al menos 6 h (horneado). El material de plástico se prepara a partir de stocks que nunca han sido manipulados sin guantes de látex, la piel es una de las principales fuentes de contaminación por RNAsas, y se esteriliza en autoclave en las condiciones anteriormente descritas.

2.2.2 REACTIVOS EMPLEADOS

El agua utilizada en todos los procesos era ultrapura. Procedía de un sistema "Milli Q" de la firma Millipore que poseía un filtro de lana, otro de carbón activo y dos columnas de resinas intercambiadoras de iones de lecho mixto. La resistividad final era de 15 a 18 MΩ/cm. Cuando su uso lo requería el agua era esterilizada en autoclave 30 min a 121°C o 1 atmósfera de sobrepresión.

Las soluciones libres de RNAsas se preparaban con agua libre de RNAsas en material de vidrio horneado y a partir de productos que se habían manipulado en todo momento con guantes. El agua libre de RNAsas se obtiene según el procedimiento :

1. Recoger agua "Milli Q" sobre material de vidrio libre de RNAsas.
2. Esterilizar en autoclave 30 min a 121°C y 1 atmósfera de sobrepresión.
3. Añadir 10 ml de DEPC 10 % en etanol absoluto y agitar durante 2 h a temperatura ambiente.
4. Calentar agitando durante 1 h para eliminar el DEPC (por descomposición en etanol y carbónico).
5. Esterilizar en autoclave como en 2. Manipular siempre la botella con guantes.

Los reactivos generales empleados han sido siempre de calidad analítica (Merck, Carlo Erba y Panreac). Los reactivos más específicos se listan a continuación.

Reactivos generales

producto	fabricante	referencia
ácido iodoacético		
acrilamida	Kodak	5521
	BioRad	161-0101
agarosa		
electroendosmosis media	Sigma	A-6877
electroendosmosis media	Hispanlab	C-7
electroendosmosis baja	Sigma	A-6013
bajo punto de fusión (LMP)	BioRad	162-0017
alta calidad para Ac. Nuc. (NA)	Pharmacia	17-0554-02
albúmina bovina (BSA) fracción V	Fluka	05480
calidad Biol. Molec. (20 mgr/ml)	Boehringer	711 454
ovalbúmina	Sigma	A-2512
ampicilina	Sigma	A-9518
ARN _i de hígado de ternera	Boehringer	647 225
levadura de panadería, tipo I	Sigma	R-9001
azul de bromofenol	BioRad	161-0404
	Merck	8122
Bacto-Agar	DIFCO	0140-01
Bacto-levadura	DIFCO	0127-01
Bacto-triptona	DIFCO	0123-01
β -hidroxiquinoleína	Sigma	H-8878
bis-acrilamida	Kodak	8383
	BioRad	161-0201
bromuro de etidio	Sigma	E-8751
cebador universal ("primer") 17 MER (-20)	N.E. Biolabs	#1211
cloruro de cesio	Boehringer	757 360
cloruro de rubidio	Merck	7622
cloruro de hexamino cobalto (III)	Sigma	H-8887
cloruro de litio	Merck	5677
cloramfenicol	Sigma	C-0378
diethylpirocarbonato (DEPC)	Fluka	32490
DNA de esperma de salmón	Sigma	D-1626
Ditiotreitol	Sigma	D-0632
EGTA	Sigma	E-4378
Espermidina	Sigma	S-2501
Fenol	Merck	206
Ficoll 400	Pharmacia	17-0400-01
Formaldehído 37 %	Merck	9684
Formamida	Sigma	F-7503
	Merck	9684
HEPES	Sigma	H-3375
Hidrocloreto de tiamina	Sigma	T-4625
IPTG	Sigma	I-5502
MES	Sigma	M-8250
MOPS	Sigma	M-9381

producto	fabricante	referencia
nitrocelulosa	Schleicher & Schull	BA65 BA65
nucleótidos		
nucleótidos trifosfato : ATP	Sigma	A-6144
	Boehringer	519 979
UTP	Boehringer	110 213
GTP	Boehringer	106 372
CTP	Boehringer	103 837
deoxinucleótidos : dATP	Boehringer	103 985
dTTP	Boehringer	104 272
dGTP	Boehringer	104 168
dCTP	Boehringer	104 143
dideoxinucleótidos : ddA, ddT, ddG, ddC	Pharmacia	24-4685-01
polietilenglicol 6000 (PEG 6000)	Merck	807491
polivinilpirrolidona	Sigma	PVP-360
Sodio-dodecil sulfato (SDS)	BDH	44244
Sephadex G25 Fine	Pharmacia	17-0032-01
G50 Fine	Pharmacia	17-0042-01
Sigmacote	Sigma	SL-2
Supersolve	Koch-Light	57-16742/8
TBMEB	Kodak	8178
	BioRad	161-0801
Tetraciclina	Sigma	T-3258
I-Gal	Sigma	B-4252

2.2.3 ENZIMAS Y KITS

Enzimas generales

enzima	fabricante	referencia	concentración
DNA polimerasa I	N.E.Biolabs	#209	10 U/μl
DNA polimerasa I Klenow	N.E.Biolabs	#210	5 U/μl
	Boehringer	104 523	5 U/μl
DNA ligasa T4	WBN	#133	25 U/μl
	Boehringer	716 359	1 U/μl
DNAasa I	Boehringer	104 159	
Fosfatasa alcalina	Boehringer	713 023	28 U/μl
Lisozima	Sigma	L-6876	
Nucleasa Bal31	Boehringer	724 793	2 U/μl
Nucleasa S1	Boehringer	818 330	300 U/μl
	Amersham	T-2410Y	49.5 U/μl
Proteinasa K	Sigma	L-6876	
RNAasa A	Sigma	R-5000	
RNAasa T1	Sigma	R-8251	
RNAasina ¹	Promega Biotec	P-2114	40 U/μl
T4 polinucleótido quinasa	Amersham	T-2020Y	5.5 U/μl
	Promega Biotec	M109	7 U/μl

Endonucleasas de restricción

enzima	fabricante	referencia	concentracion
AccI	Boehringer	728 420	3.5 U/μl
BamHI	Genofit	B602605i	20 U/μl
	Amersham	T-1010Y	12 U/μl
	Amersham	T-1010Z	40 U/μl
BglII	Amersham	T-1021Z	120 U/μl
DpnI	N.E. Biolabs	#176	5 U/μl
EcoRI	Amersham	T-1040Z	12 U/μl
	Boehringer	200 310	60 U/μl
HaeIII	Amersham	T-1051Y	10 U/μl
HincII = HindII	Amersham	T-1059Y	12 U/μl
HindIII	Amersham	T-1060Z	12 U/μl
HinfI	Amersham	T-1061Y	8 U/μl
HpaII	N.E. Biolabs	#171	6 U/μl
EprI	N.E. Biolabs	#143	10 U/μl
	Amersham	T-1068Y	8 U/μl
MboI	N.E. Biolabs	#147	6.5 U/μl
MspI	ERL	5419SA	10 U/μl
	N.E. Biolabs	#108	20 U/μl
NcoI	Boehringer	835 315	10 U/μl
PstI	Amersham	T-1073Z	30 U/μl
PvuI	Amersham	T-1075Y	12 U/μl
	Boehringer	650 137	5 U/μl
PvuII	Boehringer	642 690	10 U/μl
SacI	Amersham	T-1078Y	10 U/μl
SaiI	Amersham	T-1080Y	12 U/μl
Sau3AI	N.E. Biolabs	#169	5 U/μl
	Cultek	010901	3 U/μl
SmaI	Amersham	T-1085Y	12 U/μl
SspI	N.E. Biolabs	#132	6 U/μl
TaqI	Boehringer	404 128	9 U/μl
XbaI	Boehringer	674 257	9 U/μl

"kits" empleados

"Multiprime DNA Labelling System" Amersham RPN.1660Y

2.2.4 DISOLUCIONES STOCK MAS USUALES

<u>Disolución</u>	<u>Composición</u>	<u>Preparación</u>	<u>Observaciones</u>
acetato amónico 5 M (pm = 77.06)		96.35 g acetato amónico en 200 ml agua. Enrasar a 250 ml	Filtrar 0.45 µm No autoclavar
acetato de litio 4 M (pm = 65.987)		102 g acetato de litio en 200 ml agua. Enrasar a 250 ml	Filtrar 0.45 µm Autoclavar
acetato potásico 5M (pm = 98.15)		49.1 g acetato potásico en 100 ml de agua. Añadir 19.17 ml ácido acético glacial y 47.5 ml agua.	Filtrar 0.45 µm No autoclavar
acetato sódico 3 M pH 5.2 (pm = 82.03)		123.05 g acetato sódico en 350 ml agua. Llevar a pH 5.2 con ácido acético glacial. Enrasar a 500 ml.	Filtrar 0.45 µm Autoclavar
ácido clorhídrico 2 N (pm = 36.46)		129.6 ml HCl 25 % sobre 200 ml agua. Enrasar a 500 ml.	
ácido iodoacético 10 % (pm = 185.95)		10 g ácido iodoacético en 80 ml agua. Enrasar a 100 ml.	Filtrar 0.22 µm Guardar a -20°C Proteger de la luz
ATP 100 mM (pm = 551.1)		55.11 mg en 1 ml agua estéril	Conservar a -20°C
bromuro de etidio (10 mg/ml) (pm = 394.3)		10 mg en 1 ml agua estéril	Conservar a 4°C Proteger de la luz Mutágeno potente. Precaución
cloroformo - alcohol isoamílico (96:4 v:v)		96 ml cloroformo más 4 ml alcohol isoamílico	Tóxico
cloruro de magnesio 1 M (pm = 203.3)		20.33 g MgCl ₂ en 90 ml agua. Enrasar a 100 ml.	Filtrar 0.45 µm Autoclavar
denhardt (100x)	Ficoll 400 2 % polivinilpirrolidona 2 % BSA fracción V 2 %	10 g Ficoll 400, 10 50 ml Ficoll 400 (20 %) 10 g polivinilpirroli- dona 10 g BSA, hasta 500 ml con con agua. Agitación por inversión, más de 12 h. Aliquotar 50 ml.	Conservar a -20°C No autoclavar
DNAsa I (1 mg/ml)		1 mg DNAsaI en 1 ml agua estéril	Conservar a -20°C

Disolución	Composición	Preparación	Observaciones
Ditiotreitol 1 M (pm = 154.2)		0.1542 g DTT en 1 ml agua estér.	Conservar a -20°C
EDTA 0.5 M pH 8.5 (pm = 372.24)		53.06 g Titriplex (Merck) en 400 ml agua. Añadir NaOH en lentejas (30-35) hasta disolver EDTA (pH 7). Ajuste fino pH 8 con NaOH 10 N. Enrasar 0.5 l.	Filtrar 0.45 µm Autoclavar
Fenol saturado (pm = 94.11)		Fundir 250 g fenol (Merck) a 60°C 30 min. Añadir 62.5 ml agua est. 30 ml Tris base 1 M y 0.3 g β-OH-quinoleína. Agitar inyectando N ₂ .	Conservar a -20°C periodos largos Tóxico. Corrosivo
Fenol-cloroformo- -isoamilico (100:96:4 v:v:v)		100 ml fenol saturado, 96 ml cloroformo, 4 ml alcohol isoamilico	Tóxico. Corrosivo
Fosfato 1 M pH 6.5 (pm = 137.99)		13.8 g NaH ₂ PO ₄ en 60 ml agua. Ajustar pH 6.5 NaOH 10 N. Enrasar a 100 ml.	Filtrar 0.22 µm No autoclavar
Formamida desionizada		1 l formamida (Merck) con 100 g resina Ag 501-X8(D). Agitar 1 h. La solución 50 % en agua tiene pH 7.5. Añadir nieve carbónica en caso contrario. Alicuotar 50 ml	Filtrar Whatmann 1MM Conservar -70°C
Hidróxido sodico 2 N (pm = 40)		40 g NaOH en 400 ml agua. Enrasar a 500 ml.	
Hidróxido potásico 10 N (pm = 56.11)		28.06 g KOH en 400 ml agua. Enrasar a 500 ml.	
IPTG (20 mg/ml) (pm = 238.3)		20 mg IPTG en 1 ml agua est.	Filtrar 0.22 µm Conservar -20°C
Medios cultivo			
Medio LB	bactotripton 2 % extract. levadura 1 % NaCl 2 %	20 g bactotripton, 10 g ext. levadura, 20 g NaCl en 1 l agua. Ajustar pH 7.4 NaOH 10 N.	Autoclavar
Medio M9 Agar	Agar 1.5 % Na ₂ HPO ₄ 40 mM KH ₂ PO ₄ 22 mM NaCl 8 mM NH ₄ Cl 18 mM glucosa 0.2 % CaCl ₂ 0.1 mM Tiamina HCl 1 mM MgSO ₄ 1 mM	a: 15 g agar en 500 ml agua b: 100 ml M9 (10x) en 378 ml agua. Autoclavar. Atemperar a 50°C. Añadir 10 ml glucosa 20% 10 ml CaCl ₂ 1 M, 1 ml tiamina HCl 1 M, 1 ml MgSO ₄ 1 M. Mezclar (a) y (b) Plaquarear.	Conservar a 4°C

Disolución	Composición	Preparación	Observaciones
Medio SOB	bactotripton 2 % ext. levadura 0.5 % NaCl 10 mM KCl 2.5 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 10 mM	20 g bactotripton, 5 g ext. levadura, 0.585 g NaCl, 0.188 g KCl, 2.03 g MgCl ₂ , 2.465 g MgSO ₄ . En 900 ml agua. Enrasar a i. l. Autoclavar.	
M9 (10x)	Na ₂ HPO ₄ 0.4 M KH ₂ PO ₄ 0.22 M NaCl 80 mM NH ₄ Cl 0.18 M	30 g Na ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O, 15 g KH ₂ PO ₄ , 5 g NaCl y 10 g NH ₄ Cl en 400 ml de agua. Enrasar a 500 ml.	Filtrar 0.45 µm Autoclavar
MES-E 0.5 M pH 6.3 (pm = 195.2)		9.76 g MES en 80 ml agua a est. Llevar a pH 6.3 con KOH 10 N. Enrasar a 100 ml.	Filtrar 0.22 µm No autoclavar Aliquotar Conservar -20°C
MOPS (10x) pH 7.0 (pm = 231.3)	MOPS 0.2 M acetato sódico 50 mM EDTA 10 mM	23.13 g MOPS anhidro, 8 ml acetato sódico 3 M pH 5.2 10 ml EDTA 0.5 M pH 8.0 en 400 ml agua. Llevar a pH 7.0 con HCl 25 % (aprox. 3 ml). Enrasar a 500 ml.	Filtrar 0.22 µm Autoclavar Almacenar 4 °C
Nucleótidos			
dATP 20 mM (pm = 535.1)		Disolver 20 mg dATP en 934.4 µl Tris-HCl 50 mM pH 8	
dTTP 20 mM (pm = 570.2)		Disolver 20 mg dTTP en 876.9 µl Tris-HCl 50 mM pH 8	
dGTP 20 mM (pm = 963.2)		Disolver 20 mg dGTP en 907.3 µl Tris-HCl 50 mM pH 8	
dCTP 20 mM (pm = 519.1)		Disolver 20 mg dCTP en 963.2 µl Tris-HCl 50 mM pH 8	
		Verificar la concentración por D.O. según tabla	

nucleótido nm constante absorción (M⁻¹ cm⁻¹)

dATP	259	1.54 · 10 ⁴
dTTP	260	7.4 · 10 ³
dGTP	253	1.37 · 10 ⁴
dCTP	271	9.1 · 10 ³
UTP	262	1.0 · 10 ⁴

D.O.

M real = -----

ct.ab.

Disolución	Composición	Preparación	Observaciones
ENasa A (10 mg/ml)	ENasa A 10 mg/ml Tris-HCl pH 7.5 100 mM NaCl 15 mM	10 mg ENasa A, 10 µl Tris-HCl 1 M pH 7.5 3 µl NaCl 5 N en 987 µl agua estéril. Hervir 15 min a 100°C. Atemperar.	Alicuotar Conservar -20°C
SDS 20 % (pm = 288.38)		100 g SDS en 400 ml agua est. Enrasar a 500 ml.	Filtrar 0.22 µm No autoclavar
SSC (20x)	NaCl 3 M citrato sódico 0.3 M	175.32 g NaCl 88.23 g citrato trisódico dihidrato. En 900 ml agua. Enrasar a 1 l.	Filtrar 0.45 µm Autoclavar
SSPE (20x)	NaCl 3.6 M fosfato 0.2 M EDTA 20 mM	210.37 g NaCl 27.6 g NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O 40 ml EDTA 0.5 M pH 8.0 en 900 ml agua. Llevar a pH 7.7 con NaOH 10 N. Enrasar a 1 l.	Filtrar 0.45 µm Autoclavar
Sulfato de Magnesio 1M (pm = 246.48)		61.62 g MgSO ₄ en 200 ml agua. Enrasar a 250 ml.	Filtrar 0.45 µm Autoclavar

2.3 PURIFICACION DE DNA Y RNA

2.3.1 PURIFICACION DE DNA GENOMICO

El material de partida fue endospermos y embriones de 20 ó 25 días después de la polinización conservados en todo momento congelados a -70°C .

PROCEDIMIENTO :

1. Homogeneizar de 20 a 40 g de tejido en un mortero en presencia de nitrógeno líquido hasta convertirlo en una harina fina, cuidando que no se descongele.
2. Introducir la harina resultante en un matraz ErlenMeyer de 500 ml que contiene 50 ml de tampón de extracción precalentado a 50°C .
3. Añadir 5 mg de proteinasa-K en polvo, agitando con suavidad hasta que su disolución (concentración final 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).
4. Incubar durante 3h a 50°C con agitación muy suave (nota a). Conviene que la agitación sea orbital y suave a fin de no romper mecánicamente las largas cadenas de las moléculas de DNA.
5. Centrifugar la disolución a 1500 g.a.v. (3000 rpm en rotor Beckman JA20) a temperatura ambiente durante 10 min (tubos de polipropileno Nalgene 3119-0050).
6. Recoger el sobrenadante con pipeta de cristal en un matraz de 500 ml al que se añaden 25 ml de fenol saturado.
7. Agitar suavemente 10 min a temperatura ambiente.
8. Añadir 25 ml de una disolución de cloroformo - alcohol isoamílico.
9. Agitar suavemente 10 min a temperatura ambiente.
10. Repartir la disolución en tubos Corex de 30 ml y centrifugar 10 min a 10000 g.a.v. (9000 rpm rotor Beckman JA20) a temperatura ambiente.
11. Juntar las fases acuosas, superiores, en un matraz de 500 ml y hacer una segunda extracción con fenol y cloroformo-isoamílico como se describe (en 6 a 10).
12. Realizar dos extracciones adicionales con cloroformo-isoamílico, hasta que la interfase esté limpia.
13. Juntar todas las fases acuosas y añadir NaCl 5N (1/9 v/v). Dejar precipitando toda la noche a 4°C (nota b).
14. Centrifugar a 16000 g.a.v. (14000 rpm rotor Beckman JA20) 15 min a 4°C .
15. Eliminar el sobrenadante. Secar los tubos al vacío.
16. Resuspender el sedimento en 10 ml de tampón TE pH 7.5, suavemente.
17. Añadir 10 g de cloruro de cesio disolviéndolo sin agitar violentamente el tubo. La solución tiene una densidad de 1.55 g/ml. Añadir 10 μl de una solución de bromuro de etidio 10 mg/ml.
18. Pasar la muestra con una pipeta Pasteur a un tubo de

- polialómero de 15 ml (Quic Seal™, Beckman 342413) procurando no dejar aire en su interior.
19. Equilibrar los tubos hasta una diferencia de peso inferior a 50 mg y sellarlos.
 20. Ultracentrifugar a 122000 g.a.v. (43000 rpm rotor Beckman 50Ti, ángulo fijo de 45°) durante 60 h a 25°C. Fijar la deceleración al mínimo para evitar distorsionar las bandas.
 21. Una vez finalizada la ultracentrifugación extraer la banda de DNA. Si la banda no es claramente visible se ilumina con luz ultravioleta de onda larga (306 nm). Conviene realizar todo este proceso con poca luz para evitar roturas en la cadena de DNA.
 22. Cortar el tubo con un bisturí por la parte superior y colocarlo fijo en un soporte. Introducir en el tubo una pipeta Pasteur previamente fijada al soporte y conectada a una jeringa de 2 ml. Succionar la banda colocando la pipeta justo por debajo de la banda de DNA.
 23. Extraer el bromuro de etidio añadiendo 1 vol. de isopropanol saturado en tampón TE pH 7.5 NaCl 5 N, agitando por inversión, suavemente (sin vortex), y dejando separar las fases. Eliminar la fase superior, alcohólica, de un intenso color rosado, y repetir la extracción un mínimo de 6 veces o 2 veces más a partir del momento en que en la fase superior no se aprecie color rosado.
 24. Pasar la muestra a un tubo Corex de 15 ml. Añadir 2 volúmenes de agua para diluir el cloruro de cesio y 6 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C), mezclando por inversión. Se observa la formación inmediata de un precipitado filamentososo de color blanco formado por el DNA de alto peso molecular (nota c).
 25. Centrifugar inmediatamente a 16000 g.a.v. (14000 rpm rotor Beckman JA20) durante 20 min a 4°C.
 26. Eliminar el sobrenadante, el sedimento suele estar bien adherido al fondo del tubo y es de un color blanco lechoso (si presentara un tono rosado indicaría que no se ha extraído el bromuro de etidio en su totalidad).
 27. Lavar con 10 ml de etanol al 70%. Centrifugar a 16000 g.a.v. (14000 rpm rotor Beckman JA20) 10 min a 4°C.
 28. Eliminar el sobrenadante por aspiración, secar bien las gotas de las paredes y dejar 10 a 20 min en una campana de vacío.
 29. Resuspender en 1 a 3 ml de tampón TE pH 7.5. Para favorecer la resuspensión se calienta el tubo a 65°C 20 min para eliminar posibles DNAsas y posteriormente se deja resuspender a 37°C el tiempo necesario (nota d).
 30. Cuantificar la concentración de DNA por absorción a 260 nm (1 D.O.₂₆₀ corresponde a una concentración de 50 µg/ml). Comprobar la calidad y el tamaño del DNA purificado en un gel de agarosa al 0.7 % (notas e, f).

DISOLUCIONES

Tampón de extracción

EDTA 0.1 M pH 8.5

NaCl 0.3 M

SDS 1 %

OBSERVACIONES

- a. Es muy importante evitar en todo el proceso agitaciones bruscas de la disolución de DNA para reducir al mínimo la fragmentación mecánica de las cadenas de DNA. Por eso en ningún caso se debe agitar con vortex. Agitar invirtiendo suavemente.
- b. Si en el apartado 24 no se observa la aparición de un precipitado filamentosos ello podría ser debido a un bajo rendimiento. En tal caso dejar el tubo 30 min a -70°C y centrifugar posteriormente. De este modo se aumenta la cantidad de DNA recuperado.
- c. Se puede sustituir el paso 25 y sig. Cuando aparece el precipitado de DNA se puede recoger con ayuda de una varilla de cristal (por ej. una pipeta Pasteur) e introducirlo en un tubo eppendorf, lavándolo posteriormente con etanol al 70%, centrifugando 1 min a temperatura ambiente y resuspendiéndolo en 1 ml de TE. Este procedimiento elimina centrifugaciones y reduce los volúmenes de trabajo.
- d. El gran tamaño de los fragmentos de DNA hace que su resuspensión sea muy lenta pudiendo durar más de 24 h.
- e. Si el DNA obtenido es de buena calidad en cuanto a su tamaño su migración electroforética debe ser igual o superior a la del DNA del bacteriófago lambda-cI857, de 48.5 kbp.
- f. La medida del contenido de ácidos nucleicos de una disolución y su pureza se obtienen mediante la lectura de la absorción en el UV, siempre en el supuesto de que hay sólo DNA o RNA y de que la contaminación por nucleótidos es despreciable. El espectro de absorción del DNA y del RNA tiene un máximo cerca de 258 nm y un mínimo a 230 . Por razones prácticas los datos equivalentes de concentración se realizan a 260 nm:

- medida de la pureza del DNA o RNA respecto a proteínas :

$$D.O._{260} / D.O._{280} = 2.0 \text{ (RNA)} / 1.85 \text{ (DNA)}$$

$$D.O._{260} / D.O._{230} > 2.0$$

260 y 280 se mide la absorción de los anillos aromáticos. A 230 se mide la absorción del doble enlace en el enlace peptídico de las proteínas.

- el valor de concentración se obtiene a partir de las $D.O._{260}$ (Maniatis et al, 1982) :

$$\text{RNA} : 1 \text{ U} = 40 \mu\text{gr RNA/ml}$$

$$\text{DNA} : 1 \text{ U} = 50 \mu\text{gr DNA/ml}$$

Otros autores (Clemens, 1984) dan la equivalencia:
RNA : 1 U = 43.45 µgr RNA/ml

2.3.2 PURIFICACION DE RNA TOTAL

Las ribonucleasas (RNAsas) son enzimas extremadamente activos y resistentes a condiciones ambientales drásticas. Es importante emplear material de vidrio, porcelana y plástico libre de RNAsas (ver ap. 2.2) así como reactivos especialmente preparados y manipular siempre material y muestras con guantes de plástico o látex.

El protocolo que se describe a continuación fue tomado de Dean et al. (1985).

PROCEDIMIENTO

1. Triturar 20 g de tejido en un mortero, preenfriado en nieve carbónica, en presencia de nitrógeno líquido y de arena de cuarzo (1 g / 10 g de tejido) (nota a).
2. Sacar el mortero con la harina formada de la nieve carbónica añadir lentamente 6 ml de tampón de extracción y 6 ml de fenol saturado (libre de RNAsas) removiendo despacio mientras se tritura el tejido. Seguir triturando hasta que la masa formada licúe (nota e).
3. Pasar la disolución a un tubo Corex de 30 ml. Incubar a 65°C en un baño durante 10 min. Agitar con vortex intermitentemente (nota b).
4. Centrifugar a 8000 g.a.v. (8000 rpm rotor Beckman JA20) 15 min a 20°C (nota d).
5. Recoger la fase acuosa procurando no arrastrar interfase, muy gruesa.
6. Reextraer la fase orgánica, inferior, con 1 volumen de tampón de extracción. Mezclar agitando con vortex, centrifugar como en 4.
7. Recoger la fase acuosa y añadirla a la de 5.
8. Si se observa que la interfase no es sólida se puede realizar una segunda reextracción de la fase orgánica como en 6. En ese caso recoger la fase acuosa y añadirla a las demás.
9. Añadir el mismo volumen de cloroformo-isoamílico que el de la suma de fases acuosas. Agitar con vortex. Centrifugar como en 4.
10. Pasar la fase acuosa, superior, a un nuevo tubo Corex de 30 ml. Añadir 1 volumen de disolución de cloruro de litio + urea (nota c). Agitar.
11. Dejar precipitando toda la noche a 4°C.
12. Centrifugar a 12000 g.a.v. (10000 rpm rotor Beckman JA20) 20 min a 4°C.
13. Decantar el sobrenadante, aspirar las gotas y secar en vacío.
14. Resuspender el sedimento en 0.8 ml de tampón de resuspensión. Pasar la muestra a un tubo eppendorf.

15. Añadir 1 volumen de fenol saturado. Agitar con vortex, centrifugar dos min. Pasar el sobrenadante a nuevo eppendorf.
16. Añadir 1 volumen de fenol - cloroformo - isoamilico. Agitar con vortex, centrifugar 2 min. Pasar el sobrenadante a nuevo eppendorf.
17. Añadir 1 volumen de cloroformo-isoamilico. Agitar con vortex, centrifugar 2 min. Pasar el sobrenadante a nuevo eppendorf.
18. Añadir 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 4.8 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C). Agitar.
19. Dejar toda la noche a -20°C.
20. Centrifugar 20 min a 4°C.
21. Añadir 1 ml de etanol al 70%. Agitar hasta que se resuspenda el pellet.
22. Centrifugar 15 min a 4°C.
23. Decantar el sobrenadante. Secar.
25. Resuspender en 100 µl de agua libre de RNAsas.
26. Medir la absorción a 230, 260, 280 y 310 nm, comprobar la concentración y la calidad de la preparación en un minigel de agarosa 1.5 % (ver ap.2.3.1 nota f).
27. Conservar congelado a -70°C.

DISOLUCIONES

Tampón de extracción

Tris-HCl 50 mM pH 7.5
 EDTA 100 mM
 NaCl 150 mM
 SDS 1 %
 ácido iodoacético 1 %

Se prepara a partir de disoluciones stock y de agua libre de RNAsas. El ácido iodoacético se añade en el último momento a partir de una disolución stock al 10 %.

Tampón de resuspensión

Tris-HCl 50 mM pH 7.5
 EDTA 10 mM
 SDS 0.5 %

OBSERVACIONES

- a. Es muy importante que el tejido se mantenga congelado mientras se tritura para minimizar el peligro de degradación del RNA por RNAsas endógenas. Por el mismo motivo es también importante trabajar en hielo siempre que sea posible.
- b. La extracción con fenol-SDS da lugar a preparaciones con poca contaminación de proteínas, pero con DNA. Esta contaminación de DNA se minimiza si se realiza la extracción a 65°C.
- c. La precipitación con cloruro de litio + urea da lugar a

- preparaciones de RNA básicamente libres de DNA, polisacáridos y proteínas.
- d. La sal potásica de dodecilsulfato (SDS) es poco soluble. Por ello, hay que evitar la presencia de iones K^+ siempre que en la disolución haya SDS. Las centrifugaciones en las extracciones con fenol se hacen a temperatura ambiente para evitar la precipitación del SDS que puede retener RNA en la fase sólida que aparece.
 - e. El fenol produce quemaduras graves por lo que es conveniente utilizar guantes y gafas protectoras. El cloroformo es peligroso y el alcohol isoamílico es venenoso por lo que deben manejarse con cuidado y en campana de gases (Casey y Davidson, 1977).
 - f. La relación de densidades ópticas a 260 nm y 280 nm debe ser de 2 para que la preparación de RNA se considere óptima (ver ap.2.3.1 nota f).

2.3.3 PURIFICACION DE DNA PLASMIDICO

Se han desarrollado diferentes técnicas para aislar DNA plasmídico en E. coli. Todas ellas comprenden tres etapas básicas :

1. crecimiento de la bacteria y amplificación del plásmido
2. sedimentación y lisis de la bacteria
3. purificación del DNA plasmídico.

A diferencia del DNA del cromosoma de E. coli la replicación del plásmido, con replicones derivados de ColE1, no requiere de la síntesis de proteínas. El DNA plasmídico se puede amplificar selectivamente añadiendo al medio un agente inhibidor de la síntesis proteica como el cloramfenicol. De esta manera se obtienen rendimientos 10 a 20 veces superiores respecto a cultivos sin amplificación. Este fenómeno de amplificación no está demostrado para plásmidos como pBR322 (Bolivar et al., 1977) pero es evidente para otros menores como los plásmidos de la serie pUC (Norrander et al., 1983).

Los diferentes métodos de purificación del DNA plasmídico se basan fundamentalmente en la gran diferencia de tamaño entre el DNA del cromosoma de E. coli y el de los plásmidos que usualmente son empleados como vectores. La gran diferencia de tamaño existente entre el DNA del plásmido y el DNA del cromosoma de E. coli es la causa de que el primero conserve la estructura circular cerrada covalentemente mientras que el segundo se fragmenta en forma de largas cadenas lineales al lisis las bacterias. La exposición a condiciones desnaturizantes como el calor o el medio alcalino (hasta pH 12.5) produce la rotura de la mayor parte de los puentes de hidrógeno del DNA, desnaturizando completamente las moléculas lineales. En esas mismas condiciones las moléculas circulares de DNA plasmídico mantienen su configuración nativa.

2.3.3.1 Purificación de DNA plasmídico en gran escala : amplificación

Esta técnica permite obtener cantidades elevadas (0.5 a 5 mg de DNA por litro de cultivo bacteriano) de DNA plasmídico de gran pureza. La purificación final se basa en el diferente comportamiento del DNA plasmídico y del DNA del cromosoma de E. coli cuando se ultracentrifugan en gradientes de cloruro de cesio que contienen cantidades saturantes de un agente intercalante como es el bromuro de etidio. El DNA lineal y el circular con una cadena abierta ("nicked dsDNA") son capaces de atrapar más agente intercalante, reduciendo su densidad en mayor grado que el DNA circular cerrado covalentemente, bandeando en diferentes posiciones del gradiente.

El procedimiento que se describe se basa en el de lisis alcalina de Birnboim y Doly (Birnboim y Doly, 1979) tomado de Maniatis y col. (Maniatis et al., 1982) y modificado.

densidad del DNA de doble cadena

$$\text{densidad (g/ml)} = 0.098 (\% (G + C)) + 1.660 \text{ g/ml.mol}$$

<u>50% (G+C)</u>	<u>densidad</u>
dsDNA superenrollado	1.709 g/ml
dsDNA "nicked"	1.54 g/ml
ssDNA	1.726 g/ml
ssRNA	1.90 g/ml
proteína	1.33 g/ml

notas:

- dsDNA "nicked" atrapa más bromuro de etidio que dsDNA superenrollado.
- el bromuro de etidio a saturación produce reducciones de densidad del dsDNA de aproximadamente 0.15 g/ml
- el efecto del bromuro de etidio es el de reducción de la densidad en gradientes de cloruro de cesio.

Tabla 2.3 Densidades de diferentes formas de DNA y RNA en gradientes de cloruro de cesio (Schildkraut y Lifson, 1962).

PROCEDIMIENTO

Se describe el protocolo adaptado para plásmidos de la serie pUC (Norrander et al., 1983) de Maniatis y col. (Maniatis et al., 1982).

a. Crecimiento de las bacterias

1. Inocular un tubo de cultivo con 3 ml de medio LB + ampicilina (100 µg/ml) con una colonia aislada o a partir de un stock glicerinado (nota a).
2. Hacer crecer toda la noche con intensa agitación a 37°C.
3. Inocular con 1 ml del cultivo un matraz de 2 l que contiene 500 ml de medio LB + ampicilina (100 µg/ml).
4. Hacer crecer con intensa agitación (200-250 rpm) a 37°C hasta una D.O.₆₀₀ de 0.8 (nota b).
5. Añadir 2.5 ml de una disolución de cloramfenicol (34 mg/ml en etanol). La concentración final del cultivo será de 170 µg/ml.
6. Incubar de 12 a 18 h a 37°C con intensa agitación.

b. Sedimentación y lisis de las bacterias

7. Dejar 10 a 20 min en hielo (4°C).
8. Sedimentar las bacterias por centrifugación a 3000 g.a.v. (8000 rpm rotor Beckman JA10) en botellas de polipropileno de 500 ml (Beckman 339997) 10 min a 4°C. Eliminar el sobrenadante (nota c,d).
9. Resuspender el sedimento bacteriano en 7 ml de disolución I fría (4°C) con ayuda de una varilla de cristal engrosada en la punta.
10. Añadir 35 mgr de lisozima en polvo a cada botella, agitar hasta que se disuelva (vortex).
11. Dejar a temperatura ambiente 5 min.

c. Purificación del DNA plasmídico

12. Añadir 14 ml de disolución II (a temperatura ambiente). Agitar por inversión repetidas veces. La disolución adquiere una elevada densidad.
13. Dejar en hielo 10 min (nota e).
14. Neutralizar añadiendo 10.5 ml de acetato potásico 5M pH 4.8 frío (4°C). Agitar por inversión repetidas veces.
15. Dejar en hielo 10 min.
16. Centrifugar a 3000 g.a.v. (8000 rpm rotor Beckman JA10) 20 min a 4°C.
17. Cuidando de no arrastrar sedimento pasar el sobrenadante de cada botella a dos tubos Corex de 30 ml.
18. Añadir 0.6 vol de isopropanol a cada tubo (12 ml). Agitar bien y dejar a temperatura ambiente 15 min como mínimo.
19. Centrifugar a 16000 g.a.v. (14000 rpm rotor Beckman JA20) 10 min a 20°C (nota f).

20. Eliminar por aspiración el sobrenadante, así como las gotas de las paredes. Secar al vacío.
21. Resuspender el sedimento de cada tubo en 1.5 ml de tampón TE pH 7.5.
22. Añadir 5 µl RNasa A (10 mg/ml) a cada tubo. Concentración final de 50 µg/ml. Incubar a 37°C 20 a 30 min.
23. Juntar las disoluciones de DNA correspondientes a cada plásmido (3 ml) en tubos Corex de 15 ml. Añadir 3 ml de cloroformo. Agitar con vortex.
24. Centrifugar a 12000 g.a.v. (10000 rpm rotor Beckman JA20) 2 min a 20 °C.
25. Tomar la fase superior y medir cuidadosamente el volumen. Añadir TE pH 7.5 hasta 3.4 ml.
26. Disolver 3.5 g de cloruro de cesio.
27. Pasar la muestra a un tubo de ultracentrifuga de 4 ml (Quick Seal™, Beckman 342412) con ayuda de una pipeta Pasteur.
28. Añadir 100 µl de una disolución de bromuro de etidio (10 mg/ml). Terminar de llenar el tubo con aceite mineral, hasta que no quede aire en el interior.
29. Equilibrar tubos apareados hasta una diferencia de peso inferior a 30 mg. Sellar.
30. Ultracentrifugar a 286000 g.a.v. (60000 rpm rotor vertical Beckman VTi80) durante 12-15 h a 25°C. La aceleración será máxima y la parada se hará sin freno.
31. Extraer con ayuda de una pipeta Pasteur la banda de DNA plasmídico, inferior, cuidando de no arrastrar la superior (DNA lineal y dsDNA "nicked") (ap. 2.3.1) (nota g).
32. Eliminar el bromuro de etidio por extracciones sucesivas con isopropanol saturado en tampón TE pH 7.5 NaCl 5 N. Realizar extracciones hasta que no se aprecie color rosado en la fase alcohólica (superior) (nota h).
33. Pasar la muestra a un tubo Corex de 15 ml. Añadir 3 vol de tampón TE pH 7.5 y 10 vol de etanol absoluto frío (-20°C). Agitar. De no apreciarse formación inmediata de un precipitado blanco dejar más de 2 h a -20°C.
34. Centrifugar a 16000 g.a.v. (14000 rpm rotor Beckman JA20) 20 min a 4°C.
35. Eliminar el sobrenadante, lavar con 10 ml de etanol al 70%.
36. Centrifugar a 16000 g.a.v. (14000 rpm rotor Beckman JA20) 20 min a 4°C.
37. Resuspender el DNA en 1 ml de tampón TE pH 7.5. Comprobar la concentración de la preparación por absorción a 260 nm (1 U D.O.₂₆₀ corresponde a una concentración de 50 µg/ml de dsDNA). Cargar una alícuota en un minigel para verificar la concentración y la calidad. Conservar congelado a -20°C.

DISOLUCIONES

Disolución I

glucosa 50 mM
Tris-HCl 25 mM pH 7.5

EDTA 10 mM

Se prepara a partir de una disolución Tris-HCl 50 mM pH 7.5 EDTA 20 mM, esterilizada en autoclave (solución I (x2)) y de una disolución concentrada de glucosa 1 M.

Por cada plásmido procesado :

3.5 ml disolución I (x2)

0.318 ml glucosa 1 M

3.2 ml de agua estéril

Disolución II

NaOH 0.2 N

SDS 1 %

Se prepara justo antes de usarla a partir de las soluciones stock de NaOH 10 N y de SDS 10% (w/v). Mantener a temperatura ambiente pues si se enfría precipita el SDS. Por cada plásmido :

0.28 ml NaOH 10 N

12.32 ml agua estéril

1.4 ml SDS 10 %

OBSERVACIONES

- a. La utilización de un antibiótico u otro depende del plásmido en cuestión. En el caso de los plásmidos pUC se trata de ampicilina (concentración en el medio 50 a 100 µg/ml), en el caso de pBR322 puede ser ampicilina o tetraciclina (concentración en el medio 12.5 µg/ml).
- b. La densidad óptica a 600 nm que debe alcanzar el cultivo es de aproximadamente 0.8 en el caso de cepas recA⁻ y de 0.4 si la cepa es recA⁺.
- c. Cuando el volumen de cultivo supera los 400 ml se realizan varias centrifugaciones para sedimentar las células, todas en la misma botella a fin de recoger juntos los sedimentos bacterianos.
- d. Una vez sedimentadas las células el sobrenadante se debe esterilizar en autoclave 20-30 min a 121°C o 1 atmósfera de sobrepresión.
- e. Es importante para evitar desnaturalización del DNA plasmídico respetar los tiempos de los pasos 13 a 15.
- f. Conviene no realizar la centrifugación de la precipitación con isopropanol a una temperatura inferior a 20°C pues las sales pueden precipitar debido a su elevada concentración.
- g. El bromuro de etidio produce roturas en las hebras de DNA ("nicks") en presencia de la luz. Conviene proteger los tubos de DNA + bromuro de etidio con papel de aluminio.
- h. Es importante eliminar el bromuro de etidio inmediatamente después de aislar las bandas del gradiente. Se observa que si se conservan en frío (4°C) incluso protegidas de la luz se dificulta considerablemente la extracción de bromuro de etidio siendo imposible eliminarlo completamente.

2.3.3.2 Purificación del DNA plasmidico en pequeña escala : minipreps

Se trata de una técnica que se basa en los mismos principios que la anteriormente descrita pero que se ha adaptado a la manipulación de muchas muestras a la vez, con pequeños volúmenes de trabajo. El DNA obtenido, de relativa pureza, es suficiente en muchos casos para realizar estudios de mapado físico del DNA (localización de dianas de restricción), así como hibridaciones.

Tomada de Maniatis y col. (Maniatis et al., 1982) y modificada.

PROCEDIMIENTO

1. Inocular un tubo de cultivo con 4 ml de medio LB + antibiótico (ampicilina a 100 µg/ml para plásmidos pUC) con una colonia aislada.
2. Incubar durante la noche (>12 h) a 37°C con vigorosa agitación.
3. Pasar 1.5 ml del cultivo a un tubo eppendorf. Centrifugar 10 min en centrífuga eppendorf a temperatura ambiente. Conservar el resto del cultivo a 4 °C (nota a).
4. Eliminar el sobrenadante por aspiración. Centrifugar 10 s y eliminar el resto de medio. Mantener en hielo.
5. Resuspender en 90 µl de disolución I (fría a 4°C) con ayuda de una pipeta Gilson P200.
6. Añadir 10 ml de disolución I + lisozima. Dejar 5 min a temperatura ambiente.
7. Añadir 200 µl de disolución II. Agitar por inversión. Dejar 5 min en hielo (nota b).
8. Añadir 150 µl de acetato potásico 5 M pH 4.8 frío (4°C). Agitar el tubo invertido con el vortex. Dejar 5 min en hielo.
9. Centrifugar 5 min en centrífuga eppendorf a temperatura ambiente.
10. Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo, cuidando de no arrastrar nada de sedimento (nota c).
11. Añadir un volumen igual de fenol-cloroformo (450 µl), agitar con vortex 15 s. Centrifugar 5 min a temperatura ambiente.
12. Pasar la fase acuosa, superior, a un nuevo tubo eppendorf.
13. Añadir un volumen de cloroformo-isoamílico (450 µl). Agitar con vortex 15 s. Centrifugar 5 min a temperatura ambiente.
14. Pasar la fase acuosa, superior, a un nuevo tubo eppendorf.
15. Añadir 2 volúmenes de etanol (900 µl) a temperatura ambiente. Agitar con vortex. Dejar 5 min a temperatura ambiente. Centrifugar 5 min.
16. Eliminar el etanol por aspiración. Se puede ver un sedimento blancuzco. Secar en vacío 5 min.
17. Resuspender en 10 µl de tampón TE pH 7.5 RNAsa A.
18. Dializar la disolución de DNA frente a TE pH 7.5. En una

microplaca se colocan 5 ml de TE pH 7.5 en cada cubeta, y 1/4 de filtro Millipore tipo VM (ϕ poro de 0.05 μ m), cuidando de que la cara superior del filtro sea brillante (hidrófuga). Colocar la gota de la disolución de DNA sobre el filtro y dejar dializando durante 30 a 60 min a temperatura ambiente.

19. Recuperar el DNA y pasarlo a un tubo eppendorf. Se puede analizar en minigel de agarosa 0.7 al 1.0 % 1 μ l de la solución. Conservar el DNA congelado a -20°C.

DISOLUCIONES

Las disoluciones I y II coinciden con las empleadas en el método de amplificación de DNA plasmídico (ap.2.3.3.1).

Disolución I

glucosa 50 mM
Tris-HCl 25 mM pH 7.5
EDTA 10 mM

Por 1 ml de disolución : 40 μ l glucosa 1 M, 500 μ l disolución I (2x) y 460 μ l agua estéril. Mantener en hielo.

Disolución I + lisozima

glucosa 50 mM
Tris-HCl 25 mM pH 7.5
EDTA 10 mM
lisozima 40 mg/ml

Se prepara añadiendo lisozima en polvo a la disolución I. Preparar inmediatamente antes de utilizar. Mantener en hielo.

Disolución II

NaOH 0.2 N
SDS 1 %

Para 2 ml de disolución : 200 μ l SDS 10 %, 1760 μ l agua estéril y 40 μ l NaOH 10 N. No enfriar pues precipita SDS.

Tampón TE pH 7.5 RNasa A

Tris-HCl 10 mM pH 7.5
EDTA 1 mM
RNasa A 20 μ g/ml

Añadir 2 μ l RNasa A (10 mg/ml) por ml tampón TE pH 7.5.

OBSERVACIONES

- a. El resto del cultivo se suele emplear, cuando el plásmido es el adecuado, para obtener un glicerinado de stock. Añadir 1.5 ml de cultivo a un criotubo (NUNC 3-68632) con 200 µl de glicerol, agitar con vortex y congelar a -80°C.
- b. Es importante que la incubación con la disolución II en hielo (NaOH) sea exactamente de 5 min. Si se incuba más tiempo aparece una forma del plásmido de mayor movilidad electroforética correspondiente al DNA de cadena sencilla.
- c. Es importante no arrastrar sedimento de la precipitación con acetato potásico (paso 10) pues puede provocar inhibición de algunos enzimas de restricción.
- d. Con este método se han obtenido rendimientos de DNA desde 0.3 µgr (para plásmidos M13) hasta 3.0 µgr (plásmidos pUC). En general el rendimiento es tanto mayor cuanto menor es el tamaño del plásmido.

2.3.3.3 Preparación de la forma replicativa (RF) de M13

PROCEDIMIENTO

1. Seleccionar las células E. coli JM109 F⁺ en medio mínimo + glucosa. Sembrar las células por agotamiento en estria e incubar a 37°C durante 48 h en posición invertida (nota a).
2. Inocular un tubo de cultivo con 4 ml de medio LB con una estria. Crecer durante la noche (>12 h) con vigorosa agitación.
3. En un tubo de cultivo con 4 ml de medio LB añadir 50 µl de cultivo de E. coli JM109 F⁺ y una calva de bacteriófago empleando una aguja estéril (tubo B).
4. Inocular un tubo de cultivo con 4 ml de medio LB con una colonia aislada de E. coli JM109 F⁺ desde una placa de medio mínimo M9 + glucosa (tubo A).
5. Incubar el tubo A y el tubo B durante toda la noche a 37°C con vigorosa agitación.
6. Inocular 500 ml de LB en un matraz de 2 l con 2 ml de precultivo de bacteria (tubo A). Crecer a 37°C con vigorosa agitación hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0.6 (aproximadamente 4 a 5 h).
7. Añadir 1 ml de la suspensión de bacteriófago (tubo B), y crecer 5 h a 37°C con vigorosa agitación.
8. El cultivo se procesa como se describe en ap. 2.3.3.1.

OBSERVACIONES

- a. Es importante que las células de la cepa E. coli JM109 F⁺ procedan de una placa de medio mínimo M9 fresca a fin de evitar la pérdida del factor F en el cultivo en el medio LB, medio rico, no selectivo.

2.3.4 PURIFICACION DE DNA DEL BACTERIOFAGO LAMBDA

El bacteriófago lambda es un virus de DNA de doble cadena con un genoma de aproximadamente 50 kbp. En las partículas virales el DNA se encuentra en forma lineal con extremos de cadena sencilla de 12 bp cohesivos entre sí, los extremos cos. Inmediatamente despues de infectar una bacteria el DNA se circulariza uniéndose los extremos cos y se transcribe como una molécula circular. Es en esta etapa de infección temprana en la que se produce la decisión entre seguir el ciclo lítico o insertarse en el genoma bacteriano (ciclo lisogénico). Durante el ciclo lítico el DNA circular se replica numerosas veces en la célula, sintetizándose un gran número de productos génicos del bacteriófago que permiten la formación y maduración de nuevas partículas virales. La célula lisa y los nuevos bacteriófagos se liberan al medio. Durante el ciclo lisogénico el bacteriófago se integra en el genoma bacteriano y se transmite a la progenie como un gen más (para una revisión de la biología de lambda ver Hendrix et al. (1983) y Ptashne (1986)).

Desde la primera demostración de la utilidad del bacteriófago lambda como vehículo de clonaje (Murray y Murray, 1974; Rambach y Tiollais, 1974; Thomas et al., 1974) se han construido una gran variedad de vectores (Williams y Blattner, 1980; Hendrix et al., 1983; Pouwels et al, 1985). Los vectores derivados de lambda se clasifican en dos grandes grupos: vectores de inserción, aquellos que admiten DNA extraño insertado en su genoma, y vectores de sustitución, que admiten DNA extraño sustituyendo DNA propio. De los vectores que hemos empleado lambda-NM1150 es un vector de inserción y lambda Charon-35 lo es de sustitución.

La preparación de DNA procedente de un bacteriófago no se diferencia en mucho de los métodos generales de obtención de DNA. Sin embargo, la obtención del bacteriófago como material biológico presenta ciertas peculiaridades que dependerán, en primer lugar, del bacteriófago en cuestión.

Hay fundamentalmente dos técnicas para la preparación de grandes cantidades de DNA de bacteriófago lambda. La primera supone la infección de un cultivo bacteriano a baja multiplicidad. El cultivo infectado se inocula entonces en un gran volumen de medio. Inicialmente la concentración de bacteriófago es baja y las células no infectadas en el cultivo continuan dividiéndose durante algunas horas. Sin embargo, despues de sucesivos ciclos de infección la totalidad de la población está infectada y se produce una lisis completa del cultivo. Este método da buenos rendimientos pero como inconvenientes hay que destacar que es muy importante ajustar la multiplicidad de infección original pues afecta de modo importante el rendimiento del proceso. Asimismo hay que destacar que la multiplicidad de infección óptima varía con los vectores.

El segundo método supone inducción de un cultivo de un lisógeno. Este método da elevados rendimientos cuando el represor cI es termosensible (ej cI857), pero sólo puede emplearse con bacteriófagos que formen lisógenos estables.

En nuestro caso se empleó la primera técnica. Se describen técnicas de purificación de DNA de lambda segun Davis et al. (1980) y Maniatis et al. (1982), modificadas.

2.3.4.1 Purificación a pequeña escala de DNA de lambda : minipreparaciones

Esta técnica se emplea para obtener cantidades de DNA pequeñas pero suficientes para realizar mapas físicos de los insertos. Permite analizar un número elevado de muestras, usualmente despues de un proceso de búsqueda ("screening") de clones específicos en una biblioteca de DNA.

Se precisa disponer de una suspensión de bacteriófago de un título mínimo de 10^6 a 10^7 u.f.p./ml. El título de un lisado se define por el número de unidades formadoras de placa (u.f.p.) por ml. Para titular un lisado se prepara un banco de diluciones crecientes ($1/10^2$, $1/10^4$, $1/10^6$, etc) de forma que alguna de ellas presente un número de calvas de lisis suficientemente reducido para que se puedan contar. El título será el número de calvas leídas multiplicado por el inverso de la dilución empleada.

Se describe a continuación el proceso seguido a partir de una placa de cultivo con calvas aisladas de un bacteriófago del que se desea preparar DNA.

PROCEDIMIENTO

a. Preparación de un lisado con título suficiente

1. Inocular un tubo de cultivo con 3 ml de medio LB $MgSO_4$ 10 mM con una estria de una placa fresca de la cepa receptora del bacteriófago. Utilizar E. coli 555 recA⁻ como receptora de lambda-cI857 y de lambda-Charon 35, y E. coli Y1090 como receptora de lambda-NM1150. Incubar a 37°C toda la noche con agitación vigorosa (nota a).
2. Picar una calva aislada de la placa de cultivo con una pipeta Pasteur estéril. Poner el cilindro de agar en un tubo eppendorf.
3. Añadir 500 µl de tampón lambda dil y, seguidamente 20 µl de cloroformo. Dejar a temperatura ambiente un mínimo de 2 h o una noche a 4°C. Una agitación no violenta ayuda a la difusión de las partículas de bacteriófago.
4. Preparar dos placas con 10 y 100 µl del eluido de bacteriófago. Para ello se ponen en tubos de cultivo con 100

- μl de cultivo fresco de bacterias 10 y 100 μl de eluido respectivamente. Se incuban a 37°C durante 25 min. Añadir 3 ml de disolución de agar blando fundido y atemperado a 42°C. Agitar y verter sobre placas de cultivo LB Agar. Dejar 20 min a temperatura ambiente para que solidifique el agar antes de mover las placas.
5. Incubar toda la noche a 37°C en posición invertida (nota b).
 6. Alguna de las dos placas, o las dos, presentarán una gran densidad de calvas de lisis. Añadir a la más poblada 5 ml de tampón lambda dil, y dejar 2 - 3 h a temperatura ambiente en una bandeja con agitación suave.
 7. Pasar el tampón de encima de la placa a un tubo de cultivo con una pipeta Pasteur estéril. Añadir 100 μl de cloroformo. Agitar.
 8. Conservar el eluido a 4°C. En general, el título es ya suficiente para poder obtener minipreparaciones de DNA de lambda.
 9. Preparar un banco de diluciones (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-6}) del eluido con tampón lambda dil. Plaquear 10 μl de cada dilución tal como se describe en 4.
 10. Calcular el título como la media del observado para dos placas, por lo menos.

b. Cultivo líquido

11. Preparar un cultivo de la cepa receptora como en 1.
12. Medir la densidad óptica de una dilución 1/10 en medio LB del cultivo a 600 nm.
13. Calcular la concentración de células (células/ml) en el cultivo (1 U D.O.₆₀₀ corresponde a $8 \cdot 10^6$ células/ml) (Davis, 1980).
14. Mezclar en un tubo de cultivo $6 \cdot 10^6$ células con :
 - 1. $1.25 \cdot 10^7$ u.f.p. si se trata de lambda-Charon 35
 - 1. $1.25 \cdot 10^6$ u.f.p. si se trata de lambda cI857 o lambda NM1150
15. Incubar a 37°C durante 25 min.
16. Inocular un matraz de 50 ml con 15 ml de medio LB MgSO_4 10 mM.
17. Incubar a 37°C durante 5 - 9 h con vigorosa agitación. A partir de las 5 h algunos cultivos lisan, presentando un aspecto turbio y con abundantes restos bacterianos en forma de hebras (nota c).
18. Cuando la lisis del cultivo sea aparente añadir 300 μl de cloroformo. Agitar 10 min a 37°C con vigorosamente.
19. Conservar los cultivos lisados en hielo. Pasar el lisado a un tubo Corex de 30 ml.
20. Centrifugar a 8000 g.p.v. (8000 rpm en rotor Beckman JA20) 10 min a 4°C.
21. Pasar el sobrenadante a un tubo Corex de 30 ml, cuidando de que no pase nada de cloroformo, que suele quedar bajo el sedimento.
22. Añadir 15 μl DNasa I (1 mg/ml) y 1.5 μl RNasa A (10 mg/ml). Incubar 30 min a 37°C.



23. Añadir 15 ml de disolución PEG + NaCl fría (4°C). Incubar al menos 1 h a 4°C.
24. Centrifugar a 10000 g.a.v. (12000 rpm en rotor Beckman JA20) 20 min a 4°C.
25. Eliminar el sobrenadante por aspiración, cuidando de arrastrar al máximo posible las gotas de las paredes del tubo (nota d).
26. Resuspender el sedimento en 500 µl de tampón lambda dil.
27. Pasar a tubo eppendorf.
28. Centrifugar 2 min a temperatura ambiente. Pasar sobrenadante a nuevo eppendorf.
29. Añadir 2.5 ml SDS 10 % y 5 µl EDTA 0.5 M pH 8.5. Incubar 15 min a 68°C.
30. Añadir 500 µl de fenol saturado. Vortex intenso. Centrifugar 5 min a temperatura ambiente. Pasar la fase superior a nuevo eppendorf.
31. Añadir 500 µl de fenol - cloroformo - isoamílico. Agitar con vortex. Centrifugar 2 min. Pasar la fase superior a nuevo eppendorf.
32. Añadir 500 µl de cloroformo - isoamílico. Agitar con vortex. Centrifugar 2 min. Pasar la fase superior a nuevo eppendorf.
33. Añadir 12 µl NaCl 5N y 1 ml de etanol absoluto frío (-20°C). Agitar. Inmediatamente aparece un precipitado blanquecino. Centrifugar 15 min a 4°C.
34. Eliminar el sobrenadante por aspiración. Lavar con 1 ml de etanol al 70 %. Centrifugar 15 min a temperatura ambiente.
35. Eliminar el sobrenadante por aspiración. Secar al vacío.
36. Resuspender el sedimento en 20 ml de tampón TE pH 7.5.
37. Microdializar la muestra de DNA como se describe en ap.2.3.3.2 (20 y 21).
37. Analizar 2 µl en minigel agarosa al 0.7 % para determinar concentración y calidad.

DISOLUCIONES

Medio LB MgSO₄ 10 mM

Se añaden 10 µl de una disolución MgSO₄ 1 M estéril por ml de medio LB estéril.

Disolución de agar blando

0.65 % agar en medio LB

Tampón lambda dil

Tris-HCl 10 mM pH 7.5

MgSO₄ 10 mM

Se prepara a partir de soluciones stock y se esteriliza en autoclave. Conviene manipularlo en cantidades pequeñas para asegurar su esterilidad a microorganismos.

Disolución PEG + NaCl en lambda dil

PEG 6000 20 %
NaCl 2.5 M
Tris-HCl 10 mM pH 7.5
MgSO₄ 10 mM

Se prepara a partir de soluciones stock. Se esteriliza en autoclave. Conservar a 4°C.

OBSERVACIONES

- a. Los pasos del 1 al 18 se han de realizar en condiciones de esterilidad microbiológica. Cuando el lisado obtenido en 20 se emplee como inóculo se mantendrán las condiciones de esterilidad. En el resto de los pasos es suficiente mantener el material libre de DNAsas.
- b. En una calva de lisis de cada uno de los diferentes bacteriófagos empleados se estimó el número de u.f.p., era de $2 \cdot 10^5$ para lambda-Charon 35, y 10 veces más para lambda cI857 y lambda NM 1150. Por ello el título de los eluidos de las placas variaba mucho en función del bacteriófago ($2 \cdot 10^7$ u.f.p./ml eluido para lambda Charon 35, $3.5 \cdot 10^{10}$ u.f.p./ml eluido para lambda NM1150 y lambda cI857). Para obtener placas con lisis confluyente fue necesario plaquear de 100 a 200 µl de eluido de una calva de lambda Charon 35, y 10 µl de eluido para lambda cI857 o lambda NM1150.
- c. El lisado del cultivo en medio líquido (paso 17) no siempre es aparente. Por ello conviene incorporar un control que consiste en un cultivo líquido de 15 ml de LB MgSO₄ 10 mM inoculados con $6 \cdot 10^6$ células. Comparando el control con los cultivos de bacteriófagos determinaremos, por descenso de la turbidez, el momento de la lisis.
- d. El PEG tiene efecto inhibitor sobre algunas endonucleasas de restricción. Es importante eliminar al máximo los restos de la disolución de PEG + NaCl antes de resuspender el sedimento.

2.3.4.2 Purificación a gran escala de DNA de lambda

Se trata de un método fundamentalmente como el anterior pero en el que los volúmenes del cultivo son mayores, hasta 1 l, y en el que el bacteriófago se concentra mediante ultracentrifugación a través de cojines de cloruro de cesio de diferente densidad, según Maniatis (1982). La purificación del DNA a partir de las partículas de virus se realiza según mediante formamida según Davis et al. (1980).

PROCEDIMIENTO

a. Cultivo líquido

1. Inocular un matraz de 50 ml con 15 ml de medio LB con una estria de una placa de la cepa receptora adecuada. Incubar toda la noche a 37°C con agitación vigorosa.
2. Medir la D.O.₆₀₀ del cultivo (dilución 1/10 en medio LB) y determinar el número de células (1 D.O.₆₀₀ corresponde a 8.10⁶ células/ml).
3. En un tubo de cultivo mezclar 1.10¹⁰ células con 5.10⁶ u.f.p. en el caso de bacteriófago lambda-Charon 35, y de 5.10⁷ u.f.p. en el caso de los bacteriófagos lambda-cI857 o lambda-NM1150 (notas a, b).
4. Incubar 25 min a 37°C.
5. Inocular en un matraz de 2 l con 500 ml de medio LB MgSO₄ 10 mM atemperado a 37°C.
6. Incubar a 37°C con vigorosa agitación.
7. Seguir la D.O.₆₀₀ del cultivo a partir de las 3 h de la inoculación con intervalos de 1 h al principio y de 30 min cuando sea elevada. La D.O.₆₀₀ aumenta hasta valores no superiores a 3.5 o 4 y, bruscamente, desciende hasta valores que no suelen ser menores de 0.8 debido a la turbidez del medio causada por los restos celulares.
8. Cuando se produzca el brusco descenso de D.O.₆₀₀ añadir 10 ml de cloroformo al cultivo. Incubar a 37°C 10 min con vigorosa agitación.
10. Dejar en hielo 15 a 20 min.

b. Sedimentación del bacteriófago

11. Pasar el cultivo a botellas de polipropileno de 500 ml (Beckman 339997) y centrifugar a 4000 g.a.v. (10000 rpm rotor Beckman JA10) 10 min a 4°C.
12. Pasar el sobrenadante a un matraz de 1 l.
13. Añadir 50 µl de RNasa A (10 mg/ml) y 500 µl de DNasa A (1 mg/ml). Incubar de 30 min a 1h a 37°C (nota c).
14. Añadir 27.2 g de NaCl. Disolver con una barra magnética estéril agitando de forma suave. Dejar como mínimo 1 h en hielo (nota d, e).
15. Pasar el lisado a botellas de polipropileno de 500 ml (Beckman 339997). Centrifugar a 4000 g.a.v. (10000 rpm rotor Beckman JA10) 10 min a 4°C.
16. Pasar el sobrenadante a un matraz de 1 l.
17. Añadir 50 g PEG 6000. Agitar suavemente con una barra magnética estéril. Dejar al menos 1 h en hielo, si bien es conveniente dejarlo toda la noche.
18. Pasar el lisado a botellas de polipropileno de 500 ml (Beckman 339997). Centrifugar a 4000 g.a.v. (10000 rpm rotor Beckman JA10) 30 min a 4°C.
19. Eliminar el sobrenadante (autoclavarlo antes de desecharlo) y aspirar al máximo los restos de líquido en la botella. Dejar

- secar invertidas las botellas de 10 a 15 min a temperatura ambiente.
20. Resuspender el pellet en 4 ml de tampón lambda dil, cuidando de lavar bien las paredes de la botella.
 21. Pasar la suspensión de bacteriófago a tubos Corex de 15 ml.
 22. Añadir 4 ml de cloroformo. Agitar rápidamente. Centrifugar a 12000 g.a.v. (10000 rpm rotor Beckman JA20) 2 min a 4°C.
 23. Pasar la fase superior a un tubo de cultivo estéril, cuidando de no arrastrar interfase.
 24. Conservar a 4°C hasta ultracentrifugar en cojines de cloruro de cesio.

c. Ultracentrifugación : cojines de cloruro de cesio

25. Preparar en botellas de policarbonato de 13.5 ml (Beckman 336090) cojines de cloruro de cesio (nota f), siendo las capas :
 - inferior : 1.6 ml de disolución 1.6
 - media : 3.5 ml de disolución 1.4
26. Poner sobre los cojines 4 ml de suspensión de bacteriófago.
27. Equilibrar tubos apareados con tampón lambda dil con una diferencia de peso inferior a los 50 mg. Ultracentrifugar a 128000 g.a.v. (38000 rpm en rotor Beckman 50Ti) 2 h a 22°C. Parar sin freno.
28. La banda blanquecina, de bacteriófago, se localiza en la interfase entre las capas inferior y media (notas g, h). Se extrae con una pipeta Pasteur conectada a una jeringa de 2 ml. Pasar a un tubo eppendorf.
29. Preparar en botellas de policarbonato (Beckman 336090) el segundo cojín de cloruro de cesio, siendo las capas :
 - inferior : suspensión de bacteriófago +
1.5 ml de disolución saturada
 - medio : 4 ml de disolución 1.6
 - superior : 2.5 ml de disolución 1.3
30. Ultracentrifugar como en 27.
31. La banda de bacteriófago se localiza en la interfase entre la capa superior y la media. Extraer con una pipeta Pasteur conectada a una jeringa de 2 ml. Pasar a un tubo eppendorf. El volumen resultante es de 0.5 a 1 ml.

d. Purificación del DNA

Según método de la formamida tomado de Davis (1980)

32. Pasar la suspensión de bacteriófago en cloruro de cesio a un tubo Corex de 15 ml. Medir el volumen.
33. Añadir :
 - 0.1 volumen de Tris base 2 M
 - 0.05 volumen de EDTA 0.5 M pH 8.5
 - 1 volumen de formamida desionizada
34. Incubar 30 min a temperatura ambiente.
35. Añadir:

- 1 volumen de agua estéril
6 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C)
36. Dejar 30 min a -70°C o más de 2 h a -20°C.
 37. Centrifugar a 12000 g.a.v. (10000 rpm rotor Beckman JA20) 20 min a 4°C.
 38. Eliminar el sobrenadante. Lavar el sedimento con 5 ml de etanol al 70 %.
 39. Centrifugar como en 37.
 40. Eliminar el sobrenadante. Secar el sedimento.
 41. Resuspender en 1 a 3 ml de tampón TE pH 7.5. La resuspensión es lenta.
 42. Determinar la concentración de DNA por absorción a 260 nm, y la calidad analizando una alícuota en un minigel de agarosa al 0.7 % (nota i).
 43. Conservar la disolución congelada a -20°C.

DISOLUCIONES

Disoluciones de cloruro de cesio en lambda dil

Disolución	CsCl (M)	Tris-HCl PH 7.5 (mM)	MgSO ₄ (mM)	grCsCl/10 ml tampón lambda dil
disolución 1.3	2.5	10	10	4.3
disolución 1.4	3.2	10	10	6.3
disolución 1.6	4.8	10	10	10.2
disolución satur.	8.0	10	10	25

Esterilizar en autoclave las disoluciones.

OBSERVACIONES

- a. Es importante disponer de lisados de bacteriófago con un título elevado con el fin de que, al mezclar el bacteriófago con las células receptoras la cantidad de cloroformo presente en el lisado no mate a las bacterias. En caso necesario, se puede eliminar el cloroformo incubando el lisado 10 a 15 min a 37°C antes de añadir las bacterias. Los títulos de los lisados empleados fueron de $5 \cdot 10^6$ a $5 \cdot 10^9$ u.f.p./ml para lambda Charon 35, y de $5 \cdot 10^{10}$ u.f.p./ml para lambda NM1150 y cI857.
- b. Para obtener lisados de título suficiente en el caso de lambda Charon 35, fue necesario obtener un primer lisado a partir de la elución de una placa con lisis confluyente. A partir de este primer lisado, titulado, se podía realizar un crecimiento en medio líquido a pequeña escala (15 a 50 ml) obteniéndose un segundo lisado que, titulado, era empleado como inóculo del cultivo a gran escala así como de lisado stock del aislamiento.
- c. Es importante hacer una prolongada digestión del lisado con DNasa y RNasa para evitar que los ácidos nucleicos que liberan las bacterias al lisar atrapen las partículas víricas, lo que comporta una reducción en el rendimiento.

- d. En el caso de bacteriófagos que como lambda cI857 y lambda NM1150 crecen bien y dan elevados rendimientos es posible unir en un mismo paso la precipitación por NaCl y por PEG (pasos 14, 15, 16 y 17) en una misma precipitación disolviendo juntos los dos productos.
- e. La agitación de las soluciones que contienen bacteriófago ha de ser lenta y no violenta.
- f. Los cojines de cloruro de cesio se montan con relativa facilidad empleando jeringas de 1 ml conectadas a cánulas de 1.0 mm de ϕ . De este modo se puede añadir la disolución de una capa sobre la inferior gota a gota sobre la interfase produciendo una distorsión mínima. La suspensión de bacteriófago en el primer cojín se añadía directamente con una pipeta automática Gilson P200. En el montaje del segundo cojín un truco que facilita notablemente la operación es añadir la disolución saturada sobre la suspensión del bacteriófago directamente sobre el tubo de centrifuga de modo que se forme espuma. Al dejar caer las gotas de las capas superiores gota a gota sobre las burbujas la distorsión se minimiza.
- g. Después de la primera ultracentrifugación el bacteriófago se localiza en la interfase inferior, entre las capas de densidades 1.4 y 1.6. Las proteínas quedan retenidas en la primera interfase formando una gruesa capa y los ácidos nucleicos pasan hasta la capa inferior donde el RNA sedimenta. Después de la segunda centrifugación el bacteriófago se localiza en la interfase superior entre las capas de densidades 1.3 y 1.6, quedando los ácidos nucleicos retenidos en la capa inferior.
- h. El bacteriófago lambda Charon 35 y derivados dan rendimientos escasos. La banda de virus en los cojines es muy tenue y se ve con dificultad incluso sobre fondo negro.
- i. Los rendimientos dependen fundamentalmente del bacteriófago, y en nuestras manos fueron de 300 $\mu\text{g}/100$ ml cultivo para lambda NM1150 y cI857, y de 50 a 120 $\mu\text{g}/100$ ml cultivo para lambda Charon 35.

2.4 DIGESTION DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICION

Muchos microorganismos sintetizan un conjunto de enzimas denominados endonucleasas de restricción cuya función es proteger el organismo degradando el DNA extraño. Cada enzima reconoce una secuencia en el DNA de doble cadena de 4 ó 6 nucleótidos. La secuencia correspondiente en el genoma del organismo se encuentra modificada por metilación en adenina o citosina, a diferencia de las presentes en el DNA extraño invasor. El descubrimiento de este tipo de enzimas ha dotado de una potente herramienta de manipulación de las moléculas de DNA. En la actualidad se han aislado más de 350 enzimas (Kessler et al, 1985; Kessler y Höltke, 1986).

Se diferencian tres tipos de endonucleasas de restricción. Los denominados tipos I y III presentan juntos en la misma molécula proteica las actividades modificadora (metiltransferasa) y restrictiva (endonucleasa). Estos dos tipos requieren para su actividad ATP como cofactor y reconocen secuencias no metiladas en el DNA. Los enzimas de tipo I cortan el DNA al azar y los de tipo III lo cortan en dianas específicas.

Los enzimas de tipo II son los más empleados en manipulación de DNA. Se trata de enzimas que reconocen dianas específicas en el DNA de doble cadena y presentan únicamente actividad restrictiva (endonucleasa) estando la actividad modificadora (metiltransferasa) correspondiente asociada a otra proteína. A pesar de la diversidad de las fuentes de las que se han aislado estos enzimas las condiciones de reacciones son esencialmente las mismas : DNA sustrato incubado a 37°C en una solución tamponada de pH cercano a 7.5 y que contiene iones Mg^{2+} , frecuentemente Na^+ , y el enzima de restricción. Estos enzimas no precisan ATP pero son dependientes de Mg^{2+} y reconocen secuencias palindrómicas de 4 a 6 pares de bases cortando las dos cadenas del DNA en la secuencia o cerca de ella.

Las "condiciones óptimas de digestión para los distintos enzimas no son muy estrictas. Deben considerarse fundamentalmente dos variables : temperatura y composición del tampón de digestión. Los requerimientos en cuanto a temperatura son más estrictos que en cuanto a la composición salina. Se ha llegado a diseñar un tampón de digestión adecuado para la mayor parte de los enzimas (tampón KGB) (McClelland et al, 1988). Por ello, en la práctica, se emplean básicamente tres tipos de tampón de digestión diferente, denominados de baja, media y alta fuerza iónica. Hay enzimas, como SmaI y XbaI, que requieren un tampón especial (tampón (1), ver disoluciones ap. 2.4.2). En estos tampones los enzimas no presentan una actividad máxima, por lo cual en casos especiales, en que interesó aumentar el rendimiento en las digestiones, se emplearon tampones especialmente preparados para el enzima en cuestión, descritos como óptimos por

la casa comercial suministradora.

Las digestiones se hicieron habitualmente a una concentración de DNA de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ empleando de 2 a 4 veces la cantidad de enzima requerida. Se entiende por 1 unidad de enzima de restricción la cantidad de enzima requerida para digerir 1 μg de DNA de λ cI857 en 1 h a la temperatura de digestión óptima. Las digestiones se incubaron de 1.5 a 3 h.

Las condiciones de digestión usadas habitualmente se describen en la tabla 2.4.b.

2.4.1 DIGESTION DE DNA CON UN SOLO ENZIMA DE RESTRICCIÓN

PROCEDIMIENTO

1. Diluir el DNA en tampón TE pH 7.5 a una concentración entre 0.1 y 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
2. Añadir 1/10 de volumen del tampón de digestión apropiado (11x) (ver tabla 2.4.b) (nota d).
3. Añadir enzima en exceso de dos a cinco veces la cantidad necesaria.
4. Mezclar bien y centrifugar brevemente.
5. Incubar de 1.5 a 3 h a la temperatura apropiada.
6. La reacción se puede detener añadiendo EDTA 0.5 M pH 8.5 hasta una concentración final de 10 mM o bien calentando a 70°C durante 5 a 10 min, si el enzima es sensible a inactivación por calor (ver tabla 2.4.b).
7. Tomar una alícuota de la restricción, añadir tampón de muestras de electroforesis y aplicar en un minigel de agarosa para visualizarlo.

2.4.2 DIGESTION DE DNA CON MAS DE UN ENZIMA DE RESTRICCIÓN

Si se ha de cortar el DNA con más de un enzima de restricción, las dos digestiones pueden hacerse simultáneamente si los enzimas pueden actuar en las mismas condiciones de salinidad. En caso contrario, se realiza primero el corte con el enzima cuyo requerimiento salino es más bajo, se corrige la concentración salina y se realiza el segundo corte. En el caso de que las dos dianas de corte estén próximas, pueden producirse impedimentos para que se realice bien el segundo corte, por lo que entre uno y otro hay que incluir un proceso de fenolización de la muestra para extraer las proteínas y una precipitación con etanol, resuspendiendo el DNA en un medio adecuado a la actuación del segundo enzima. Esto es especialmente importante en la preparación de los vectores de clonaje donde las dianas de restricción en el "polylinker" están muy próximas.

PROCEDIMIENTO

1. Cortar el DNA con el enzima que utiliza el tampón de fuerza iónica menor (ap.2.4.1).
2. Inactivar el enzima con EDTA o por temperatura.
3. Añadir 1/10 de volumen del tampón de corrección apropiado (11x).
4. Añadir el segundo enzima con un exceso de 2 a 5 veces el necesario.
5. Mezclar bien y centrifugar brevemente.
6. Incubar de 1.5 a 3 h a la temperatura adecuada.
7. Parar la restricción con EDTA o por efecto de la temperatura.
8. Analizar una alícuota por electroforesis en geles de agarosa o acrilamida.

DISOLUCIONES

Tampones de digestión

<u>tampón</u>	<u>NaCl (mM)</u>	<u>Tris-HCl pH 7.5 (mM)</u>	<u>MgSO₄ (mM)</u>	<u>DTT (mM)</u>
BAJA	0	10	10	1
MEDIA	50	10	10	1
ALTA	100	50	10	1
(1)	20 (KCl)	10 pH 8.0	10	1

Tampones de digestión (11x)

Para DNA en TE pH 7.5

<u>tampón</u>	<u>NaCl (M)</u>	<u>Tris-HCl pH 7.5 (M)</u>	<u>MgSO₄ (M)</u>	<u>DTT (M)</u>
BAJA	0	0	0.13	0.011
MEDIA	0.55	0	0.13	0.011
ALTA	1.10	0.44	0.13	0.011

Tampones de corrección (11x)

<u>tampón</u>	<u>NaCl (M)</u>	<u>Tris-HCl pH 7.5 (M)</u>	<u>MgSO₄ (M)</u>
BAJA a MEDIA	0.55	0.01	0.01
MEDIA a ALTA	0.60	0.45	0.01
BAJA a ALTA	1.10	0.45	0.01

OBSERVACIONES

- a. Los enzimas de restricción son estables a -20°C en 50% glicerina. A temperatura ambiente pierden actividad rápidamente.
- b. Ciertos enzimas, en determinadas condiciones, presentan una actividad secundaria (actividad "star"), que permite reconocer una secuencia de restricción alterada. En general

reconocen sólo los nucleótidos centrales de la secuencia de reconocimiento. Algunas de las causas que provocan esta actividad se resumen en la tabla 2.4.a, siendo las más frecuentes una concentración de glicerol en el medio de reacción superior al 10%, o una relación de unidades de enzima/ μ gr DNA superior a 25.

- c. La mayoría de las cepas de E. coli tienen dos metiltransferasas de DNA, dam y dcm-metiltransferasas. La dam-metiltransferasa reconoce la secuencia 5'-GATC-3' metilando la posición N6 de la adenina. La dcm-metiltransferasa reconoce la secuencia 5'-CC(A/T)GG-3', metilando la posición C5 de la citosina. Estas secuencias forman parte de las dianas de reconocimiento de algunos enzimas de restricción, siendo inhibidos por la metilación (ver tabla 2.4.c).
- d. En los casos en que fue necesario cortar bastante DNA con un enzima de restricción para optimizar la reacción se emplearon tampones de digestión óptimos como los recomendados por las propias casas suministradoras. En nuestro caso se emplearon los tampones suministrados por Amersham que se detallan a continuación (concentraciones en mM, composición 1x, se suministran 10x) :

tampón	Tris-HCl	pH	NaCl	MgCl ₂	β -merc	BSA	Otros	Enzimas
E1	10	7.5	175	7	7	0	0.2 EDTA	SalI
E4	10	7.5	150	7	7	0		EcoRI
E5	20	7.5	100	10	0	0		PstI
E6	10	8.0	100	7	7	0		BamHI
E8	10	7.5	60	7	7	0		HindIII HaeIII
E13	6	7.5	6	6	6	0.02%		EpnI
E14	10	7.5	0	7	7	0		SacI
E17	10	8.0	0	7	7	0	150 KCl	PvuI
E19	10	8.0	0	7	7	0	20 KCl	SmaI

Enzima	A	B	C	D	E	F	G	H
AvaI	+	+		+				
BamHI	+	+	+	+				+
BstI		+	+					
BsuI		+		+		+		
EcoRI	+	+		+	+	+		
HaeIII		+		+				
HhaI		+		+				+
HindIII					+			
HpaI	+	+		+				
PstI	+	+		+				+
PvuII		+		+				
SaiI	+	+		+				+
SstI		+		+				+
SetI		+		+				+
XbaI		+		+				+

causas de actividad "star" :

- A. etilén glicol (45 %)
- B. glicerol (12-20 %)
- C. etanol (12 %)
- D. concentración de enzima (> 25 U / µgr DNA)
- E. sustitución de Mg²⁺ por Mn²⁺
- F. pH 8.5
- G. dimetilsulfoxido (8 %)
- H. ausencia de NaCl

Tabla 2.4 : Condiciones de reacción que inducen actividad "star" en algunos enzimas (de Fuchs y Blakesley, 1983).

enzima	salinidad	temperatura (°C)	inac. calor	diana
AccI	media	37	si	GT*A/CG/TAC
AluI	media	37	si	AG*CT
AvaI	media	37	si	G*PyCGPuG
AvaII	media	37	si	G*GGA/TCC
AvrII	baja	37	si	CCTAGG
BamHI	media	37	no	G*GATCC
BbvI	baja	37	si	GCT/AGC
BclI	media	60	no	T*GATCA
BglI	media	37	si	GCCNWN*NGGC
BglII	media	37	si	A*GATCT
BstBII	media	60	no	G*GTNACC
BstNI	baja	60	no	CC*A/TGG
DdeI	media	37	si	C*TNAG
EcoRI	alta	37	no	G*AAATTC
EcoRII	alta	37	si	*CCA/TGG
Fnu4HI	baja	37	si	GC*NGC
FnuDII	baja	37	si	CG*CG
HaeI	baja		si	A/TGG*CCT/A
HaeII	baja	37	si	PuGCGC*Py
HaeIII	baja	37	si	GG*CC
HgaI	media	37	si	CACGCN ₂ /1,*
HgiAI	alta	37	si	GT/AGCT/A*C
HhaI	media	37	si	GC*GC
HincII	media	37	si	GTPy*PuAC
HindII	media	37	si	GTPy*PuAC
HindIII	media	37	no	A*AGCTT
Hinfi	media	37	si	G*ANTC
HpaI	baja	37	si	GTT*AAC
HpaII	baja	37	si	C*CGG
HphI	baja	37	si	GGTCAN ₂ /,*
KpnI	baja	37	si	GGTAC*C
MboI	alta	37	si	*GATC
MboII	baja	37	si	GAAGAN ₂ /,*
MspI	baja	37	si	C*CGG
PstI	media	37	si	CTGCA*G
PvuI	alta	37	si	CGATCC
PvuII	media	37	si	CAG*CTG
SacI	baja	37	si	GAG*CTC
SacII	baja	37	si	CCGC*GG
SalI	alta	37	no	G*TCGAC
Sau3AI	media	37	si	*GATC
SmaI	(1)	37	si	CCC*GGG
TaqI	baja	65	no	T*CGA
XbaI	alta	37	si	T*CTAGA
XhoI	alta	37	si	C*TCGAG
XmaI	baja	37	si	C*CCGGG

Tabla 2.5 : Condiciones de digestión para los diferentes enzimas de restricción (tomada de Maniatis et al(1982)y modificada).

Endonucleasas sensibles a metilación en A

1. sin superposición con la diana de dam-metiltransferasa

EcoRI	GAA [*] TTC	AccI	GT(A/C)(G/T)A [*] C
HpaI	GTTAA [*] C ^o	HindII ^o	GTPyPuA [*] C
HindII	A [*] A ^o GC ^o TT	XhoI	CTC [*] GA [*] G
MboII	GAAGA [*] (N) _{1,2}		

2. con superposición con la diana de dam-metiltransferasa

BstBIII	<u>GA[*]TC</u>	CpaI	<u>GA[*]TC</u>
DpnII	<u>GA[*]TC</u>	FnuAII	<u>GA[*]TC</u>
FnuCI	<u>GA[*]TC</u>	MboI	<u>GA[*]TC</u>
MnoIII	<u>GA[*]TC</u>	MosI	<u>GA[*]TC</u>
NdeII	<u>GA[*]TC</u>	AtuCI	<u>TGA[*]TCA</u>
BclI	<u>TGA[*]TCA</u>	BstGI	<u>TGA[*]TCA</u>
CpeI	<u>TGA[*]TCA</u>	XbaI	<u>TCTAGA[*]</u>
TaqI	<u>TCCA[*]</u>	TthBBI	<u>TCCA[*]</u>
ClaI	<u>ATCGA[*]T</u>		

Endonucleasas sensibles a metilación en C

1. sin superposición con la diana de dcm-metiltransferasa

BamHI	<u>GGATC[*]C^o</u>	AluI	AGC [*] T
HaeIII	<u>GGC[*]C^o</u>	BalI	TGGC [*] CA
HhaI	GC [*] GC [*]	HaeII	PuGC [*] GCPy
HapII	CC [*] GG	HpaII	C [*] C [*] GG
HspI	C [*] C [*] GG	SmaI	CCC [*] GGG
SalI	GTC [*] GAC	XhoI	CTC [*] GA [*] G
AvaI	CPyCGPuG	AhaI	CC [*] (G/C)GG
BbvI	GCAGC(N) _{1,2}		

2. con superposición con la diana dcm-metiltransferasa

AvaII	<u>GG(A/T)CC[*]</u>	Sau96I	<u>GGNCC[*]</u>
AtuBI	<u>CC[*](A/T)GG</u>	AtuII	<u>CC[*](A/T)GG</u>
BstGII	<u>CC[*](A/T)GG</u>	BcaII	<u>CC[*](A/T)GG</u>
EclII	<u>CC[*](A/T)GG</u>	EcoBII	<u>CC[*](A/T)GG</u>
MphI	<u>CC[*](A/T)GG</u>		

A^{*} : N⁶-metiladenina C^{*} : 5-metilcitosina
A^o, C^o : no se produce inhibición si está metilado

Tabla 2.6 : Listado de enzimas sensibles a metilación en A o C con sus dianas (tomado de McClelland, 1981; Roberts, 1982).

2.4.3 CONSTRUCCION DE MAPAS DE RESTRICCION

La construcción de mapas de restricción es un proceso complejo que supone realizar digestiones de fragmentos de DNA con uno, dos o más enzimas de restricción, determinando los tamaños de los distintos fragmentos con la mayor precisión posible por electroforesis en geles de agarosa y acrilamida de distintos porcentajes. La construcción de mapas de insertos grandes como es el caso de los bacteriófagos recombinantes de una librería genómica es complejo. En nuestro caso se realizaron para cuatro enzimas (BamHI, KpnI, EcoRI y HindIII), y se localizaron los fragmentos de interés que, después de clonados en plásmidos, se mapearon con mayor detalle.

En primer lugar se emplean enzimas de restricción que reconocen dianas de 6 bp, y en una segunda fase enzimas que reconocen dianas de 4 bp. Las restricciones se realizan como se describe en los ap. 2.4.1 y 2.4.2. Las electroforesis se describen en el ap. 2.5.

2.4.4 DIGESTION DE DNA GENOMICO CON ENZIMAS DE RESTRICCION

La elevada complejidad del DNA genómico, así como el desconocimiento tanto del número de dianas para un determinado enzima, como de las modificaciones que pueda presentar y de su posible estructura, hacen que al digerir en cantidades importantes de dicho DNA (10 a 100 µgr) se intenten optimizar las condiciones de digestión adoptando las siguientes medidas :

1. emplear una concentración de DNA no superior a 0.1 µgr/µl.
2. añadir al medio de reacción BSA libre de nucleasas a una concentración de 100 µgr/ml, con la finalidad de proteger el enzima de restricción.
3. añadir el enzima de restricción en 3 fases, cada 2 h de digestión, en una relación de 5 U / µgr DNA cada vez. La alternativa de incubar el DNA un largo período de tiempo con gran exceso de enzima no es adecuada, pues se sabe que muchos enzimas de restricción carecen de actividad después de 2 a 3 h a la temperatura de digestión.
4. añadir a la digestión una pequeña cantidad de DNA control. En el caso de digestiones con enzimas que reconocen 6 bp se añade DNA de lambda-cI857, de patrón de restricción conocido, a una concentración de 1 ng/µg DNA genómico. Cuando se emplean enzimas que reconocen dianas de 4 bp se emplea DNA de los plásmidos pBR322 ó pUC18/19 a la misma concentración. La transferencia de una alícuota del DNA digerido a filtros de nitrocelulosa, hibridando posteriormente con DNA control marcado radiactivamente debe revelar, de ser completa la digestión, el patrón de bandas esperado para una digestión exhaustiva del DNA control. Es importante añadir este control interno de digestión hasta determinar las condiciones óptimas en cada caso.

2.5 ELECTROFORESIS DE DNA

Las técnicas electroforéticas son muy utilizadas en la separación e identificación de fragmentos de DNA y RNA, así como para su aislamiento a partir de una mezcla heterogénea (electroforesis preparativas).

La electroforesis de DNA puede realizarse con soporte de agarosa (Helling et al., 1974), acrilamida (Maniatis et al., 1975) o en geles combinados agarosa-acrilamida. La aplicación más común es la separación de fragmentos de DNA de doble cadena a valores de pH neutros. En esas condiciones, el DNA presenta una carga neta negativa y migra a partir de un pocillo situado en el cátodo hacia el ánodo del sistema. La movilidad electroforética de los fragmentos de DNA es dependiente del tamaño y viene afectada muy escasamente por la composición de bases o la secuencia. Los factores determinantes de la movilidad son los siguientes (Maniatis, 1982):

- A. Longitud del DNA. Las moléculas de DNA lineal migran a través del gel a una velocidad que es inversamente proporcional al log de su peso molecular. De este modo puede determinarse la longitud de un fragmento de DNA desconocido por co-electroforesis con marcadores de peso molecular conocido. Los marcadores que se han empleado se recogen en la tabla 2.5.a.
- B. Conformación del DNA. El DNA circular cerrado (forma I), DNA circular relajado (forma II) y el DNA lineal (forma III) del mismo peso molecular se desplazan en un gel a diferente velocidad. Las movilidades relativas dependen esencialmente de la porosidad del gel aunque también están influidas por la corriente aplicada, la fuerza iónica del tampón de recorrido así como por la densidad de giros superhelicoidales de la molécula circular cerrada (forma I). En los geles más comunmente empleados, geles de agarosa de 1 %, el orden a partir de la banda de migración más rápida sería DNA circular cerrado, DNA lineal y DNA circular relajado.
- C. Porosidad del gel. Existe una relación directa entre el log de la movilidad electroforética de un fragmento de DNA y la porosidad del gel. Los geles de agarosa pueden usarse para separar fragmentos de DNA desde 70 bp (agarosa 3 %) hasta 800000 bp (agarosa 0.1 %) (Fangman, 1978), y los geles de acrilamida se usan para separar fragmentos de entre 6 bp (acrilamida 20 %) a 1000 bp (acrilamida 3 %). Como referencia se puede seguir la tabla siguiente :

<u>Gel</u>	<u>X</u>	<u>intervalo de separación</u>
agarosa	0.3	60 - 5.0 kbp
agarosa	0.7	20 - 1.0 kbp
agarosa	1.2	6 - 0.4 kbp
agarosa	1.5	4 - 0.2 kbp
agarosa	2.0	2 - 0.1 kbp
acrilamida	3.5	1 - 0.1 kbp
acrilamida	6.0	500 - 60 pb
acrilamida	10	300 - 25 pb
acrilamida	20	50 - 1 pb

D. Corriente aplicada. La velocidad de migración de fragmentos de DNA lineal es proporcional al voltaje aplicado cuando este es bajo. Para obtener la máxima resolución de los fragmentos de DNA los geles no se deben correr a más de 5 V/cm.

La cantidad más pequeña de DNA no radiactivo detectable en un gel en cualquier clase de tamaño es de 1 ng, con una resolución menor al 0.5 % de la longitud del fragmento.

2.5.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Se emplearon geles horizontales de tres diferentes tamaños :

- a. minigeles : 10.2 x 6.5 cm, con un volumen de 30 ml
- b. geles medianos : 15 x 10.7 cm, con un volumen de 100 ml
- c. geles grandes : 20 x 18.2, con un volumen de 150 ml

La elección de uno u otro dependió del experimento concreto a realizar. Así para análisis de calidad y cantidad de DNA y comprobación de digestiones, se emplearon minigeles, y se usaron los geles medianos y grandes para electroforesis preparativas y estudio de DNA genómico. La ventaja de los minigeles es de tipo económico pues los volúmenes de gel y muestra necesaria son menores, así como de tiempo pues la electroforesis puede hacerse en 1 h.

2.5.1.1 Geles de agarosa nativos

En los geles de agarosa nativos el DNA corre en forma de doble cadena. Su migración viene afectada por los factores que se han descrito anteriormente. Paralelamente a la muestra analizada, se corrían diferentes marcadores de peso molecular, en el margen de tamaños en que se esperaban los fragmentos problema. Los marcadores más usuales se describen en la tabla 2.5.a.

PROCEDIMIENTO

1. Pesar la cantidad correspondiente de agarosa en polvo y añadir

- el volumen correspondiente de tampón de electroforesis.
2. En un horno de microondas calentar a pulsos hasta fundir la agarosa, evitando que queden partículas libres.
 3. Atemperar la disolución en un baño a 50 - 55°C. Añadir bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml a partir de una solución stock de 10 mg/ml (nota i).
 4. Verter la solución sobre un molde en el que se han sellado los extremos con cinta adhesiva. Colocar el peine a 0.5 - 1 cm del extremo verificando que está separado de la base del gel 0.5 a 1 mm para que los pocillos sean estancos. Dejar a temperatura ambiente de 30 min a 1 h.
 5. Quitar el peine cuidando de no desgarrar los pocillos. Colocar el gel en la cubeta de electroforesis llena de tampón de electroforesis con bromuro de etidio (nota i). El tampón debe cubrir completamente el gel. Se trata de geles sumergidos en su totalidad (nota a).
 6. Las muestras se preparan añadiendo 1/5 volumen de tampón de muestras (6x). Calentarlas 5 min a 65°C y cargar el gel (notas b, c, d, e).
 7. Aplicar un voltaje constante entre 20 y 80 V (dependiendo del tipo de gel) corriendo hasta que el primer colorante, azul de bromofenol, haya recorrido 2/3 partes del gel (nota k).
 8. Visualizar el gel a través de un transiluminador de luz UV (nota j) (302 nm) fotografiándolo a través de filtro rojo (Kodak 23A) (notas f, g, h).

DISOLUCIONES

Tampones de electroforesis

a. Tampón Tris-acetato (TAE) (50x)

Tris 40 mM
ácido acético 20 mM
EDTA 2 mM
pH 8.1

Para preparar 1 litro disolver 242 g de Tris en 800 ml de agua MilliQ, añadir 57.1 ml de ácido acético y 37.2 g de EDTA. Enrasar a 1 l. Filtrar a través de un filtro de ϕ de poro 0.45 µm (Millipore HAWPO4700). Conservar a 4°C.

b. Tampón Tris-borato (TBE) (10x)

Tris 89 mM
ácido bórico 89 mM
EDTA 2.5 mM
pH 8.3

Para preparar 1 l disolver 108 g de Tris en 800 ml de agua MilliQ. Añadir 55 g de ácido bórico y 9.3 g de EDTA. Enrasar a 1 l. Filtrar a través de un filtro de ϕ de poro 0.45 µm (Millipore HAWPO4700). Si se almacena

mucho tiempo aparecen precipitados que lo inutilizan.

Tampón de muestras (6x)

Ficoll 400 30 %

xilencianol 0.25 %

azul de bromofenol 0.25 %

EDTA 10 mM pH 8.5

Disolver 25 mg de cada colorante (xilencianol y azul de bromofenol) por ml de Ficoll 400 al 30%. Añadir 2 μ l EDTA 0.5 M pH 8.5 por ml solución. Esterilizar en autoclave.

OBSERVACIONES

- a. Se emplea, en la mayor parte de los casos, TAE como tampón de electroforesis a pesar de que su capacidad tamponadora es baja. Por ello en electroforesis largas se recomienda emplear TBE.
- b. En el tampón de carga se puede emplear también glicerol en lugar de Ficoll. La ventaja de este último es que confiere a este tampón una densidad superior facilitando la carga y evitando que las bandas de DNA migren en el gel en forma de U.
- c. La cantidad de DNA que debe cargarse en cada pocillo depende del número de fragmentos y de su longitud. En minigeles se aplicaron normalmente del orden de unos 100 ng de DNA por banda. Se pueden detectar, no obstante, hasta 10 ngr.
- d. Las muestras que contienen fragmentos de restricción de DNA se calientan siempre antes de cargarlas en el gel para evitar que los extremos cohesivos que estén unidos mantengan fragmentos unidos en la electroforesis haciendo aparecer o desaparecer bandas artefactuales. Esto es especialmente importante en el caso de los marcadores de peso molecular obtenidos por restricción de DNA de lambda debido a la presencia de los extremos cos.
- e. Cuando se trabajó con DNA genómico se aplicaron siempre 10 μ gr de DNA por pocillo empleando geles medianos o grandes.
- f. En caso de querer visualizar bandas con muy poco DNA, hasta 1 ngr, es necesario eliminar el bromuro de etidio del gel, lo que se consigue sumergiendo éste en una solución de $MgSO_4$ 1 mM durante 30 min a temperatura ambiente.
- g. Cuando se desea comparar muestras de diferente contenido en sales es importante corregir las diferencias, pues la cantidad de sales en la muestra influye en la movilidad del DNA.
- h. En el caso de que la muestra que se carga en el pocillo contenga mucha proteína parte del DNA puede quedar retenido en el pocillo, agregado.
- i. El bromuro de etidio es un agente mutágeno. Conviene, por tanto, manipular siempre con guantes los geles y las disoluciones que lo contengan.

- j. Es importante evitar al máximo la irradiación con luz UV del transiluminador, pues provoca quemaduras en la piel, así como graves daños en la retina. Visualizar los geles protegidos con gafas que filtren la radiación UV.
- k. La migración correcta del DNA puede seguirse visualizando el gel en el transiluminador cuando sea necesario o mediante los colorantes que aporta el tampón de muestras. Como aproximación se puede tener en cuenta la siguiente tabla en la que se recoge la movilidad de los dos colorantes (en equivalentes a kbp) empleados a diferentes concentraciones de agarosa :

<u>Concentración de agarosa</u>	<u>silencianol</u>	<u>azul de bromofenol</u>
0.5 %	12	1.5
0.8 %	4.5	1.0
1.0 %	2.4	0.6
1.5 %	1.9	0.39
2.5 %	1.0	0.15

2.5.1.2 Geles de agarosa alcalinos

El DNA lineal en un medio alcalino se desnaturaliza, separándose las dos cadenas. En los geles de agarosa alcalinos el DNA migra desnaturalizado. Esto es importante cuando se pretende determinar el tamaño de sondas de DNA marcadas por "nick translation" o por "random primer". Se describe el procedimiento empleado para la determinación del tamaño de un fragmento de DNA marcado radiactivamente.

PROCEDIMIENTO

1. Pesar la cantidad necesaria de agarosa en polvo. Añadir el volumen preciso de solución del gel (nota a).
2. En un horno microondas fundir la agarosa.
3. Atemperar en un baño a 50 - 55°C.
4. Verter la solución en un soporte de gel con los bordes sellados con cinta adhesiva. Poner el peine.
5. Dejar a temperatura ambiente entre 30 min y 1 h.
6. Quitar el peine, eliminar la cinta adhesiva. Colocar el gel sumergido completamente en solución de electroforesis alcalina. Dejar al menos 30 min antes de cargar.
7. Preparar las muestras :
 - x µl DNA
 - 2 µl tampón de muestras (6x)
 - 1 µl solución NaOH - EDTA
 - (7-x) µl agua estéril
8. Quitar todo el líquido que cubre el gel, y elevar éste sobre el soporte, por ej. poniendo debajo un peine. Montar una bomba peristáltica que recircule la solución de

- electroforesis alcalina (notas b, c).
9. Cargar las muestras. Aplicar un voltaje constante entre 30 y 80 V (usualmente 60 V, 7.5 V/cm) y dejar correr hasta que el primer colorante (azul de bromofenol) recorra las 2/3 partes del gel (aprox 2 h, para minigel).
 10. Una vez acabada la electroforesis fijar el DNA con TCA 7 % durante 30 min a temperatura ambiente. Secar el gel entre papeles de filtro con un peso encima durante 10 min y terminar de secarlo en un secador de geles conectado a un liofilizador (nota d).
 11. Recubrir el gel con una película plástica y exponerlo frente a una película autorradiográfica.

DISOLUCIONES

Disolución de electroforesis alcalina

NaOH 30 mM
EDTA 2 mM pH 8.5

Disolución NaOH - EDTA

NaOH 0.5 M
EDTA 10 mM
Justo antes de usar poner 2.5 µl NaOH 10 N, 1 µl EDTA 0.5 M pH 8.5 en 46.5 µl agua.

Disolución del gel

NaCl 50 mM
EDTA 1 mM pH 8.5
Para minigel mezclar 0.3 ml NaCl 5 N con 60 µl EDTA 0.5 M pH 8.5 en 30 ml de agua.

OBSERVACIONES

- a. Debido a que la adición de hidróxido sódico a la solución de agarosa caliente produce la hidrólisis de ésta, se gelifica el gel en una solución tamponada neutra, y se equilibra posteriormente en la disolución de electroforesis alcalina. Es conveniente vigilar la intensidad de corriente que circula a través del gel a lo largo de la electroforesis.
- b. La solución de electroforesis alcalina no es una solución tamponada y por ello es importante que su recircularización sea rápida. Una bomba peristáltica puede homogeneizar la solución de electroforesis durante el proceso.
- c. Conviene que el gel no quede sumergido durante la electroforesis para evitar la difusión de las muestras y del colorante. Antes de cargar las muestras es conveniente poner debajo del soporte del gel un peine que lo eleve y abra una comunicación entre las cubetas de los dos electrodos.
- d. En muchos casos es importante visualizar el DNA en el gel,

como por ejemplo los marcadores de peso molecular. Para ello despues de la electroforesis se recorta el trozo que corresponde a los marcadores, se neutraliza en una solución de Tris-HCl 1 M pH 7.5 1.5 M NaCl durante 30 min, tiñéndolo posteriormente en una solución de 0.5 µg/ml de bromuro de etidio en agua durante 15 a 30 min. La visualización se realiza en un transiluminador UV de 306 nm.

2.5.2. GELES DE ACRILAMIDA

Los geles de acrilamida se emplearon para separar fragmentos de DNA en un margen de tamaños desde 10 a 500 bp. Los geles empleados fueron verticales. Se emplearon geles de diversos tamaños:

- minigeles (6.5 x 10 cm).
- geles medianos (16.5 x 23.5 cm).
- geles de secuencia de DNA (38 x 50 cm).

Se describe el procedimiento para geles medianos de 16.5 x 23.5 cm.

PROCEDIMIENTO

1. Preparar la solución de acrilamida necesaria según la tabla siguiente (notas a, c) :

<u>reactivos</u>	<u>% gel de poliacrilamida</u>			
	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>8</u>	<u>12</u>
solución de acrilamida 20 %	20.0	30.0	40.0	60.0
TBE (10x)	10.0	10.0	10.0	10.0
persulfato amónico 10 %	0.8	0.8	0.8	0.8
agua	69.2	59.2	49.2	29.2
	----	----	----	----
volumen total (ml)	100.0	100.0	100.0	100.0

2. Poner la solución en un matraz kitasato y desgasificar durante 15 a 30 min.
3. Limpiar muy bien las placas de vidrio (16.5 x 23.5 cm) con etanol. Colocar las placas una encima de otra separadas por los espaciadores (metacrilato de 1.5 mm de espesor), fijarlas con pinzas y sellar alrededor con solución de agar 1.8 %.
4. Añadir 80 µl de TEMED a la solución de acrilamida, mezclar bien sin formar burbujas y verter entre las dos placas de cristal puestas en posición vertical.
5. Colocar el peine y dejar polimerizar a temperatura ambiente durante 1 h.
6. Quitar el peine y lavar enseguida los pocillos con TBE (1x) para eliminar los restos de acrilamida no polimerizada. Si polimerizan en los pocillos se forma una capa que dificulta

- la entrada de las muestras de DNA.
7. Quitar el espaciador inferior y colocar el gel en la cubeta de electroforesis.
 8. Llenar la cubeta con tampón de electroforesis (TBE (1x)). Quitar las burbujas que quedan retenidas en la parte inferior del gel con una jeringa.
 9. Añadir 1/9 de volumen de tampón de muestras (10x) a las muestras, calentarlas 5 min a 65°C. Cargar el gel.
 10. Conectar una diferencia de potencial que puede oscilar entre 1 y 8 V/cm, hasta que el primer colorante, azul de bromofenol, haya recorrido 2/3 partes del gel.
 11. Separar las dos placas de cristal y sumergir el gel en una solución de 0.5 µgr/ml de bromuro de etidio. Teñir 30 min.
 12. Visualizar el DNA irradiando el gel sobre el transiluminador UV a 306 nm (nota b).

DISOLUCIONES

Disolución de acrilamida 20 %

acrilamida 19 % (w/v)
bisacrilamida 1 % (w/v)
en agua

Para preparar 1 l de disolución disolver en 800 ml de agua MilliQ 190 g de acrilamida y 10 g de bisacrilamida. Añadir 10 g de carbón activo. Dejar agitando 10 a 12 h protegiendo el frasco de la luz con papel de aluminio. Filtrar primero a través de papel Whatmann 3MM y después a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.45 µm. Desgasificar 1 h. Conservar en botella oscura a 4°C.

OBSERVACIONES

- a. La solución de persulfato amónico 10 % se ha de preparar al momento. El persulfato amónico es altamente higroscópico. Se debe disponer de una pequeña cantidad de persulfato amónico de la que se toma el necesario para preparar la solución y que debe cambiarse con frecuencia.
- b. El monómero de acrilamida tiene una elevada absorbancia al ultravioleta, por lo que la sensibilidad de estos geles es menor que la de los de agarosa. Este efecto se puede reducir dejando que la polimerización se desarrolle más tiempo, durante 12 a 24 h.
- c. La acrilamida es neurotóxica y es absorbida con rapidez por la piel. Emplear siempre guantes cuando se manipule, así como máscara cuando se pese el polvo.

2.5.3. GELES DE SECUENCIA DE DNA

Para resolver fragmentos que difieren en un único nucleótido, para tamaños entre 20 y 500 nucleótidos, se emplearon

geles de acrilamida (6 %) - urea 7 M, con una relación acrilamida-bisacrilamida de 19:1. En el caso de que fuera importante leer los primeros 25 nucleótidos de la secuencia (geles de secuencia para el método de Maxam y Gilbert (1980)) se elevó el porcentaje de acrilamida al 20 %.

Se utilizaron dos equipos de geles de secuencia:

1. Sistema LKB 2020-001 "Macrophor Electrophoresis Unit", con geles de 20 x 55 cm y refrigeración de la placa de gel con un baño termostático.

2. Sistema Biorad "Sequegen™" con geles de 38 x 50 cm y sin refrigeración externa al propio sistema.

La electroforesis se realiza a temperaturas entre 45 y 60°C y voltajes entre 1500 y 3500 V en tampón tris borato (TBE 1x). El espesor de los geles era de 0.2 a 0.4 mm (Sanger y Coulson, 1978; Geroff y Ansorge, 1981). Con la finalidad de aumentar la secuencia resuelta en un solo gel se realizan dos cargas de la muestra. La primera de ellas se corre hasta que el segundo colorante, xilencianol, alcanza la mitad del gel, y la segunda hasta que el primer colorante, azul de bromofenol, alcanza la base del gel. En el caso de los geles de acrilamida 20 % se realizaba una única carga, dejando correr el gel hasta que el azul de bromofenol alcanzaba 1/3 parte del gel.

PROCEDIMIENTO

Se describe el montaje de los geles de 38 x 50 cm pues fue el equipo más empleado. En observaciones se hace referencia a los detalles de montaje del equipo LKB.

a. Preparación de los cristales, espaciadores y peine

1. El cristal de la cubeta de tampón superior (nota a) :
 - lavar abundantemente con agua y detergente (no emplear disolventes orgánicos en ningún caso).
 - en una campana de gases repartir bien por todo el cristal 1 ml de Sigmacote, siliconización, empleando un pañuelo de papel. Es conveniente siliconizar cada vez que se use. Dejar secar 5 a 10 min.
 - Con un pañuelo de papel limpiar la superficie del cristal.
2. Cristal de soporte del gel :
 - lavar abundantemente con agua y detergente.
 - en campana de gases repartir bien 10 ml de solución de silano. Dejar secar 10 min.
 - limpiar el exceso de silano con un pañuelo de papel empapado en etanol. Dejar secar 5 min.
3. Espaciadores y peine. Conviene lavar bien los espaciadores y el peine, de teflón, con agua y detergente, y con etanol. Además, conviene siliconizarlos con Sigmacote cada 2 a 3 geles (nota b).

b. Preparación de la disolución de polimerización

4. Se prepara una solución de polimerización :
 - 36 ml de solución de acrilamida (20 %, 19:1)
 - 24 ml de tampón tris borato (TBE 20x)
 - 50.4 g urea
 - añadir agua hasta un volumen de 120 ml.Agitar hasta la completa disolución de la urea. Para facilitarla es conveniente calentar la solución a 40-50°C.
5. Filtrar la solución a través de filtro Millipore de ϕ 0.45 μ m (Millipore HAWPO2500).
6. Pasar 20 ml de solución a una probeta de 25 ml. El resto se desgasifica 10 a 20 min.

c. Montaje del gel (nota f)

7. Montar los cristales con los espaciadores entre ellos evitando en todo momento que la cara siliconizada y la silanizada entren en contacto.
8. Añadir a la probeta con 20 ml de solución de polimerización 100 μ l de TEMED y 140 μ l de persulfato amónico 25 % (w:v). Agitar rápidamente por inversión y verter en la cubeta de sellado. Colocar en ésta el gel con rapidez. Por capilaridad la solución penetra por la base del gel unos milímetros. Esta solución polimeriza en 30 a 60 seg. Dejar 5 min en posición vertical.
9. Verter 100 ml de solución de polimerización en un vaso de precipitado de 250 ml. Añadir 100 μ l de TEMED y 130 μ l de persulfato amónico 25 %. Con ayuda de dos jeringas de 50 ml agitar la solución sin producir burbujas. Cargar las dos jeringas.
10. Poner la cubeta formando un ángulo de 20 a 25° con la mesa. Verter suavemente la solución del gel por un extremo, evitando que se formen burbujas.
11. Una vez lleno colocar el peine. Conviene pinzar los dos cristales con una pinza fuerte, para conseguir un espesor uniforme en todo el gel. Dejar polimerizar durante 20 a 30 min (nota e).

d. Electroforesis

12. Montar el gel en la cubeta. Llenar de tampón tris borato (TBE 1x) las cubetas superior e inferior. Limpiar muy bien los pocillos con ayuda de una jeringa. Asegurar la cubeta y conectar los electrodos a la fuente de alto voltaje (nota f).
13. Hacer un pre-recorrido de 30 min a 60 W (aprox. 1500 V) (nota d).
14. Desconectar la fuente. Limpiar de nuevo los pocillos muy bien. Cargar las muestras de la primera carga. Evitar que el gel esté detenido más de 15 min para reducir al máximo la

difusión de la urea (nota c).

15. Conectar los electrodos y la fuente. Correr a 60 W (voltaje entre 1500 y 1900 V), potencia constante, hasta que el segundo colorante, xilencianol, llega a 2/3 del gel.
16. Desconectar la fuente. Desconectar los electrodos. Limpiar los pocillos y cargar las muestras de la segunda carga.
17. Conectar los electrodos y la fuente. Correr a 60 W (voltaje entre 1500 y 1900 V), potencia constante, hasta que el primer colorante esté a punto de escapar del gel.
18. Desconectar la fuente y los electrodos. Separar el gel de la cubeta. Enfriar pasando agua por encima de los cristales y por la cubeta del tampón superior. Dejar 2 min enfriando con el agua corriendo. Quitar las pinzas y separar los cristales. El gel queda adherido al cristal silanizado (nota g).

e. Fijación, secado y exposición

19. Sumergir el gel en una solución de ácido acético 10 %. Agitar suavemente durante 15 a 25 min.
20. Sacar el gel de la solución de acético. Lavar el cristal y el gel con abundante agua desionizada para evitar restos de urea.
21. Secar el gel en estufa a 65°C durante más de 3 h. Si al secarse se aprecian manchas de urea en el gel se debe lavar de nuevo con agua desionizada y secar de nuevo.
22. Sacar de la estufa. Atemperar. Exponer con placa radiográfica.

DISOLUCIONES

Disolución de silano

Poner en 10 ml de etanol absoluto 300 µl de ácido acético glacial y 40 µl de silano (gamma-(metacriloxi)-propiltrimetoxisilano). Se debe preparar inmediatamente antes de usar. Es importante que se manipule en campana de gases por su elevada toxicidad.

Disolución de persulfato amónico 25 %

Pesar 250 mg de persulfato amónico, añadir 1 ml de agua. Agitar. Preparar inmediatamente antes de usar a partir de un stock fresco de persulfato amónico.

Disolución de ácido acético 10 %

Se preparan 5 l por gel. 500 ml de ácido acético glacial en 4.5 l de agua MilliQ. Se reutiliza 4 a 5 veces.

OBSERVACIONES

- a. Toda la manipulación se debe hacer, a causa de la toxicidad de los materiales empleados, con guantes, y, en caso necesario, en campana de gases.
- b. Los geles empleados fueron de espesor fijo (0.2 ó 0.4 mm) o bien de espesor variable, geles en gradiente de espesor (de 0.25 mm en los pocillos a 0.5 mm en la base)(Garoff y Ansorge, 1981). Los geles en gradiente de espesor permiten resolver secuencias de DNA mucho más largas, de hasta 550 nucleótidos por clon con dos cargas. Estos geles se montan como se ha descrito, empleando espaciadores BioRad de 0.25 mm (165-3713) a los que se han pegado tiras de cinta adhesiva (cel.lo). Las tiras son de una longitud de 6, 12, 18 y 24 cm. A un lado del espaciador, ajustadas a su extremo se pegan las tiras de 6 cm y encima la de 18 cm. Al otro lado del espaciador, ajustadas al mismo extremo, se pegan las tiras de 12 y 24 cm. De este modo se consigue un aumento de espesor del espaciador hacia la base del gel. Los peines empleados fueron de diente de tiburón de 0.25 mm.
- c. Cuando se emplean los geles en gradiente de espesor la primera carga dura hasta que el segundo colorante, xilencianol, sale del gel, y la segunda carga hasta que el primer colorante, azul de bromofenol, está a punto de salir. De esta forma el solapamiento de secuencia entre la primera y segunda carga se reduce a 100 - 150 nucleótidos y se puede resolver mas secuencia en el gel. Este tipo de geles sólo es adecuado cuando las reacciones de secuencia se hacen empleando como isótopo radiactivo ^{35}S .
- d. La temperatura a que se realiza la electroforesis es crítica, debiendo ser superior a 40°C para mantener las condiciones desnaturalizantes del gel. Empleando este equipo sólo puede regularse con la potencia que aplica la fuente. En nuestras manos las condiciones de 50 - 60 W determinan una temperatura en el gel entre 45 y 50°C, óptima. Una potencia superior permitiría acortar el tiempo de electroforesis (5 a 6 h para la primera carga y 3 h para la segunda) pero podría dañar la cubeta.
- e. Cuando el gel no va a ser empleado inmediatamente después de polimerizar conviene sellar la parte superior con una solución de agarosa 1 %, para evitar que se reseque la zona de los pocillos.
- f. Los pocillos deben limpiarse inmediatamente después de quitar el peine con TBE (1x) para evitar que los restos de acrilamida puedan polimerizar dificultando o distorsionando la entrada de las muestras.
- g. El tampón de la cubeta inferior es radiactivo y debe tratarse como un residuo líquido de baja actividad.
- f. Las diferencias en el montaje del gel respecto al equipo LKB son:
 - la solución de polimerización necesaria es la mitad

(60 ml).

- la placa termostática no debe siliconizarse más que cada 3 a 5 geles.
- el montaje del gel se realiza por deslizamiento de la placa soporte del gel sobre la placa termostática.
- no es necesario sellar el gel.
- la regulación de la temperatura se consigue mediante un baño regulador, a 60°C, lo que permite realizar la electroforesis a potencias superiores, con voltajes entre 3000 y 3500 V.

2.6 ELECTROFORESIS DE RNA

Los geles de RNA incluyen agentes desnaturizantes tipo formaldehído, hidróxido de metilmercurio o urea. La presencia del agente desnaturizante en el gel o en la muestra impide que el RNA adopte estructuras secundarias. Sólo en estas condiciones la movilidad del RNA es proporcional al logaritmo de su peso molecular. Aparte de esta característica los geles son básicamente idénticos a los empleados en el análisis de DNA.

2.6.1 GELES DE AGAROSA FORMALDEHIDO

Se prepararon geles horizontales de las mismas dimensiones que los empleados para DNA (ap.2.5.1). Se emplearon geles de agarosa del 1.5 %. Todo el material empleado en el gel debe ser libre de RNAsas.

PROCEDIMIENTO

1. Añadir la cantidad de agarosa en polvo (electroendósmosis media) necesaria a una cantidad determinada de agua.
2. Calentar en microondas hasta que la agarosa esté completamente fundida. Enfriar a 65°C.
3. En una campana de gases añadir MOPS (10x) y formaldehído 35% hasta una concentración final de MOPS (1x) y formaldehído (nota b) 2.2 M. Agitar hasta que no se formen aguas.
4. En la campana de gases verter la solución sobre un soporte de gel sellado con cinta adhesiva. Colocar el peine. Dejar gelificar de 30 min a 1 h (nota a).
5. Una vez gelificado quitar el peine del gel y colocar éste en la cubeta de electroforesis separado 1 mm de la base, por ejemplo sobre un peine. Llenar la cubeta con MOPS (1x) justo hasta el nivel del gel. Llenar los pocillos con MOPS (1x). Si el gel quedara cubierto con el tampón el formaldehído difundiría y se perderían las condiciones desnaturizantes.
6. Preparar las muestras (nota c) :

RNA (5-10 µgr)	4.5 µl en agua
MOPS (10x)	2.0 µl
formaldehído	3.5 µl
formamida	10.0 µl
tampón de muestras (x5)	2.0 µl
7. Calentar las muestras 10 min a 65°C. Poner en hielo.
8. Cargar las muestras. Correr el gel a 5-10 V/cm, recircularizando el tampón con una bomba peristáltica (positivo a negativo).
9. Para teñir el gel hay que eliminar el formaldehído lavando el gel durante 30 min a 1 h en agua o en acetato amónico 0.1 M, tiñendo en una solución de bromuro de etidio 0.5 µgr/ml 5 min y destiñendo 10 a 30 min en agua. Visualizar el gel por irradiación con luz UV en transiluminador de 302 nm (nota

- d).
10. Si no se necesita teñir se puede transferir directamente (ap.2.8.3).

DISOLUCIONES

Todos los reactivos, disoluciones y material de cristal y plástico deben ser libres de RNAsas.

MOPS (10x)

MOPS (pH 7.0) 0.2 M
acetato sódico 50 mM
EDTA 10 mM

Ajustar pH 7.0 con NaOH. Si la solución se autoclava se vuelve de color amarillo.

Tampón de carga (x5)

Ficoll 400 30 %
EDTA 1 mM
azul de bromofenol 0.4 %
xilencianol 0.4 %

OBSERVACIONES

- a. La cubeta y el soporte del gel, así como el peine se lavan bien con agua y detergente. Se enjuagan abundantemente con etanol.
- b. El formaldehído debe tener un pH superior a 4.0.
- c. Si se emplean marcadores de DNA las muestras se procesan igual que si fueran de RNA. Sin embargo, debe cargarse más DNA (200 a 400 ng DNA / banda) ya que el DNA de cadena sencilla se tiñe peor que el DNA de doble cadena.
- d. Se emplean habitualmente RNAs ribosomales como marcadores de peso molecular ya que se conocen sus longitudes. Se han empleado rRNAs vegetales de tamaños (Dyers, 1979) :

rRNA citoplasmático :

25 S	1.30 x 10 ⁶ daltones	3580 nucleótidos
18 S	0.7 x 10 ⁶ daltones	1926 nucleótidos

rRNA de cloroplasto

23 S	1.10 x 10 ⁶ daltones	3000 nucleótidos
16 S	0.56 x 10 ⁶ daltones	1500 nucleótidos
5 S	3.80 x 10 ⁵ daltones	120 nucleótidos

2.7 PURIFICACION DE DNA A PARTIR DE GELES

Se han descrito una gran variedad de métodos para la recuperación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa y de acrilamida, aunque todos ellos presentan básicamente dos problemas. En primer lugar, la mayoría de agarosas están contaminadas por polisacáridos sulfatados que pueden extraerse conjuntamente con el DNA y que son potentes inhibidores de muchos de los enzimas empleados posteriormente como las endonucleasas de restricción, metiltransferasas, ligasas, kinasas,...). En segundo lugar la recuperación de fragmentos largos de DNA acostumbra a ser baja, para fragmentos de DNA de 20 kb o superiores no es superior al 20 %.

Se han empleado las técnicas de electroelución para purificar bandas de geles de agarosa y de acrilamida, el método descrito por Dretzen (1981) para geles de agarosa y el método de agarosa de bajo punto de fusión. Se describen a continuación.

2.7.1 ELECTROELUCION DE FRAGMENTOS DE DNA

Este método, con pocas modificaciones se puede aplicar tanto a la extracción de fragmentos de DNA de geles de agarosa como de acrilamida.

2.7.1.1 Geles de acrilamida

Para la electroelución del DNA (Ho, 1981) se utilizaron cubetas de metacrilato diseñadas especialmente. Estas cubetas constan de dos partes, una amplia (a) donde se deposita el gel y una más estrecha (b) donde se recupera el DNA eluido. Esta segunda parte presenta un estrechamiento en su extremo y el volumen de la zona situada entre el estrechamiento y la membrana de diálisis es de 200 μ l.

PROCEDIMIENTO

1. Separar los fragmentos de DNA por electroforesis en geles de acrilamida vertical.
2. Separar las dos placas de cristal y teñir el gel durante 30 min en una disolución de bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) en agua.
3. Localizar las bandas de DNA con una lámpara de luz UV de onda larga y cortar el trozo de gel que contiene la banda con un bisturí.
4. Colocar membranas de diálisis en las dos partes de la cubeta de electroelución. Lavarlas con agua estéril y comprobar que no hay fugas.
5. Colocar la cubeta de electroelución entre dos cubetas de

- electroforesis y llenarlas con tampón tris borato (TBE) (0.5x).
6. Cortar el gel en trozos pequeños y colocarlos en la parte ancha (a) de la cubeta de electroelución. Comprobar que no pasen trozos de gel a la otra parte, estrecha (b), de la cubeta.
 7. Conectar los electrodos a una fuente de alimentación (el electrodo negativo en el lado del gel (a)) con una diferencia de potencial de 300 V durante 30 min. Durante la electroelución el DNA se sitúa adherido a la membrana de diálisis en la parte estrecha (b) de la cubeta de electroelución.
 8. Desconectar la fuente. Vaciar la cubeta de electroelución hasta el estrechamiento de la parte (b).
 9. Recoger los 200 µl de volumen de la parte (b). Limpiar la membrana pipeteando repetidas veces sobre ella. Pasar la solución a un tubo eppendorf.
 10. Llenar la parte (b) de la cubeta de electroelución con 200 µl de TBE (0.5x) y colocar la punta de un electrodo (hilo de platino) dentro de este volumen. Invertir la polaridad de la fuente y aplicar una diferencia de potencial de 75 V durante 10 seg. Al invertir la polaridad el DNA adherido a la membrana de diálisis se libera y queda en solución.
 11. Recoger los 200 µl de tampón y añadirlos a los 200 µl anteriores.
 12. Extraer con un volumen igual de fenol-cloroformo y con éter.
 13. Precipitar el DNA añadiendo 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C). Dejar más de 2 h a -20°C.
 14. El sedimento se lava con etanol al 70%, se seca y se resuspende en 10 a 20 µl de tampón TE pH 7.5.

OBSERVACIONES

- a. La recuperación de DNA por este método es baja, del 20 al 40 %. Esto puede ser debido a que parte del DNA queda fuertemente adherido a la membrana de diálisis. Este problema se agrava para fragmentos grandes de DNA y al aumentar el tiempo de electroelución.

2.7.1.2 Geles de agarosa

PROCEDIMIENTO

1. Separar en un gel de agarosa los distintos fragmentos.
2. Con un bisturí recortar la banda a purificar ajustando al máximo el trozo de agarosa a la banda. Colocar el trozo de agarosa en el interior de una bolsa de diálisis. Sellar la bolsa con pinzas.
3. Poner en el interior de la bolsa 2.5 ml de TNE. Sumergir la bolsa de diálisis en una cubeta mediana con tampón TBE (1x)

- 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio, procurando que el trozo de agarosa quede tocando la bolsa de diálisis hacia el electrodo negativo.
4. Conectar una fuente con 120 V durante 2h. El DNA migra saliendo de la agarosa y queda retenido por la pared de la bolsa de diálisis. Iluminando con una lámpara de UV de onda larga se puede ver el DNA adherido a la bolsa.
 5. Invertir la polaridad 1 min. El DNA se separa de la bolsa y queda en solución.
 6. Recoger la disolución del interior de la bolsa de diálisis y lavarla con 0.5 ml de tampón TNE. Pasar todo a un tubo Corex de 15 ml.
 7. Añadir 300 μl de acetato sódico 3 M pH 5.2 (1/10 de volumen) y 9 ml de isopropanol (3 volúmenes).
 8. Dejar toda la noche a -20°C .
 9. Centrifugar a 12000 gav (10000 rpm rotor Beckman JA20) 30 min a 4°C .
 10. Eliminar el sobrenadante. Secar y resuspender en 400 μl TE pH 7.5.
 11. Pasar la muestra a un tubo eppendorf. Añadir 16 μl NaCl 5 M y 800 μl de etanol absoluto frío (-20°C).
 12. Dejar más de 2 h a -20°C .
 13. Centrifugar 15 min a 4°C .
 14. Decantar el sobrenadante. Lavar con 1 ml de etanol al 70 %.
 15. Resuspender el sedimento en 10 a 50 μl tampón pH 7.5.

DISOLUCIONES

Tampón TNE

Tris-HCl 10 mM pH=7.5

EDTA 1 mM

NaCl 100 mM

Sacos de diálisis

El procedimiento de preparación (de Maniatis, 1982) :

- cortar las bolsas de diálisis en los tamaños adecuados (10 a 20 cm).
- hervir 10 min en 2 l de solución de bicarbonato sódico 2% EDTA 1 mM.
- lavar con agua MilliQ abundante.
- hervir 10 min en 2 l de solución 1 mM EDTA.
- enfriar a temperatura ambiente. Conservar a 4°C con las membranas de diálisis sumergidas en todo momento.
- antes de utilizar lavar las membranas por dentro y por fuera con agua estéril. Manipular las membranas siempre con guantes.

OBSERVACIONES

- a. El rendimiento de este método es bajo,, y sólo es adecuado

para fragmentos de DNA grandes y en cantidad elevadas (20 a 100 μ gr).

- b. Las membranas de diálisis pueden ser esterilizadas en autoclave durante 10 min a 121°C o 1 atmósfera de sobrepresión sumergidas en agua.

2.7.2 METODO DE PAPEL DEAE CELULOSA

Descrito por Dretzen (1981). Fue el método más empleado. La simplicidad de manipulación de las muestras y el elevado rendimiento lo hacen muy adecuado. El papel DEAE celulosa en condiciones de baja fuerza iónica presenta una elevada afinidad por el DNA. El DNA ligado puede recuperarse lavando el papel con un tampón de elevada fuerza iónica. Se ha empleado en la purificación de DNA lineal de tamaños comprendidos entre 100 y 5000 bp. Para DNA superhelicoidal, DNA de cadena sencilla o DNA de cadena doble de gran tamaño, los rendimientos son pequeños.

PROCEDIMIENTO

a. Preparación del papel DEAE celulosa

Este tratamiento elimina posibles impurezas de los papeles que podrían eluir con el DNA y afectar procesos posteriores.

1. Se empleó papel DEAE celulosa Whatman (DE81). Sumergir 40 a 50 filtros en NaCl 2.5 M durante 2h a temperatura ambiente.
2. Escurrirlos sobre papel de filtro y pasarlos por agua MilliQ en 3 lavados sucesivos.
3. Secarlos a temperatura ambiente entre hojas de papel de filtro.

b. Purificación de DNA

4. Separar los fragmentos de DNA en un gel de agarosa del porcentaje adecuado, con bromuro de etidio para poder visualizarlos con luz UV (nota d).
5. Colocando el gel sobre un transiluminador UV de onda larga (302 nm) visualizar los fragmentos. Con un bisturí hacer una incisión justo delante de la/s banda/s a purificar. Si hay bandas de tamaño superior que podrían contaminar hacer una incisión justo por encima de la que interesa (nota c).
6. Con ayuda de unas pinzas abrir la incisión y poner un trozo de filtro de DEAE celulosa de la misma altura del gel, de modo que cubra toda la anchura de la banda. Presionar el gel contra el papel para evitar la formación de burbujas.
7. Colocar de nuevo el gel en la cubeta. Conectar la fuente a 100 V de 5 a 10 min.
8. Comprobar que todo el DNA se ha quedado adherido al papel DEAE celulosa irradiándolo con luz UV. De no ser así seguir con la electroforesis.

9. Una vez todo el DNA pegado al papel se saca éste y se lava en agua estéril.
10. Colocar el papel compactado en el fondo de un tubo eppendorf al que previamente se le habrá practicado un orificio en el fondo con una aguja y varios en el tapón.
11. Centrifugar el eppendorf con el papel dentro de otro tubo eppendorf 15 seg a temperatura ambiente para descartar los restos de tampón de electroforesis que empapan el papel.
12. Añadir 200 µl de tampón de elución. Si es necesario se puede tapar la base del eppendorf con parafilm. Colocar el eppendorf con el papel dentro de otro e incubarlo 30 min a 37°C.
13. Quitar el parafilm del tubo y recuperar el tampón por centrifugación 15 seg a temperatura ambiente.
14. Añadir 100 µl de tampón de elución. Incubar 15 min a 37°C.
15. Recuperar el tampón centrifugando 15 seg a temperatura ambiente.
16. Repetir 14 y 15.
17. Tenemos la bande eluida en un volumen de 400 µl de tampón de elución. Añadir 400 µl de 1-butanol saturado en tampón de elución. Agitar con vortex. Centrifugar 1 min a temperatura ambiente.
18. Eliminar la fase superior, alcohólica. En esta fase se encuentra el bromuro de etidio que arrastraba el DNA.
19. Hacer extracciones con fenol-cloroformo y con cloroformo-alcohol isoamílico.
20. Añadir 1/10 volumen de acetato sódico 3 M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C). Precipitar en frío.
21. Lavar el sedimento con 1 ml de etanol al 70%.
22. Secar el sedimento. Resuspender en 10 a 50 µl de tampón TE pH 7.5 (notas a, b).

DISOLUCIONES

Tampón de elución

Tris-HCl pH 7.5 10 mM
 EDTA 1 mM
 NaCl 1.5 M

Disolución de 1-butanol saturado en tampón de elución

Se mezclan 4 volúmenes de 1-butanol con 1 volumen de tampón de elución. Agitar con vortex. Dejar separar las fases 1 a 2 h.

OBSERVACIONES

- a. La recuperación de fragmentos de DNA lineal oscila entre el 60 y el 90 %, dependiendo de la longitud del DNA. La recuperación de DNA superhelicoidal, de cadena simple o

- mayor de 10 kbp es, sin embargo, del 20 % o inferior.
- b. Los fragmentos purificados por este método se utilizaron en reacciones de restricción, ligación y marcajes, sin que se observara ningún tipo de inhibición de la reacción.
 - c. Para evitar la contaminación de las bandas de tamaño superior se coloca papel DEAE celulosa entre éstas y las de interés. Esto se puede hacer también cortando la zona del gel que contiene las bandas no deseadas.
 - d. Se observó que es muy difícil que al purificar una banda de DNA no aparezcan contaminaciones de bandas vecinas aunque en una proporción muy baja. Se encontró que cuando se separan las bandas en ausencia de bromuro de etidio en el gel y en el tampón de electroforesis esta contaminación se reduce considerablemente.

2.7.3 PURIFICACION A PARTIR DE GELES DE AGAROSA LMP

Este método requiere que tanto el DNA como la agarosa se encuentren en solución, lo cual se consigue empleando agarosa LMP o de bajo punto de fusión, que funde a 65-70°C y se mantiene licuada por encima de 30°C.

PROCEDIMIENTO

1. Separar los fragmentos de DNA por electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión. Por las características de estos geles es necesario montar el gel y realizar la electroforesis en cámara fría (4°C).
2. Localizar las bandas de interés irradiando el gel con luz UV de onda larga (302 nm). Con un bisturí recortar el trozo de gel que contiene la banda a purificar.
3. Transferir el trozo de agarosa a un tubo eppendorf. Incubar 30 min a 65°C para fundirlo.
4. Extraer dos veces con 1 volumen de fenol saturado, lavando dos veces la fase orgánica con TE pH 7.5.
5. Juntar las fases acuosas y extraer con 1 volumen de fenol-cloróformo y después con 1 volumen de éter.
6. Añadir 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C). Precipitar en frío y lavar con etanol al 70 %.
7. Resuspender el DNA en tampón TE pH 7.5.

OBSERVACIONES

- a. Con este método se obtienen unos rendimientos del 60 al 70%. Es recomendable, pues, únicamente si el DNA a purificar es de tamaño superior a 10 kbp o si se trata de DNA lineal o superhelicoidal.
- b. La preparación de DNA obtenido contiene más impurezas que el obtenido por extracción con DEAE celulosa. Si con los fragmentos purificados se quiere hacer alguna reacción

enzimática delicada debe someterse a purificación por elución a través de columna (ap.2.8.4).

2.7.4 ELUCION POR COLUMNA

Este método aprovecha las características de la agarosa de bajo punto de fusión (ap.2.8.3) y la especial afinidad que por el DNA presentan unas minicolumnas denominadas Elutip-d™ (Schleicher & Schull NA010/0) (nota a). La muestra se aplica a la minicolumna en condiciones de baja fuerza iónica (aprox. 200 mM NaCl) y se eluye el DNA en condiciones de elevada fuerza iónica (1.5 M NaCl). Cada minicolumna puede retener 100 µgr de DNA.

PROCEDIMIENTO

Se ha seguido el procedimiento suministrado con el producto.

a. Preparación de la muestra

La muestra se aplica a la columna en solución, en unas condiciones de fuerza iónica baja (200 mM NaCl).

1. Separar los fragmentos de DNA por electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión. Por las características de estos geles es necesario preparar el gel y realizar la electroforesis en cámara fría (4°C).
2. Localizar las bandas de interés irradiando el gel con luz UV de onda larga (302 nm). Con un bisturí recortar el trozo de gel que contiene la banda a purificar.
3. Poner el trozo de agarosa en un tubo Corex de 15 ml. Añadir 5 ml de solución I.
4. Fundir a 65°C durante 30 min.

b. Preparación de la minicolumna

5. Cortar la punta inferior de la minicolumna cerca de la matriz blanca. Quitar el tapón de protección. Cargar una jeringa de 5 ml con 2 ml de solución II y pasarla a través de la minicolumna. Lavado de la columna de posibles impurezas.
6. Equilibrar la minicolumna con solución I pasando 5 ml de esta solución.

c. Purificación

7. Colocar un prefiltro desechable (Schleicher & Schull FP030/20) en la parte superior de la minicolumna.
8. Cargar la muestra en una jeringa y pasarla muy lentamente a través del prefiltro y la minicolumna. Recoger el eluido en un tubo esteril (nota b).
9. Pasar 3 ml de solución I, para lavar restos retenidos de forma inespecífica.

10. Quitar el prefiltro. Pasar 0.4 ml de solución II, recogiendo el eluido de la columna en un tubo eppendorf.
11. Precipitar el DNA de los 400 μ l recogidos añadiendo 2 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C). Precipitar en frío. Centrifugar.
12. Lavar el sedimento con etanol al 70%. Secar.
13. Resuspender el sedimento en 10 a 20 μ l de tampón TE pH 7.5.

DISOLUCIONES

Disolución I

NaCl 200 mM
Tris-HCl 20 mM pH 7.5
EDTA 1 mM

Disolución II

NaCl 1.0 M
Tris-HCl 20 mM pH 7.5
EDTA 1 mM

OBSERVACIONES

- a. Minicolumnas equivalentes son las comercializadas por BRL bajo el nombre comercial NACS PREPAC (BRL 1505 SK).
- b. Con la finalidad de evitar que la agarosa de bajo punto de fusión solidificara toda la manipulación se realizaba en el interior de una campana de flujo laminar que a los 30 min de funcionamiento alcanzaba una temperatura de 37-39°C.
- c. Este método permite obtener un DNA muy puro. Asimismo se puede emplear para concentrar DNA en pequeños volúmenes.

2.8 TRANSFERENCIA DE DNA Y RNA A FILTROS DE NITROCELULOSA O NYLON

La localización de secuencias de DNA o RNA con homología a otras empleadas como sondas, por hibridación, es una técnica fundamental en biología molecular. Se ha realizado normalmente por la técnica de transferencia descrita por Southern (1975). El método consiste en separar el DNA, ya sea en un gel, en colonias bacterianas o en calvas de lisis aisladas, desnaturalizarlo y fijarlo sobre un filtro de nitrocelulosa o de nylon. Normalmente se emplearon filtros de nitrocelulosa excepto para trabajos con DNA genómico en que se utilizaron filtros de nylon (Zeta-Probe™ BioRad, Hybond™ Amersham). Después de la transferencia el DNA unido al filtro se hibridó con DNA marcado con ^{32}P , y se localizaron las secuencias complementarias a la sonda radiactiva por autorradiografía.

Esta técnica se emplea para localizar secuencias específicas en DNA clonado así como sobre DNA genómico digerido con diferentes enzimas de restricción.

2.8.1 TRANSFERENCIA DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE DNA

Se emplearon dos técnicas similares aunque difieren en la eficiencia de la transferencia y en el tiempo que dura ésta. En la primera el tiempo de transferencia se reduce a 30 min o 1 h, y en la segunda de 8 a 12 h. Es adecuado para la transferencia de fragmentos de restricción de DNA, en los que la cantidad de DNA por banda es suficientemente elevada para que incluso una transferencia parcial sea suficiente. La transferencia lenta asegura una elevada eficiencia de transferencia.

2.8.1.1 Transferencia rápida

PROCEDIMIENTO

1. Separar el DNA por electroforesis en gel de agarosa. Fotografiar el gel colocando una regla milimetrada en un lateral con la finalidad de disponer de una referencia del tamaño real.
2. Depurinación. Incubar el gel a temperatura ambiente durante 10 min en disolución de HCl con agitación suave. De este modo el DNA se fragmenta en trozos de menor longitud (nota a).
3. Lavar el gel con agua.
4. Desnaturalización. Incubar el gel en solución de desnaturalización 20 min con agitación suave.
5. Neutralizar el gel durante 30 min en tampón de neutralización (I). Agitar suavemente.
6. Montar la transferencia tal como se observa en la figura

2.9.1, siendo las capas :

- gel
- filtro de nitrocelulosa, empapado en solución de neutralización (I)
- 3 capas de papel Whatman 3MM Chr(Whatmann 3030 917)
- 3 a 4 cm de papel de filtro
- cristal
- peso de 3 a 5 kg

De este modo se consigue establecer un flujo de líquido que sale del gel, atraviesa el filtro de nitrocelulosa y pasa a los papeles de filtro, desplazando al DNA y poniéndolo en contacto con el filtro de nitrocelulosa.

7. Dejar transferir de 30 min a 1 h. Desmontar sin separar el filtro de nitrocelulosa del gel. Marcar con un lápiz o bolígrafo la posición de los pocillos y hacer un corte en la esquina inferior izquierda para orientar el filtro.
8. Separar el gel del filtro. Teñirlo 15 a 30 min en una solución de bromuro de etidio (0.5 µgr/ml) en agua para comprobar la eficiencia de la transferencia.
9. Lavar el filtro en SSC (6x) 2 min. Colocar el filtro de nitrocelulosa entre papeles de filtro hasta que esté seco (10 a 20 min a temperatura ambiente).
10. Incubar el filtro de nitrocelulosa (entre papeles de filtro) a 80°C durante 2 a 3 h. El DNA se une fuertemente a la nitrocelulosa. El filtro con el DNA fijado se puede conservar a temperatura ambiente o someterlo a prehibridación e hibridación con sonda radiactiva.

DISOLUCIONES

Disolución de HCl

HCl 0.2 N

Tampón de desnaturalización

NaOH 0.5 N

NaCl 1.5 M

Tampón de neutralización (I)

NaOH 20 mM

acetato amónico 1 M

2.8.1.2 Transferencia lenta

PROCEDIMIENTO

1. Separar el DNA por electroforesis en gel de agarosa. Fotografiar el gel colocando una regla milimetrada en un lateral con la finalidad de disponer de una referencia del

- tamaño real.
2. Irradiar el gel con luz UV de onda corta (254 nm) 4 min por encima de 3.5 kbp y 8 min por encima de 6 kbp. El efecto de la luz UV es provocar roturas en las cadenas de DNA, reduciendo de este modo su tamaño y facilitando la transferencia (nota a).
 3. Desnaturalización. Incubar en disolución de desnaturalización 60 min a temperatura ambiente con agitación suave.
 4. Lavar con agua MilliQ.
 5. Neutralización. Incubar en disolución de neutralización (II) 30 min a temperatura ambiente con agitación suave.
 6. Lavar con agua MilliQ.
 7. Incubar 30 min más en disolución de neutralización (II).
 8. Pasar el gel a una solución de SSC (10x).
 9. Montar el sistema descrito en la figura 2.9.2.
 - dos tiras de papel Whatmann 3MM como mechas
 - gel, rodeado de tiras de parafilm
 - filtro de nitrocelulosa, empapado en SSC (2x)
 - 2 capas de papel Whatman 3MM empapadas en SSC (2x)
 - 2 capas de papel Whatman 3MM secas
 - 5 a 10 cm de papel de filtro
 - cristal
 - peso de 0.5 a 1 kgr
 10. El tampón de transferencia es SSC (10x). Envolver todo el sistema con una capa de plástico para evitar la evaporación.
 11. Dejar transfiriendo durante 8 a 12 h (nota b).
 12. Desmontar el sistema, señalar los pocillos y hacer un corte en el filtro para orientarlo. Teñir el gel de 15 a 30 min en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) en agua.
 13. Lavar el filtro de nitrocelulosa en SSC (6x) 2 min a temperatura ambiente. Dejar secar sobre papel de filtro.
 14. Incubar el filtro a 80°C durante 2 a 3 h para fijar el DNA.

DISOLUCIONES

Tampón de neutralización (II)

Tris-HCl 0.5 M pH 7.5

NaCl 1.5 M

OBSERVACIONES

- a. La depurinación con HCl tiene un efecto de rotura de cadenas de DNA en general, con el peligro de que fragmentos de pequeño tamaño también se fragmenten. Esto se evita con la irradiación con UV de onda corta si tapamos la zona del gel de los fragmentos menores, con lo cual se rompen sólo las cadenas de DNA de alto peso molecular.
- b. Los primeros experimentos realizados con DNA genómico se realizaron empleando filtro de nitrocelulosa como soporte y la transferencia se realizaba siguiendo el método lento. El tiempo de transferencia se incrementó a 24 h.

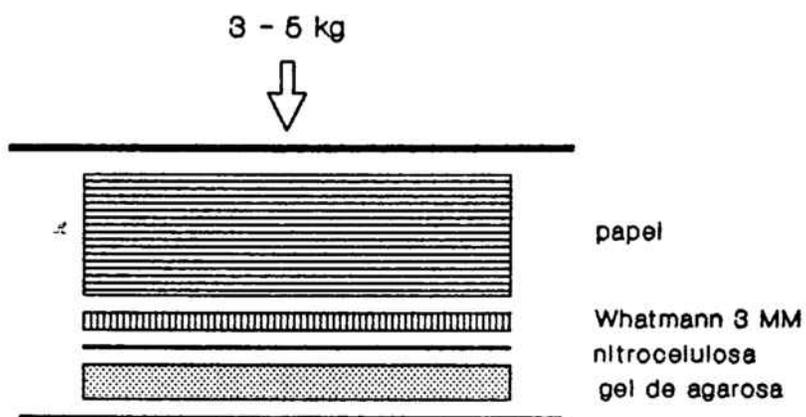


Figura 2.4 : Transferencia rápida de DNA a papel de nitrocelulosa.

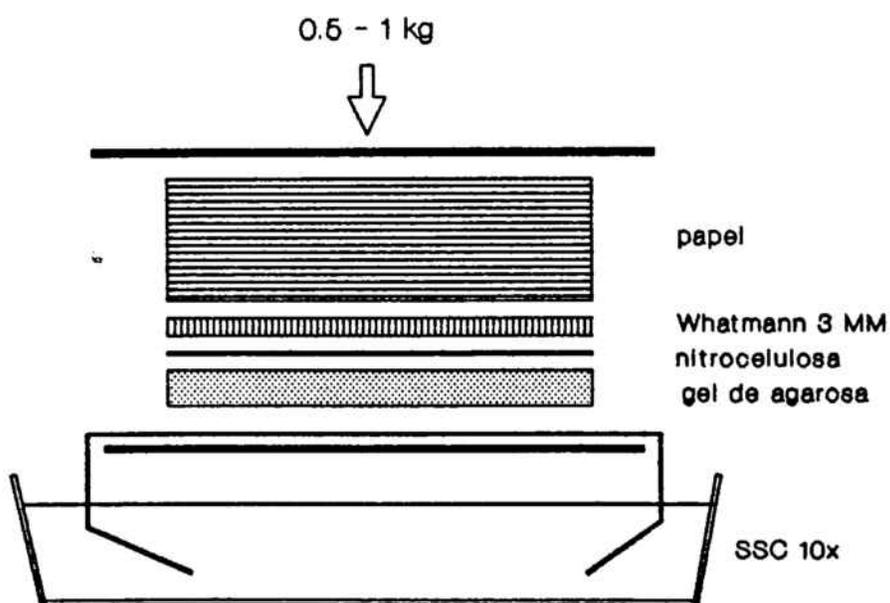


Figura 2.5 : Transferencia lenta de DNA a papel de nitrocelulosa.

2.8.2 TRANSFERENCIA DE DNA A NYLON : TRANSFERENCIA ALCALINA

El empleo de membranas de nylon se justifica en algunos experimentos pese a su mayor precio por que presentan una mayor resistencia mecánica, mayor resolución, mayor sensibilidad y pueden deshibridarse con facilidad. En el caso de estudios sobre DNA genómico es el soporte más adecuado. En nuestro caso se emplearon membranas de nylon Zeta-Probe[®] de BioRad y ocasionalmente Hybond[®] de Amersham.

PROCEDIMIENTO

1. Separar el DNA por electroforesis en gel de agarosa. Fotografiar el gel colocando una regla milimetrada en un lateral con la finalidad de disponer de una referencia del tamaño real.
2. Incubar el gel en disolución de HCl 10 min a temperatura ambiente con agitación suave.
3. Montar el gel en un sistema de transferencia como el que se describe en la figura 2.8.1.2.a. La disolución de transferencia que se utiliza es NaOH 0.4 N. Colocar el gel sobre el papel Whatman 3MM que actúa de mecha procurando que no queden burbujas. Cubrir el gel con una pequeña cantidad de NaOH 0.4 N.
4. Colocar sobre el gel la membrana de nylon previamente humedecida en agua estéril. Evitar las burbujas. Cubrir la membrana con NaOH 0.4 N.
5. Humedecer en agua dos papeles Whatman 3MM y colocarlos sobre la membrana. Terminar de montar la transferencia tal como se indica en la figura 2.8.1.2.a.
6. Dejar transferir de 12 a 24 h.
7. Desmontar la transferencia y marcar en la membrana la posición de los pocillos. Hacer un corte en la esquina inferior izquierda para orientar el filtro.
8. Lavar el filtro de nylon en SSC (2x) y secarlo al aire. Las membranas secas son estables a temperatura ambiente. El DNA en este proceso queda fijado a la membrana durante la transferencia y no es necesaria ninguna fijación posterior.

2.8.3 TRANSFERENCIA DE RNA A FILTROS DE NYLON

La transferencia se hace a partir de geles desnaturalizantes, geles de agarosa-formaldehido para permitir la correcta medida del peso molecular. Todo el material empleado debe ser libre de RNAsas.

PROCEDIMIENTO

1. Separar los diferentes RNAs en un gel de agarosa formaldehido (ap.2.6.1). Teñido o no el el gel se transfiere sin ningún

- procesamiento previo. Es conveniente teñir al menos los marcadores para tener una referencia del tamaño real.
2. Recortar con un bisturí estéril la zona del gel a transferir.
 3. Montar las piezas según el montaje de la figura 2.8.1.2.a :
 - mechas de papel Whatman 3MM empapadas en SSPE (20x)
 - gel. Colocar sobre las mechas evitando las burbujas. Colocar encima un poco de SSPE (20x).
 - membrana de nylon Hybond™ (Amersham, o ZetaProbe™ de BioRad). Evitar las burbujas. Poner encima un poco de SSPE (20x).
 - 3 a 4 capas de papel Whatman 3MM.
 - de 5 a 8 cm de papel de filtro.
 - cristal
 - peso de 0.5 a 1 kg.
 4. El tampón de transferencia es SSPE (20x).
 5. Dejar transferir de 8 a 14 h.
 6. Desmontar el sistema. Marcar la posición de los pocillos en la membrana y hacer un corte en una esquina para orientarla.
 7. Secar la membrana entre papel de filtro hasta que no moje.
 8. Envolver el filtro en plástico Saran-Wrap™, sin arrugas en la cara donde está adherido el RNA.
 9. Colocando el filtro envuelto con la cara que presenta el RNA en contacto con el transiluminador irradiarlo durante 2 a 5 min con luz UV de onda larga (302 nm). Habitualmente 4 min (notas a, b).
 10. El filtro se conserva a 4°C (nota c).

DISOLUCIONES

SSPE (x20)

NaCl 3.6 M
NaH₂PO₄ . 7 H₂O 0.2 M
EDTA 20 mM

OBSERVACIONES

- a. El tiempo de irradiación depende de la humedad que queda en el filtro. Se aumenta el tiempo de irradiación cuanto más húmedo esté, hasta un máximo de 5 a 6 min. Este proceso fija el RNA a la membrana de nylon.
- b. En el caso de que el gel de agarosa-formaldehído se haya teñido se puede aprovechar el tiempo de irradiación de la membrana con UV para fotografiar el RNA fijado a la membrana. El RNA retiene el bromuro de etidio y es visible cuando se irradia con luz UV. Es un buen control del estado del RNA y de la transferencia. Es conveniente, asimismo, teñir el gel después de la transferencia para comprobar que ha sido completa.
- c. El filtro se puede conservar largos períodos de tiempo a 4°C en oscuridad (protegido con plástico y papel de aluminio).

2.8.4 "DOT BLOT" DE DNA

Este método permite analizar con rapidez una gran cantidad de muestras de DNA para encontrar secuencias homólogas por hibridación. Se trata de una transferencia rápida de DNA en forma de manchas ("dots" o "spots") sobre filtro de nitrocelulosa. El método se ha tomado de Davis et al. (1986).

PROCEDIMIENTO

1. Mojar una pieza de Whatman 3MM y otra de nitrocelulosa cortadas al tamaño del aparato a emplear (Hybri.dot Manifold, BRL #1050MM) en SSC (10x). Colocar primero la pieza de papel Whatman 3MM evitando las burbujas y encima la de nitrocelulosa.
2. Cerrar el aparato, asegurarlo y conectar el vacío.
3. Lavar los pocillos con 100 µl de SSC (20x)
4. Marcar algunos pocillos añadiendo 2 µl de solución colorante como marcadores de posición.
5. Poner de 1 a 2 µgr de DNA en 10 µl de tampón TE pH 7.5. Calentar las muestras a 95°C durante 5 min. Clavar en hielo. Cargar en los pocillos.
7. Lavar cada pocillo con 100 µl de SSC (20x) bajo vacío.
8. Eliminar el vacío. Desmontar el aparato y quitar el filtro.
9. Secar el filtro de nitrocelulosa entre papel de filtro. Incubar 3 h a 80°C para fijar el DNA.
10. Conservar el filtro a temperatura ambiente o proceder a hibridar.

DISOLUCIONES

Disolución colorante

azul de bromofenol 0.25 %
Ficoll 400 25 %

2.8.5 REPLICAS DE PLACAS DE BACTERIOFAGO

La obtención de réplicas sobre filtros de nitrocelulosa de las calvas de lisis de bacteriófago presentes en una placa de cultivo permite la búsqueda de fragmentos homólogos al DNA marcado empleado como sonda. Este procedimiento es la base de las búsquedas de secuencias homólogas sobre librerías genómicas o genotecas. En placas de 9 cm de ϕ se pueden llegar a plaquear hasta 10^5 u.f.p. de lambda Charon35, pudiendo de este modo analizar 10^5 fragmentos diferentes de DNA en un único filtro.

PROCEDIMIENTO

1. Sembrar el bacteriófago en las placas (ver ap. 2.3.4.1) a la

- densidad deseada, empleando solución de agarosa blanda en la capa superior. Incubar durante más de 12 h a la temperatura apropiada, usualmente 37°C (nota a).
2. Dejar las placas crecidas a 4°C de 30 a 60 min.
 3. Tomar un filtro de nitrocelulosa circular (85 mm \varnothing) (Schleicher y Schuell BA85), escribir el nombre de la placa con lápiz en un lado.
 4. Con ayuda de unas pinzas poner el filtro sobre la placa de cultivo. Con una aguja hipodérmica mojada en tinta china hacer tres orificios asimétricos para poder orientar la placa con posterioridad. La tinta debe manchar el medio de cultivo.
 5. Dejar de 20 a 30 s.
 6. Sacar el filtro de nitrocelulosa con cuidado de no arrastrar agarosa (nota b).
 7. Sumergir en una placa de Petri con 40 ml solución I, desnaturalizante. Dejar 1 min (nota c).
 8. Sacar el filtro. Escurrir sobre papel de filtro.
 9. Sumergir en una placa de Petri de 15 cm \varnothing con 200 ml solución II, neutralizante. Dejar 1 min.
 10. Sacar el filtro. Escurrir sobre papel de filtro.
 11. Sumergir en una placa de Petri de 15 cm \varnothing con 200 ml solución III. Dejar de 30 s a 1 min.
 12. Escurrir sobre papel de filtro. Dejar secar 20 min a temperatura ambiente entre hojas de papel de filtro.
 13. Para fijar el DNA a la nitrocelulosa se incuban los filtros a 80°C en una estufa durante 2 a 3 h (notas d, e, f).

DISOLUCIONES

Disolución de agarosa blanda

0.7 % agarosa en medio LB

Disolución I

NaOH 0.1 N

NaCl 1.5 M

Para 50 ml : 5 ml NaOH 10 N, 15 ml NaCl 5 N y 30 ml agua.

Disolución II

Tris-HCl 0.5 M pH 7.5

NaCl 1.5 M

Para 200 ml : 60 ml NaCl 5 N, 50 ml Tris-HCl 2 N pH 7.5 y 90 ml agua.

Disolución III

SSPE 2x

OBSERVACIONES

- a. Conviene emplear solución de agarosa blanda en lugar de agar pues al enfriarse es más consistente y se evita el arrastre de medio por el filtro al hacer la réplica.
- b. Se pueden hacer 2 réplicas por placa. En ese caso, para hacer la primera se dejará el filtro 20 s y para la segunda 2 min. Marcar la primera réplica haciendo 3 orificios asimétricos, y la segunda haciendo 6, en parejas, asimétricos.
- c. Si se han de procesar bastantes filtros conviene cambiar la disolución I y II cada 25.
- d. No es conveniente dejar los filtros más de 3 h a 80°C, para fijar el DNA, pues se hacen frágiles.
- e. Las placas de cultivo se conservan selladas a 4°C.
- f. Los filtros se pueden reutilizar. Para deshibridarlos se sumergen en agua hirviendo, y se dejan a 65°C con agitación durante 1 h. Secar a temperatura ambiente entre hojas de papel de filtro. No conviene deshibridarlos más de dos o tres veces.

2.8.6. REPLICAS DE COLONIAS DE BACTERIAS

Permite buscar secuencias homólogas a la sonda empleada directamente sobre las colonias bacterianas crecidas en una placa de cultivo.

PROCEDIMIENTO

1. Crecer las colonias en las placas de cultivo.
3. Tomar un filtro de nitrocelulosa circular (85 mm \varnothing) (Schleicher y Schuell BA85), escribir el nombre de la placa con lápiz en un lado.
4. Con ayuda de unas pinzas poner el filtro sobre la placa de cultivo. Dejar el filtro 20 s.
5. Retirar el filtro con cuidado de no arrastrar ninguna colonia sobre la placa.
6. Dejar las placas en la estufa a 37°C para que las colonias vuelvan a crecer.
7. Colocar el filtro con la cara de las colonias hacia arriba sobre papel 3MM empapado en disolución I, desnaturalizante. Dejar 5 min. Durante este tiempo las bacterias lisan y las colonias se vuelven brillantes.
8. Escurrir los filtros 10 s sobre papel de filtro (nota a).
9. Colocar los filtros sobre papel 3MM empapado en disolución II, neutralizante. Dejar 5 min.
10. Escurrir los filtros sobre papel de filtro.
11. Colocar los filtros sobre papel 3MM empapado en disolución II, neutralizante. Dejar 5 min.
12. Meter los filtros en una cubeta con etanol al 70 %, únicamente 10 s.
13. Dejar secar los filtros sobre hojas de papel de filtro a

temperatura ambiente.

14. Fijar el DNA a la nitrocelulosa incubando los filtros entre hojas de papel de filtro a 80°C durante 2 a 3 h.

OBSERVACIONES

- a. En la mayor parte de las réplicas suelen quedar restos de colonias y de medio adherido a la nitrocelulosa. Es conveniente eliminar estos restos pues dificulta la correcta hibridación. Se eliminan despues del lavado en etanol al 70 % (paso 12) o, preferiblemente, despues de la prehibridación de los filtros.

2.9 MARCAJE RADIOACTIVO DE DNA

El desarrollo de las técnicas de marcaje de ácidos nucleicos ha jugado un papel decisivo en la investigación del DNA recombinante. A lo largo de la última década se han desarrollado una serie de técnicas para incorporar marcaje radiactivo a los ácidos nucleicos con elevada eficiencia. Como revisión de los métodos de marcaje ver "Nucleic acid labelling", Hames y Higgins (1985). En nuestro trabajo se han empleado sondas de DNA marcadas radiactivamente para :

- "Southern blots" : detección de DNA fraccionado en gel despues de transferirlos a membranas de nitrocelulosa o nylon (ap. 2.8.1 y 2.8.2).
- "Dot blots" : detección de DNA no fraccionado inmovilizado sobre membranas de nitrocelulosa.
- "blots" de colonias o placas : detección de DNA liberado por bacterias lisadas o bacteriófagos e inmovilizado a membranas de nitrocelulosa.
- secuenciación de DNA.

Las técnicas de marcaje que empleadas han sido :

1. "nick translation"
2. "random primer"
3. marcaje terminal
 - 3.1 Extremos 3' con quinasa y $\alpha^{32}\text{P}$ ATP
 - 3.2 Extremos 3' con DNA polimerasa I y $\alpha^{32}\text{P}$ dNTP
 - 3.3 Extremos 5' con terminal transferasa y $\alpha^{32}\text{P}$ ddATP

Como trazador se empleó siempre ^{32}P excepto en las reacciones de secuencia en que se usó también ^{35}S .

2.9.1 MARCAJE DE DNA POR "NICK TRANSLATION"

Esta técnica fue la más utilizada. Se puede emplear con una variedad de marcajes para generar sondas adecuadas para muchas aplicaciones de hibridación. Su mayor ventaja sobre otros métodos de marcaje uniforme de DNA es su flexibilidad con respecto a factores tales como el tamaño de la sonda, actividad específica y concentración. Es especialmente adecuado para la producción de grandes cantidades de sonda para utilizar en hibridaciones múltiples que requieran elevadas concentraciones de sonda y altas actividades específicas.

La reacción de "nick translation" comprende la acción simultánea de dos enzimas: deoxirribonucleasa I pancreática (DNasa I) y DNA polimerasa I de E.coli. La DNasa I introduce roturas al azar ("nicks") en una de las hebras de la molécula de DNA, liberando extremos 3' hidroxilo y 5' fosfato. La DNA polimerasa I presenta dos actividades que actúan en esos puntos

de rotura del DNA. Mediante su actividad exonucleasa 5'-3', a partir del extremo 5' fosfato, elimina sucesivamente nucleótidos. Simultáneamente su actividad polimerasa 5'-3' añade nucleótidos a partir del grupo 3' hidroxilo libre empleando la cadena de DNA como molde. De este modo la rotura ("nick") se desplaza a lo largo de la molécula de DNA. Debido a que la DNasa I introduce roturas al azar en la molécula de DNA el efecto neto es la producción de una población de moléculas de DNA uniformemente marcadas. Empleando uno o más deoxirribonucleótidos marcados se pueden conseguir actividades específicas elevadas (1×10^5 cpm ^{32}P / μg de DNA).

Un factor muy importante en la reacción es la cantidad de DNasa I presente. Un defecto en la cantidad de DNasa I es causa de bajas incorporaciones y un exceso conduce a una fragmentación excesiva de la molécula de DNA, con lo que se incrementa considerablemente el fondo inespecífico de las hibridaciones. Las condiciones óptimas son aquellas que permiten la incorporación del 30 al 60 % del marcaje y que generan fragmentos de DNA de cadena sencilla de alrededor de 300 nucleótidos. Para una revisión en profundidad de la técnica ver "Nucleic acid labelling", "Labelling of DNA with ^{32}P by nick translation".

El método fue descrito por Rigby y Dieckmann (1977) y tomado de Maniatis (1982).

PROCEDIMIENTO

a. Reacción de marcaje

1. Mezclar en un tubo eppendorf (nota a) :
 - 2.5 μl tampón de nick (10x)
 - 2.5 μl solución de nucleótidos (10x)
 - x μl DNA (100 a 200 ngr)
 - (18 - x) μl agua estéril
2. Diluir el enzima DNasa I en agua a 10^{-5} .
3. Añadir los enzimas (nota c) :
 - 1.0 μl DNasa I (dilución 1×10^{-5} del stock DNasa I de 1 mg/ml)
 - 1.0 μl DNA polimerasa I E. coli (10 U/ μl)
4. Centrifugar brevemente.
5. Añadir 2.0 μl (20 μCi) $\alpha^{32}\text{P}$ dATP (10 μCi / μl) (nota b).
6. Agitar con la pipeta. Incubar 1 h 30 min en baño de agua a 13°C (nota d).
7. Parar la reacción añadiendo 5 μl EDTA 0.5 M pH 5.2. Si se va a proceder a ligar la sonda pasar a 9 (nota g).
8. Añadir :
 - 170 μl tampón TNE
 - 2 μl solución azul de bromofenol
 - 5 μl DNA de salmón (10 mg/ml)y proceder a separar el DNA marcado de los nucleótidos libres (paso 15) (nota e).

b. Reacción de ligación de la sonda

9. Calentar 10 min a 65°C para inactivar completamente los enzimas DNasa I y DNA polimerasa I.
10. Añadir:
 - 150 µl MgCl₂ 10 mM
 - 20 µl tampón de ligación (10x)
 - 2.5 µl ATP 80 mM
 - 2.0 µl DTT 1 M
11. Centrifugar brevemente.
12. Añadir una punta de pipeta de T4 DNA ligasa (NEN) (10 U/µl)
13. Incubar de 2 a 3 h a temperatura ambiente.
14. Añadir:
 - 5 µl DNA de salmón (10 mgr/ml)
 - 4 µl NaCl 5 N (o 30 µl acetato sódico 3M pH 5.2)
 - 2 µl solución de bromofenol

c. Separación de los nucleótidos libres

15. Tomar 1 µl de la solución para contar las cpm, sobre 5 ml de Supersolve^R.
16. Añadir 400 µl de etanol absoluto frío (-20°C).
17. Centrifugar 10 min a temperatura ambiente, para evitar que precipiten los nucleótidos (nota e).
18. Eliminar el sobrenadante que se desecha como residuo radiactivo. Lavar el sedimento con 1 ml de etanol al 70 %. Centrifugar 10 min a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante, rechazado como residuo radiactivo. Secar el sedimento.
19. Resuspender el sedimento en 200 µl de tampón TE pH 7.5.
20. Contar 1 µl sobre 5 ml de Supersolve^R (nota f).
21. Conservar el tubo con el DNA marcado en un vial de plomo a -20°C.

DISOLUCIONES

Tampón de nick (10x)

Tris-HCl 0.5 M pH 7.5
MgSO₄ 0.1 M
DTT 1 mM
BSA 1 mg/ml

Conservar a -20°C. Emplear BSA (calidad para ácidos nucleicos, ap. 2.2.2).

Disolución de nucleótidos (10x)

	dATP	dTTP	dGTP	dCTP
- A (x10)	-	0.2	0.2,	0.2
- T (x10)	0.2	-	0.2	0.2
- G (x10)	0.2	0.2	-	0.2
- C (x10)	0.2	0.2	0.2	-

Se preparan diluyendo en agua a partir de stocks preparados según Maniatis y col. (1982) a 20 mM.

Tampón TNE

Tris-HCl 10 mM pH 7.5
EDTA 1 mM
NaCl 150 mM

Disolución de azul de bromofenol

azul de bromofenol 1 % en agua

Tampón de ligación (10x)

Tris-HCl 0.5 M pH 7.5
MgCl₂ 0.1 M

Sephadex G-50

Para inflar el gel añadir 12 ml agua estéril por gr Sephadex (el gel se infla aprox 9-11 ml/g), y dejar más de 3 h a 20°C o al menos 1 a 90°C. Eliminar el resto de líquido por decantación. Se puede esterilizar en autoclave. Es conveniente no emplear agitadores magnéticos en el proceso de inflado ("Gel filtration. Theory and Practice").

OBSERVACIONES

- a. Cantidad de DNA. Con 100 a 200 ngr de DNA hay suficiente para la mayor parte de las aplicaciones, aunque pueden marcarse cantidades mayores, hasta 1 µg, sin variar las condiciones que se describen. La utilización de cantidades menores de DNA se justifica por la economización de éste, por la necesidad de actividades específicas máximas así como por el hecho de que en algunos procesos de purificación de fragmentos de DNA a partir de geles se arrastran contaminaciones que inhiben la DNA polimerasa I. Al reducir la concentración de DNA en la reacción se diluye asimismo el inhibidor y aumenta la eficiencia del marcaje. Nuestra experiencia es que el DNA purificado desde geles por el método de papel DEAE celulosa (ap.2.7.2) no presenta problemas.

- b. Radiactividad empleada. Se emplean por reacción 20 μCi de ^{32}P cuando se trata de las presentaciones $\alpha^{32}\text{P}$ dATP de 400 y 800 Ci/mmol (Amersham PB10164 y PB10138). En el caso de emplear la presentación de 3000 Ci/mmol (Amersham PB10204) es necesario poner de 30 a 40 μCi para ajustar la concentración de dATP en la reacción.
- c. La disolución de DNasa I se preparó siempre :
- 1 μl DNasa I (1 mgr/ml) en 1 ml de agua estéril (sol. A)
 - 10 μl sol. A (10^{-3} mgr/ml) en 1 ml de agua estéril.
- d. La reacción de marcaje se realiza a baja temperatura (13-15°C) debido a que temperaturas superiores pueden causar una rápida degradación de la sonda debida a un incremento de la actividad del enzima DNasaI y de la actividad exonucleasa 5'-3' del enzima DNA polimerasa I. Asimismo se ha observado (Rigby y Dieckmann, 1977) que por encima de 20°C el proceso de "nick translation" puede ser reemplazado por desplazamiento de cadenas. En ese caso una cadena en elongación desplaza residuos del dúplex en lugar de escindirlos con la actividad exonucleasa 5'-3'. Bajo esas condiciones es posible que la DNA polimerasa I copie una cadena desplazada produciendo regiones de complementariedad dentro de la misma cadena.
- e. La separación de nucleótidos no incorporados de la sonda es necesaria para evitar un fondo inespecífico elevado en la hibridación. Además es importante eliminar el exceso de radiactividad, inútil, por su propia peligrosidad. La precipitación con etanol si bien elimina la mayor parte de los nucleótidos incorporados no lo hace completamente. Se consigue una mejor separación empleando una purificación a través de columnas de Sephadex-G50 (Maniatis et al, 1982) según el proceso que se describe :
1. Colocar en el interior de una jeringa de 1 ml un poco de lana de vidrio siliconizada, y apretarla con el émbolo.
 2. Llenar la jeringa con Sephadex-G50 inflado en agua estéril.
 3. Colocar la jeringa en el interior de un tubo de cristal de modo que quede colgando.
 4. Centrifugar a 1600 gav a temperatura ambiente en una centrífuga con rotor basculante (2100 rpm en SORVALL RT6000) 2 min.
 5. Rellenar la jeringa con más Sephadex y centrifugar de nuevo.
 6. Repetir la operación 5 hasta que sólo quede espacio en la jeringa para 200 μl aproximadamente. El gel en el interior de la columna tiene aspecto agrietado.
 7. Cargar 200 μl de tampón TNE en la columna. Centrifugar.
 8. Repetir la operación 7 dos veces.
 9. Poner la jeringa en un nuevo tubo de cristal dentro del cual se ha introducido un tubo eppendorf sin tapa.
 10. Cargar la muestra radiactiva, a una concentración

de NaCl de 0.15 M aproximadamente. Centrifugar.

12. El DNA atraviesa la columna y queda en el eppendorf al fondo del tubo, en la columna quedan retenidos los nucleótidos y el colorante. Si pasa colorante la separación no habrá sido completa y se tendrá que repetir. Pasar el líquido del eppendorf a otro tubo. Desechar la jeringa como desecho radiactivo.

- f. Las incorporaciones conseguidas oscilaron entre el 20 y el 50 %, y alcanzaron actividades específicas de 0.5 a 2×10^6 cpm ^{32}P / μg DNA empleando un solo nucleótido marcado. Cuando se emplean dos o más nucleótidos marcados puede llegar a ser de 1.5×10^9 cpm ^{32}P / μg DNA.
- g. Las sondas suelen ligarse cuando se trata de fragmentos pequeños de 150 a 500 bp. En nuestro caso se ligaba en la mayor parte de los casos pues las sondas más empleadas fueron de 300 a 900 bp. De este modo se conseguían sondas de un tamaño más uniforme.

2.9.2 MARCAJE DE DNA POR "RANDOM PRIMER"

Los métodos de 'polimerización a partir de cebador' ("primer extension") emplean la capacidad de las DNA polimerasas de sintetizar una nueva cadena de DNA complementaria a una cadena molde iniciándose a partir del extremo 3' hidroxilo que puede ser suministrado por un oligonucleótido corto unido al molde. Es esencial en este proceso emplear una DNA polimerasa que carezca de actividad exonucleasa 3'-5' para preservar la integridad del cebador. Por ello se suele emplear el fragmento grande de la DNA polimerasa I de *E. coli*. o polimerasa Klenow.

En la técnica de "random primer" descrita por Feinberg y Vogelstein 1983; 1984) hexanucleótidos de secuencia al azar producidos ya sea por digestión con DNaseI de DNA de timo de ternera o por síntesis de oligonucleótidos, se han empleado como cebadores para preparar copias marcadas tanto de DNA como de RNA. Esta técnica consigue DNA marcado con una elevada actividad específica; de 1.8×10^9 cpm ^{32}P / μg DNA cuando se emplea un solo nucleótido marcado. Cuando se emplean tres nucleótidos marcados sólo se consigue un ligero aumento en la actividad específica (3×10^9 cpm ^{32}P / μg DNA).

La cantidad de DNA empleada como molde en la reacción es mucho menor que la necesaria para un marcaje por "nick translation" de 10 a 25 ngr. La incorporación de radiactividad es del 70 al 80 % en reacciones de 3 a 4 h a temperatura ambiente (25°C). La cantidad de sonda sintetizada es menor que en una reacción de "nick translation" y su actividad específica es muy superior. Es una técnica idónea para situaciones como la localización de genes de copia única en "blots" genómicos ("Southern blot") donde se requieren sondas de elevada actividad específica y baja concentración. El tamaño de los fragmentos

marcados oscila entre 100 y 200 nucleótidos, y se ha observado que la variación de tamaños es mayor que en los marcajes por "nick translation".

Se siguió el procedimiento descrito en el manual suministrado con el kit "Multiprime DNA labelling system" de Amersham (Amersham, RPN1600Z). La composición de las soluciones se indica sólo cualitativamente. Como nucleótido marcado se empleó habitualmente $\alpha^{32}\text{P}$ dATP de 3000 Ci/mmol (Amersham PB10204).

PROCEDIMIENTO

1. Preparar una solución del DNA a marcar a una concentración de 25 μg / ml en agua o tampón TE.
2. Poner en un tubo eppendorf :
 - 2.5 μl solución DNA (25 μg / ml)
 - 20.5 μl agua estéril
3. Incubar a 95 - 100°C durante 10 min. Clavar en hielo.
4. Añadir :
 - 4 μl solución TTP (100 μM)
 - 4 μl solución GTP (100 μM)
 - 4 μl solución CTP (100 μM)
 - 5 μl tampón de reacción (nota d)
 - 5 μl solución de cebador + BSA
5. Centrifugar brevemente.
6. Añadir de 30 a 50 μCi $\alpha^{32}\text{P}$ dATP.
7. Añadir 2 μl polimerasa Klenow (5 U / μl). Agitar con la pipeta, no violentamente pues puede perder actividad el enzima.
8. Incubar de 3 a 5 h a temperatura ambiente dentro de un vial de plomo (nota a).
9. Añadir :
 - 6 μl acetato sódico 3 M pH 5.2
 - 5 μl tRNA (10 mg/ml)
 - 125 μl etanol absoluto frío (-20°C)
10. Centrifugar 10 min a temperatura ambiente (nota b).
11. Eliminar el sobrenadante. Tratarlo como desecho radiactivo.
12. Lavar el sedimento con 1 ml de etanol al 70 %. Centrifugar 10 min a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante. Secar el sedimento.
13. Resuspender el sedimento en 200 μl de tampón TE pH 7.5.
14. Contar 1 μl de la solución sobre 5 ml de Supersolve^R (nota c, e).

DISOLUCIONES

Tampón de reacción

Tris-HCl pH 8.0
MgCl₂
2-mercaptoetanol

Solución de cebador + BSA

hexanucleótidos al azar en solución acuosa con BSA libre de nucleasas.

OBSERVACIONES

- a. La temperatura de incubación y el tiempo de reacción pueden elegirse a conveniencia pues la reacción alcanza un máximo de incorporación a las pocas horas que no se reduce significativamente durante un período de 24 h. Una temperatura ambiente de 25°C durante 3 a 5 h es suficiente, pero las reacciones pueden desarrollarse toda una noche. Cuando se emplean 2 nucleótidos marcados o más la tasa de incorporación se reduce, al ser la concentración de éstos limitante, y se requieren un mínimo de 5 h para una incorporación máxima.
- b. Si la incorporación es superior al 50 % no es necesario eliminar de la solución los nucleótidos no incorporados. En nuestro caso se eliminaron siempre.
- c. Para medir la incorporación se pueden contar 2 μ l del sobrenadante del paso 11, o bien calcularlo a partir de un valor teórico.
- d. La composición del tampón de reacción sólo la conocemos de modo cualitativo. Feinberg y Vogelstein (1984) describen el tampón OLB de reacción como :
 - 250 mM Tris-HCl pH 8.0
 - 25 mM MgCl₂
 - 0.4 % (v/v) 2-mercaptoetanol
 - 600 mM HEPES pH 6.6
 - 1.2 M NaOH
- e. El tamaño de las sondas se comprobó por electroforesis en geles de agarosa alcalinos (ap. 2.5.1.2) variando entre 100 y 180 nucleótidos.

2.9.3 MARCAJE TERMINAL DEL DNA

Se han desarrollado una amplia variedad de técnicas para introducir marcaje en los extremos 3' o 5' del DNA lineal o del RNA. Usualmente sólo se incorpora uno o pocos nucleótidos marcados por lo cual las actividades específicas que se consiguen son mucho menores que las alcanzadas con los métodos de marcaje uniforme.

Se emplearon las técnicas :

- adición de un fosfato marcado, en 5', con γ -³²P ATP y T4 polinucleótido quinasa.
- relleno de los extremos 5' protuberantes con DNA polimerasa I en presencia de α -³²P dNTP.
- adición de un nucleótido marcado en 3' con terminal

transferasa y $\alpha^{32}\text{P}$ ddATP.

La utilización de uno u otro método depende del tipo de extremo del DNA a marcar y del tipo de nucleótido disponible.

2.9.3.1 Marcaje en extremo 5' con $\gamma^{32}\text{P}$ ATP y polinucleótido quinasa

El enzima T4 polinucleótido quinasa cataliza la transferencia del fosfato en posición γ de un ribonucleótido 5'-trifosfato donador a un grupo 5' hidroxilo de un polinucleótido, oligonucleótido o nucleósido 3' fosfato aceptor (Richardson, 1981).

El donador más comunmente empleado para marcaje terminal es $\gamma^{32}\text{P}$ ATP. El grupo fosfato marcado es transferido al DNA que dispone de un grupo hidroxilo en posición 5'. Esta es la denominada reacción directa. Muchos polinucleótidos, por ejemplo los resultantes de digestión con endonucleasas de restricción, tienen un grupo fosfato en posición 5' que debe ser eliminado utilizando fosfatasa alcalina antes de que pueda ser usado como sustrato de la reacción de marcaje con kinasa. Esta fase puede evitarse realizando una reacción de intercambio con la T4 polinucleótido quinasa en presencia de un exceso de ADP. En estas condiciones el enzima T4 polinucleótido quinasa tiende a transferir el fosfato 5' terminal del DNA al ADP y a refosforilar el DNA tomando el fosfato marcado del $\gamma^{32}\text{P}$ ATP. Esta reacción, aunque más conveniente que la directa que implica una desfosforilación con fosfatasa alcalina es considerablemente menos eficiente. En nuestro caso siempre se empleó la reacción directa.

PROCEDIMIENTO

a. Desfosforilación del DNA

1. Digerir 5 - 20 pmol de DNA (10 - 40 pmol de extremos) con un enzima que libere extremos 5' protuberantes o romos (nota a). Comprobar que la digestión sea completa por electroforesis en geles de agarosa (nota b).
2. Extraer la mezcla de digestión con un volumen igual de fenol-cloroformo y luego con éter. Precipitar el DNA con etanol. Redisolver el DNA en 10 μl de agua estéril (nota c).
3. En un tubo eppendorf mezclar :
 - 10 μl DNA (10 - 40 pmol de extremos)
 - 2 μl tampón CIP^b (10x)
 - (8 - x) μl agua
 - x μl de fosfatasa alcalinaDiluir la fosfatasa alcalina (Boehringer 25 U / μl) 1/10 en tampón CIP (1x). Poner 1 μl por cada 10 pmol de extremos (0.25 U / pmol de extremos).

4. Mezclar bien. Incubar 1 h a 37°C si son extremos 5' protuberantes y 30 min a 56°C si se trata de extremos romos.
5. Añadir 30 µl de tampón TNE y 2.5 µl de SDS 10 %. Inactivar el enzima calentando 30 min a 69°C.
6. Extraer con un volumen igual de fenol - cloroformo. Agitar intensamente con el vórtex (3 min). Centrifugar 2 min a temperatura ambiente. Transferir la fase superior a otro tubo.
7. Reextraer el fenol con 50 µl de tampón TNE. Reunir las dos fases acuosas y extraer de nuevo con fenol - cloroformo. Extraer con éter.
8. Añadir 1/10 volumen de acetato sódico 3 M pH 5.2 y precipitar con dos volúmenes de etanol.
9. Secar. Resuspender en 5 µl de agua estéril.

b. Reacciones de marcaje

Extremos 5' protuberantes

10. En un tubo eppendorf poner :
 - 5.0 µl DNA desfosforilado (10 - 40 pmol extremos)
 - 2.0 ml tampón quinasa (I) (10x)
 - 6.0 µl gamma³²P ATP (3000 Ci/mmol, 10 µCi/µl)
 - 6.0 µl agua estéril
 - 1.0 µl T4 polinucleótido quinasa
 Hay que conseguir una concentración mínima de 1 µM ATP en la reacción.
11. Mezclar e incubar 1 h a 37°C.
12. Parar la reacción con 1.0 µl EDTA 0.5 M pH 8.0. Extraer con un volumen igual de fenol - cloroformo y con éter.
13. Añadir acetato amónico 10 M hasta una concentración final de 3 M y precipitar con etanol.
14. Lavar dos veces con etanol al 70 %. Secar al vacío y resuspender en tampón TE pH 7.5.

Extremos romos

Las moléculas de DNA con extremos romos se marcan con mucha menor eficiencia que las moléculas con extremos protuberantes. La eficiencia de marcaje aumenta si se desnaturaliza el DNA por calor antes de la reacción enzimática, ya que así los extremos 5' se hacen más accesibles a la quinasa.

15. En un tubo eppendorf poner :
 - 5.0 µl DNA desfosforilado (10 - 40 pmol de extremos)
 - 4.0 µl agua estéril
 - 1.0 µl tampón de desnaturalización (10x)
16. Calentar 2 min a 90°C, enfriar rápidamente en hielo. Centrifugar brevemente.
17. Añadir :
 - 2.0 µl tampón quinasa (II) (10x)
 - 6.0 µl gamma³²P ATP (3000 Ci/mmol, 10 µCi / µl)

- 2.0 μ l T4 polinucleótido quinasa (NEN, 10 U / μ l)
10.0 μ l agua estéril
18. Mezclar bien. Incubar 30 min a 37°C.
 19. Parar la reacción añadiendo 1 μ l EDTA 0.5 M pH 8.0. Extraer con un volumen igual de fenol - cloroformo y con éter.
 20. Añadir acetato amónico 10 M hasta una concentración final de 3 M. Precipitar con 2 volúmenes de etanol.
 21. Lavar dos veces con etanol al 70 % y secar en vacío.
 22. Resuspender el sedimento en tampón TE pH 7.5.

DISOLUCIONES

Tampón CIP (10x)

Tris-HCl 0.5 M pH 9.0
MgCl₂ 10 mM
ZnCl₂ 1 mM
espermidina 10 mM

Tampón quinasa (I) (10x)

Tris-HCl 0.5 M pH 7.6
MgCl₂ 0.1 M
DTT 50 mM
espermidina 1 mM
EDTA 1 mM

Tampón quinasa (II) (10x)

Tris-HCl 0.5 M pH 9.5
MgCl₂ 0.1 M
DTT 50 mM
glicerol 50 %

Tampón de desnaturalización (10x)

Tris-HCl 0.2 M pH 9.5
espermidina 10 mM
EDTA 1 mM

OBSERVACIONES

- a. No es aconsejable marcar extremos 5' recesivos ya que la eficiencia de marcaje es bajísima. Los extremos 5' recesivos se pueden convertir en romos mediante la actividad exonucleasa 3'-5' del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I. :
 - Digerir el DNA con el enzima de restricción.
 - Comprobar que la digestión sea completa cargando una alicuota en un minigel.
 - Inactivar el enzima calentando 10 min a 70°C.
 - Añadir 5 a 10 U de polimerasa Klenow e incubar 1 h a

temperatura ambiente.

- Extraer con 1 volumen de fenol - cloroformo y éter.
- Precipitar el DNA con etanol.

- b. Si el DNA está contaminado con RNA, aunque en muy pequeña proporción, éste último se marcará predominantemente en la reacción enzimática. En caso de que sea necesario digerir durante 30 min a 37°C con 50 µg/ml de RNasa A libre de DNAsas.
- c. La T4 polinucleótido quinasa es inhibida por los iones amonio. No precipitar el DNA a partir de tampones que contengan iones amonio antes de la reacción con quinasa.
- d. Una expresión útil para el cálculo de los picomoles de extremos (P.E.) presentes en un microgramo de DNA lineal de longitud (L) en pares de nucleótidos es :

$$\text{P.E./}\mu\text{g DNA lineal} = \frac{3030}{L}$$

2.9.3.2 Marcaje en 3' con $\alpha^{32}\text{P}$ dNTP y DNA polimerasa I

En presencia de deoxiribonucleótidos (dNTP) la actividad polimerasa 5'-3' de la DNA polimerasa I puede emplearse para rellenar extremos recesivos 3' producidos por cortes con endonucleasas de restricción empleando el correspondiente extremo 5' como cebador. El producto es una molécula con los extremos romos. Se pueden emplear los cuatro nucleótidos radiactivos con lo cual se alcanza una actividad específica relativamente alta (1 a 2×10^7 cpm ^{32}P / µg DNA). Hay que tener en cuenta en ese caso que la actividad exonucleasa 3'-5' de la DNA polimerasa I actuará una vez llenado el extremo 3' recesivo intercambiando pirofosfato eliminando el nucleótido terminal. A bajas concentraciones de nucleótidos, esto puede causar conversión de todos los nucleótidos correspondientes al nucleótido terminal en dNMP con pérdida final de dicho nucleótido. Por ello se emplean tiempos de reacción cortos (10 a 15 min). Con el fin de evitar la actuación de la actividad exonucleasa 5'-3' se realiza la reacción en condiciones de elevada concentración de sal y baja temperatura. Por ello no se debe inactivar la polimerasa por calor pues se favorece la reacción de intercambio (exonucleasa 3'-5') y la exonucleasa 5'-3'.

La DNA polimerasa I se puede emplear también para marcar extremos romos aprovechando su capacidad de intercambiar el nucleótido 3' terminal (actividad exonucleasa 3'-5') por uno radiactivo (actividad polimerasa 5'-3').

PROCEDIMIENTO

1. Digerir 5 - 10 pmol de DNA (10 - 20 pmol de extremos) (ver ap. 2.9.3.1 nota d) con un enzima que libere extremos 5' protuberantes o romos. Comprobar que la digestión sea

- completa por electroforesis en geles de agarosa.
2. Extraer la mezcla de digestión con un volumen igual de fenol-cloroformo y luego con éter. Precipitar el DNA con etanol. Redisolver el DNA en 10 μ l de agua estéril.
 3. En un tubo eppendorf, en hielo, mezclar :
 - 10.0 μ l DNA (10 - 20 pmol de extremos)
 - 2.0 μ l mezcla de nucleótidos
 - 3.0 μ l α^{32} P dNTP (3000 Ci/mmol, 10 μ Ci / μ l)(notas c,d)
 - 5.0 μ l tampón DNA polimerasa I (10x)
 - 29.0 μ l agua estéril
 4. Centrifugar brevemente. Mantener la mezcla en hielo 10 min.
 5. Añadir 1.0 μ l DNA polimerasa I (Biolabs 5 U / μ l).
 6. Incubar 10 min en hielo (nota a).
 7. Separar los nucleótidos no incorporados por precipitación con etanol y dos lavados con etanol al 70 % (nota b).

DISOLUCIONES

Tampón DNA polimerasa I (10x)

Tris-HCl 70 mM pH 7.4
NaCl 70 mM
MgCl₂ 10 mM

Mezcla de nucleótidos

2.0 mM de tres nucleótidos en agua

Preparar la mezcla de nucleótidos menos el nucleótido radiactivo a partir de un stock 20 mM. Añadir 1 μ l de cada uno de ellos y 7 μ l de agua. Conservar a -20°C.

OBSERVACIONES

- a. La actividad 5'-3' exonucleasa de la DNA polimerasa I es inhibida por la sal y por la baja temperatura de la reacción.
- b. No inactivar el enzima por calor ya que se activaría la exonucleasa. Por otro lado el incremento de temperatura podría hacer que los extremos de DNA se separasen, y que se hicieran susceptibles de digestión por la actividad exonucleasa 3'-5'.
- c. Si el fragmento de DNA tiene los dos extremos diferentes se puede conseguir marcar sólo uno de los dos extremos, utilizando como precursor radiactivo un nucleótido que se encuentre en uno de los extremos y no en el otro.
- d. Si el DNA no se va a emplear para secuenciar, sino como sonda, preparación de marcadores, etc. se puede utilizar cualquier nucleótido que esté en la secuencia de reconocimiento, sin tener en cuenta el número de veces que se presenta este nucleótido en dicha secuencia, ni si se van a marcar los dos extremos.

2.9.3.3 Marcaje en 3' con terminal transferasa y $\alpha^{32}\text{P}$ ddATP

El enzima terminal-deoxinucleotidil-transferasa añade deoxirribonucleótidos a los extremos 3' de los fragmentos de DNA. No requiere un molde, añadiendo series de los nucleótidos disponibles sobre el extremo 3' preferentemente si éste es protuberante. Se puede conseguir incorporar solamente un nucleótido si se pone en el medio únicamente un ($\alpha^{32}\text{P}$) dideoxirribonucleótido 5' trifosfato como precursor. Como carece del grupo 3' hidroxilo la polimerización se detiene cuando se ha añadido un residuo (Yousaf et al., 1984). El marcaje de extremos 3' romos por medio de terminal transferasa y $\alpha^{32}\text{P}$ ddATP es del orden de tres veces más eficiente que con T4 polinucleótido quinasa. En presencia de iones Co^{2+} el enzima puede adicionar nucleótidos a extremos 3' recesivos pero la eficiencia de marcaje es mucho menor.

PROCEDIMIENTO

1. Digerir 5 - 10 pmol de DNA (10 - 20 pmol de extremos) (ver ap. 2.9.3.1 nota d) con un enzima que libere extremos 5' protuberantes o romos. Comprobar que la digestión sea completa por electroforesis en geles de agarosa.
2. Extraer el DNA con un volumen igual de fenol cloroformo y luego con éter. Precipitar con etanol y redissolver en 20.0 μl de agua (nota a).
3. Poner en un tubo eppendorf :
 - 20.0 μl DNA (10 - 20 pmol de extremos)
 - 5.0 μl tampón TdT (10x)
 - 5.0 μl $\alpha^{32}\text{P}$ ddATP (3000 Ci/mmol, 10 μCi / μl)
 - 20.0 μl agua estéril
 - 1.0 μl terminal-transferasa (Genofit, 15 U / μl)
4. Mezclar e incubar 1 h a 37°C.
5. Extraer la mezcla de reacción con un volumen de fenol-cloroformo. Extraer con éter.
6. Añadir acetato amónico 10 M hasta una concentración final de 3 M. Precipitar con 2 volúmenes de etanol.
7. Lavar 2 veces con etanol al 70 % (a temperatura ambiente) y secar al vacío

DISOLUCIONES

Tampón TdT (10x)

Cacodilato - KOH 1.4 M pH 7.6

Tris-HCl 0.3 M pH 7.5

DTT 1 mM

CoCl_2 10 mM

Para evitar que el Co^{2+} precipite, añadir el CoCl_2 en último lugar y en constante agitación. En la mezcla de

incubación este tampón se diluye 10 veces, bajando el pH a 6.9.

OBSERVACIONES

- a. Resuspender el DNA digerido en agua en lugar de tampón TE pH 7.5, ya que la terminal transferasa precisa de iones divalentes (Mg^{2+} o Co^{2+}) para ser activa, siendo la reacción inhibida por el EDTA.

2.10 HIBRIDACION DE SONDAS DNA

La tasa de formación de híbridos para sondas de cadena sencilla sobre DNA fijado a membranas sigue una cinética de primer orden donde la secuencia sonda se encuentra en gran exceso sobre la secuencia diana. Para sondas de doble cadena la situación es más compleja debido a que la reasociación de la sonda en la disolución reduce la concentración accesible para la hibridación.

El tiempo requerido para que la mitad de la sonda hibride con el DNA diana viene determinado por :

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K \cdot C} \quad (\text{ecuación 1})$$

donde :

K es la constante de primer orden (l/mol nucleótido.s)

C concentración de la sonda (mol nucleótido /l)

La constante de la tasa de hibridación (K) es función de la longitud de la sonda (L), de la complejidad molecular (N, número total de pares de bases en una secuencia no repetida), temperatura, fuerza iónica, viscosidad y pH. Los últimos cuatro factores se incluyen en la constante k_N' en la expresión :

$$K = k_N' L^{0.5} N^{-1} \quad (\text{ecuación 2})$$

La fuerza iónica y el pH afectan escasamente la constante (K). Se sabe por determinación empírica que la tasa máxima de hibridación en disolución ocurre 25°C por debajo de la temperatura de fusión (Tm) del dúplex. La temperatura de fusión de una molécula de DNA es aquella a la cual la mitad de los dúplex se encuentran disociados (Britten y Kohne, 1966). Esto se verifica para sondas de longitud superior a 150 bp (Cox et al., 1983). Sin embargo, este óptimo de temperatura con máxima tasa de reasociación es mucho más bajo para sondas cortas (< 100 bp) (Brahic y Haase, 1978; Wallace, 1983).

Bajo condiciones óptimas de hibridación la relación de Wetmur y Davidson (1968) para cualquier tamaño de sonda puede ser descrita por la siguiente ecuación :

$$K = 3.5 \cdot 10^5 L^{0.5} N^{-1} \quad (\text{ecuación 3})$$

Combinando las ecuaciones 1 y 3 se obtiene una expresión del tiempo ($t_{1/2}$) en segundos que se requiere para hibridar la mitad de la sonda a la diana :

$$t_{1/2} = \frac{N \ln 2}{3.5 \cdot 10^5 L^{0.5} C} \quad (\text{ecuación 4})$$

lo que indica que el tiempo de hibridación es mínimo empleando sondas de baja complejidad a elevadas concentraciones. Sin embargo, la predicción, a partir de la ecuación, de que sondas largas deberían precisar tiempos cortos de hibridación parece no ser cierta, pues secuencias diana fijadas sobre el soporte sólido pueden ser difícilmente accesibles por sondas grandes (Brahic y Haase, 1978; Cox, 1983).

La tasa de hibridación puede aumentar en solución (Wetmur, 1975) y en hibridaciones sobre DNA fijado a membrana (Wahl et al, 1979) empleando polímeros de dextrano aniónicos como por ejemplo dextrán sulfato 500. En hibridaciones sobre membrana el efecto del dextrán sulfato es más pronunciado para polinucleótidos de tamaño superior a 250 bp y no tiene efecto apreciable sobre oligonucleótidos de 14 bp (Meinkoth y Wahl, 1984). El incremento de la tasa de hibridación es de unas 3 veces para hibridaciones sobre membrana cuando se usan sondas de DNA de cadena sencilla y del orden de 100 veces cuando se trata de sondas de DNA de doble cadena (Wahl et al, 1979).

Dado que la concentración de la sonda es un factor decisivo en la tasa de hibridación es recomendable emplear volúmenes pequeños, por ejemplo hibridando en bolsas de plástico selladas. Esto reduce la cantidad de sonda necesaria y la consiguiente peligrosidad de su manipulación.

La formación de híbridos es un proceso reversible de ahí que sea muy importante ajustar las condiciones de hibridación en torno a las óptimas para todos los factores que influyen a fin de discriminar entre híbridos perfectos e imperfectos. La estabilidad se puede determinar por la temperatura de fusión (T_m). La temperatura de fusión está influida por la fuerza iónica (M , como concentración de Na^+ en mol/l, sabiendo que SSC (1x) es 0.195 M Na^+), composición de bases (% (G+C)), la longitud de la cadena más corta en el dúplex (n) y la concentración de elementos desestabilizadores de la hélice como la formamida (Schildkraut y Lifton, 1965; McConaughy et al, 1969). Se ha establecido la siguiente expresión para cuantificar la influencia de estos factores :

$$T_m = 81.5 \text{ } ^\circ\text{C} + 16.6 \log M + 0.41 (\%(\text{G+C})) - 500/n - 0.7 (\% \text{ formamida}) \quad (\text{ecuación 5})$$

para sondas mayores de 50 bp. Los híbridos de oligonucleótidos (14 - 20 bp) y DNA inmovilizado presentan una estabilidad menor (Wallace, 1983). Se ha descrito una expresión empírica para determinar las condiciones óptimas de hibridación (Wallace et

al., 1979). La temperatura a la que la mitad de esos dúplex cortos disocian (T_d) cuando la hibridación se realiza en las condiciones estándar (por ejemplo 0.9 M NaCl) viene dada por la siguiente expresión :

$$T_d = 4 (G+C) + 2 (A+T) \quad (\text{ecuación 6})$$

donde G, C, A y T indican el número de nucleótidos correspondientes en el oligonucleótido. Una temperatura de 5°C por debajo de T_d se usa para detectar hibridación entre moléculas con homología perfecta (Suggs et al., 1981; Wallace, 1983).

Para híbridos de longitud superior a 150 bp, la T_m del DNA dúplex decrece 1°C por cada 1% de pares de bases desapareadas (Bonner et al., 1973). Para híbridos menores de 20 bp la T_d decrece aproximadamente 5°C por nucleótido desapareado.

El uso de formamida en la solución de hibridación reduce la T_m en 0.7°C por cada 1 % de formamida. Esto permite reducir la temperatura de hibridación con lo que se evitan los problemas causados por la evaporación. Sin embargo, la tasa de hibridación se reduce a la mitad, por lo que los tiempos de hibridación se deben incrementar de 2 a 3 veces.

Así pues, la severidad de la hibridación ("stringency") se debe ajustar fijando la concentración de sal y/o la de formamida y cambiando la temperatura. La severidad puede ajustarse tanto durante la hibridación como durante los lavados. En algunas aplicaciones es conveniente hacer la hibridación con poca severidad y lavar incrementando ésta, analizando los resultados después de cada lavado. Esto permite la detección de secuencias relacionadas y seguir la eficacia de los lavados para eliminar esas secuencias.

A G+C	S S C x 1												
	6	5	4	3	2	1	0.6	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0.01
30	94.9	93.6	92.0	89.9	87.0	82.0	77.0	75.4	73.3	70.4	65.4	60.4	45.8
32	95.7	94.4	92.8	90.7	87.8	82.8	77.8	76.2	74.1	71.2	66.2	61.2	49.6
34	96.5	95.2	93.6	91.5	88.6	83.6	78.6	77.0	75.0	72.0	67.0	62.0	50.4
36	97.3	96.0	94.5	92.4	89.4	84.5	79.5	77.9	75.8	72.9	67.9	62.9	51.3
40	99.0	97.7	96.1	94.0	91.1	86.1	81.1	79.5	77.4	74.5	69.5	64.5	52.1
42	99.9	98.6	96.9	94.9	91.9	86.9	81.9	80.3	78.2	75.3	70.3	65.3	53.7
44	100.7	99.3	97.7	95.6	92.7	87.7	82.7	81.1	79.0	76.1	71.2	66.2	54.6
46	101.5	100.2	98.6	96.5	93.6	88.6	83.6	82.0	79.9	77.0	72.0	67.0	55.4
50	103.1	101.8	100.2	98.1	95.2	90.2	85.2	83.6	81.5	78.6	73.6	68.6	57.0
52	104.0	102.7	101.1	99.0	96.0	91.0	86.0	84.4	82.3	79.4	74.4	69.4	57.8
54	104.8	103.5	101.9	99.8	96.9	91.9	86.9	85.3	83.2	80.3	75.3	70.3	58.7
56	105.6	104.3	102.7	100.6	97.7	92.7	87.7	86.1	84.0	81.1	76.1	71.1	59.5
58	106.4	105.1	103.5	101.5	98.5	93.5	88.5	86.9	84.9	81.9	76.9	71.9	60.3
60	107.2	105.9	104.3	102.2	99.3	94.3	89.3	87.7	85.7	82.7	77.7	72.7	61.1
62	108.1	106.8	105.1	103.1	100.1	95.1	90.1	88.5	86.5	83.5	78.5	73.5	61.9
64	108.9	107.6	106.0	103.9	101.0	96.0	91.0	89.3	87.3	84.4	79.4	74.4	62.8
66	109.7	108.4	106.8	104.7	101.8	96.8	91.8	90.2	88.1	85.2	80.2	75.2	63.6
68	110.5	109.2	107.6	105.5	102.6	97.6	92.6	90.1	89.0	86.0	81.0	76.0	64.4
70	111.3	110.0	108.4	106.3	103.4	98.4	93.4	91.8	89.7	86.8	81.8	76.8	65.2
72	112.2	110.8	109.2	107.2	104.2	99.2	94.2	92.6	90.6	87.6	82.6	77.6	66.0
74	113.0	111.7	110.0	108.0	105.1	100.1	95.1	93.4	91.3	88.4	83.4	78.4	66.9
76	113.8	112.5	110.9	108.8	105.9	100.9	95.9	94.2	92.2	89.3	84.3	79.3	67.7
78	114.6	113.3	111.7	109.6	106.7	101.7	96.7	95.1	93.0	90.1	85.1	80.1	68.5
80	115.4	114.1	112.5	110.4	107.5	102.5	97.5	95.9	93.8	90.9	85.9	80.9	69.3

Tabla 2.7 : Temperaturas de fusión de DNA en función del % (G+C) y de la concentración de sal (1x SSC = 0.195 M Na⁺) según la ecuación 5.

DNA en el filtro	Actividad específica de la sonda (cpm/μgr)	Cantidad de sonda añadida	Tiempo de hibridación
DNA clonado (100 ngr/banda)	1 x 10 ⁷ - 10 ⁸	1 x 10 ⁵ / 1 x 10 ⁶ (0.01 - 0.1 μgr)	3 a 4 horas
DNA eucariota (10 μgr)	1 x 10 ⁸ - 10 ⁹	1 - 5 x 10 ⁷ (0.1 - 0.5 μgr)	12 a 16 horas

Tabla 2.8 : Condiciones generales de hibridación (tomado de Maniatis et al., 1982).

2.10.1 HIBRIDACION DE DNA SOBRE FRAGMENTOS DE RESTRICCION

Como sonda radiactiva se utilizó, siempre DNA marcado por "nick translation" (ap.2.9.1) y sólo ocasionalmente marcado por "random primer" (ap.2.9.2).

PROCEDIMIENTO

1. Colocar los filtros en bolsas de plástico sellables por calor de modo que queden ajustadas por dos lados paralelos. La bolsa en el otro sentido ha de ser más larga que el filtro. Sellar sólo 3 lados.
2. Añadir la solución de prehibridación (nota a).
3. Eliminar las burbujas aplanando la bolsa. Sellar el lado abierto lo más alejado posible del filtro evitando que queden burbujas. Si se va a incubar en un baño es conveniente colocar la bolsa dentro de otra mayor.
4. Incubar más de 2 h (más de 5 h si se trata de una membrana de nylon) en un baño o estufa a la temperatura apropiada con agitación.
5. En un eppendorf poner :
x μ l de sonda radiactiva
(1000 - x) μ l de agua
incubar en agua a 90 - 100°C durante 10 m (nota c,d).
6. Añadirlo inmediatamente sobre la solución de hibridación atemperada a la temperatura de hibridación.
7. Cortar la bolsa donde está el filtro por una esquina. Tirar la solución de prehibridación.
8. Poner la solución de hibridación con la sonda. Aplanar la bolsa evitando las burbujas. Sellar. Verificar que no hay fugas.
9. Incubar una noche (> 12 h) a la temperatura adecuada en baño o estufa con agitación.
10. Para eliminar la sonda cortar la bolsa por una esquina y recoger el líquido sobre un tubo Falcon de 50 ml. Terminar de cortar la bolsa. Sacar el filtro.
11. Sumergir el filtro en solución I de lavado, 20 m a la temperatura de hibridación, con agitación. Hacer 1 cambio. El volumen depende del tamaño del filtro entre 200 y 500 ml.
12. Pasar el filtro a solución II de lavado, 20 m a la temperatura de hibridación, con agitación. Hacer 2 cambios.
13. Dejar secar los filtros al aire sobre papeles de filtro durante 10 a 20 m.
14. Exponer los filtros en una cassette autoradiográfica frente a una película de autoradiografía de 2 h a 3 d (nota b).

DISOLUCIONES

La composición de las disoluciones dependerá de las condiciones de la sonda, composición en bases, etc... A continuación se citan soluciones que se han empleado con

frecuencia.

Disolución de prehibridación

SSC 2x
Denhardt 2x

Disolución de hibridación

SSC 2x
Denhardt 2x
 $1 \times 10^5 - 0.5 \times 10^6$ cpm /ml de sonda

Disoluciones de lavado

	SSC	SDS
Solución I	2x	0.1 %
Solución II	0.1x	0.1 %

OBSERVACIONES

- El volumen de hibridación es grande, de 10 a 15 ml para filtros de 9 x 6 cm, y proporcional para mayores tamaños. El volumen de hibridación ha de ser el menor posible que mantenga la bolsa sumergida para aumentar al máximo la concentración de sonda. Usualmente se empleó como volumen de prehibridación el doble del de hibridación.
- En este tipo de hibridaciones la cantidad de DNA ligada al filtro es muy grande; por ello las exposiciones suelen ser muy cortas, de 1 a 8 h. Por el mismo motivo, no es necesario saturar el filtro con DNA de esperma de salmón con la excepción del que aporta la propia sonda, a excepción de los filtros de nylon que si se han de saturar.
- La actividad específica de la sonda en estas hibridaciones resultó ser de $10^7 - 10^6$ cpm/ μ gr DNA. Se emplearon de 10^5 a 0.5×10^6 cpm /ml de solución de hibridación.
- Conviene manipular con cuidado todas aquellas soluciones que contienen sonda radiactiva. Todo el proceso de manipulación se realiza en el laboratorio de radiactividad y protegido detrás de una pantalla. El material contaminado se debe desechar o, si no es posible, hay que descontaminarlo con una solución de pirofosfato sódico 0.1 M.

2.10.2 HIBRIDACIONES DE DNA SOBRE DNA GENOMICO

Como sonda radiactiva se empleó siempre DNA marcado por "random primer" (ap.2.9.2).

PROCEDIMIENTO

Prehibridación

1. Introducir la membrana de nylon en una bolsa de plástico sellable por calor. Añadir la solución de prehibridación y sellar la bolsa.
2. Incubar de 12 a 24 h a 68°C.

Hibridación

3. Cortar una esquina de la bolsa, retirar la solución de prehibridación y añadir la solución de hibridación.
4. Desnaturalizar la sonda (nota b) calentando 5 min a 100°C, poner rápidamente en hielo.
5. Añadir la sonda a la solución de hibridación. Sellar la bolsa teniendo mucho cuidado de que no queden burbujas.
6. Incubar de 12 a 24 h a 68°C.

Lavados

7. Abrir la bolsa y retirar la solución de hibridación.
8. Lavar los filtros :
 - durante 20 min en 250 ml de solución I de lavado a 68°C, 2 veces.
 - durante 20 min en 250 ml de solución II de lavado a 68°C, 3 veces.
 - durante 20 min en 250 ml de solución III de lavado a 68°C.
9. Si no se va a reutilizar la membrana, dejar secar al aire. Si se va a reutilizar, mantenerla húmeda (nota c).
10. Exponer la membrana dentro de una bolsa de plástico sobre una película autoradiográfica (nota a, d).

Deshibridación

Si el filtro quiere volverse a hibridar con otra sonda es necesario deshibridarlo antes. Para ello se emplea el método descrito en ("Membrane transfer and detection methods" Amersham).

11. Lavar el filtro en 500 ml de solución I de deshibridación, 30 min a 45°C.
12. Lavar el filtro en 500 ml de solución II de deshibridación, 30 min a 45°C. Conservar el filtro húmedo si ha de usarse a lo largo de los dos días siguientes. En caso contrario, secar entre papel de filtro.

DISOLUCIONES

Disolución de prehibridación

SSC 1.5 x
SDS 1.0 %

BLOTTO 0.5 %

DNA de esperma de salmón 0.5 mgr/ml

El DNA de esperma de salmón se debe desnaturalizar justo antes de añadirlo a la solución. Calentar a 100°C durante 5 min y poner rápidamente en hielo.

Disolución de hibridación

Con la misma composición que la solución de hibridación más la sonda radiactiva a una concentración de al menos 10⁶ cpm/ml de solución.

Disoluciones de lavado

	SSC	SDS
Solución I	2x	0.1 %
Solución II	0.1x	0.1 %
Solución III	0.1x	1.0 %

Disolución I de deshibridación

NaOH 0.4 M

Disolución II de deshibridación

Tris-HCl 0.2 M pH 7.5

SSC 0.1 x

SDS 0.1 %

OBSERVACIONES

- En este tipo de hibridaciones el filtro debe exponerse bastante tiempo, siendo este variable según el número de copias que existan en el genoma para el gen con que se esté trabajando. El tiempo oscila entre 2 y 7 días.
- La actividad específica de la sonda en estas hibridaciones resultó ser de 10⁶ - 10⁹ cpm/μgr de DNA. Se emplearon al menos 10⁶ cpm/ml de solución de hibridación.
- Es importante que la membrana no se seque en ninguno de los pasos.

2.10.3 HIBRIDACIONES DE DNA SOBRE COLONIAS

En este tipo de hibridaciones se utilizó como sonda radiactiva DNA marcado por "nick translation".

PROCEDIMIENTO

El procedimiento es idéntico al descrito en el ap.2.10.1. Únicamente cambian los tiempos y las soluciones de prehibridación, hibridación y lavados, debido a las

características del DNA fijado al filtro de nitrocelulosa.

Prehibridación

4 - 6 h a 42 °C

Hibridación

48 h a 42 °C

Lavados

- 1 lavado durante 10 min en SSC 5x SDS 0.1 % a temperatura ambiente.
- 2 lavados durante 20 min en SSC 5 x SDS 0.1 % a 68°C.
- 3 lavados durante 20 min en SSC 0.5 x SDS 0.1 % a 68°C.

DISOLUCIONES

Disolución de prehibridación e hibridación

formamida 50 %
Fosfato sódico 50 mM pH 6.5
SSC 5 x
Denhardt 5 x
SDS 0.1 %
DNA de espermatozoos de salmón 100 µg/ml

OBSERVACIONES

- a. La severidad en este caso es menor que en otro tipo de hibridaciones debido a las características del DNA fijado al papel de nitrocelulosa, ya que es un DNA más sucio y más difícilmente accesible que en los otros casos.
- b. Se incluye formamida en las soluciones de prehibridación e hibridación para evitar al máximo el fondo y aumentar la resolución que en este caso es muy importante.
- c. La actividad específica de la sonda resultó ser de 10^7 cpm/µg DNA y utilizó a una concentración mínima de 10^6 cpm/ml de solución de hibridación.

2.10.4 HIBRIDACIONES DE DNA SOBRE PLACAS DE BACTERIOFAGO

PROCEDIMIENTO

Prehibridación

1. Poner en un cristizador de 9 cm de ϕ la solución de prehibridación.
2. Dejar sumergir los filtros uno a uno, procurando que queden bien empapados.

3. Sellar el cristizador. Envolverlo en plástico. Incubar más de 2 h a 65°C.

Hibridación

4. Desnaturalizar la sonda (nota a) y añadirla sobre la solución de hibridación en un cristizador de 9 cmts de ϕ atemperado a 65°C.
5. Sacar los filtros de la solución de prehibridación y sumergirlos uno a uno en la solución de hibridación. Entre cada uno de ellos queda una fina película de solución.
6. Sellar el cristizador. Envolver en plástico. Incubar a 65°C durante 12 h, con agitación suave.

Lavados

7. Sacar los filtros de la solución de hibridación. Conservar la solución de hibridación a -20°C.
8. Sumergir los filtros en 500 ml de solución I de lavado, a 68°C durante 30 min.
9. Pasar los filtros a 330 ml de solución II de lavado, a 45°C durante 30 min. Hacer 2 cambio.
10. Pasar los filtros a 500 ml de solución III de lavado, a 45°C durante 45 min. Hacer 1 cambio.
11. Dejar secar los filtros de 10 a 20 min entre papel de filtro a temperatura ambiente. Exponer ante película radiográfica (nota b).

DISOLUCIONES

Disolución de prehibridación e hibridación

SSC 6 x

Denhardt 2 x

En la solución de hibridación está además el DNA de esperma de salmón que aporta la sonda.

Disoluciones de lavado

	SSC (x)	Denhardt (x)	SDS (%)
Disolución I	6	2	-
Disolución II	2	-	0.1
Disolución III	0.1	-	0.1

OBSERVACIONES

- a. Se empleó sonda radiactiva a una concentración de 2×10^5 a 1×10^6 cpm/ml de solución.
- b. En el caso de hibridar frente a calvas de bacteriófago lambda-Charon35 el tiempo de exposición en muchos casos fue de 4 días. Frente a otros bacteriófagos como lambda-NM1150 era de 12 h de media.

2.10.5 HIBRIDACION SOBRE FILTROS DE RNA ("NORTHERN")

PROCEDIMIENTO

El procedimiento seguido fue el mismo que se describe en el ap.2.10.1, con diferencias en las condiciones de hibridación y de lavado :

Prehibridación

4 - 6 h a 42°C. Agitación.

Hibridación

36 a 48 h a 42°C con agitación suave. Se realizó con una concentración de sonda de 10^6 cpm/ml de solución de hibridación como mínimo. La actividad específica de la sonda fue de 10^7 a 10^8 cpm/ μ gr de DNA.

Lavados

- 1 lavado a temperatura ambiente en SSC 3 x SDS 0.1 %, 10 min.
- 2 lavados a 68°C en SSC 3 x SDS 0.1 %, 30 min.
- 3 lavados a 68°C en SSC 0.3 x SDS 0.1 %, 20 min.

DISOLUCIONES

Disolución de prehibridación e hibridación

formamida 50 %
SSC 3 x
Denhardt 3 x
DNA de esperma de salmón 100 μ gr/ml

OBSERVACIONES

- a. Se empleó formamida pues estabiliza el híbrido DNA:RNA ante el dúplex DNA:DNA (Casey y Davidson, 1977).

2.11 PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACION

La transformación de E. coli por plásmidos fue demostrada por Cohen et al. (1972) aplicando la observación de Mandel e Higa (1970) de que la combinación de E. coli y bacteriófago lambda en una solución de CaCl_2 a 0°C producía infección (hoy denominado transfección). Se han desarrollado numerosos estudios desde entonces, desarrollándose técnicas de eficiencia muy superior y caracterizando los factores que están implicados en el proceso. E. coli interacciona con el DNA en un medio de cationes divalentes a bajas temperaturas. Una serie de factores tales como un breve tratamiento de la mezcla de células y DNA a elevada temperatura (choque térmico), adición de hexamino (III) cobalto, el tratamiento de las células con solventes y reactivos con grupos sulfhidrilo, así como el crecimiento en medios conteniendo niveles elevados de Mg^{2+} aumentan la eficiencia del proceso desde $1/10^5$ a $1/10^2$ (1 de cada 100 moléculas de plásmido transforma una bacteria).

Un primer factor a tener en cuenta es la cepa de E. coli empleada. La elección vendrá dictada por las necesidades de la experimentación en cuanto a la receptividad al plásmido en cuestión así como la eficiencia medida en la transformación para cada método. En general se empleó la cepa E. coli JM109 F^+ como receptora de los plásmidos de la serie M13 y pUC. Para revisión de las técnicas de transformación ver Hanahan (1985).

2.11.1 METODO DEL CaCl_2

Se trata de una variante del primer método de transformación descrito por Dagert y Ehrlich (1979).

PROCEDIMIENTO

1. Sembrar por agotamiento en placa E. coli JM109 F^+ a partir del glicerinado stock (-70°C) sobre medio mínimo M9 + glucosa. Dejar crecer a 37°C en posición invertida durante 2 días.
2. Inocular con una colonia un tubo de cultivo con 3 ml de medio LB. Incubar 12 h a 37°C con intensa agitación.
3. Inocular con 200 μl un matraz de 250 ml con 50 ml de medio LB. Incubar con agitación intensa hasta una D.O.₆₀₀ de 0.6 (aproximadamente 1×10^6 células /ml).
4. Dejar 10 min en hielo. Pasar el cultivo a tubos de polipropileno de 50 ml (Nalgene 3119-0050).
5. Centrifugar a 3000 g (5000 rpm rotor Beckman JA20) 10 min a 4°C .
6. Eliminar el sobrenadante por decantación. Resuspender suavemente el sedimento bacteriano en 20 ml de solución de CaCl_2 0.1 M frío (0°C).
7. Centrifugar como en 5.

8. Eliminar el sobrenadante por decantación. Resuspender con suavidad el sedimento celular en 500 μ l de solución de CaCl_2 0.1 M frío (0°C).

OBSERVACIONES

- a. Las células se conservan en hielo en la cámara fría pues son muy sensibles a la temperatura. Se pueden emplear a partir de las 6 h de prepararlas, con un máximo de eficiencia a las 24 h. Se llegaron a utilizar hasta 52 h después de preparadas, aunque la eficiencia decae considerablemente.
- b. Las alícuotas para transformar son de 100 μ l y el volumen máximo que admite de DNA es 1/10 (10 μ l).
- c. La eficiencia de transformación de este método oscila entre 1×10^5 y 1×10^6 colonias/ μ gr de DNA para cepas como E. coli HB101. Sin embargo para la cepa E. coli JM109 F⁺ sólo resultó ser de 1×10^4 colonias/ μ gr de DNA.
- d. Las células competentes pueden conservarse, como los stocks de células, a -70°C. Se añade un 20 % de glicerol (0°C) a las 4h de preparadas, se mezclan bien por inversión y se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservan a -70°C hasta su uso. La eficiencia, sin embargo, decrece al menos un orden de magnitud.

2.11.2 METODO DEL RbCl / CaCl₂

Se siguió el protocolo descrito por Hanahan (1983). Se hacen crecer células en presencia de una concentración elevada de Mg^{2+} , y posteriormente se tratan con Mn^+ , Ca^{2+} , Rb^+ , DMSO, DTT y cloruro de hexamino cobalto (III).

PROCEDIMIENTO

1. Partir de una placa de E. coli JM109 F⁺ en medio mínimo M9 + glucosa fresca (no más de 3 semanas). Inocular un tubo de cultivo con 3 ml de medio LB con una colonia. Dejar crecer 12 h a 37°C con vigorosa agitación.
2. Inocular con 200 μ l un matraz de 250 ml con 50 ml de medio LB 10 mM MgCl_2 10 mM MgSO_4 . Crecer a 37°C durante 2 a 3 h hasta que alcance una D.O.₆₀₀ de 0.6.
3. Enfriar el cultivo en hielo durante 20 min. Pasar a tubos de polipropileno de 50 ml (Nalgene 3119-0050).
4. Centrifugar a 1000 g.a.v. (3000 rpm centrífuga MSE) a 4°C 10 min.
5. Eliminar el sobrenadante por decantación.
6. Resuspender el sedimento bacteriano en 15 ml de tampón TFB frío (0°C). Poner 1 ml de tampón y resuspender el sedimento con ayuda de la pipeta Gilson P1000, con suavidad. Posteriormente añadir los 14 ml de tampón TFB restantes. Mantener 15 min en hielo.
7. Centrifugar como en 4.

8. Eliminar el sobrenadante por decantación.
9. Resuspender el sedimento suavemente en 4 ml de tampón TFB frío (0°C).
10. Añadir 150 µl de DMSO. Dejar 5 min en hielo.
11. Añadir 150 µl de solución DTT - acetato potásico. Dejar 10 min en hielo.
12. Añadir 150 µl de DMSO. Dejar 5 min en hielo.

DISOLUCIONES

Medio LB MgCl₂ 10 mM MgSO₄ 10mM

Añadir por cada 50 ml de medio LB estéril 0.5 ml de MgCl₂ 1 M y 0.5 ml de MgSO₄ 1 M ambas soluciones estériles.

Tampón TFE

MES-K 10 mM pH 6.2	20 ml MES-K 0.5 M pH 6.3 / 1
RbCl 100 mM	12.09 gr/l
MnCl ₂ .4 H ₂ O 45 mM	8.9 gr/l
CaCl ₂ .2 H ₂ O 10 mM	1.5 gr/l
cloruro de hexaminocobalto (III) 3 mM	0.8 gr/l

Equilibrar una solución de MES 0.5 M a pH 6.3 empleando KOH 10 N. Esterilizar por filtración a través de nitrocelulosa de ϕ 0.22 µm y almacenar en alícuotas a -20°C. Hacer una solución 10 mM en agua MilliQ. Añadir las sales como sólidos. Filtrar a través de nitrocelulosa de ϕ 0.22 µm. Alicuotar en botellas estériles. Conservar a 4°C. Estable durante más de 1 año.

DMSO

Conviene que sea fresco. Alicuotar en eppendorfs y congelar a -20°C. Una vez descongelada una alícuota desecharla.

Disolución DTT - acetato potásico

DTT 2.25 M
acetato potásico 40 mM pH 6.0

Disolución DnD

DTT 1 M
DMSO 90 %
acetato potásico 10 mM

Se preparan 10 ml disolviendo 1.53 gr de DTT en 9 ml de DMSO. Añadir 100 µl de acetato potásico 1 M pH 7.5. No

es necesario esterilizar por filtración pues todos los componentes son estériles.

OBSERVACIONES

- a. Rendimiento obtenido de 10^7 colonias / μgr DNA. Por su elevada eficiencia se suelen plaquear 10, 50 y 200 μl del volumen final.
- b. Estas células pueden emplearse hasta 6 h después de preparadas. Se emplean alícuotas de 210 μl , con un volumen de DNA menor a 20 μl .
- c. Como protocolo alternativo también descrito por Hanahan (1983, "Simple method") con las diferencias :
 - el cultivo crece en medio LB
 - una vez resuspendido en 4 ml de tampón TFB (paso 9) se procesa :
 - añadir 70 μl disolución DnD. Incubar 10 min en hielo.
 - añadir 70 μl disolución DnD. Incubar 15 min en hielo.A partir de ahí están listas para transformar en alícuotas de 200 μl .

2.11.3 TRANSFORMACION

PROCEDIMIENTO

1. En un tubo eppendorf poner 200 μ l de células competentes y DNA (de 10 a 40 ngr) en un volumen menor a 20 μ l. Incubar 30 min en hielo.
2. Incubar 90 s a 42°C. Choque térmico.
3. Atemperar a temperatura ambiente durante 10 min.
4. Añadir 1 ml de medio LB. Incubar a 37°C durante 1 h.
5. Plaquear diferentes cantidades sobre placas de cultivo selectivas para el plásmido en cuestión.
6. Incubar las placas a 37°C durante 12 a 18 h en posición invertida.

DISOLUCIONES

LB Agar

Agar 1.5 % en medio LB.

15 gr de agar por litro de medio LB. Autoclavar. Atemperar a 50-55°C. Añadir los antibióticos y otros aditivos. Plaquear.

	<u>conc. stock</u>	<u>vol./ litro</u>	<u>conc. medio</u>
ampicilina	25 mgr/ml	4 ml	100 μ gr/ml
tetraciclina	12.5 mgr/ml	1 ml	12.5 μ gr/ml
X-Gal	20 mgr/ml DMF	1600 μ l	32 μ gr/ml
IPTG	20 mgr/ml	400 μ l	8 μ gr/ml

OBSERVACIONES

- a. Si se emplean células competentes preparadas por el método de CaCl_2 el volumen de éstas es de 100 μ l y el máximo de DNA 1/10 de volumen, 10 μ l.
- b. En el caso de que el antibiótico selectivo en el medio sea tetraciclina el tiempo de incubación en medio LB se puede reducir a 45 min. Este período de incubación es necesario para que la resistencia al antibiótico comience a expresarse.
- c. Los medios selectivos empleados fueron :

<u>plásmido</u>	<u>medio</u>
M13	placas LB Agar. Top XGal - IPTG.
pUC	placas LB Agar Ampicilina XGal IPTG
pBR322	placas LB Agar Tetraciclina

- c. En el caso de plásmidos M13 el proceso de transformación es como el descrito entre los pasos 1 a 3, pero varia en los siguientes :

4. mezclar en un tubo de cultivo (2 tubos/ transformación :

- a y b) :
- 25 μ l IPTG
 - 25 μ l XGal
 - 3 ml solución agar blando atemperado a 45°C
 - 100 μ l solución saturada de E. coli JM109F⁺
- en el tubo a : 160 μ l de células competentes transformadas
- en el tubo b : 40 μ l de células competentes transformadas
5. Verter inmediatamente sobre placas LB Agar sobre una bandeja equilibrada. Dejar solidificar el agar.
6. Incubar en posición invertida unas 12 h.
Se puede modificar este protocolo para obtener un crecimiento en menor tiempo (aprox. 6 h) poniendo en el tubo de cultivo (paso 4) :
- 25 μ l IPTG
 - 25 μ l XGal
 - 300 μ l solución saturada de E. coli JM109F⁺
 - 6 ml solución agar blando atemperado a 45°C
- d. Es importante emplear controles en la transformación, como por ejemplo, para determinar la eficiencia transformar con 10 ngr de pUC, y para determinar la viabilidad de las células plaquear una alícuota sobre placa LB Agar.
- e. Es importante no incubar las placas que contienen ampicilina a 37°C durante más de 18 h pues la β -lactamasa excretada al medio por las células transformadas resistentes al antibiótico difunde rápidamente destruyendo la ampicilina en el medio y permitiendo así el rápido crecimiento de colonias satélites sensibles a la ampicilina.
- f. Las células E. coli JM109F⁺ transforman con una eficiencia baja, del orden de 1 a 5 x 10⁵ colonias/ μ gr DNA. Esta eficiencia es suficiente para la mayor parte de los casos (subclonajes).

2.12 CLONAJE EN PLASMIDOS Y BACTERIOFAGOS

Los vectores plasmídicos empleados han sido dos fundamentalmente : M13 y PUC. Para revisión de vectores adecuados para la manipulación de diferentes organismos ver Pouwels et al. (1985).

1. M13

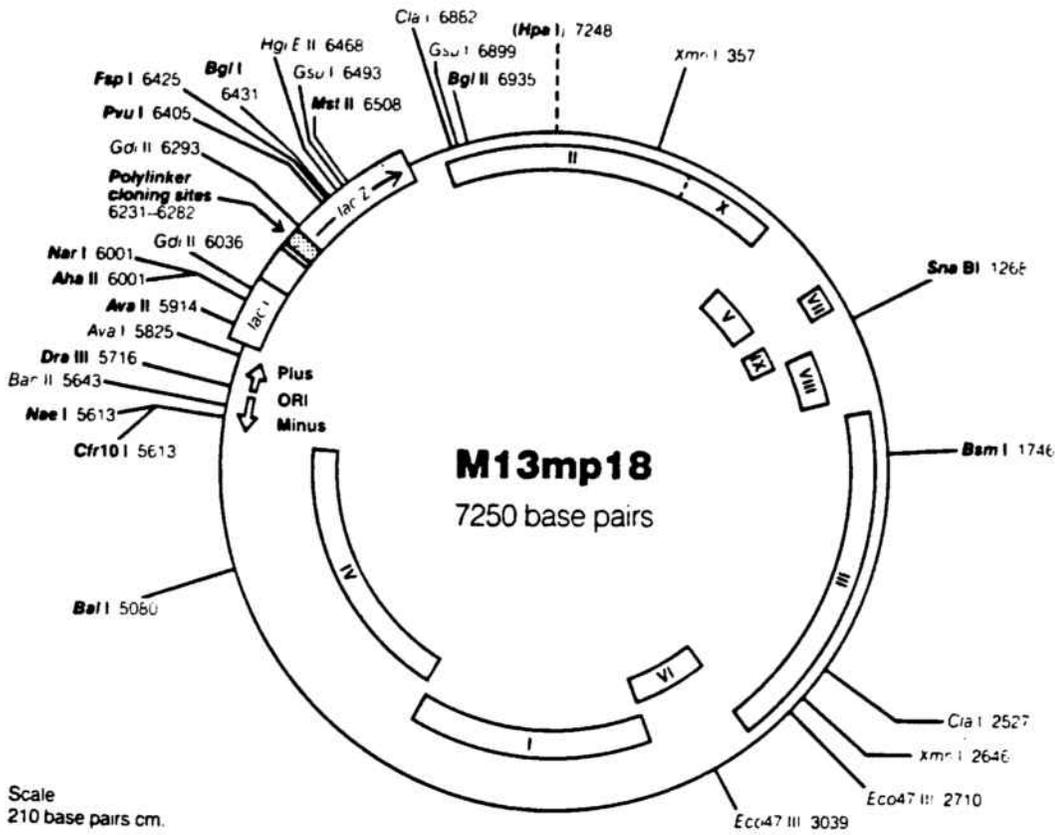
M13 es un bacteriófago específico de células donantes F⁺ de E. coli que contiene un genoma circular de DNA de cadena sencilla de 7235 bp (Denhardt et al., 1978). Los bacteriófagos M13mp son modificaciones del tipo salvaje M13 que permiten un subclonaje sencillo de una amplia variedad de fragmentos de DNA en el vector. Una secuencia "polylinker" (o conjunto de dianas de restricción) se ha introducido en el extremo amino del gen lacZ. El gen lacZ es el gen estructural codificante para el enzima responsable de la metabolización de galactosa (β -galactosidasa). La infección de bacterias deficientes en galactosidasa (gal⁻), como las cepas JM103 ó JM109 con M13, con bacteriófagos sin inserto que rompa la pauta de lectura de lacZ permite que complemente a la célula huésped, convirtiéndola en gal⁺. Esto les permite metabolizar el análogo de galactosa X-Gal a un pigmento azul. Un inserto clonado en la región del "polylinker" interrumpirá el gen lacZ convirtiendo al bacteriófago en gal⁻. De este modo E. coli gal⁻ infectadas no metabolizarán X-Gal. Así pues, placas claras de bacteriófago son características de los recombinantes.

El bacteriófago infecta E. coli a través de los "pili" sexuales, de ahí la necesidad del factor F. La célula huésped, pro⁻, se complementa con el gen proA⁺B⁺ presente en el episoma. La selección se obtiene sobre medio mínimo (por ej. M9) más glucosa. Una vez dentro de la célula el DNA viral de cadena sencilla (cadena +) se copia en una forma replicativa de doble cadena (RF), la cual puede ser aislada de las células como un plásmido y utilizarla como vector de clonaje. Este DNA de doble cadena se replica dentro de la bacteria hasta dar 100 a 200 copias de RF/célula, a partir de las cuales se copia de nuevo la cadena de DNA viral (cadena +). El DNA de cadena sencilla una vez sintetizado se empaqueta dentro de la cubierta proteica dando lugar a partículas maduras que son continuamente secretadas al medio sin provocar la lisis celular sino causando solamente un retardo en el crecimiento que conduce a la formación de calvas turbias sobre el cesped bacteriano. De este modo, el DNA de M13 se puede purificar con facilidad en forma de cadena sencilla a partir de las partículas virales secretadas por células infectadas. El DNA de cadena sencilla contenido en las partículas víricas es homólogo sólo a una de las dos cadenas del DNA clonado, y por ello, puede ser empleado como molde para las reacciones de secuencia del método de Sanger (Sanger et al. 1977;

1980). Se han desarrollado oligonucleótidos que hibridan en la cadena de M13 y que se pueden usar como cebadores en las reacciones de secuencia o para la obtención de sondas por el método de "primer extension" por ejemplo para análisis de protección por nucleasa S1 (Davis et al., 1986).

En teoría M13 admite fragmentos de DNA de longitud elevada pues al tratarse de un bacteriófago filamentoso no tiene restricciones estructurales sobre la longitud del DNA a empaquetar. En la práctica, sin embargo, se ha observado que los fragmentos de más de 2 kbp son difíciles de subclonar y tienden a ser inestables y a perderse con más facilidad durante el crecimiento del bacteriófago (Messing et al., 1981).

Figura 2.6 : Bacteriófago M13mp18. Se indica el mapa físico, características generales del plásmido y la secuencia del "polylinker" (tomado de Pouwels et al., 1985 y catálogo "Stratagene").



Replicon : M13²¹⁶
 Size : 7.2 kb
 Selectable phenotype: M13 plaques
 Genetic markers : *lacZ*⁺
 Cloning sites : *AccI*, *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*II, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sma*I, *Sph*I, *Xba*I
 Special host strains : *lacI*^q strain

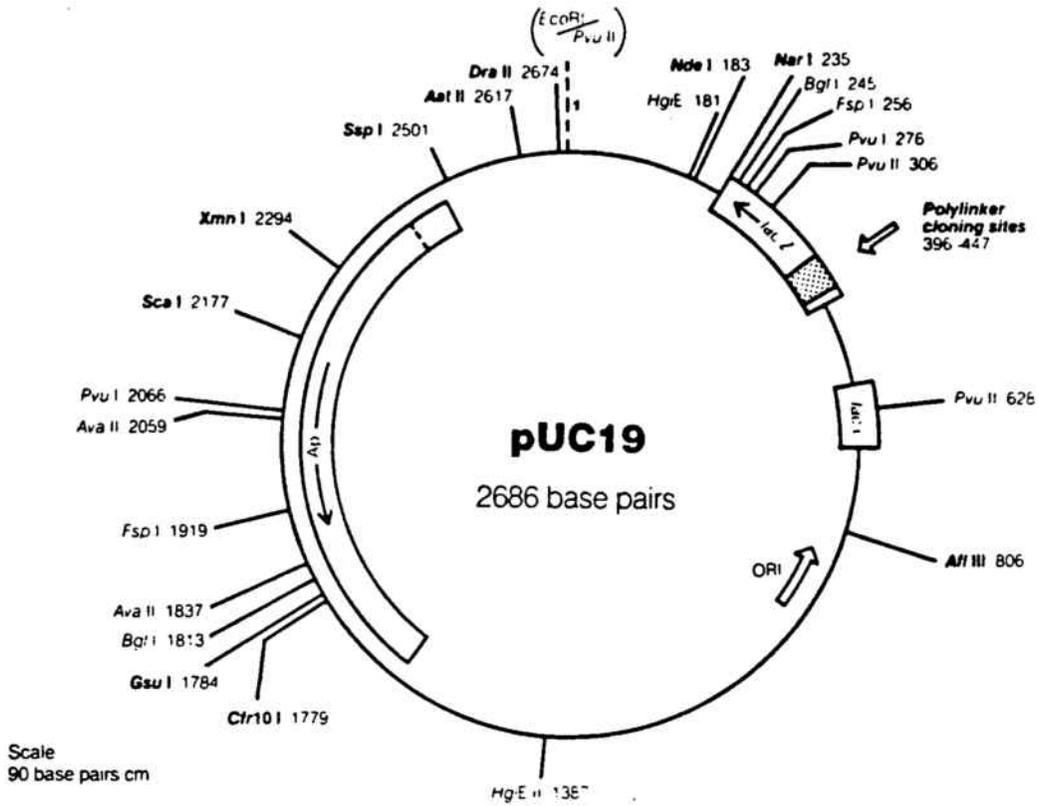
M13mp18 Thr - Met - Ile - Thr - Asn - Ser - Ser - Ser - Val - Pro - Gly - Asp - Pro - Leu - Glu - Ser - Thr - Trp - Arg - His - Ala - Ser - Leu - Ala - Leu - Ala
 ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCG AGC TCG GTA CCC GGG GAT CCT CTA GAG TCG ACC TGC AGG CAT GCA AGC TTG GCA CTG GCC
 1 2 3 4 *Eco*RI *Sac*I *Kpn*I *Sma*I *Bam*HI *Xba*I *Sal*I *Pst*I *Sph*I *Hind*III 7 8
*Acc*I
*Hind*II

M13mp19 Thr - Met - Ile - Thr - Pro - Ser - Leu - His - Ala - Cys - Arg - Ser - Thr - Leu - Glu - Asp - Pro - Arg - Val - Pro - Ser - Ser - Asn - Ser - Leu
 ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG CAT GCC TGC AGG TCG ACT CTA GAG GAT CCC CCG GTA CCG AGC TCG AAT TCA CTG
 1 2 3 4 *Hind*III *Sph*I *Pst*I *Sal*I *Xba*I *Bam*HI *Sma*I *Kpn*I *Sac*I *Eco*RI 7
*Acc*I
*Hind*II

2. pUC

Esta serie de plásmidos posee muchas características de pBR y de M13. Se trata de plásmidos pequeños (2686 bp, para pUC18 y 19) que tienen el gen de resistencia a la ampicilina de pBR322, su origen de replicación y una porción del gen lacZ de E. coli. En el interior del gen lac presenta una secuencia "polylinker" de 54 bp de dianas de reconocimiento únicas idénticas a la existente en el M13mp correspondiente. Los plásmidos pUC crecen hasta un elevado número de copias por célula y pueden ser amplificados con cloramfenicol. Presentan el mismo sistema de selección de recombinantes por inactivación de lac, revelado en medio con X-Gal e IPTG. Como en el caso de M13 se dispone de parejas de plásmidos pUC cuya única diferencia es la orientación del "polylinker".

Figura 2.7 : Plásmido pUC19. Se indica el mapa físico, características generales del plásmido y la secuencia del "polylinker" (tomado de Pouwels et al., 1985 y catálogo "Stratagene").



Replicon	: pMB1 ²	Amplifiable	: yes
Size	: 2.7 kb	Self-transmissible	: no
Selectable phenotype:	Amp ^R	Mobilisation genes:	no
Genetic markers	: <i>lacZ</i> ⁻	Mob site	: yes
Cloning sites for	: (<i>AccI</i>), (<i>Bam</i> HI), (<i>Eco</i> RI), (<i>Hind</i> III), (<i>Pst</i> I), (<i>Sal</i> I)		
gene-inactivation			
Other cloning sites	: not given		

18 Thr - Met - Ile - Thr - Asn - Ser - Ser - Ser - Val - Pro - Gly - Asp - Pro - Leu - Glu - Ser - Thr - Trp - Arg - His - Ala - Ser - Leu - Ala - Leu - Ala
 ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCG AGC TCG GTA CCC GGG GAT CCT CTA GAG TCG ACC TGC AGG CAT GCA AGC TTG GCA CTG GCC
 1 2 3 4 *Eco*RI *Sac*I *Kpn*I *Sma*I *Bam*HI *Xba*I *Sal*I *Pst*I *Sph*I *Hind*III 7 8
*Acc*I
*Hind*II

19 Thr - Met - Ile - Thr - Pro - Ser - Leu - His - Ala - Cys - Arg - Ser - Thr - Leu - Glu - Asp - Pro - Arg - Val - Pro - Ser - Ser - Asn - Ser - Leu
 ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG CAT GCC TGC AGG TCG ACT CTA GAG GAT CCC CCG GTA CCG AGC TCG AAT TCA CTG
 1 2 3 4 *Hind*III *Sph*I *Pst*I *Sal*I *Xba*I *Bam*HI *Sma*I *Kpn*I *Sac*I *Eco*RI 7
*Acc*I
*Hind*II

Diana de clonaje en el plásmido		Fragmentos de restricción compatibles	
Enzima	Diana	Enzima	Diana
AccI	GT/CGAC	HinPI	G/CGC
		HpaII/MspI	C/CGG
		MaeII	A/CGT
		TaqI	T/CGA
		AbaII	GPu/CGPyC
		AsuII	TT/CGAA
		AccI	GT/CGAC
		ClaI	AT/CGAT
		NarI	GG/CGCC
		MboI/Sau3AI	/GATC
		BclI	T/GATCA
		BamHI	G/GATCC
		BglII	A/GATCT
BamHI	G/GATCC	XhoII	Pu/GATCPy
		EcoRI	G/AATTC
EcoRI	G/AATTC	EcoRI star	/AATT
		fragmentos con extremos romos	
HincII	GTC/GAC	HindIII	A/AGCTT
HindIII	A/AGCTT	KpnI	GGTAC/C
KpnI	GGTAC/C	NsiI	ATGCA/T
PstI	CTGCA/G	PstI	CTGCA/G
SacI	GACCT/C	SacI	GAGCT/C
		SalI	G/TCGAC
SalI	G/TCGAC	XhoI	C/TCGAG
		fragmentos con extremos romos	
SmaI	CCC/GGG	NlaIII	CATG/
SphI	GCATG/C	Nsp7524I	PuCATG/Py
		SphI	GCATG/C
IbaI	T/CTAGA	AvrII	C/CTAGG
		NheI	G/CTAGC
		SpeI	A/CTAGA
		XbaI	T/CTAGA
		XmaI	C/CCGGG

Tabla 2.9 : Dianas de restricción únicas en el polylinker de pUC18-19 y M13mp18-19. Dianas compatibles.

2.12.1 PREPARACION DEL VECTOR

PROCEDIMIENTO

1. Cortar el vector con 1 ó 2 enzimas de restricción, aproximadamente 2 μ gr, tal como se describe en los ap.2.4.1 y 2.4.2.
2. Extraer con 1 volumen de fenol cloroformo. Extraer con éter y precipitar con 2.5 volúmenes de etanol.
3. Lavar con etanol al 70% y secar al vacío.
4. Resuspender el DNA en tampón TE pH 7.5 a una concentración de 0.1 μ gr/ μ l si se trata de extremos cohesivos y de 1 μ gr/ μ l si se trata de extremos romos. Conservar a -20°C.

OBSERVACIONES

- a. Es aconsejable, pero no necesario, desfosforilar el vector (ver ap. 2.9.3.1) si se van a subclonar una mezcla de varios fragmentos o si se trata de extremos romos. Si se van a subclonar varios fragmentos a la vez, la eficiencia debe ser buena para poderlos obtener todos. Al desfosforilar el vector la eficiencia aumenta. Si se utilizan enzimas tales como SmaI o HincII que liberan extremos romos es conveniente desfosforilar el vector pues presentan frecuentemente contaminación de exonucleasas que podrían dar lugar a colonias o calvas blancas no recombinantes.

2.12.2 PREPARACION DEL DNA

PROCEDIMIENTO

1. Cortar el DNA con los enzimas de restricción que se desee. Comprobar que la digestión sea completa cargando una alícuota en un minigel (50 a 100 ngr por banda).
2. Puede procederse de dos formas diferentes :
 - 2.a. Cargar la mezcla de digestión en un gel preparativo y purificar el fragmento deseado (ap.2.7) (nota a).
 - 2.b. Extraer con 1 volumen de fenol cloroformo. Extraer con éter. Precipitar con 2 volúmenes de etanol, secar al vacío y resuspender en tampón TE pH 7.5 (nota b).

OBSERVACIONES

- a. El procedimiento 2.a. es más lento, pero es aconsejable cuando en la mezcla de digestión hay muchos fragmentos distintos y, sobre todo, si sólo interesa subclonar uno de ellos. También es recomendable, aunque no haya muchos fragmentos distintos si el fragmento de interés es mayor que el resto, ya que los fragmentos pequeños se subclonan con mucha más eficiencia que los grandes, con lo que se corre el riesgo de no obtener ningún subclón del fragmento que interesa.

- b. El procedimiento 2.b. puede utilizarse cuando los fragmentos resultantes de la digestión son sólo 2 ó 3. También puede hacerse aunque sean muchos los fragmentos, sobre todo si se quieren subclonar todos, pero en este caso es preferible desfosforilar el vector.

2.12.3 LIGACION

La ligación se realizó siempre a una relación molar de 3:1 (fragmento DNA:vector). Las condiciones que se emplearon han fueron :

1. Extremos cohesivos.
Concentración de DNA total : 10 a 20 µgr/ml
Cantidad de enzima : 1 U
Duración de la ligación : 2 a 12 h
2. Extremos romos.
Concentración de DNA total : 100 a 200 µgr/ml
Cantidad de enzima : 10 U
Duración de la ligación : 12 a 24 h

PROCEDIMIENTO

1. Preparar en un tubo de polipropileno :
x µl de vector digerido
y µl de fragmento de DNA
(20 - x - y) µl de agua (nota a)
Incubar 5 min a 65°C.
2. Añadir :
5 µl de tampón de ligación (5x)
1 a 10 U T4 DNA ligasa
3. Incubar en un gradiente de temperatura de 13 a 20°C durante 12 h, en un baño de agua.

DISOLUCIONES

Tampón de ligación (5x)

Se empleó el tampón de ligación suministrado por New England Nuclear, de composición :

Tris-HCl 250 mM pH 7.6
MgCl₂ 50 mM
DTT 100 mM
ATP 5 mM
BSA 250 µgr/ml

Disolución de nucleótidos

5 mM de cada nucleótido en agua. Conservar a -20°C.

OBSERVACIONES

- a. Los volúmenes en que se realiza la ligación pueden ser de 25 μ l como se describe, de 10 o de 5 μ l. Depende esencialmente de la cantidad de DNA de que se dispone y de la concentración a que se debe hacer.
- b. La ligación de extremos romos es mucho menos eficiente que la de extremos cohesivos. No obstante, cualquier fragmento de DNA con extremos romos puede ser insertado en el vector cortado con HincII o SmaI.
- c. Si interesa subclonar un fragmento cuyas dianas no son compatibles con las del "polylinker" pueden generarse extremos romos en este fragmento y subclonarlo en la diana SmaI o HincII del vector. Esto se puede hacer aprovechando las actividades polimerasa 5'-3' del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, en el caso de extremos 5' protuberantes, o la actividad exonucleasa 3'-5' de dicho enzima en el caso de extremos 5' recesivos :
 - digerir el DNA con el enzima de restricción (0.1 a 5 μ gr).
 - comprobar la digestión en un minigel.
 - inactivar el enzima calentando 10 min a 70°C.
 - añadir :
 - a. para extremos 5' recesivos :
 - 5 a 10 U Klenow
 - b. para extremos 5' protuberantes :
 - 1 μ l solución nucleótidos
 - 5 a 10 U Klenow
 - incubar 1 h a temperatura ambiente.
 - extraer con 1 volumen de fenol-cloroformo. Extraer con cloroformo.
 - precipitar con 2 volúmenes de etanol. Secar al vacío y redisolver en tampón TE pH 7.5.

2.12.4 CLONAJE EN EL BACTERIOFAGO LAMBDA

Fundamentalmente, debido a la gran eficiencia de los procedimientos de empaquetamiento 'in vitro' e infección posterior con las partículas víricas reconstituidas el clonaje en vectores fágicos es imprescindible cuando se requiere un elevado número de recombinantes, como es el caso de la preparación de bancos genómicos o genotecas. Asimismo, se debe considerar que existen vectores capaces de admitir insertos desde 0.1 kbp a 25 kbp en el rango de los vectores fágicos, y hasta 50 kbp en el caso de los cósmidos. El elevado tamaño de los insertos reduce considerablemente el número de recombinantes necesarios para la obtención de genotecas representativas.

2.12.4.1 Preparación de los extractos de empaquetamiento

Esta técnica fue desarrollada inicialmente por Becker y Gold (1975) utilizando mezclas de extractos obtenidos de bacterias infectadas con mutantes del bacteriófago lambda. Estos mutantes lo eran en genes necesarios para el ensamblaje de las partículas del bacteriófago. La técnica ha sido modificada en diferentes laboratorios hasta alcanzar eficiencias de 10^7 a 10^5 u.f.p./ μ gr DNA de lambda.

Las estirpes mutantes empleadas del bacteriófago lambda lo son en los productos génicos :

- a. proteína E : componente mayoritario de la cápsida, necesario para la formación de la precápside. Los mutantes en este gen acumulan precursores de la cápside.
- b. proteína D : localizada en la parte exterior de la cápside. Implicada en el proceso de introducción de la molécula de DNA en el interior de la cápside.
- c. proteína A : implicada en la entrada de DNA en la cápside y en el corte específico del concaténmero en la secuencia cos.

Se utilizan extractos complementarios de bacterias infectadas con mutantes A y E o con mutantes D y E. En general los extractos se preparan a partir de lisógenos del bacteriófago lambda con el genotipo apropiado (mutaciones ámbar en los genes A, D y E). Asimismo, portan mutaciones en otros genes importantes en el sistema :

- d. cIts857 : sensibilidad de la molécula represora cI a la temperatura. Así el lisógeno es estable a 32°C y se induce por temperatura a $42-45^{\circ}\text{C}$.
- e. Sam7 : mutación ámbar del gen S, necesario para la lisis de la bacteria permite la acumulación de productos fágicos durante las 2 a 3 h siguientes a la inducción.
- f. b2 / b1007 : delección de la zona b, elimina la secuencia de reconocimiento att del DNA de lambda.
- g. red3 (lambda) / recA (E. coli) : inactivación de los sistemas de recombinación general del bacteriófago y de la célula huésped, minimizando la recombinación entre el DNA de lambda endógeno del extracto y los genomas recombinantes que se han de mezclar con los extractos.

El procedimiento general de obtención de los extractos de empaquetamiento supone obtener un cultivo de la cepa lisogénica, a 32°C hasta aproximadamente la mitad de la fase exponencial. Se inducen las funciones de lisis al incubar a 45°C durante 2 a 3 h, período en el que se acumulan los productos. A continuación se procede a la lisis bacteriana y obtención de los extractos.

Las cepas empleadas fueron E. coli BHB2690 , que proporciona la precápside, y E. coli BHB2688, que proporciona la proteína de

encapsidamiento (Scalenghe et al., 1981; Maniatis et al., 1982).

2.12.4.1.1 Lisado por congelación-descongelación de BHB2688

PROCEDIMIENTO

1. Inocular un matraz de 250 ml con 100 ml de medio LB- Mg con una colonia de E. coli BHB2688. Incubar más de 12 h a 32°C con agitación intensa.
2. Inocular 3 matraces de 2 l con 500 ml de medio LB-Mg, precalentado a 32°C, con 5 ml del cultivo saturado. Incubar a 32°C con agitación vigorosa hasta una D.O.₂₆₀ de 0.3 (2 a 3 h).
3. Inducir el lisógeno sumergiendo los matraces en un baño de agua a 45°C. Agitarlos durante 15 min.
4. Incubar a 39°C durante 3 h con agitación vigorosa.
5. Pasar el cultivo a botellas de polipropileno de 500 ml (Beckman 339997).
6. Centrifugar a 4000 g (9000 rpm rotor Beckman JA10) 10 min a 4°C.
7. Eliminar el sobrenadante. Invertir las botellas 10 min. Secar las paredes.
8. Resuspender las células en 3 ml de solución de sacarosa fría (4°C). En este momento la manipulación es delicada. Las células se resuspenden con ayuda de pipetas de cristal de 1 ml.
9. Repartir en tubos eppendorf alicuotas de 0.6 ml.
10. Añadir 30 µl de solución de lisozima fresca y fría (4°C). Mezclar por inversión. Congelar los tubos en alcohol - nieve carbónica o en nitrógeno líquido.
11. Conservar una noche a -70°C.
12. Descongelar sobre hielo. Añadir en frío (4°C) 30 µl de tampón de empaquetamiento recién preparado (4°C). Debido a la viscosidad de los extractos, es necesario mezclar con ayuda de la pipeta, removiendo.
13. Reunir todos los extractos en una botella policarbonato de 13.5 ml (Beckman 336090).
14. Centrifugar a 80000 g (28000 rpm rotor Beckman 50Ti) 1 h a 4°C.
15. Repartir el sobrenadante en alicuotas de 10 µl en tubos eppendorf enfriados previamente. Congelar inmediatamente en un baño de alcohol - nieve carbónica o en nitrógeno líquido. Conservar a -70°C.

DISOLUCIONES

Medio LB-Mg

MgSO₄ 10 mM en medio LB

Disolución de sacarosa

sacarosa 10 %
Tris-HCl 50 mM pH 8.0

Disolución de lisozima

lisozima 2 mgr/ml
Tris-HCl 250 mM pH 8.0

Tampón de empaquetamiento

Tris-HCl 6 mM pH 8.0
espermidina 50 mM
putrescina 50 mM
MgCl₂ 20 mM
ATP 30 mM
β-mercaptoetanol 30 mM

OBSERVACIONES

a. Es importante verificar la idoneidad de los stocks de las cepas empleadas en la preparación de extractos, especialmente que sean recA⁻ y que sean lisogénicas inducibles por la temperatura.

a.1 Control de recA⁻

- sembrar por agotamiento en estría células en placa LB Agar. Dejar crecer a 32°C. Sembrar de la misma forma E. coli C600 recA⁺.
- picar varias colonias aisladas sobre otra placa y una o dos de la cepa recA⁺, dejar crecer a 32°C.
- hacer 5 réplicas de la placa con papel de filtro estéril (Whatman 1 12.5 cm ø). Conservar la placa original.
- irradiar las placas 1, 2 y 3 con luz UV de onda corta (254 nm) 10, 20 y 40 segundos. Taparlas con papel de aluminio inmediatamente después para que la luz no active el sistema de reparación inducible por ésta. Dejar crecer las placas tapadas a 32°C.

Se espera que las colonias que sean recA⁻ resistan menos la irradiación UV que el control recA⁺.

a.2 Control de lisogenia inducible por temperatura.

- incubar la réplica 4 a 40°C, y la 5 a 32°C. Se espera que las bacterias que porten un lisógeno lisen y no aparezcan en la placa 4, creciendo normalmente colonias del control C600 recA⁺. Todas, lisógenos y control, deben crecer normalmente en la placa 5.

2.12.4.1.2 Lisado por sonicación de BHB2690

PROCEDIMIENTO

Las etapas 1 a 7 son iguales a las del proceso anterior, con el inóculo inicial de E. coli BHB2690.

8. Resuspender las células en 3.6 ml de tampón de sonicación. Pasar la solución a un tubo de plástico transparente.
9. Hacer sonicaciones cortas (10 s), a la máxima potencia, empleando la sonda más fina. Enfriar la muestra en hielo de 20 a 30 s entre sonicaciones. Sonicar hasta que la solución se clarifica y decrece la viscosidad.
10. Pasar el extracto a un tubo Corex de 15 ml y centrifugar a 12000 g (16000 rpm rotor Beckman JA20) 10 min a 4°C para eliminar restos celulares.
11. Añadir al sobrenadante el mismo volumen (3 ml) de tampón de sonicación y 1/6 parte de tampón de empaquetamiento fresco. Congelar en nitrógeno líquido alícuotas de 15 µl en tubos eppendorf preenfriados. Conservar siempre a -70°C.

SOLUCIONES

Tampón de sonicación

20 mM Tris-HCl pH 8.0
1 mM EDTA
5 mM β-mercaptoetanol

OBSERVACIONES

- a. Es fundamental en este proceso la duración de la sonicación. La clarificación de la solución y pérdida de viscosidad no es aparente. La primera vez que se preparan es conveniente tomar alícuotas a diferentes tiempos de sonicación, procesarlas y hacer con ellas empaquetamientos 'in vitro' para cuantificar su eficiencia y así determinar el óptimo de sonicación.

2.12.4.2 Ligación y encapsidamiento 'in vitro' del DNA recombinante

2.12.4.2.1 Ligación

Hay dos parámetros importantes en una reacción de ligación: la relación brazos/inserto potencial y la concentración del DNA de ambos tipos. Los valores óptimos de ambos parámetros se pueden calcular. Necesariamente los cálculos asumen que todas las moléculas del DNA son perfectas y esta condición no suele presentarse en la práctica por lo que es conveniente llevar a cabo reacciones previas para determinar las condiciones óptimas

en la práctica. La eficiencia se determina después del encapsidamiento 'in vitro', momento en el que se puede saber el número de bacteriófagos recombinantes obtenidos. Los recombinantes obtenidos en estas pruebas se conservan, pues el número puede ser suficientemente elevado para formar ya una biblioteca genómica representativa.

El mejor sustrato de encapsidamiento es el concatenámero formado por brazo (izquierdo + inserto + brazo derecho)_n. Para obtener el máximo rendimiento de este concatenámero deben encontrarse en la solución de ligación cantidades equimolares de los extremos internos de los brazos y de los extremos del inserto. Dado que cada brazo contiene un único extremo compatible y que puede unirse a dos extremos del inserto potencial la relación de las moléculas debe ser de 2:1:2 (brazo izquierdo : inserto : brazo derecho). Es decir, una relación molar de 2:1 de los brazos unidos entre sí respecto del inserto potencial. La concentración total de DNA en la solución de ligación debe ser de alrededor de 0.2 µgr/µl, con un volumen típico de 10 µl. Para más detalles Maniatis et al. (1982).

PROCEDIMIENTO

1. En un tubo eppendorf se ponen cantidades de DNA de inserto y de brazos del vector en relación molar 1:2, un total de 2 µgr. Se añade NaCl hasta concentración final de 150 mM y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C).. Dejar a -20°C > 2h. Precipitar.
2. Resuspender el sedimento en 10 µl de agua. Dejar un tiempo a temperatura ambiente para conseguir la resuspensión completa 3-5 h. Guardar a -20°C una alícuota de 1 µl (0.2 µgr) para un control electroforético posterior.
3. Añadir 1 µl de tampón de ligación (10x) y 1 µl T4 DNA ligasa (5 U). Incubar en un baño de agua con un gradiente de temperatura de 12 a 15°C durante 24 h.
4. Tomar una alícuota de 1 µl (0.18 µgr DNA) para control electroforético. Analizar las dos alícuotas en minigel agarosa 0.7 %.
5. Conservar la ligación a -20°C hasta el momento de proceder al encapsidamiento 'in vitro'.

DISOLUCIONES

Tampón de ligación (10x)

Tris-HCl) .66 M pH 7.5
MgCl₂ 50 mM
DTT 50 mM
ATP 50 mM

OBSERVACIONES

- a. Es conveniente en la preparación de los brazos del vector o en la ligación conseguir que los dos brazos estén unidos por los extremos cos de modo covalente. Para ello :
 - precipitar el DNA del vector con etanol
 - resuspender el sedimento en tampón TE pH 8.0 10 mM MgCl₂ a una concentración de 0.2 µgr/µl
 - incubar a 42°C durante 1 h en un baño de agua. Dejar enfriar a temperatura ambiente
 - controlar en minigel agarosa 0.7 % si se han formado concatenámeros
 - proceder a la restricción para separar los brazos y, en su caso, eliminar el "stuffer"
- b. Para comprobar la ligación se comparan las dos alícuotas de DNA conservadas en el proceso en un minigel de agarosa 0.7 %. Una ligación correcta hace desaparecer las bandas correspondientes de DNA vector e inserto apareciendo una o más bandas de peso molecular muy superior.

2.12.4.2.2 Encapsidamiento 'in vitro'

PROCEDIMIENTO

1. Descongelar los extractos de encapsidamiento (BHB2688 y BHB2690) en hielo. El extracto BHB2688 (10 µl) descongela antes que el BHB2690 (15 µl). Añadir el extracto BHB2688 sobre el BHB2690 antes de que se descongele el segundo. Agitar suavemente con la punta de la pipeta.
2. Añadir 1 µl de DNA ligado, en un volumen de 5 µl, sobre la mezcla de los dos extractos. Poner la punta de la pipeta en el fondo del tubo y expulsar el DNA suavemente. Mezclar removiendo sin aspirar.
3. Incubar en baño de agua a 25°C durante 2 h.
4. Añadir 1 ml de tampón lambda dil y 20 µl de cloroformo. Mezclar por inversión.
5. Centrifugar 2 min a temperatura ambiente.
6. Titular el sobrenadante. Hacer un banco de diluciones y plaquear como se describe en ap.2.3.4.1 paso 4 y sig.

OBSERVACIONES

- a. La eficiencia de los extractos de empaquetamiento se determina en una reacción piloto en la que se empaqueta 1 µgr de DNA de lambda cI857 ligado por los extremos cos (ap. 2.12.4.2.1 nota a). Suele ser del orden de 10⁷ u.f.p./µgr DNA, llegando en algunos casos a ser de 10⁶ u.f.p./µgr DNA.
- b. Es conveniente comprobar al menos una vez la inexistencia de DNA de lambda endógeno de los extractos adecuado para el empaquetamiento. Para ello se realiza un empaquetamiento 'in vitro' como el descrito pero sin añadir DNA de lambda. Se

- titula el sobrenadante.
- c. Los extractos de encapsidamiento 'in vitro' muestran un alto grado de selectividad respecto al tamaño del DNA. Recombinantes con un 80 a 90 % del tamaño del DNA de lambda salvaje son encapsidados con una eficiencia 20 a 50 veces menor que éste.
 - d. En la titulación se puede inhibir la infección de las bacterias, aunque esta inhibición sólo es apreciable cuando se vierte en una placa de cultivo de 9 cm ϕ 1/10 del sobrenadante del encapsidamiento.

2.13 METODO DE SECUENCIACION DE SANGER

El método de secuenciación de Sanger (Sanger et al., 1977; 1980) o de terminación de cadena se basa en la capacidad del enzima DNA polimerasa I de sintetizar, en presencia de un DNA molde de cadena sencilla, de un iniciador y de los 4 deoxinucleótidos, una cadena de DNA complementaria al DNA molde, así como en la capacidad de los 2'-3' dideoxinucleótidos de actuar como terminadores de cadena cuando son incorporados en una cadena creciente de DNA por la DNA polimerasa I. Los dideoxinucleótidos carecen del grupo 3' hidroxilo necesario para la formación del siguiente enlace fosfodiéster en la cadena creciente de DNA, y como consecuencia dan lugar a la terminación específica de la cadena de DNA.

En las reacciones de secuencia se incubaba el DNA molde más el cebador con el enzima en presencia de los 4 dNTPs, uno de ellos marcado con un isótopo radiactivo, P^{32} o S^{35} , en posición α (α - P^{32} dATP o α - S^{35} dATP), y cada uno de los dideoxi-NTPs en cuatro incubaciones independientes. En presencia de la mezcla deoxi-dideoxinucleótidos se obtiene una serie de fragmentos marcados, con el extremo 5' común en que se haya incorporado el dideoxinucleótido. Al analizar las cuatro reacciones en paralelo en un gel de secuencia, se obtiene una distribución de bandas que corresponde a la posición de los diferentes dideoxinucleótidos en el DNA sintetizado y, por tanto, a la secuencia del DNA.

Para el molde de cadena sencilla, el DNA que se quiere secuenciar se clona en el bacteriófago M13. El DNA de doble cadena se inserta en una de las dianas de restricción del "polylinker" (ap.2.12.3) de la forma replicativa. Se transforma E. coli con la forma replicativa (ap.2.11.3, nota c) y se purifica el DNA de cadena sencilla a partir del sobrenadante de bacteriófagos (ap.2.13.1).

Como cebador se utiliza un oligonucleótido sintético de 17 nucleótidos de secuencia 5'-dGTAAAACGACGGCCAGT-3', cebador universal complementario a una secuencia de M13 situada a la derecha del "polylinker".

Como precursor radiactivo se empleó tanto αP^{32} dATP (3000 Ci/mmol) como αS^{35} dATP (1000 Ci/mmol).

2.13.1 PREPARACION DEL MOLDE :DNA DE CADENA SENCILLA DE M13

Se parte de una placa de cultivo fresca con calvas de M13 blancas.

PROCEDIMIENTO

1. Inocular en un tubo de cultivo con 3 ml de medio LB con una colonia de E. coli JM109F+. Agitar vigorosamente a 37°C durante más de 12 h.
2. Inocular en un tubo de cultivo con 3 ml de medio LB con 10 µl del cultivo saturado de E. coli JM109F+ y una calva de M13 picada con un tip estéril. Dejar crecer el cultivo con agitación vigorosa 8 h a 37°C.
3. Pasar el cultivo a 2 tubos eppendorf, 1.5 ml a cada uno. Centrifugar 10 min a temperatura ambiente.
4. Pasar 1.2 ml de sobrenadante a un nuevo tubo. Centrifugar 10 min a temperatura ambiente.
5. Pasar 1 ml de sobrenadante a un nuevo tubo.
6. Añadir 300 µl de solución PEG - NaCl. Mezclar con vortex. Dejar 30 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugar 15 min a temperatura ambiente.
8. Eliminar el sobrenadante por aspiración. Eliminar al máximo los restos de líquido. En esta etapa se aprecia un sedimento muy tenue de bacteriófagos.
9. Resuspender el sedimento en 100 µl de solución de RNasa A. Incubar 20 a 30 min a 37°C.
10. Unir las soluciones de los dos tubos correspondientes al mismo cultivo. Volumen de trabajo 200 µl.
11. Añadir 1 volumen de fenol. Agitar 30 s con el vórtex. Dejar 5 min a temperatura ambiente. Agitar 30 s con el vórtex. Centrifugar 5 min a temperatura ambiente.
12. Recuperar el máximo de fase acuosa, superior. Pasar a nuevo tubo. Añadir 1 vol de cloroformo isoamílico. Agitar 30 s con vórtex. Centrifugar 5 min a temperatura ambiente.
13. Recuperar el máximo de la fase acuosa, superior.
14. Añadir 30 µl de acetato sódico 3M y 500 µl de etanol absoluto frío (-20°C).
15. Dejar en frío (más de 2 h a -20°C, 30-45 min a -70°C). Centrifugar 15 min a 4°C.
16. Eliminar al máximo el etanol, con cuidado de no arrastrar el sedimento, inapreciable.
17. Secar en vacío. Resuspender el sedimento en 9 µl de tampón TE pH 7.5. Conservar congelado a -20°C.

DISOLUCIONES

Disolución PEG - NaCl

PEG 6000 20 %
NaCl 2.5 M

20 gr. de PEG 6000 más 14.61 gr de NaCl en 80 ml de agua. Enrasar a 100 ml. Esterilizar por autoclavado.

Disolución de RNAsa

RNAsa A 0.2 µgr/ml
Tris-HCl 10 mM pH 7.5
EDTA 1 mM

10 µl RNAsa A (20 mgr/ml) en 990 µl de tampón TE pH 7.5.

OBSERVACIONES

- a. El sedimento bacteriano de la centrifugación en el paso 3 puede servir para preparar la forma replicativa (ap.2.3.3.2). El resto de sobrenadante no empleado en el paso 4 se emplea como stock del lisado, conservándolo a 4°C, y es estable durante más de tres meses.
- b. Es importante eliminar al máximo todos los restos de PEG pues puede interferir en las reacciones de secuencia.
- c. Cuando las reacciones se hacen empleando como marcaje S³⁵ se necesita mayor cantidad de molde que cuando se emplea P³², por ello procesamos los 3 ml de cultivo y se emplean 8 de los 9 µl de DNA de cadena sencilla obtenidos para hacer las reacciones. El µl restante se usa para comprobar su estado en un minigel de agarosa al 1 %.

2.13.2 REACCIONES DE SECUENCIA

Se describen las reacciones de secuencia en que se emplea ³⁵S-dATP como marcador. El procedimiento se tomó de "Sequencing Manual" Pharmacia.

PROCEDIMIENTO

a. "Annealing"

1. En un tubo eppendorf mezclar :
 - 8 µl DNAs (aprox. 1.5 µl)
 - 1 µl tampón PL-I
 - 1 µl solución cebador
2. Incubar 1 h a 60°C. Sacar del baño, centrifugar brevemente y dejar a temperatura ambiente 15 a 20 min. Se pueden emplear inmediatamente o dejar congeladas a -20°C.

b. Reacciones

3. Marcar cuatro tubos eppendorf A, T, G y C.
4. Añadir sobre hielo a cada uno de ellos 2 µl de la solución correspondiente de deoxi-dideoxinucleótidos fría (es decir al tubo A se le añade la solución A, etc...)
5. Preparar la solución molde + Klenow + marcaje , sobre hielo :
 - 10 µl solución de "annealing"

- 1 μl $\alpha\text{-S}^{35}\text{-dATP}$ (aprox 410 Ci/mmol) (nota a)
1 a 2 U Klenow
6. Añadir 2.5 μl de solución molde + Klenow + marcaje a cada uno de los cuatro tubos. Centrifugar brevemente.
 7. Incubar a 30°C durante 20 min.
 8. Añadir a cada tubo 2 μl de solución Chase. Centrifugar brevemente.
 9. Incubar 15 min a 30°C.
 10. Añadir a cada tubo 3 μl de solución de parada + colorantes. Centrifugar brevemente.
 11. Alicuotar 2 μl por tubo, 2 tubos por cada letra, para las dos cargas del gel de secuencia. Conservar congelado a -20°C.

DISOLUCIONES

Tampón PL-I

Tris-HCl 100 mM pH 7.5
MgCl₂ 100 mM
DTT 50 mM

Conviene que sea fresco. Se prepara 1 ml con 100 μl Tris-HCl 1M pH 7.5, 100 μl MgCl₂ 1 M, 50 μl DTT 1M con 750 μl de agua. Se hacen alicuotas de 100 μl que se conservan a -20°C.

Disolución de cebador

2.5 ngr/ μl cebador M13 17 MER Biolabs (#1211)

Disoluciones stock de dideoxinucleótidos

ddNTP 10 mM

Se ha empleado el kit de dideoxis de Pharmacia, preparados a una concentración de 10 mM. Se conservan en alicuotas de 25 μl a -70°C.

Disoluciones de deoxi-dideoxinucleótidos

Las concentraciones y relaciones empleadas se han ido variando en función de la secuencia a determinar. Las que se indican a continuación han sido las más frecuentes :

Disolución A Disolución T Disolución G Disolución C

ddATP	13 μ M	-	-	-
ddTTP	-	175 μ M	-	-
ddGTP	-	-	45 μ M	-
ddCTP	-	-	-	25 μ M
dATP	-	-	-	-
dTTP	62.5 μ M	4.1 μ M	82 μ M	82 μ M
dGTP	62.5 μ M	82 μ M	4.1 μ M	82 μ M
dCTP	62.5 μ M	82 μ M	82 μ M	4.1 μ M
MgCl ₂	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
Tris-HCl 7.5	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
DTT	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM

Se parte de las soluciones :

ddA 1 mM : 2 μ l ddA 10 mM + 18 μ l agua estéril

ddT 10 mM

ddG 1 mM : 2 μ l ddG 10 mM + 18 μ l agua estéril

ddC 1 mM : 2 μ l ddC 10 mM + 18 μ l agua estéril

conservadas a -70°C.

dA, dT, dG, dC 0.5 mM cada una, conservadas a -20°C

y se preparan en el momento :

dT 0.1 mM : 2 μ l dT 0.5 mM + 8 μ l agua estéril

dG 0.1 mM : 2 μ l dG 0.5 mM + 8 μ l agua estéril

dC 0.1 mM : 2 μ l dC 0.5 mM + 8 μ l agua estéril

y también las disoluciones según la tabla :

Disolución A Disolución T Disolución G Disolución C

ddA (1 mM)	1.3 μ l	-	-	-
ddT (10 mM)	-	1.65 μ l	-	-
ddG (1 mM)	-	-	4.5 μ l	-
ddC (1 mM)	-	-	-	2.5 μ l
dA (0.5 mM)	-	-	-	-
dT (0.5 mM)	12.5 μ l	-	16.4 μ l	16.4 μ l
dG (0.5 mM)	12.5 μ l	16.4 μ l	-	16.4 μ l
dC (0.5 mM)	12.5 μ l	16.4 μ l	16.4 μ l	-
dT (0.1 mM)	-	4.1 μ l	-	-
dG (0.1 mM)	-	-	4.1 μ l	-
dC (0.1 mM)	-	-	-	4.1 μ l
MgCl ₂ 1 M	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Tris 1 M 7.5	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
DTT 0.1 M	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
agua estéril	54.9 μ l	58.4 μ l	55.5 μ l	57.6 μ l
vol total	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l

Se preparan volúmenes pequeños (100 μ l) y se alicuotan (25 a 50 μ l). Conservar a -20°C. Conviene no emplearlos más de seis semanas seguidas, especialmente si se



descongelan con frecuencia.

Disolución "Chase"

0.5 mM de cada dNTP (dA, dT, dG y dC) +
Tris-HCl 10 mM pH 7.5

Disolución de parada + colorante

Disolver en 1 ml de formamida desionizada 1 mg xilencianol,
1 mgr azul de bromofenol y 20 μ l EDTA 0.5 M pH 8.5.

OBSERVACIONES

- a. La radiactividad empleada en las reacciones de marcaje fue en forma de α -S³⁵ dATP, que puede adquirirse con tres actividades específicas diferentes (Amersham). Se empleó preferentemente la primera citada, pero también ocasionalmente las otras en las cantidades que se citan :
 - SJ 264 Amersham 410 Ci/mmol, 1 μ l/reacción
 - SJ 304 Amersham 650 Ci/mmol, 1.5 μ l/reacción
 - SJ 1304 Amersham >1000 Ci/mmol, 3 μ l/reacción
- b. Se empleó como polimerasa Klenow indistintamente las suministradas por Boehringer o Biolabs, ambas de aproximadamente una actividad de 5 U/ μ l.
- c. Las reacciones se conservaron a -20°C por un periodo de 1 semana sin que en los geles se apreciara degradación radioquímica significativa.

3. RESULTADOS

3.1 BUSQUEDA DE CLONES GENOMICOS HOMOLOGOS A LAS DISTINTAS SONDAS DISPONIBLES

Como se ha citado en la Introducción en el laboratorio se disponía de una colección de clones cDNA codificantes para las distintas familias descritas hasta el momento (Messing et al. 1983) cedidos por el Dr. B. Burr así como los clones pME119 (glutelinas-2 28 kDa) y pME117 (zeínas-II 16 kDa) obtenidos en el laboratorio por S. Prat y J. Cortadas (Prat et al, 1985; Prat, 1986). Estos clones cDNA eran, según Messing (Messing et al, 1983), clones de referencia en la clasificación de los genes conocidos de proteínas de reserva del maíz (ver Tabla 1.7). Las características de estos clones se resumen en la tabla 3.1.

nombre	plásmido	sistema clonaje	longitud inserto	recup. diana	referencia
A20	pMB9 EcoRI	colas A-T	921 pb	no	Park et al, 80
A30	pMB9 EcoRI	colas A-T	794 pb	no	Park et al, 80
B49	pMB9 EcoRI	colas A-T	467 pb	no	Park et al, 80
B59	pMB9 EcoRI	colas A-T	800 pb	no	Burr et al, 82
B36	pMB9 EcoRI	colas A-T	310 pb	no	Burr et al, 82
pME117	pBB322 PstI	colas G-C	670 pb	si (PstI)	Prat, 1986
pME119	pBB322 PstI	colas G-C	870 pb	si (PstI)	Prat et al, 85

Tabla 3.1 : Características de los plásmidos empleados como sondas en la búsqueda de clones genómicos

El inserto de los clones A20, A30, B49, B59 y B36 no se puede aislar íntegro pues el método de clonaje empleado no permite recuperar la diana de restricción donde se inserta. Los insertos de los clones pME117 y pME119 se pueden aislar empleando el enzima PstI pero troceados pues contiene diversas dianas para este enzima. Por esto en todos los casos se decidió emplear el plásmido linealizado como sonda en los experimentos de búsqueda de clones genómicos.

Para poder localizar una secuencia de copia única en una genoteca de DNA de maíz de las características anteriormente

descritas es necesario probar un número de recombinantes de alrededor de 1.10^6 . Las dificultades de manipulación de un número de filtros tan elevado, con varias sondas simultáneamente, nos hicieron plantear la búsqueda a partir de un número menor de clones inicialmente. Se realizaron un total de 5 búsquedas con un total de 1.3×10^6 recombinantes analizados.

3.1.1 PRIMERA BUSQUEDA : 200000 U.F.P. (0.5 X GENOMA)

Esta primera búsqueda se planteó con la finalidad de aislar clones genómicos homólogos a todas las sondas disponibles (7, Tabla 3.2). Para ello se sembró la genoteca en placas de LB-Agar 1.5 % de 9 cm \varnothing con agarosa blanda a una densidad de aproximadamente 10000 u.f.p./placa, sobre la cepa 555 recA⁻ de E. coli. Después de crecer las placas durante unas 12 h a 37°C se enfrían a 4°C para endurecer la agarosa y se obtienen réplicas en filtros de nitrocelulosa de 85 mm \varnothing (ver ap. 2.8.5). De cada placa se obtuvieron dos réplicas (A y B).

El procedimiento de búsqueda se describe en la figura 3.1. Cada uno de los juegos de réplicas se hibridó (ver ap. 2.10.4) con una serie de sondas en procesos seguidos de hibridación, lavado y exposición autoradiográfica. El primer juego de filtros se hibridó con las sondas pME117 y A20. Después de deshibridar se hibridó con las sondas A30 y B36. El segundo juego de filtros se hibridó con las sondas pME119 y B49 y, después de deshibridar, con la sonda B59. Debido a la fragilidad de los filtros, se decidió no deshibridar más que en una ocasión a lo largo de todo el proceso. Después de cada ciclo de exposición autorradiográfica se aislaban las señales positivas de las placas de cultivo. Así sólo se contabilizaban como positivas para una sonda determinada aquellas señales positivas nuevas que aparecían en cada ciclo.

Todo proceso de aislamiento de clones genómicos a partir de

una genoteca en bacteriófago requiere someter al aislado positivo a una serie de ciclos de siembra-réplica-hibridación hasta asegurar que la totalidad de u.f.p. presentes es positiva a la sonda empleada. Este procedimiento se ilustra en la figura 3.1 Después de aislar la señal positiva se eluye el bacteriófago en tampón lambda-dil (500 μ l), durante 2 h a 4°C. Se siembra cada uno de los clones aislados a una densidad de 500 a 1000 u.f.p./placa. Después de crecer durante unas 12 h a 37°C se obtiene una réplica en nitrocelulosa, que se hibrida con la sonda empleada en su aislamiento. Se exponen los filtros frente a una película autorradiográfica. De aquellas placas que presenten señales positivas se aíslan dos de ellas, que se eluyen de la misma forma. Seguidamente, se siembran a una densidad menor, de 100 a 500 u.f.p./placa, de modo que queden bien aisladas. Se obtiene una nueva réplica en nitrocelulosa, y se vuelve a hibridar con la sonda. Después de exposición autorradiográfica debe comprobarse que la totalidad de las calvas de lisis de bacteriófago en la placa de cultivo presentan señal positiva. Se aíslan dos de ellas y se eluyen en tampón 'lambda dil' (ap. 2.3.4.1) (500 μ l).

3.1.1.1 Búsqueda

Las sondas se prepararon por marcaje radiactivo con $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP por la técnica de 'nick - translation' (ver ap. 2.9.1) a partir de los plásmidos linealizados. Se obtuvieron sondas con una actividad específica de aproximadamente 200000 cpm/ μ gr DNA.

Las hibridaciones se realizaron en condiciones relajadas (ver ap. 2.10.4), con una concentración de sonda de 200000 cpm/ml de solución de hibridación por término medio. La duración de la hibridación fue en todos los casos de 12 a 15 h, a 68°C. Los lavados a que se sometieron los filtros se describen en el ap. 2.10.4. Los filtros, secos, se expusieron frente a película autorradiográfica en dos períodos, de 12 h y de 4 d. Las señales

positivas se aislaban mediante pipetas Pasteur, y se eluían en 500 ml de tampón 'lambda dil' (ap. 2.3.4.1) (ver ap. 2.3.4.1).

Después de la primera serie de hibridaciones se observó que la presencia de DNA de esperma de salmón desnaturalizado en la solución de hibridación a concentraciones de 250 µgr/ml reducía la intensidad de las señales positivas. En estos casos clones positivos presentaban señales ténues en su mayoría incluso en exposiciones de 4 d con pantallas amplificadoras. Por ello se decidió reducir la concentración de DNA de esperma de salmón desnaturalizado en la solución de hibridación a 1-5 µgr/ml, aportado por la solución de sonda.

De las 248 (#1 a #248) señales positivas aisladas en el primer ciclo de purificación se mantuvieron como positivas después de tres ciclos un total de 31, que se distribuían como se recoge en la tabla 3.2.

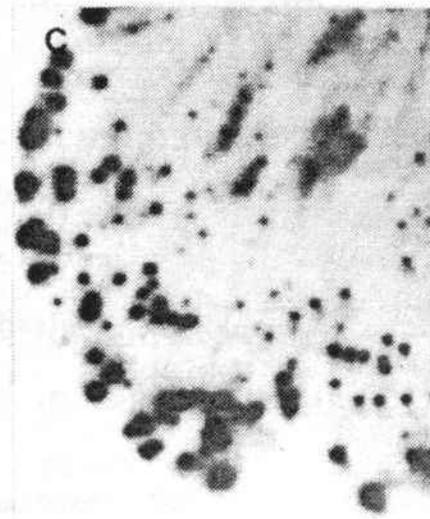
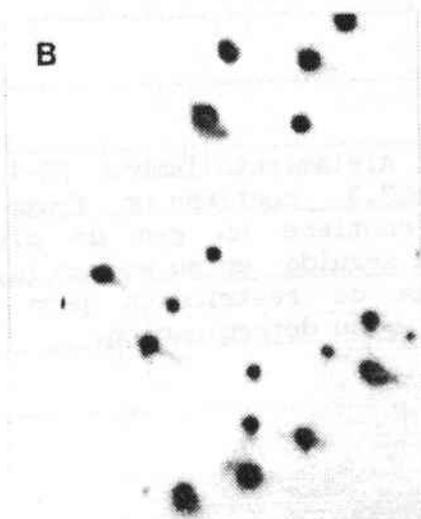
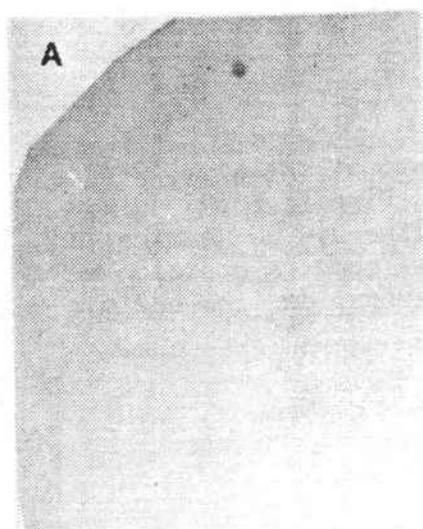
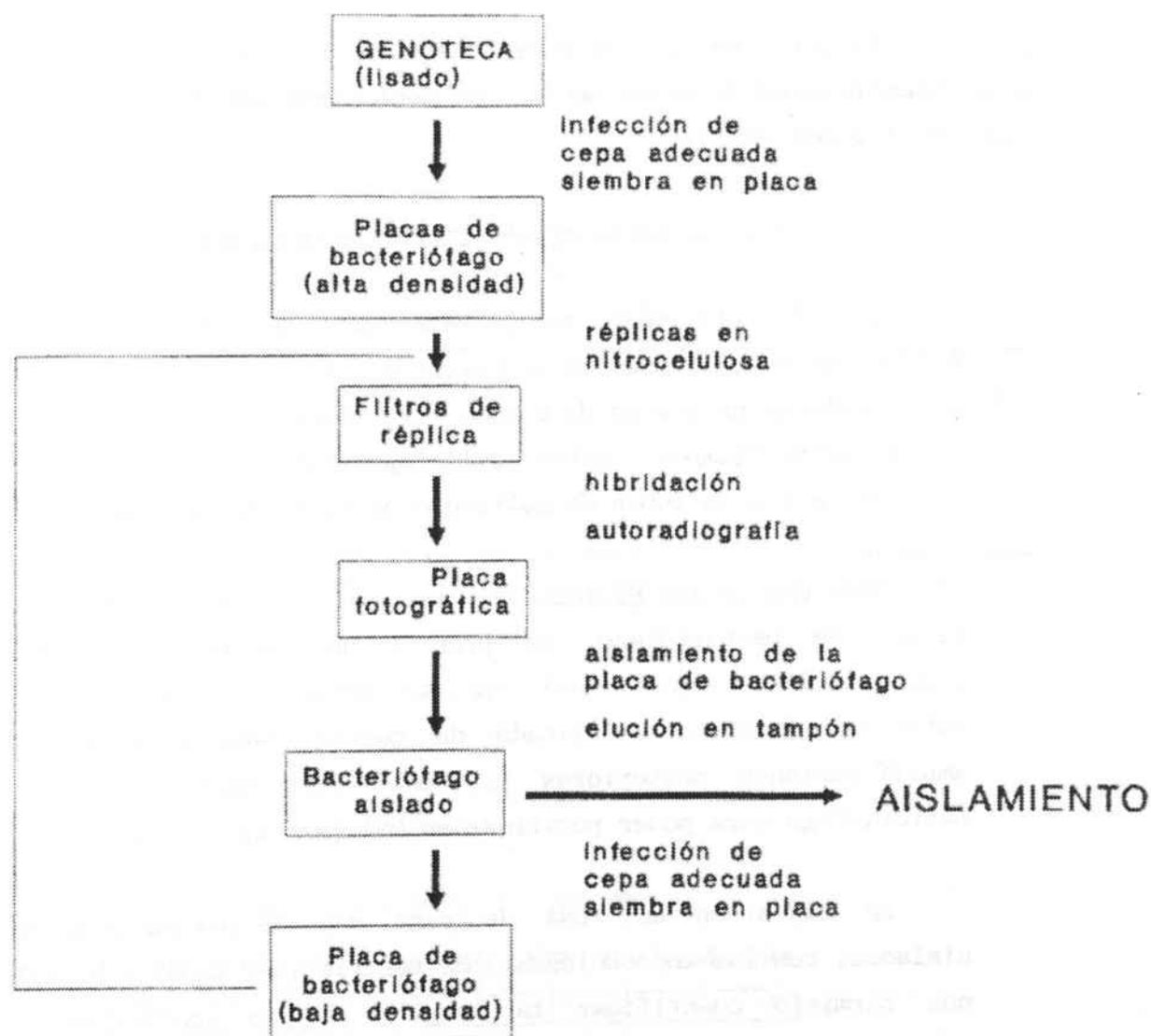
sonda	numero de positivos	aislamientos
pMB119	2	#3, #6
pMB117	0	
A20	15	#13, #15, #19, #28, #31, #32, #33, #41, #45, #46, #47, #49, #50, #53, #56
B49	3	#60, #61, #62
B59	3	#185, #187, #200
A30	5	#204, #205, #206, #207, #208
B36	3	#218, #223, #225

Tabla 3.2 : Aislamientos en la primera búsqueda.

Figura 3.1 : Esquema del procedimiento de aislamiento de clones genómicos de una genoteca empleando una sonda homóloga.

- A : señal primaria, densidad de 10000 u.f.p./placa
- B : señal secundaria, densidad 500 - 1000 u.f.p./placa
- C : señal definitiva, densidad 50 - 100 u.f.p./placa

ESQUEMA DE AISLAMIENTO DE CLONES GENOMICOS



Después de la primera búsqueda se dispuso de clones genómicos positivos a todas las sondas empleadas, con excepción de la sonda pME117.

3.1.1.2 Caracterización de los aislamientos

Con la finalidad de preparar DNA de cada uno de los aislamientos realizados se sembraron a lisis confluyente (> 10000 u.f.p./placa) en placas de 9 cm ø. Los bacteriófagos se eluyeron con 5 ml de tampón 'lambda dil' (ap. 2.3.4.1). Este eluido se conservó a 4°C en tubos de cultivo como stock del aislamiento.

Cada uno de los eluidos se tituló (ap. 2.3.4.1). Conocido el título de bacteriófago, se preparó un crecimiento en medio líquido (15 ml) a partir del cual se obtuvieron, por una parte suficiente volumen de lisado de bacteriófago para stock y amplificaciones posteriores y, por otra parte, suficiente bacteriófago para poder purificar su DNA (ver ap. 2.3.4).

La digestión del DNA de cada uno de los bacteriófagos aislados, con las endonucleasas de restricción EcoRI y HindIII, nos permitió cuantificar la longitud de los insertos con una media de 12.7 kbp.

Figura 3.2 : Aislamiento lambda ZG-1 (Boronat et al., 1986). Plásmido p22.3, contiene un fragmento HindIII-EcoRI de 1.9 kbp que contiene un gen de glutelina-2. Se indica la estrategia seguida en su secuencia, así como la posición de las dianas de restricción para algunos de los enzimas empleados en su determinación.

En el laboratorio, simultáneamente a este experimento de búsqueda se estaba caracterizando un fragmento de DNA genómico (plásmido p22.3, Boronat et al., 1986; ver figura 3.2) que contenía un gen de glutelina-2. De este estudio se desprendía que sólo se disponía de unos 500 pb de la zona flanqueante a 5' de este gen. Para un estudio de los posibles elementos de regulación a 5' era importante disponer de un fragmento mayor de esta zona. Por ello, nos dispusimos a caracterizar primordialmente los clones positivos a la sonda pME119.

3.1.1.3 Caracterización aislamientos #3 y #6

Los clones #3 y #6 se aislaron como positivas a la sonda pME119 con una señal intensa. Sin embargo, en el segundo juego de réplicas se apreciaron señales más ténues en la zona de estos dos aislamientos para la sonda pME117. Este resultado se entiende cuando se comparan la homología entre estos dos clones cDNA. Esta secuencia se resolvió, por S. Prat (Prat, 1986), casi contemporáneamente a este proceso de búsqueda. Se observa que en la zona de homología, de 670 pb, ésta es del 80 %. En las condiciones de hibridación que se emplean es difícil diferenciar entre secuencias con una homología tan elevada. El cambio de las condiciones de severidad en las hibridaciones o en los lavados no es aconsejable debido a la muy escasa cantidad de DNA del bacteriófago en cada una de las calvas de lisis de la placa. Esto es aún más remarcable en el caso de los vectores que crecen sobre cepas recA⁻, donde el rendimiento es muy bajo.

Se preparó DNA de los aislamientos por doble ultracentrifugación en cojines de cloruro de cesio (ver ap. 2.3.4.2). El rendimiento, bajo en ambos casos (aproximadamente 400-500 µgr), fue superior para el bacteriófago #6. El DNA obtenido permitió realizar digestiones con diversos enzimas de restricción (EcoRI, HindIII y BamHI) y comparar los productos de

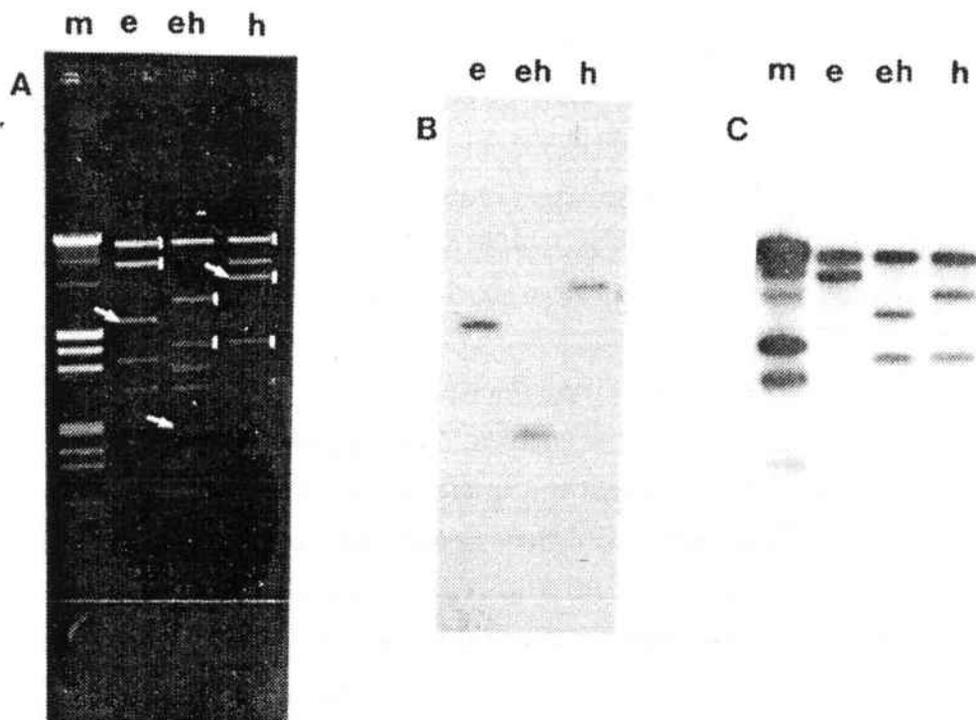


Figura 3.3 : Aislamiento #6 (pME119 +)

A : Gel de agarosa (0.8%) de los productos de restricción:
m : lambda CI857 HindIII + EcoRI
e : DNA aislamiento #6 EcoRI
eh : DNA aislamiento #6 EcoRI + HindIII
h : DNA aislamiento #6 HindIII

B : Autoradiografía del filtro después de hibridar con la sonda pME119 marcada por 'nick translation'. Las bandas que presentan señal se representan en l con una flecha.

C : Autoradiografía del filtro después de hibridar con la sonda lambda Charon-35 marcada por 'nick-translation'. Las bandas que presentan señal se representan en l con una línea.

digestión. El inserto, de 17 kbp, era en los dos aislamientos el mismo.

Analizando los productos de digestión para los enzimas EcoRI, HindIII y EcoRI+HindIII del aislamiento #6 se observaron una serie de anomalías (ver figura 3.3) :

1. En la digestión EcoRI el fragmento de mayor movilidad electroforética, correspondiente al brazo izquierdo del vector lambda Charon-35 (19471 bp) tiene el tamaño esperado, pero el fragmento siguiente, correspondiente al brazo derecho del vector (10615 bp) tiene un tamaño aparente superior, entre 11.5 y 12.5 kbp.
2. La doble digestión EcoRI-HindIII muestra que la banda de peso molecular aparente de 7.0 kbp es completamente anómala, pues cabría esperar una banda de 10.5 kbp en su lugar, correspondiente al brazo menor del bacteriófago.

Con la finalidad de resolver :

- a. qué fragmentos de restricción eran responsables de la señal positiva a la sonda pME119, y
- b. qué fragmentos de restricción correspondían al vector

se transfirió el gel de la figura 3.3.a a nitrocelulosa (ver ap. 2.8.1.2) y se hibridó con la sonda pME119 marcada por 'nick translation' a una concentración de 400000 cpm/ml de solución de hibridación en condiciones estándar (ap. 2.10.1). El resultado de la exposición autoradiográfica se muestra en la figura 3.3.b. Una vez deshibridado el filtro y comprobado, se rehibridó con la sonda lambda Charon-35 marcada por "nick-translation", en condiciones similares a las anteriores. El resultado de la exposición autoradiográfica del filtro se muestra en la figura

212 resultados

3.2.c.

Los fragmentos de restricción positivos a la sonda pME119 son una banda de 6.0 kbp EcoRI-EcoRI, de 1.9 kbp EcoRI-HindIII y de 9.0 kbp HindIII-HindIII. A la sonda lambda Charon-35 se revelan positivas las bandas de 20 y 12 kbp EcoRI, de 20, 7.0 y 4.5 kbp EcoRI-HindIII y de 20, 9.0 y 4.5 kbp HindIII. Estos resultados, inesperados según el mapa físico descrito del vector (figura 2.2) (Loenen y Blattner, 1983) nos hicieron pensar que estos aislamientos presentaban indicios claros de recombinación que afectaba al brazo derecho de éste. Hay que resaltar que esta anomalía en el tamaño de los brazos del vector no se observó en ningún otro de los aislamientos estudiados.

De esta primera búsqueda se dispuso de clones genómicos para las sondas A20, A30, B36, B49 y B59. Los clones aislados para la sonda pME119 presentaban claros indicios de recombinación, y no se encontraron señales positivas a la sonda pME117. Por ello, se procedió a realizar nuevos procesos de búsqueda, ahora sólo para las sondas pME119 y pME117.

3.1.2 SEGUNDA BUSQUEDA : 470000 CLONES (1.2 X GENOMA)

Este segundo proceso de búsqueda se realizó simultáneamente a la caracterización de los aislamientos positivos, especialmente del #3 y #6. Por ello, sólo se realizó para la sonda pME117.

Se plaquearon 470000 u.f.p. en placas de 9 cm ϕ como se ha descrito anteriormente. De cada placa se preparó sólo una réplica, que se hibridó con la sonda pME117. Después de 4 días de exposición autoradiográfica de los filtros se aislaron 10 señales positivas ténues. Estas señales desaparecen en las siguientes rondas de purificación.

3.1.3 TERCERA BUSQUEDA : 360000 CLONES (0.9 X GENOMA)

3.1.3.1 Búsqueda

Este tercer proceso de búsqueda se realizó a partir de 36 placas, en las que se sembró la genoteca, y de las que se obtuvo una réplica en filtros de nitrocelulosa.

En un primer paso se hibridaron las réplicas con la sonda pME119, en las condiciones anteriormente descritas. Después de exposición autoradiográfica se localizaron 44 señales positivas (#261 a #304), de diferentes intensidades que, después de tres ciclos de purificación quedaron reducidas a 27. Se trata de los aislamientos : #261, #262, #264, #266, #267, #268, #269, #270, #271, #272, #273, #278, #280, #281, #282, #283, #284, #285, #286, #287, #289, #290, #291, #292, #302, #303 y #304.

Después de deshibridar los filtros de réplica, se hibridaron con la sonda pME117. Una exposición autoradiográfica de 4 días no permitió apreciar señales positivas que no coincidieran con los aislamientos #261 a #304. En todos los casos la señal era más tenue.

3.1.3.2 Caracterización aislamientos #261 a #304

De todos los aislamientos se obtuvo a partir de una placa a lisis confluyente un eluido en tampón 'lambda dil' (ap. 2.3.4.1) que se conservó como stock. A partir de éste, titulado, se preparó un crecimiento del bacteriófago en medio líquido del que se aisló DNA del bacteriófago. Una primera caracterización se realizó a partir de este DNA por restricción con los enzimas EcoRI y HindIII. El hecho de que el vector de clonaje crezca sobre cepas recA⁻ debe reducir las posibilidades de recombinación, pero asimismo reduce, y mucho, los rendimientos de purificación de DNA del bacteriófago, pues crece con dificultad.

214 resultados

Por ello, para obtener DNA suficiente para establecer un mapa físico del inserto y poder, de ser necesario, purificar alguna banda para el subclonaje, fue necesario crecer cada uno de los aislamientos en 1 litro de medio, y purificar el bacteriófago por doble ultracentrifugación a través de cojines de cloruro de cesio (ver ap. 2.3.4.2).

A partir de 1 litro de cultivo del bacteriófago se obtuvieron entre 200 y 600 μ gr de DNA del bacteriófago. Este rendimiento es escaso pero sin embargo suficiente para poder hacer las digestiones necesarias con enzimas de restricción para establecer mapas físicos del inserto.

Se emplearon cuatro enzimas de restricción : BamHI, EcoRI, HindIII y KpnI. Para poder determinar con precisión tanto los fragmentos grandes (superiores a 4 kbp) como los pequeños (entre 300 y 1500 pb) se analizaron siempre los productos de digestión en minigeles de agarosa de dos concentraciones diferentes : 0.7 y 1.5 % (ver ap.2.5.1.1). A partir del estudio de estos productos de digestión se establecieron mapas físicos bastante aproximados (ver figuras 3.4.c a 3.9.c).

Para todos ellos se determinaron las bandas de restricción responsables de la señal positiva a la sonda pME119. Para ello se transfirieron a nitrocelulosa los productos de digestión del DNA de cada aislamiento con diferentes enzimas de restricción (ver figuras 3.4.a a 3.9.a) y se hibridaron estos filtros con la sonda pME119 en condiciones estándar. Los resultados se pueden observar en las figuras 3.4.b a 3.9.b.

Los 27 bacteriófagos aislados poseen solamente 9 insertos diferentes. Se pueden clasificar los aislamientos en 9 diferentes clases, como se expone en la tabla 3.3. El nombre de la clase corresponde al aislamiento del que se obtuvo un mejor rendimiento.

Figura 3.4 : Aislamiento #262 (pME119 +).

A : Gel de agarosa de los productos de restricción del DNA del bacteriófago, con los enzimas B : BamHI, E : EcoRI, H: HindIII y K : KpnI. Marcador de peso molecular (m) lambda cI857 HindIII + EcoRI.

B : Autoradiografía del filtro réplica hibridado con la sonda PvuI-XbaI de p22.3 marcada por 'nick translation'. Las bandas que presentan señal se han marcado con una flecha en A.

C: Mapa físico del inserto, localizado dentro del bacteriófago lambda Charon 35. Observar la presencia de una diana HindIII anómala en el brazo derecho.

Figura 3.5 : Aislamiento #264 (pME119 +).

A : Gel de agarosa de los productos de restricción del DNA del bacteriófago, con los enzimas B : BamHI, E : EcoRI, H: HindIII y K : KpnI. Marcador de peso molecular (m) lambda cI857 HindIII + EcoRI.

B : Autoradiografía del filtro réplica hibridado con la sonda PvuI-XbaI de p22.3 marcada por 'nick translation'. Las bandas que presentan señal se han marcado con una flecha en A.

C: Mapa físico del inserto, localizado dentro del bacteriófago lambda Charon 35. Observar la presencia de una diana HindIII anómala en el brazo derecho.

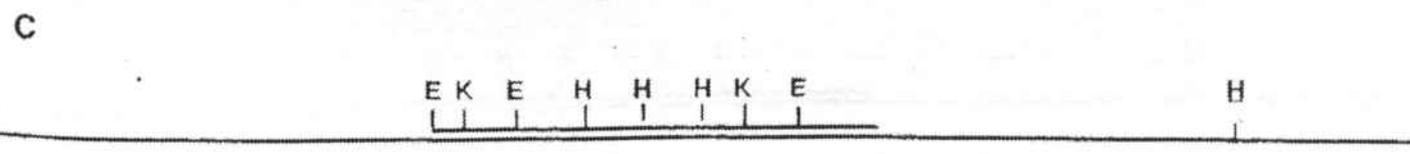
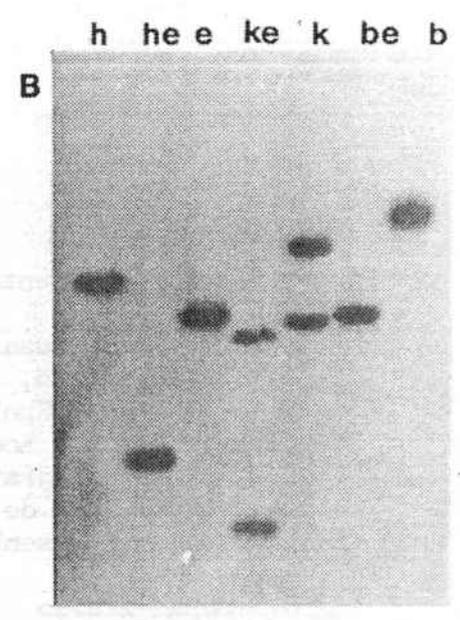
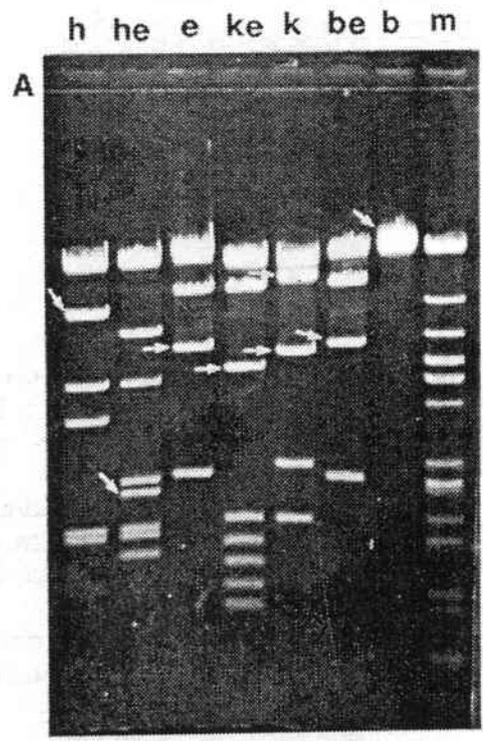
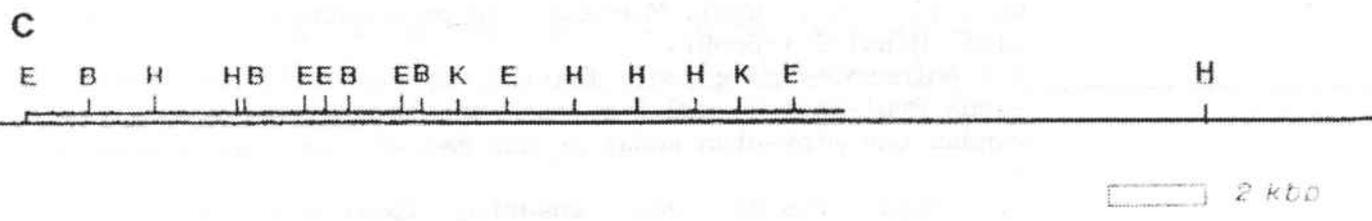
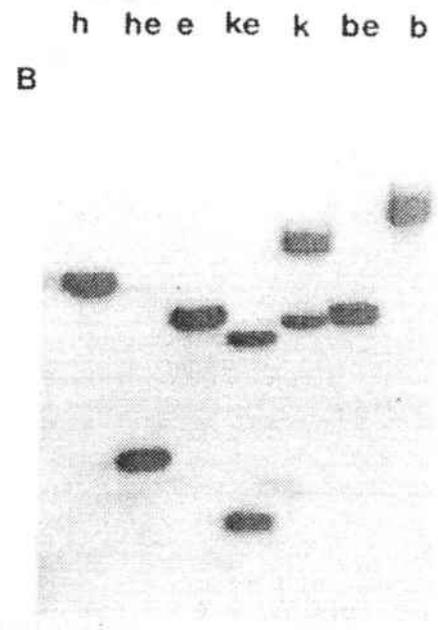
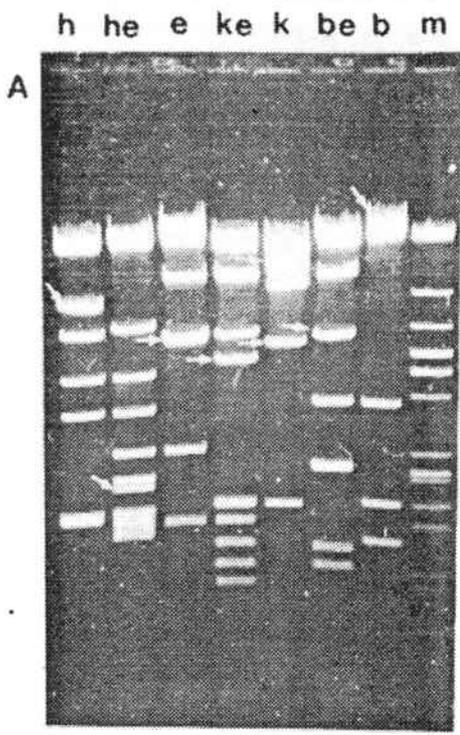


Figura 3.6 : Aislamiento #268 (pME119 +).

A : Gel de agarosa de los productos de restricción del DNA del bacteriófago, con los enzimas B : BamHI, E : EcoRI, H: HindIII y K : KpnI. Marcador de peso molecular (m) lambda cI857 HindIII + EcoRI.

B : Autoradiografía del filtro réplica hibridado con la sonda PvuI-XbaI de p22.3 marcada por 'nick translation'. Las bandas que presentan señal se han marcado con una flecha en A.

C: Mapa físico del inserto, localizado dentro del bacteriófago lambda Charon 35.

Figura 3.7 : Aislamiento #269 (pME119 +).

A : Gel de agarosa de los productos de restricción del DNA del bacteriófago, con los enzimas B : BamHI, E : EcoRI, H: HindIII y K : KpnI. Marcador de peso molecular (m) lambda cI857 HindIII + EcoRI.

B : Autoradiografía del filtro réplica hibridado con la sonda PvuI-XbaI de p22.3 marcada por 'nick translation'. Las bandas que presentan señal se han marcado con una flecha en A.

C: Mapa físico del inserto, localizado dentro del bacteriófago lambda Charon 35. Observar la presencia de una diana HindIII anómala en el brazo derecho.

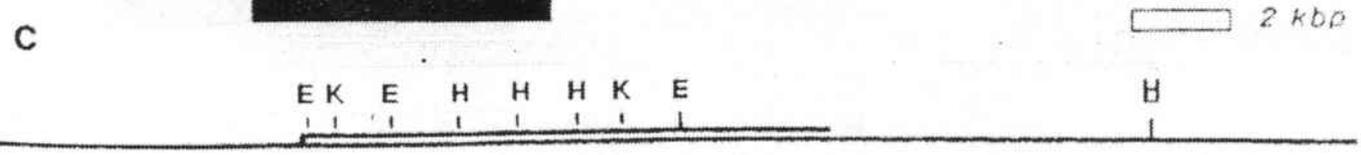
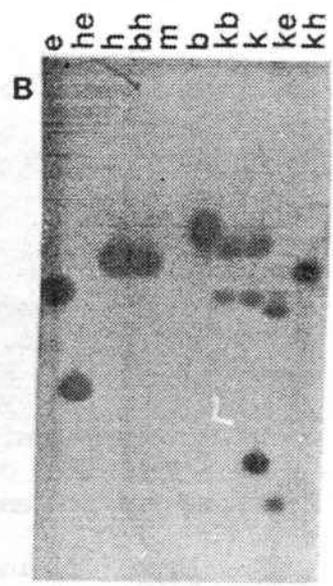
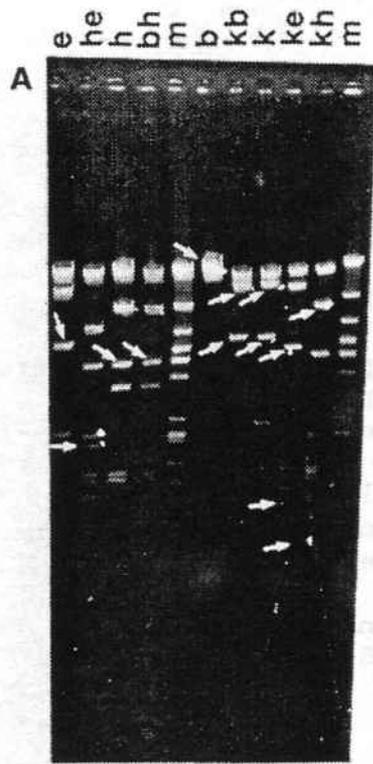
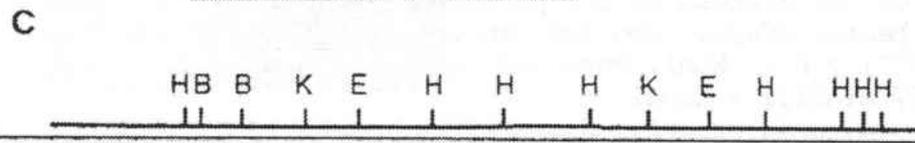
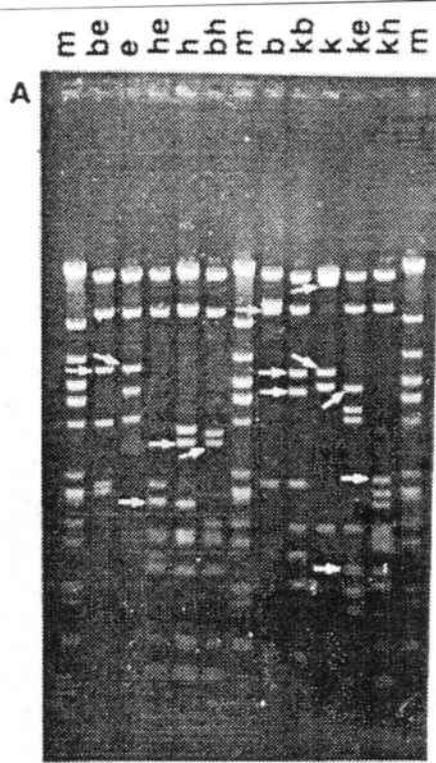


Figura 3.8 : Aislamiento #289 (pME119 +).

A : Gel de agarosa de los productos de restricción del DNA del bacteriófago, con los enzimas B : BamHI, E : EcoRI, H: HindIII y K : KpnI. Marcador de peso molecular (m) lambda cI857 HindIII + EcoRI.

B : Autoradiografía del filtro réplica hibridado con la sonda PvuI-XbaI de p22.3 marcada por 'nick translation'. Las bandas que presentan señal se han marcado con una flecha en A.

C: Mapa físico del inserto, localizado dentro del bacteriófago lambda Charon 35.

Figura 3.9 : Aislamiento #302 (pME119 +).

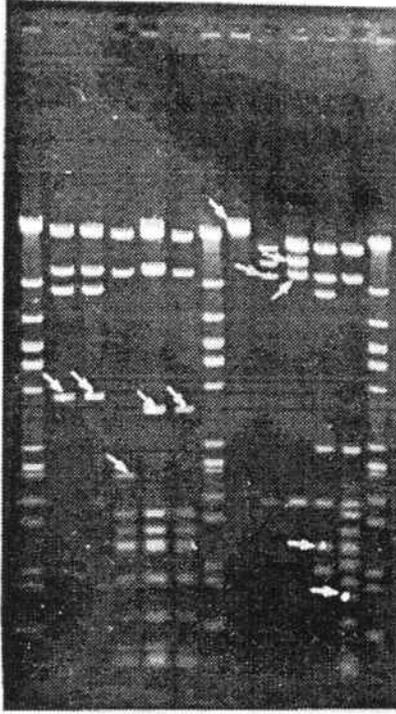
A : Gel de agarosa de los productos de restricción del DNA del bacteriófago, con los enzimas B : BamHI, E : EcoRI, H: HindIII y K : KpnI. Marcador de peso molecular (m) lambda cI857 HindIII + EcoRI.

B : Autoradiografía del filtro réplica hibridado con la sonda PvuI-XbaI de p22.3 marcada por 'nick translation'. Las bandas que presentan señal se han marcado con una flecha en A.

C: Mapa físico del inserto, localizado dentro del bacteriófago lambda Charon 35.

m b e e h e h h b m b k b k k e k h m

A

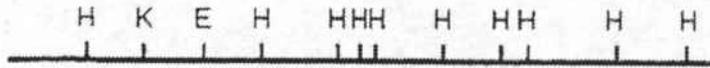


b e e h e h h b m b k b k k e k h

B

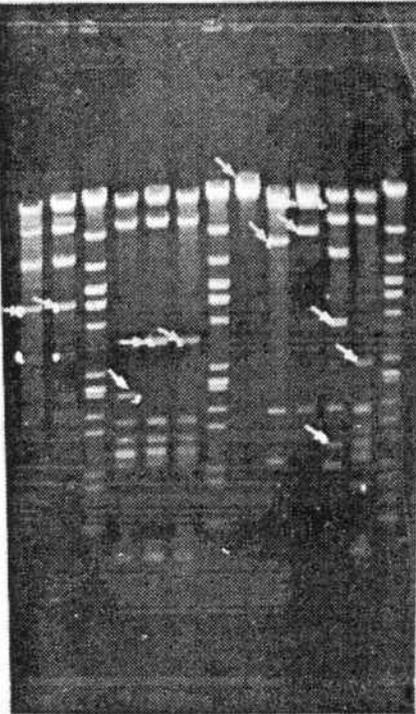


C



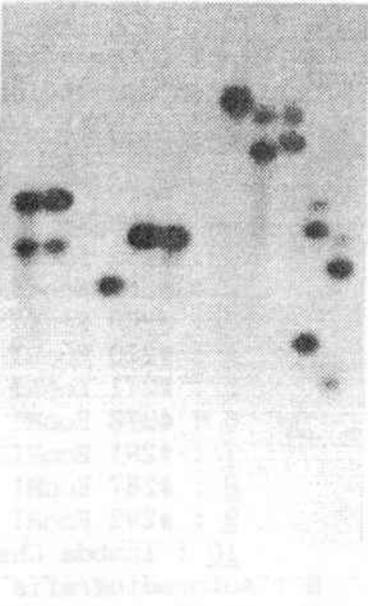
b e e m e h e h h b m b k b k k e k h m

A

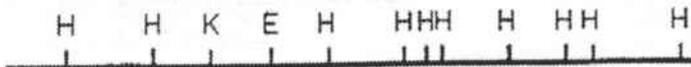


b e e m e h e h h b m b k b k k e k h

B



C



en la purificación de DNA, en el caso de que hubieran varios en la misma clase.

clase	longitud inserto	brazos correctos	numero	representantes
262	15.5	no	1	#262
264	8.5	no	17	#261, #264, #266, #267, #272, #273, #280, #281, #282, #283, #284, #285, #286, #290, #292, #303, #304
268	14.0	si	1	#268
269		no	1	#269
270	15.0	no	1	#270
271	15.5	no	1	#271
287	13.5	no	1	#287
289	10.0	si	1	#289
302		si	3	#278, #291, #302
			total	27

Tabla 3.3 : Clasificación de los aislamientos positivos a la sonda pME119.

Figura 3.10 : Localización de los fragmentos de restricción EcoRI + HindIII de los diferentes aislamientos genómicos que contienen secuencias del vector lambda Charon-35.

A : Gel de agarosa mediano, 0.7 %..:

m : marcador de peso molecular lambda cI857 HindIII + EcoRI

1 : #262 EcoRI + HindIII

2 : #268 EcoRI + HindIII

3 : #269 EcoRI + HindIII

4 : #270 EcoRI + HindIII

5 : #271 EcoRI + HindIII

6 : #278 EcoRI + HindIII (clase #302)

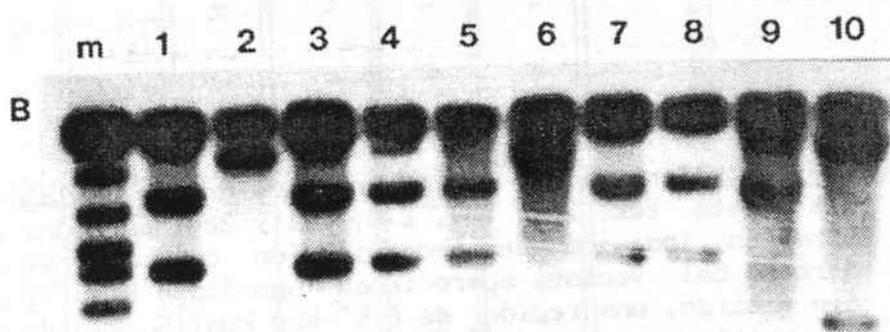
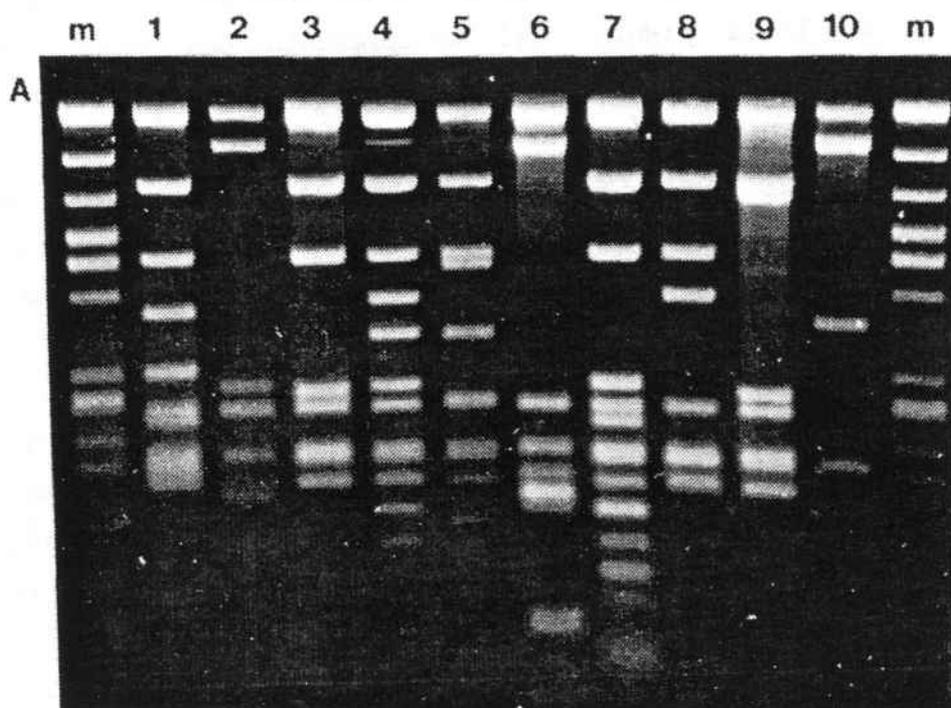
7 : #281 EcoRI + HindIII (clase #264)

8 : #287 EcoRI + HindIII

9 : #292 EcoRI + HindIII (clase #264)

10 : lambda Charon 35 EcoRI + HindIII

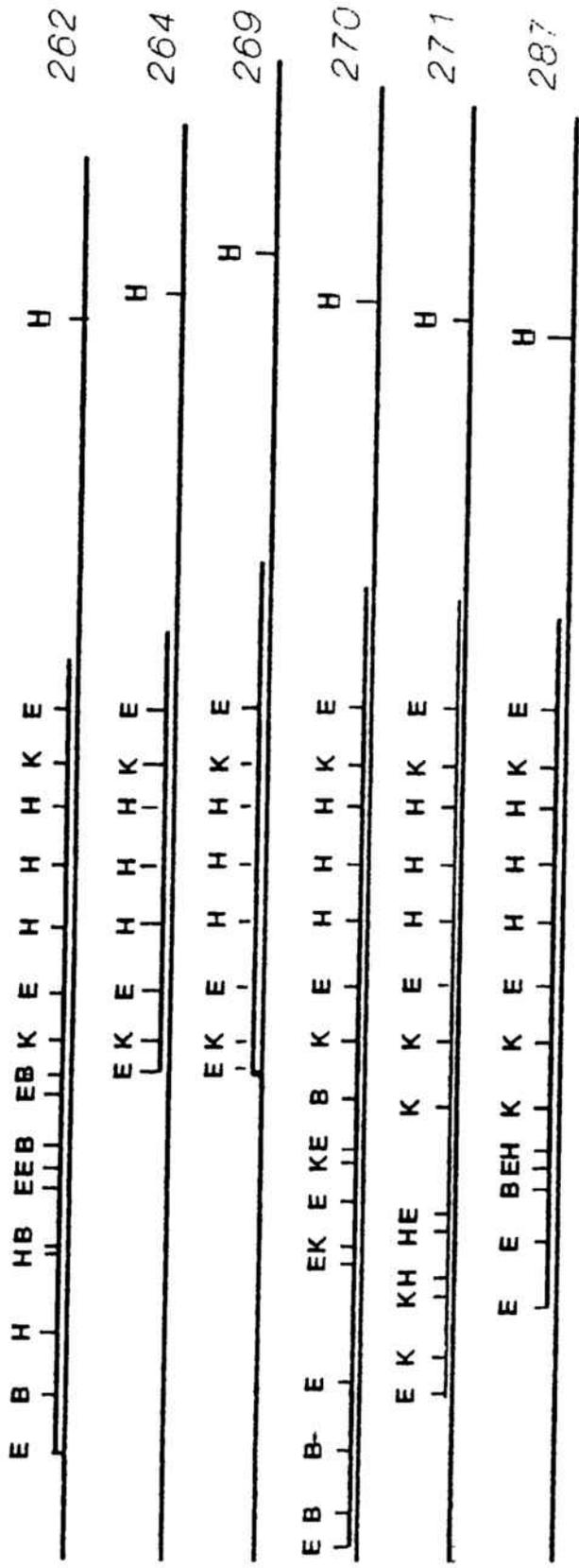
B : Autoradiografía del filtro hibridado con la sonda lambda Charon-35 marcada por 'nick translation'.



De los 27 aislamientos mapados hay claros indicios de recombinación que afectan al brazo derecho del vector en 22 de ellos. En la figura 3.11 se presenta una alineación de los insertos de estas clases. Se observa que hay una región de alineamiento perfecto, de aproximadamente 6.5 kbp KpnI - Eco RI. Hacia 5' de esa región la alineación de las dianas se pierde. Cabe pensar que la recombinación observada podría haber afectado a una parte del inserto, lo que haría que estos aislamientos no fueran fiables.

Con la finalidad de delimitar qué fragmentos de restricción correspondían a DNA del vector y cuáles a inserto se cargaron en un gel mediano de agarosa 1.0% digestiones dobles EcoRI+HindIII de DNA de representantes de cada una de las clases descritas. Después de transferir estos fragmentos a un filtro de nitrocelulosa éste se hibridó con la sonda lambda Charon-35. El gel empleado, así como el resultado de la exposición autorradiográfica del filtro se muestran en la figura 3.10.a y b. De este modo quedaron confirmados los mapas establecidos. En ellos se señalan los fragmentos de restricción que contienen DNA del vector.

Figura 3.11 : Alineamiento de los insertos de los aislamientos de las clases 262, 264, 269, 270, 271 y 287. En todos ellos se aprecian indicios de recombinación que afecta al brazo derecho del vector, apareciendo una diana HindIII anómala. Sin embargo, una región de 6.9 kbp KpnI-EcoRI (recuadrada) se mantiene en todos ellos, pudiendo alinearse todos los insertos perfectamente. Dentro de esta región se localiza un fragmento HindIII-EcoRI donde se encuentra el gen correspondiente al clon cDNA pME119 (Prat et al., 1985).



zona de alineamiento

orientación del gen

2 kbp

ALINEAMIENTO CLASES 262, 264, 269, 270, 271 y 287

Las causas que pudieran haber provocado esta recombinación son desconocidas por nosotros. Sin embargo, parece interesante destacar los dos puntos siguientes :

1. se observó un aspecto anómalo del brazo derecho únicamente en los clones aislados como positivos a pME119.
2. en todos los casos en que se observó este fenómeno el gen de glutelina-2 se encontraba situado en las 2 a 3 kb más próximas a este brazo, y con la región 5' del gen dirigida hacia éste. Tan sólo en la clase 302 el gen presenta esta misma orientación, pero la distancia al brazo derecho es sensiblemente superior (7 kbp).

En 5 aislamientos de los 27 no hubo ningún indicio que haga pensar en que habían presentado recombinación. Una alineación de los insertos se muestra en la figura 3.12. Estos insertos alinean perfectamente en una región que comprende 18.5 kbp de genoma. Si se alinean con respecto al clon descrito ZG-1 (Boronat et al., 1987) se cubre una zona de genoma de 20 kbp (ver figura 3.12).

Figura 3.12 : Alineamiento de los insertos de los aislamientos de las clases 268, 289 y 302. En estos clones genómicos el inserto se puede alinear perfectamente, delimitando una zona de genoma de 18.5 kbp. El gen correspondiente al clon cDNA pME119 se localiza en un fragmento HindIII-EcoRI de 1.9 kbp.

Así pues, se habían aislado 5 clones genómicos homólogos a la sonda pME119 correctos. Estos sólo tenían tres insertos diferentes, pero cubrían una zona de genoma de 18.5 kbp (20 kbp si se incluye el aislamiento anterior ZG-1). El gen de glutelina-2 se encuentra casi centrado en esta zona.

Para confirmar que se trataba realmente del mismo fragmento de DNA genómico se procedió a subclonar el fragmento HindIII-HindIII de 3.0 kbp de los aislamientos #268, #289 y #302 en un plásmido de elevado número de copias como pUC18 (ver ap.2.12). De este modo se obtuvieron los plásmidos p268C, p289 y p302. Después de su amplificación (ver ap. 2.3.3.1) se mapeó el inserto mediante los enzimas de restricción BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, PstI, SalI y XbaI. De la comparación de los productos de restricción se concluyó que los tres insertos eran idénticos.

Figura 3.13 : Alineamiento de los insertos de los aislamientos de las clases 268, 289 y 302, y del clon genómico lambda ZG1 (Boronat et al., 1987). Alineando los cuatro insertos se cubre una región de genoma de 20 kbp, con el gen correspondiente al clon cDNA pME119 centrado. Se indica la posición del gen y su orientación, así como la zona de genoma de la que se ha determinado la secuencia nucleotídica.

3.1.3.3 Determinación de la secuencia nucleotídica del inserto p268C

Una vez determinado el mapa físico para estos enzimas del inserto del plásmido p268C (ver figura 3.14) se diseñó una estrategia de secuenciación. El método de secuencia empleado fue el descrito por Sanger (Sanger et al., 1977; 1980) (ver ap. 2.13), con $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP como nucleótido marcado. Se cambió de isótopo trazador a ^{35}S en forma de $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP tan sólo en la resolución de la secuencia de los últimos subclones.

Para obtener los subclones adecuados a la secuencia se realizaron clonajes dirigidos en los vectores M13mp18 y M13mp19 (ver ap.2.12) empleando para ello fragmentos de DNA purificados de gel (ver ap. 2.7) o bien al azar de los fragmentos de restricción Sau3AI en la diana BamHI del vector M12mp18. La estrategia de secuencia se resume en la figura 3.14.

La preparación de DNA molde (DNAss) se realizó como se describe en el ap.2.13.2.

Figura 3.14 : Mapa de restricción del inserto del plásmido p268C

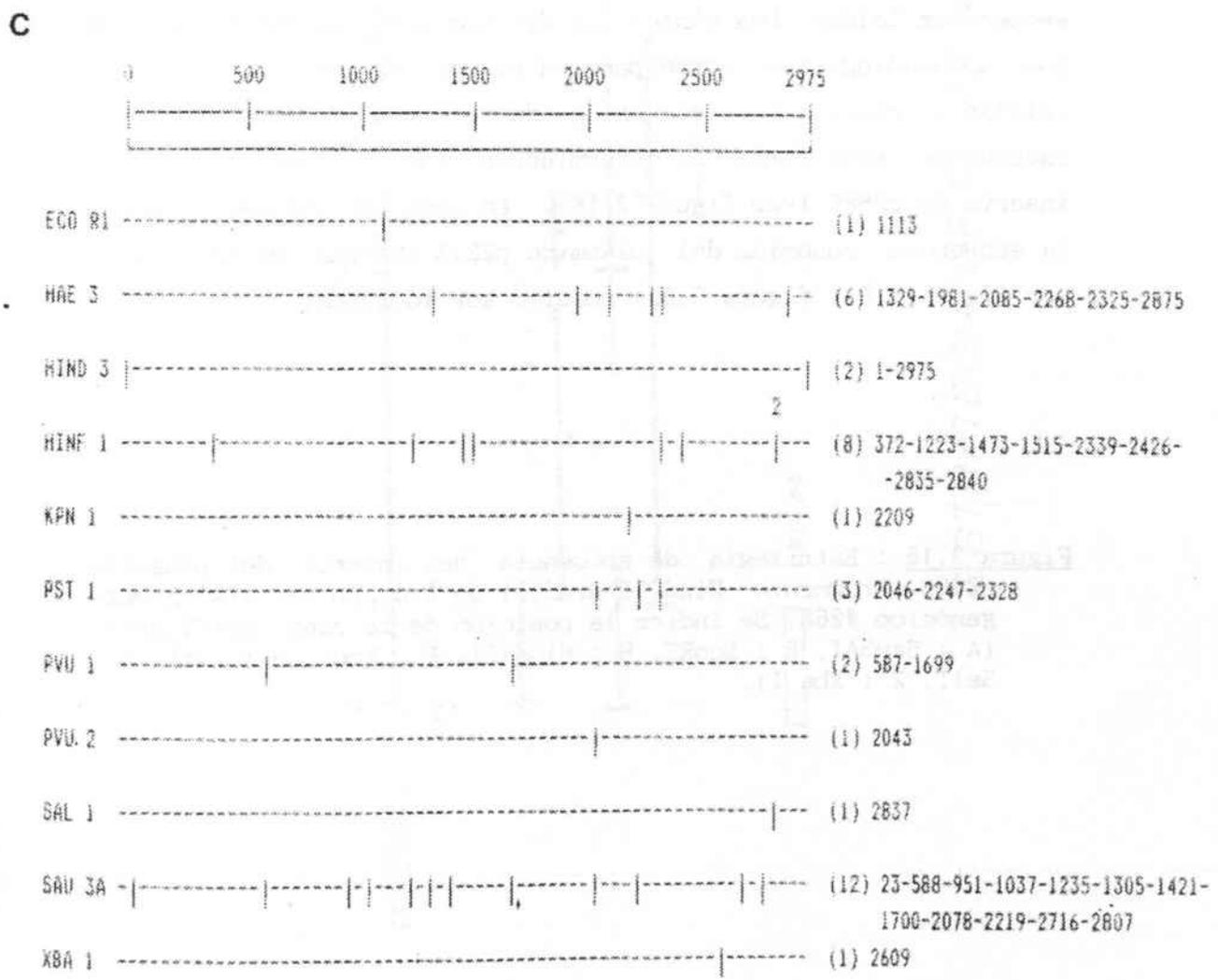
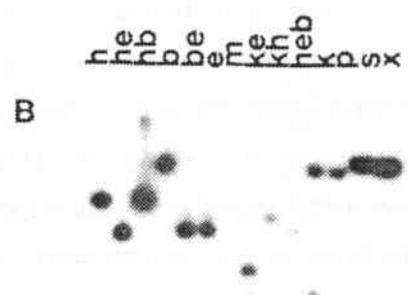
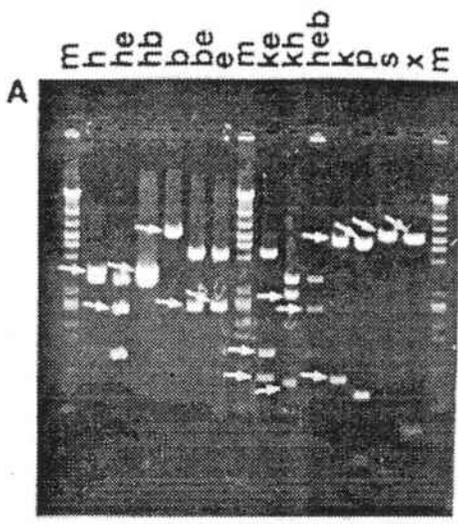
A : Gel de agarosa 0.8%

m : marcador peso molecular lambda cI857 HindIII + lambda cI857 HindIII + EcoRI.

y los productos de restricción del plásmido p268C para los enzimas h : HindIII, e : EcoRI, b : BamHI, k : KpnI, p : PstI, s : SalI y x : XbaI.

B : Autorradiografía del filtro réplica del gel hibridado con la sonda PvuI-XbaI de p22.3 marcada por 'nick translation'.

C : Localización física de las dianas de restricción para algunos enzimas. La posición exacta se ha obtenido a partir del estudio de la secuencia de nucleótidos (figura 3.17).

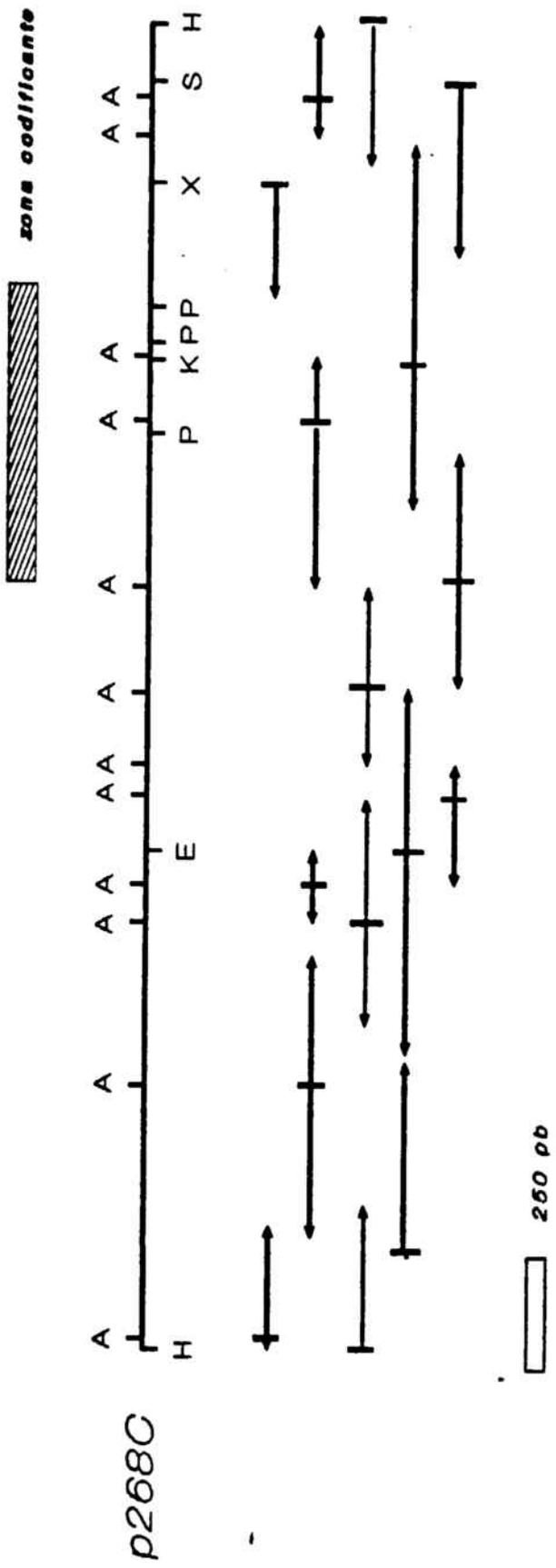


orientación del gen →

Los productos de reacción se analizaban en geles de acrilamida 6% (ver ap.2.5.3) de 0.25 mm de espesor, en las condiciones ya descritas. Una vez secado el gel sobre el vidrio se exponía este a temperatura ambiente frente a película autorradiográfica. En exposiciones de 12 h a 4 d se podían obtener autorradiogramas que permitían determinar de 200 a 350 bp por cada clón analizado en dos cargas sucesivas.

Una vez leídas las secuencias de los geles, se introducían en un ordenador IBM-PC AT en el que se encuentra instalado el programa Micro-Genie[®] (Beckman) y con la opción de alineación (Merge) se obtenían los solapamientos entre las diferentes secuencias leídas. Los puntos de discordancia se comprobaban en los autorradiogramas correspondientes, y de ser necesario se volvían a repetir las secuencias de esa zona, leyendo la otra cadena. De esta forma se determinaron los 2975 nucleótidos del inserto de p268C (ver figura 3.16). La zona de solapamiento con la secuencia conocida del plásmido p22.3 (Boronat et al., 1987; ver figura 3.2 y figura 3.32) resultó ser idéntica.

Figura 3.15 : Estrategia de secuencia del inserto del plásmido p268C. Fragmento HindIII-HindIII de 3.0 kbp del aislamiento genómico #268. Se indica la posición de la zona codificante. (A : Sau3AI, E : EcoRI, H : HindIII, K : KpnI, P : PstI, S : Sall, X : Xba I).



ESTRATEGIA DE SECUENCIA INSERTO p268C

10	20	30	40	50	60
AAGCTTGACT	GAAATGGAAG	ACGATCATAA	CGAAGGATGA	AACGGTCACG	AAGCTATGTG
70	80	90	100	110	120
CAGAGGAGCT	TCGGCATGAC	AGCAGAAAAGG	GGAAACCGAC	TTAAAGATGA	AAAGCCAAAT
130	140	150	160	170	180
CAGCCCTCAA	AGAATTACTA	TAGAGTTATT	GATAAAAAGT	AAAGGGCATT	AATGTAATTT
190	200	210	220	230	240
TATACGGACT	GCGTCCCGTG	CCTATAAATA	GATGAACAGT	ATTCATGTAT	TGTTACGCT
250	260	270	280	290	300
GACTTGGCAT	TGGTATCAAG	CCTCTACCT	TACTTTTCTT	CAAGCCGAAG	TACATTTGTT
310	320	330	340	350	360
GTTGTCGTTT	ATATAAGCAA	AATAAATGAA	AATGAATTAA	TGTTCAAAAG	TAATCATATT
370	380	390	400	410	420
ATTTTATGTG	TGAATCTTCT	TTACTTTTTTC	ATTTGATTAT	GATTATGAAG	GTATGACCTT
430	440	450	460	470	480
CATAACCTTC	GTCCGAAATC	CATTATATCC	AAAGGAAAAT	AATGCTTCGA	AGGACGAAGG
490	500	510	520	530	540
ATTTTGATAT	TTAACATTTT	ATGTTGCCTT	GTTCTTAATT	CATAGCATTT	GAGAACAAGT
550	560	570	580	590	600
CCCCAACACC	AATCTTTATC	TTTACTATAT	TAAAGCACCA	GTTCAACGAT	CGTCTCGTGT
610	620	630	640	650	660
CAATATTATT	AAAAAACTCC	TACATTTCTT	TATAATCAAC	CCGCACTCTT	ATAATCTCTT
670	680	690	700	710	720
CTCTTACTAC	TATAATAAGA	GAGTTTATGT	ACAAAATAAG	GTGAAATTAT	GTATAAGTGT
730	740	750	760	770	780
TCTGGACCTT	GGTTGTTGGC	TCATATTCAC	ACAACCTAAT	CAATAGAAAA	CATATGTTTT
790	800	810	820	830	840
ATTAACAACAA	AATTTATCAT	ATATATATAT	ATATATATAT	ATATATATAT	ATATATATAT
850	860	870	880	890	900
AATATAAACC	GTAGCAATGC	ACAGGCATAT	GACTAGTGGC	AACTTAATAC	CATGTGTGTA
910	920	930	940	950	960
TTAAGATGAA	TAAGAGGTAT	CCAAATAAAT	AACTTGTTTCG	CTTACGTCTG	GATCGAAAGG

Figura 3.16 : Secuencia nucleotídica del inserto del plásmido p268C. Se ha subrayado la zona codificante.

970	980	990	1000	1010	1020
GGTTGGAAAC	GATTAAATCT	CTTCCTAGTC	AAAATTTAAAT	AGAAGGAGAT	TTAATCGATT
1030	1040	1050	1060	1070	1080
TCTCCCAATC	CCCTTCGATC	CAGGTGCAAC	CGAATAAGTC	CTTAAATGTT	GAGGAACACG
1090	1100	1110	1120	1130	1140
AAACAACCAT	GCATTGGCAT	GTAAAGCTCC	AAGAATTCGT	TGTATCCTTA	ACAACTCACA
1150	1160	1170	1180	1190	1200
GAACATCAAC	CAAAATTGCA	CGTCAAGGGT	ATTGGGTAAAG	AAACAATCAA	ACAAATCCTC
1210	1220	1230	1240	1250	1260
TCTGTGTGCA	AAGAAACACG	GTGAGTCATG	CCGAGATCAT	ACTCATCTGA	TATACATGCT
1270	1280	1290	1300	1310	1320
TACAGCTCAC	AAGACATTAC	AAACAACTCA	TATTGCATTA	CAAAGATCGT	TTCATGAAAA
1330	1340	1350	1360	1370	1380
ATAAAATAGG	CCGGAACAGG	ACAAAAATCC	TTGACGTGTA	AAGTAAATTT	ACAACAAAAA
1390	1400	1410	1420	1430	1440
AAAAGCCATA	TGTCAAGCTA	AATCTAATTC	GTTTTACGTA	GATCAACAAC	CTGTAGAAGG
1450	1460	1470	1480	1490	1500
CAACAAAAC	GAGCCACGCA	GAAGTACAGA	ATGATTCCAG	ATGAACCATC	GACGTGCTAC
1510	1520	1530	1540	1550	1560
GTAAAGAGAG	TGACGAGTCA	TATACATTTG	GCAAGAAAAC	ATGAAGCTGC	CTACAGCCGT
1570	1580	1590	1600	1610	1620
CTCGGTGGCA	TAAGAACACA	AGAAATTGTG	TTAATTAATC	AAAGCTATAA	ATAACGCTCG
1630	1640	1650	1660	1670	1680
CATGCCGTGTG	CACCTCTCCA	TCAACCACCAC	TGGGTCTTCA	GACCATTAGC	TTTATCTACT
1690	1700	1710	1720	1730	1740
CCAGAGCGCA	GAAGAACCCG	ATCGACACCA	TGAGGGTGTT	GCTCGTTGCC	CTCGCTCTCC
1750	1760	1770	1780	1790	1800
TGGCTCTCGC	TGCGAGCGCC	ACCTCCACGC	ATACAAGCGG	CGGCTGCGGC	TGCCAGCCAC
1810	1820	1830	1840	1850	1860
CGCCGCCGGT	TCATCTACCG	CCGCCGGTGC	ATCTGCCACC	TCCGGTTTAC	CTGCCACCTC
1870	1880	1890	1900	1910	1920
CGGTGCATCT	CCCACCGCCG	GTCCACCTGC	CGCCGCCGGT	CCACCTGCCA	CCGCCGGTCC
1930	1940	1950	1960	1970	1980
ATGTGCCGCC	GCCGGTTCAT	CTGCCGCCGC	CACCATGCCA	CTACCCTACT	CAACCGCCCC

1990	2000	2010	2020	2030	2040
GGCCTCAGCC	TCATCCCCAG	CCACACCCAT	GCCCCTGCCA	ACAGCCGCAT	CCAAGCCCGT
2050	2060	2070	2080	2090	2100
GCCAGCTGCA	GGGAACCTGC	GGCGTTGGCA	GCACCCCGAT	CCTGGGCCAG	TGCGTCGAGT
2110	2120	2130	2140	2150	2160
TTCTGAGGCA	TCAGTGCAGC	CCGACGGCGA	CGCCCTACTG	CTCGCCTCAG	TGCCAGTCGT
2170	2180	2190	2200	2210	2220
TGCGGCAGCA	GTGTTGCCAG	CAGCTCAGGC	AGGTGGAGCC	GCAGCACCGG	TACCAGGCGA
2230	2240	2250	2260	2270	2280
TCTTCGGCTT	GGTCCTCCAG	TCCATCCTGC	AGCAGCAGCC	GCAAAGCGGC	CAGGTCGCGG
2290	2300	2310	2320	2330	2340
GGCTGTTGGC	GGCGCAGATA	GCGCAGCAAC	TGACGGCGAT	GTGCGGCCTG	CAGCAGCCGA
2350	2360	2370	2380	2390	2400
CTCCATGCC	CTACGCTGCT	GCCGGCGGTG	TCCCCACTG	AAGAACTAT	GTGCTGTAGT
2410	2420	2430	2440	2450	2460
ATAGCCGCTG	GCTAGCTAGC	TAGTTGAGTC	ATTTAGCGGC	GATGATTGAG	TAATAATGTG
2470	2480	2490	2500	2510	2520
TCACGCATCA	CCATGGGTGG	CAGTGTCACT	GTGAGCAATG	ACCTGAATGA	ACAATTGAAA
2530	2540	2550	2560	2570	2580
TGAAAAGAAA	AAAGTATTGT	TCCAAATTAA	ACGTTTTAAC	CTTTTAATAG	GTTTATACAA
2590	2600	2610	2620	2630	2640
CAATTTATAT	GTGTGTTTTT	TATATATATC	TAGATTTGTT	ATCATCCATT	TGGATATAGA
2650	2660	2670	2680	2690	2700
CAAAAAAAAA	TTATAAGAAC	TAAAACGAAT	ACTAATTTGA	AATAAAGGGG	GTATATATTG
2710	2720	2730	2740	2750	2760
GGATAATGTC	CATGAGATCC	CTCGTAATAT	CACTGACATC	ACACGTGTGC	AGTATCACTG
2770	2780	2790	2800	2810	2820
ATACATGTAT	TCACATTTGT	TCTGCGTAGG	CATACCTAAC	AATTTTGATC	GA CTATCAGA
2830	2840	2850	2860	2870	2880
AAGTCAACGA	AAGTGAGTCG	ACTCAAAAAA	AAATGGGTTG	TGGATGAGGC	GTTAGGCCCA
2890	2900	2910	2920	2930	2940
CCTTATGGCA	GAAAGATATC	CACAATTGCT	GGTTTATATA	TACGTTGCT	GCTATGTCCT
2950	2960	2970			
TCGCCTCCCT	TAGTTAAAGA	CTTGAAGCTA	AGCTT		

3.1.4 CUARTA BUSQUEDA : 300000 U.F.P. (0.75 X GENOMA)

Empleando como sonda el plásmido pME117 marcado por 'nick translation' se encuentran, sobre 300000 u.f.p., analizadas 10 señales ténues después de exposiciones autoradiográficas de 4 d. Después de 3 ciclos de purificación se mantuvieron 7 señales, ténues (#306, #308, #312, #315, #317, #318 y #319).

De todos los aislamientos se obtuvo a partir de una placa a lisis confluyente un eluido en tampón 'lambda dil' (ap. 2.3.4.1) que se conservó como stock. A partir de éste, debidamente titulado, se preparó un crecimiento del bacteriófago en medio líquido del que se aisló DNA. Una primera caracterización del inserto por restricción con los enzimas EcoRI y HindIII permitió observar que en todos ellos se había producido un proceso de recombinación que afectaba el brazo derecho del vector. Comprobados los mapas físicos de los insertos, dichos mapas correspondieron a alguno de los descritos previamente (ver Tabla 3.3 y figuras 3.4.c a 3.9.c).

3.1.5 QUINTA BUSQUEDA : 300000 U.F.P. (0.75 X GENOMA)

La secuencia del clon cDNA pME119 se determinó en el laboratorio en 1985 (Prat et al., 1985). Cuando se resolvió la secuencia del clon cDNA pME117, que carece de parte de la zona codificante, se pudo comprobar que en la zona homóloga, 3', presentaba una importante homología con pME119 (ver figura 3.17). La búsqueda del clon cDNA "full length" correspondiente a pME117 se prolongó durante más de un año. Cuando finalmente se consiguió aislar, el clon cDNA pME177, la caracterización se desarrollaba contemporáneamente a las búsquedas tercera y cuarta ya descritas (ver ap. 3.4 y 3.5). Al resolverse la secuencia de este clon y compararla con la secuencia del clon cDNA pME119 se observó que la zona 5' presenta menor homología que la zona 3' (70 % ante 85 %) (ver figura 3.17). Esta región es, además, fácilmente

purificable pues queda comprendida entre dos dianas de restricción (PstI-BamHI), y se libera un fragmento de 306 bp. Con la finalidad de resolver entre los clones genómicos pME119⁺ y pME177⁺ se decidió emplear este fragmento como sonda en la búsqueda sobre la genoteca.

La purificación del fragmento, preparado a partir de la doble restricción PstI-BamHI de pME177, se hizo en geles preparativos de agarosa al 1%. La purificación de la banda del gel se realizó mediante papel DEAE-Celulosa (ver ap. 2.7.2). Una vez purificado se analizó en otro gel preparativo y se volvió a purificar por el mismo método.

Se analizaron 300000 u.f.p. con la sonda PstI-BamHI de pME177, en las condiciones habituales. Las 10 señales, ténues, que aparecieron se mantuvieron en los diferentes ciclos de purificación.

Después de purificar el DNA de cada uno de los aislamientos como ya se ha descrito (ver ap. 3.4) se analizaron los productos de restricción con los enzimas EcoRI y HindIII. El patrón obtenido era el ya familiar que se encontró en los aislamientos pME119⁺ que presentaban indicios de recombinación que afectaba al brazo derecho del vector. En todos los casos los insertos eran idénticos a alguno de los ya descritos (ver figuras 3.4.c a 3.9.c).

Estos resultados nos hicieron plantearnos si alguno de los aislamientos ya realizados (consideramos como clones genómicos de pME119) era realmente genómico de pME177, y, que el mapa físico fuera similar. Para resolver esta posible ambigüedad, se prepararon dos filtros de nitrocelulosa en los que se fijaron por la técnica de "Dot" (ver ap. 2.8.4) muestras de DNA de los diferentes aislamientos pME119⁺ y pME117-pME177⁺. Asimismo, como controles se dispusieron los plásmidos pME119, pME177 y DNA del

vector lambda Charon-35.

La primera réplica se hibridó con la sonda PvuI-XbaI de p22.3 (Boronat et al., 1987), correspondiente a la zona codificante de pME119. La segunda réplica se hibridó con la sonda PstI-BamHI de pME177. Las condiciones de hibridación empleadas fueron estrictas para las dos sondas que presentan un 60.7% G+C (PvuI-XbaI p22.3, 910 bp) y 57.9% G+C (PstI-BamHI pME177, 300 bp). Estas fueron : 1xSSC, Denhardt x5, 300 µgr/ml DNA de salmón desnaturalizado, 200000 cpm/ml de sonda marcada por 'nick translation' con $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP, durante 16 h a 65 °C con agitación constante. Los lavados se realizaron:

1. 2xSSC, 0.1%SDS, 45 °C, 20 min (-54 Tm)
2. 2xSSC, 0.1%SDS, 65 °C, 20 min (x2) (-34 Tm)
3. 0.15xSSC, 0.1%SDS, 65 °C, 20 min (x3) (-15 Tm)

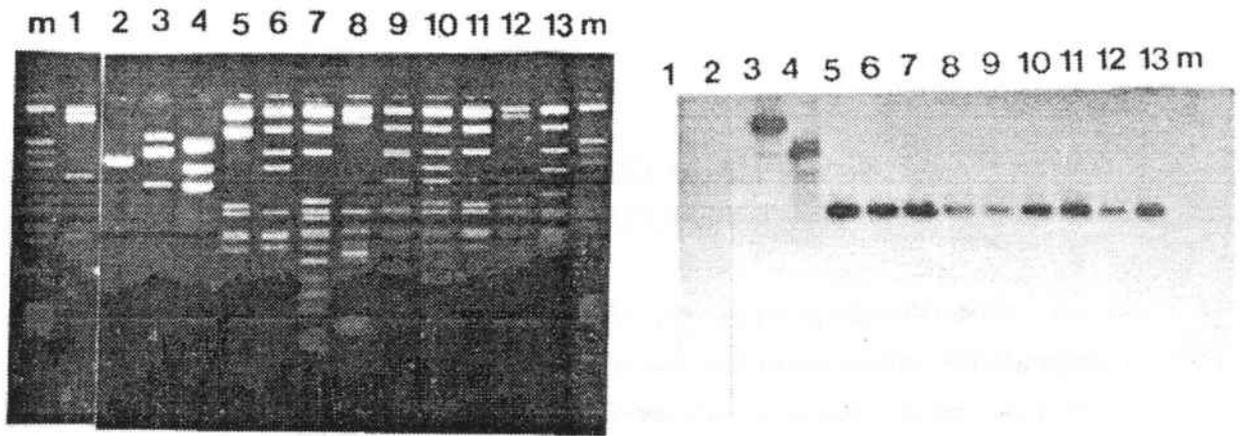
Los filtros se expusieron, una vez secos, frente a película autorradiográfica sin pantalla amplificadora 2 y 48 h. Los resultados se muestran en la figura 3.18.

Figura 3.18 : Determinación del fragmentos de restricción HindIII-EcoRI de los diferentes aislamientos que contiene el gen Zc2. "Dot blot" de los diferentes aislamientos ante las sondas pME119 y pME177.

- A: m : marcador de peso molecular lambda cI857 HindIII + EcoRI
1 : lambda Charon-35 HindIII + EcoRI + pBR322 HaeIII
2 : p22.2b EcoRI (Boronat et al.; 1988; ver figura 3.2)
3 : p22 EcoRI / p22.3 HindIII + EcoRI
4 : p21 EcoRI / p22.1 EcoRI
5 : #290 HindIII + EcoRI (clase 264)
6 : #287 HindIII + EcoRI (clase 287)
7 : #281 HindIII + EcoRI (clase 264)
8 : #278 HindIII + EcoRI (clase 302)
9 : #271 HindIII + EcoRI (clase 271)
10 : #270 HindIII + EcoRI (clase 270)
11 : #269 HindIII + EcoRI (clase 269)
12 : #268 HindIII + EcoRI (clase 268)
13 : #262 HindIII + EcoRI (clase 262)

B: "Dot blot". En la plantilla se indican los aislamientos analizados. Exposiciones de 2 y 48 h.

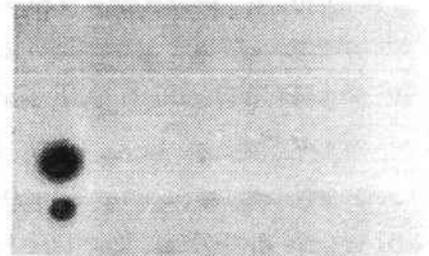
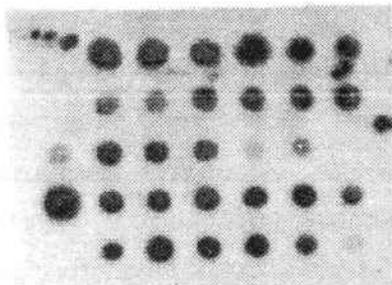
A



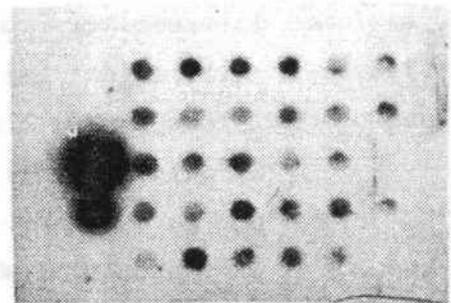
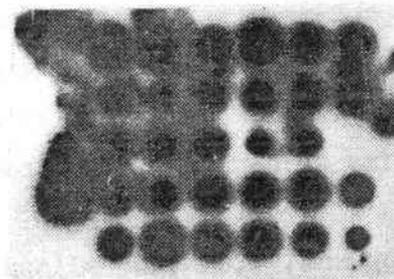
B

	291	285	280	270	264	3
pME177	292	286	281	271	266	259
pME119	302	287	282	272	267	6
lan-Ch35	303	289	283	273	268	261
	304	290	284	278	269	262

2 h



48 h



↑
PvuI-XbaI p22.3

↑
PstI-BamHI pME177

3.2 ESTUDIO DE LA ORGANIZACION GENOMICA DE LOS GENES CORRESPONDIENTES A PME119 Y PME177

Gallardo (Gallardo, 1986; Gallardo et al., 1988) realizó en nuestro laboratorio estudios sobre la organización genómica de los genes de glutelinas-2 de 28 kDa. En estos estudios se determinó que el fragmento de restricción EcoRI del DNA de endospermo (de 20 días después de la polinización) que presentaba señal positiva a la sonda PvuI-XbaI p22.3 era de 11.8 kbp. En el DNA de embrión (del mismo período) se encuentran para la restricción EcoRI 2 fragmentos, de 11.8 y 5.8 kbp respectivamente. Se demostró que el fragmento de 11.8 kbp contiene el de 5.8 kbp, y que se trata de una diana EcoRI metilada en el endospermo y parcialmente en el embrión. Para el enzima de restricción HindIII el patrón de bandas en ambos tejidos, endospermo y embrión es coincidente, de 3.1 kbp. En estos mismos trabajos se procedió a determinar el número de copias del gen de glutelina-2 por genoma haploide empleando la técnica de reconstitución genómica. Sus resultados permite estimar entre 1 y 2 el número de genes estructurales de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) por genoma haploide.

Se desconocía completamente la organización genómica del gen correspondiente al clon cDNA pME177. El estudio de la organización genómica de los genes correspondientes a la sonda pME119 (glutelina-2 de 28 kDa) y a pME117 permitiría :

1. resolver cuestiones como cuáles son las dianas de restricción que flanquean en el genoma la secuencia de interés.
2. determinar el número de copias de cada uno de los genes por genoma haploide.
3. ensayar las condiciones de hibridación y lavado que permitieran diferenciar con certeza entre los dos genes.

3.2.1 PREPARACION DE DNA GENOMICO

A partir de granos de maíz de 20 días después de la polinización suministrados por el Dr. Natale DiFonzo de Bergamo, Italia, congelados en nitrógeno líquido y conservados a -70°C hasta su uso se diseccionaron sobre nieve carbónica endospermos de embriones, eliminando el pericarpio. De estos tejidos se extrajo el DNA genómico tal como se describe en el apartado 2.3.1.

A partir de 46 gr. de endospermo se obtuvieron 8.87 mgr de DNA genómico bandeado en gradiente de cloruro de cesio. A partir de 4.3 gr de embriones se obtuvieron 605 μgr de DNA.

3.2.2 "SOUTHERN" GENOMICOS

Una alícuota de 50 μgr de DNA se digirió con los enzimas de restricción BamHI, EcoRI y HindIII en las condiciones que se describen en el ap. 2.4.4. Como control interno de digestión se empleó DNA del bacteriófago lambda cI857 a una concentración de 1 ngr/ μgr de DNA genómico. Una alícuota de 500 ngr del DNA digerido se sometió a electroforesis en un minigel de agarosa 1%, en paralelo con 0.5 ngr de DNA de lambda cI857 cortado con el mismo enzima. Al transferir estos fragmentos resueltos a nitrocelulosa e hibridar con la sonda lambda cI857 marcada con ^{32}P cabía esperar, en el caso de una digestión del DNA genómico completa, que las bandas de los dos carriles fueran coincidentes. Este control se realizó en todas las digestiones de DNA genómico que se llevaron a cabo.

Se prepararon dos geles medianos de agarosa 0.8% en los que se analizaron 10 μgr del DNA genómico de embrión o endospermo digeridos con BamHI, EcoRI o HindIII. Se transfirieron a nitrocelulosa tal como se describe en el ap. 2.8.1.2. Uno de los filtros, filtro 1, fue hibridado con la sonda PvuI-XbaI de p22.3,

y el segundo, filtro 2, fue hibridado con la sonda PstI-BamHI de pME177. Las sondas se prepararon por 'nick translation' (ver ap. 2.9.1) empleando dos nucleótidos marcados, $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP y $\alpha^{32}\text{P}$ -dGTP, con lo que se consiguieron actividades específicas de 2×10^5 cpm/ μgr DNA. El estado de las sondas se comprobó por electroforesis en geles de agarosa alcalinos. Las condiciones de la hibridación se detallan a continuación :

- a. prehibridación : 1xSSC, Denhardt x5, 300 $\mu\text{gr/ml}$ DNA de esperma de salmón desnaturalizado, a 68°C durante 6 h.
- b. hibridación : 5xSSC, Denhardt x5, 50% formamida, 20 mM tampón fosfato pH 6.5, 300 $\mu\text{gr/ml}$ DNA de esperma de salmón desnaturalizado, y sonda a 4.0×10^6 cpm/ml, a 45 °C durante 50 h, en un baño de agua con agitación.
- c. lavados :
 1. 6xSSC, 0.1% SDS a 45 °C 20 min (-87 Tm)
 2. 2xSSC, 0.1% SDS a 45 °C 20 min (-54 Tm)
 3. 2xSSC, 0.1% SDS a 65 °C 20 min (x2) (-34 Tm)
 4. 0.15xSSC, 0.1% SDS a 65 °C 20 min (x3) (-15 Tm)

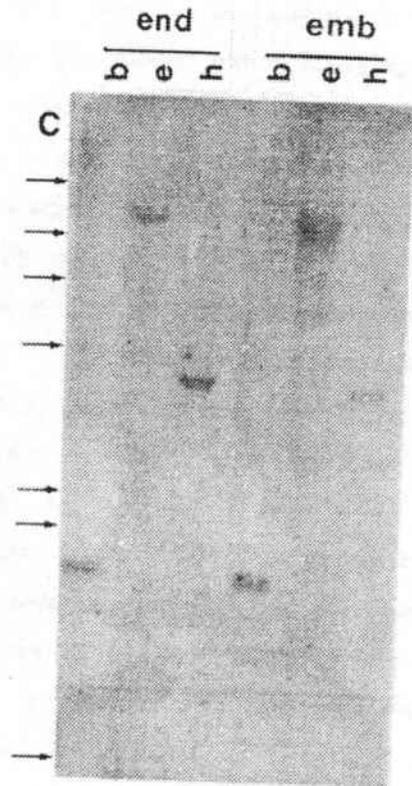
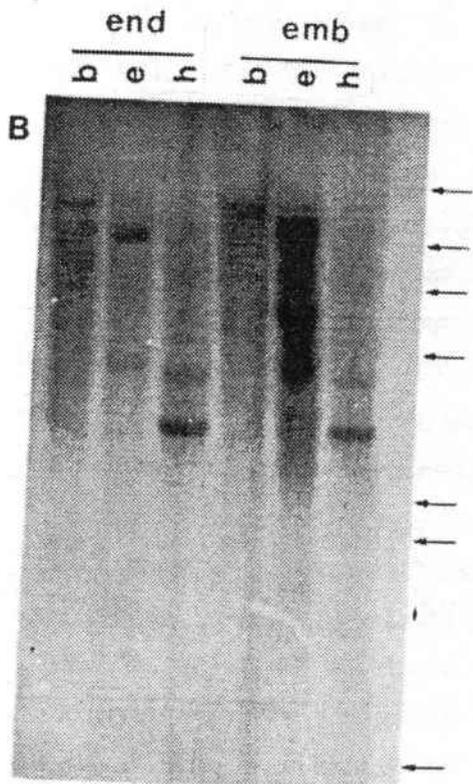
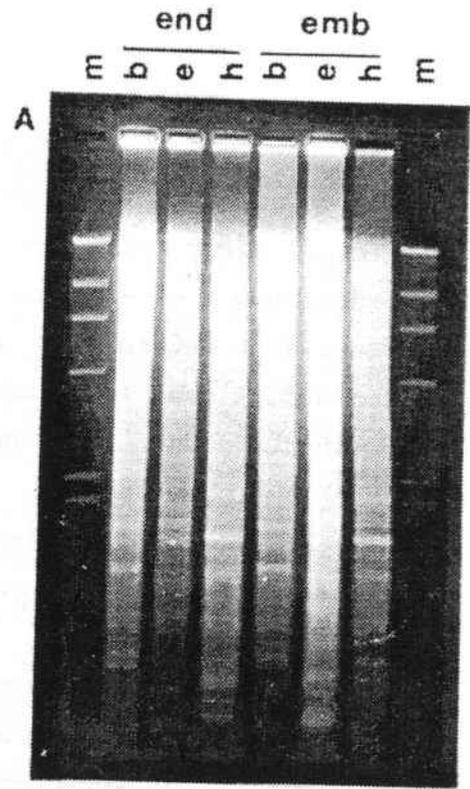
Los filtros una vez secos se expusieron frente a una película fotográfica a -70 °C durante 5 días con pantalla amplificadora.

Figura 3.19 : Fragmentos de restricción genómicos que comprenden a los genes de zeínas-II de 14 kD (Zc1) y glutelina-2 (Zc2).

A : Gel de agarosa 0.8 % de los productos de digestión BamHI (b), EcoRI (e) y HindIII (h) del DNA de endospermo (end) y del DNA de embrión (emb). m : marcador de peso molecular lambda cI857 HindIII.

B : Autoradiografía del filtro réplica hibridado con la sonda PvuI-XbaI de p22.3. Organización genómica de Zc2.

C : Autoradiografía del filtro réplica hibridado con la sonda PstI-BamHI de pME177. Organización genómica de Zc1.



Los resultados obtenidos con la sonda PvuI-XbaI de p22.3 fueron coincidentes con los observados por D. Gallardo, con claras diferencias en el patrón de digestión EcoRI entre el endospermo y el embrión. En el caso de la sonda PstI-BamHI no se observaron diferencias en el patrón de restricción entre los dos tejidos, siendo los fragmentos observados de 1.6 kbp para BamHI, de 18 kbp para EcoRI y de 4.1 kbp para HindIII.

En las condiciones empleadas de hibridación y lavado, empleando los fragmentos antes citados, se puede diferenciar claramente el patrón de restricción genómico correspondiente a ambos genes. El patrón más claro corresponde al enzima HindIII. La banda de 3.0 kbp observada para la sonda PvuI-XbaI de p22.3 coincide con la secuenciada (inserto del plásmido p268C), y es claramente diferente de la banda de 4.1 kbp que se observa con la sonda PstI-BamHI de pME177.

3.3 CONTROL DE CALIDAD DE LA GENOTECA EMPLEADA

En total se analizaron, en cinco procesos de búsqueda sucesivos 1.16×10^6 u.f.p., unas 3 veces la longitud del genoma. Se comprobó que 46 aislamientos correspondían a clones genómicos que incluían en el inserto el gen correspondiente a pME119. Si se estimara el número de copias de este gen por genoma haploide a partir de estos datos, cabría pensar que es del orden de 8 a 12 copias. Sin embargo, estudios realizados en el laboratorio (Gallardo et al., 1988), y que en parte se expondrán posteriormente (ap. 3.6.2), indican que el número de copias por genoma haploide para este gen es de 1. Si, además, se tiene en cuenta que de los 46 aislamientos caracterizados en 42 de ellos se aprecian señales de recombinación que afectan al brazo derecho del vector, así como incoherencias en el mapa físico del inserto, cabe pensar que en la construcción de la genoteca empleada se había producido algún proceso de recombinación de mayor o menor extensión.

En la bibliografía se describen una serie de técnicas para controlar o determinar la calidad de una genoteca. Un procedimiento inicialmente empleado se basa en comparar las cinéticas de reasociación del DNA de la genoteca (ver Maniatis et al., 1975). Sin embargo, un ensayo típico de reasociación de DNA tiene una precisión de aproximadamente un 10%. De este modo, la ausencia de más de 10^6 bp de secuencia en un DNA genómico de mamífero puede pasar desapercibido. Phillips y col. (Phillips et al., 1985) propusieron un método de medición de la calidad de una genoteca con una precisión muy superior. Este método se basa en analizar por "Southern blot" (ver ap. 2.8.1 y 2.10.2) en carriles paralelos los productos de restricción para diferentes enzimas de DNA genómico y de DNA de la genoteca (obtenido de una muestra amplificada de ésta). Como la genoteca contiene una colección de fragmentos grandes que incluyen en su totalidad o en parte la secuencia de interés es de esperar que las bandas del DNA de la genoteca sean de tamaño menor o igual que las bandas del DNA genómico, siempre que el enzima de

CONTROL DE CALIDAD DE LA GENOTECA

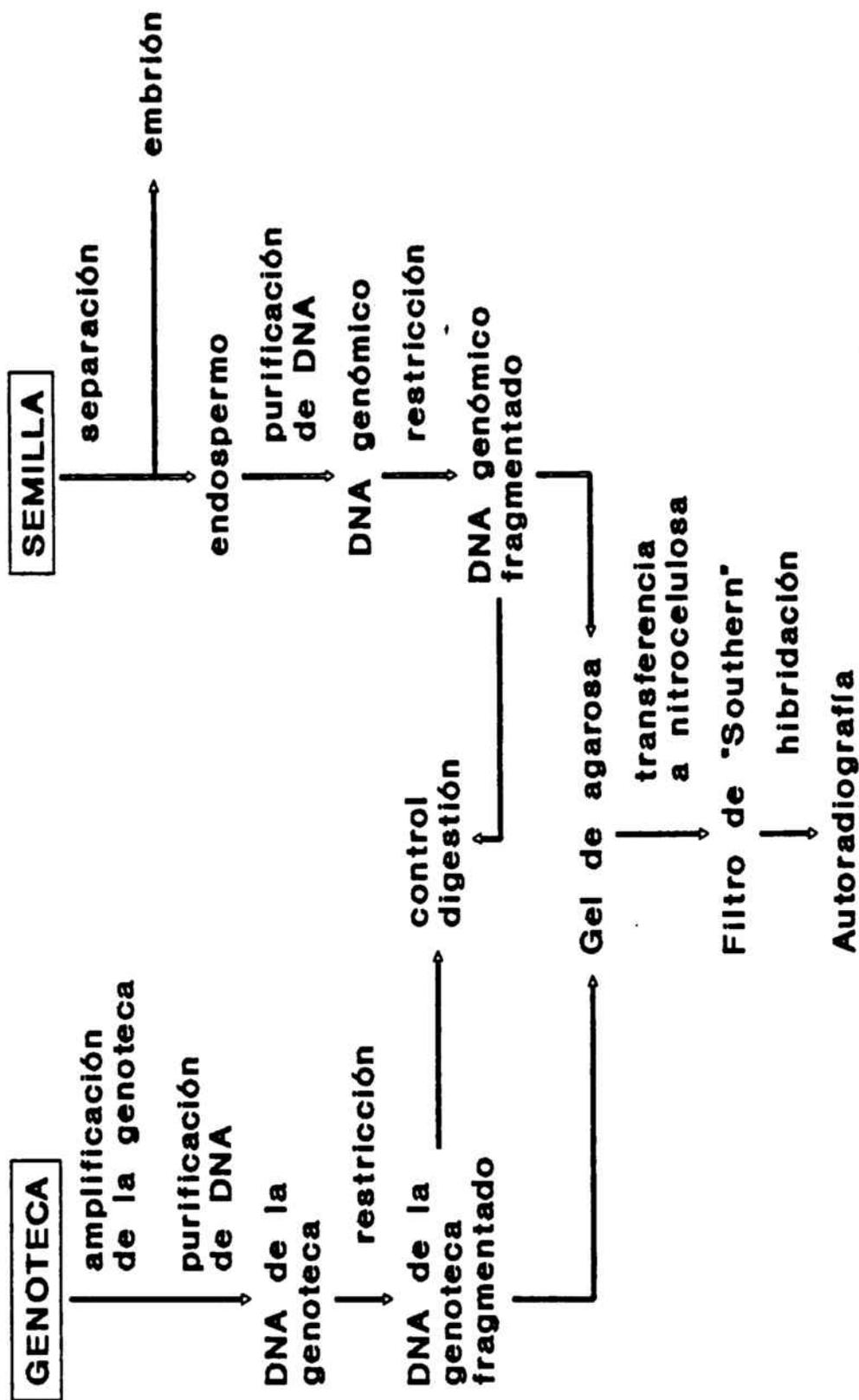


Figura 3.20 : Esquema del método de Phillips y col. (1985) para determinar la calidad de la genoteca.

restricción empleado libere el inserto. Asimismo, si se analiza en el gel la misma cantidad de DNA genómico que de inserto en el DNA de la genoteca, la suma de intensidades de las diferentes bandas en los dos DNAs debe ser similar para poder excluir una sobre / sub-representación de la secuencia de interés en la genoteca.

Conviene, por lo tanto, disponer de DNA genómico del tejido del que se preparó la genoteca, así como de DNA de ésta. El DNA genómico se prepara como se describe en el ap. 2.3.1 (ver ap. 3.2.1). El DNA de la genoteca se prepara a partir de una alícuota amplificada de ésta.

3.3.1 PREPARACION DEL DNA DE LA GENOTECA

La genoteca de DNA de endospermo en el vector lambda Charon-35 (figura 1.6) (Gallardo et al., 1988) se obtuvo en dos experimentos independientes de empaquetamiento "in vitro". En el primero de ellos se obtuvieron un total de 400000 u.f.p. y en el segundo 850000. Cada una de estas colecciones de bacteriófagos se amplificaron por separado, y se mantuvieron en todo momento independientes.

Tituladas, como se describe en el ap. 2.3.4.1, las dos soluciones de genoteca (A1 y A2) los valores obtenidos eran de 2.1×10^6 u.f.p./ml y 2.82×10^6 u.f.p./ml. Para proceder a su amplificación en medio líquido era necesario obtener un lisado con un título más elevado. Por ello se crecieron en 15 ml de medio, como se describe en el ap. 2.3.3.1, con un inóculo de 6×10^6 células/ml de la cepa de E.coli 555 recA⁻. De esta manera se obtuvieron títulos de 2.7×10^9 u.f.p./ml y de 3.2×10^9 u.f.p./ml respectivamente para A1 y A2. El crecimiento a gran escala, ver ap. 2.3.4.2, se realizó a partir de una alícuota de este lisado. El rendimiento obtenido a partir de 1 l de cultivo fue de 150 µgr para A1 y de 185 µgr para A2.

3.3.2 "SOUTHERN"

Se digirieron 75 μ gr de DNA de la genoteca con los enzimas EcoRI y HindIII en las condiciones que se describen en el ap. 2.4.4., sin añadir DNA de lambda cI857 como control de digestión. El DNA cortado procedía en un 36 % del amplificado A1 y el 64% restante del amplificado A2, proporcional al número de u.f.p. que aporta. Se puede verificar la digestión completa del DNA de la genoteca observando la presencia de bacteriófago sin cortar en la parte alta de un gel de agarosa de baja concentración (0.4-0.6%) y la intensidad relativa de los dos brazos del vector. No es necesario incorporar controles internos de digestión.

La cantidad de DNA genómico que se carga en el gel para hacer el "Southern" es de 10 μ gr. La relación entre la longitud del DNA del inserto (se asume que la media es de 17.5 kbp) y el bacteriófago completo (48 kbp) es de 0.36. Para que la cantidad de inserto en la genoteca sea igual a la cantidad de DNA genómico cargado en el gel (10 μ gr) hay que cargar 27 μ gr de DNA de la genoteca digerida.

Se prepararon dos geles iguales de agarosa 0.8% en los que se sometieron a electroforesis muestras de DNA genómico y de la genoteca digeridos con los enzimas EcoRI y HindIII. Los dos geles se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa como se describe en el ap. 2.8.1.2. El primer filtro se hibridó con la sonda PvuI-XbaI de p22.3 y el segundo con la sonda PstI-BamHI de pME177, en las condiciones que se describen en el ap. 3.2.2.

3.3.3 ANALISIS DE LOS RESULTADOS

La exposición autorradiográfica de los filtros durante 4 días (ver figura 3.24) reveló situaciones diferentes en los dos casos. En el filtro 1 se observó una señal mucho más intensa en los fragmentos revelados en el DNA de la genoteca que en el DNA

genómico. Los fragmentos observados correspondieron a los siguientes tamaños :

Filtro 1 : sonda PvuI-XbaI p22.3

Genoteca EcoRI Genómico EcoRI Genoteca HindIII Genómico HindIII

		12.0 kbp		
			8.5 kbp	
6.0 kbp	-----	6.0 kbp		
		4.7 kbp		4.7 kbp
4.3 kbp				4.1 kbp
3.4 kbp				
2.7 kbp			3.1 kbp	----- 3.1 kbp
			2.2 kbp	

Filtro 2 : sonda PstI-BamHI pME177

Genoteca EcoRI Genómico EcoRI Genoteca HindIII Genómico HindIII

		12.0 kbp		
			8.5 kbp	
6.0 kbp	-----	6.0 kbp		
4.7 kbp	-----	4.7 kbp		
3.4 kbp			4.1 kbp	----- 4.1 kbp
2.4 kbp				
		1.6 kbp		

Figura 3.21 : Experimento de control del estado de la genoteca de DNA de endospermo de maíz (W64A+) construida sobre el vector lambda Charon-35 (Rigau et al, 1985; Gallardo et al., 1988), para los genes de zeina-II de 14 kD (Zc1) y de glutelina-2 de 28 kD (Zc2).

A : Gel de agarosa mediano 0.8 % :

m : marcador de peso molecular lambda cI857 HindIII + EcoRI

1 : DNA de la genoteca amplificada digerido con EcoRI

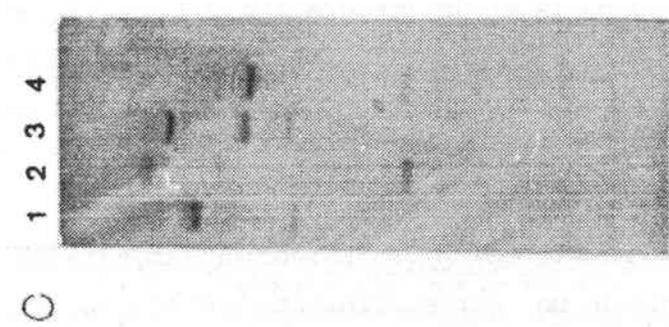
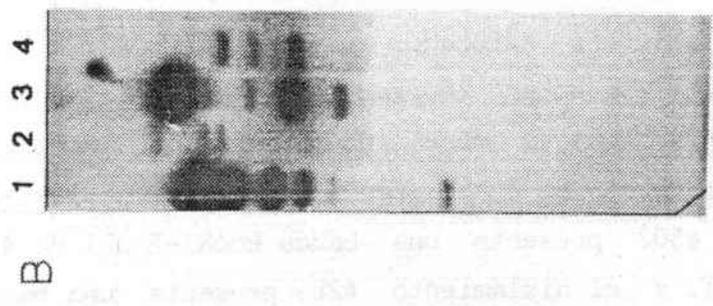
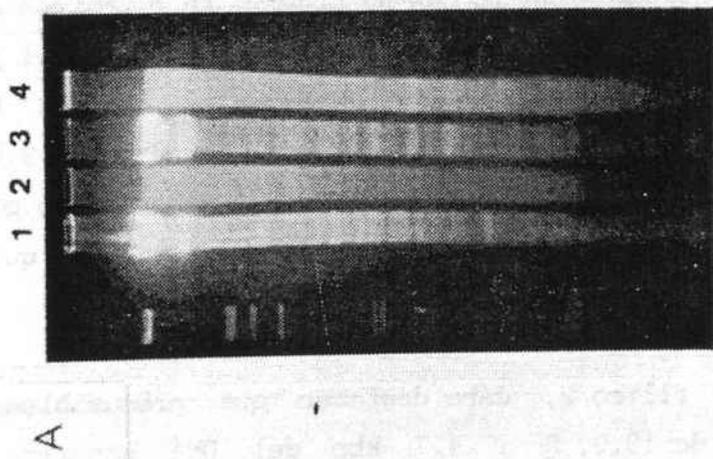
2 : DNA genómico de maíz digerido con EcoRI

3 : DNA de la genoteca amplificada digerido con HindIII

4 : DNA genómico de maíz digerido con HindIII

B : Autoradiografía del filtro de réplica después de hibridar con la sonda PvuI-XbaI de p22.3.

C : Autoradiografía del filtro de réplica después de hibridar con la sonda PstI-BamHI de pME177.



PvuI - XbaI p22.3 PstI - BamHI pME177

Respecto al filtro 1 la diferencia de señal, mucho más intensa en el DNA de la genoteca que en el DNA genómico indica una sobrerrepresentación de fragmentos homólogos a la sonda en la genoteca. Aunque no se puede excluir que esta 'amplificación' observada se produjera en la preparación del DNA de la genoteca, los resultados coinciden con lo observado en los diferentes procesos de búsqueda : aparecen siempre muchos más clones genómicos positivos a la sonda pME119 de los que se podrían esperar. Este efecto no se observa en el filtro 2. Así pues, cabe pensar que en la construcción y posterior amplificación de la genoteca se produjo un enriquecimiento que afectó, al menos, la región del genoma que comprende las secuencias homólogas a pME119, y no a las secuencias homólogas a pME177.

Los aislamientos agrupados en las clases #262, #264, #269, #270, #271 (que presentan reorganizaciones que afectan al brazo derecho del vector) y #268 (no reorganizado) contienen en el inserto el fragmento de 6 kbp EcoRI-EcoRI (28 aislamientos). El aislamiento #302 presenta una banda EcoRI-EcoRI de 4.3 kbp (2 aislamientos), y el aislamiento #289 presenta una banda EcoRI-EcoRI de 3.4 kbp. Así pues disponemos de bacteriófagos aislados de la genoteca que, de modo aproximado en su frecuencia de aislamiento, representan lo que se observa en el patrón de bandas EcoRI del DNA de la genoteca. Lo mismo ocurre para el patrón de bandas HindIII. La banda más representada en el DNA de la genoteca tiene una longitud aproximada de 8.5 a 9.0 kbp, y correspondería a la banda del mismo tamaño que se observa en todos los aislamientos que presentan reorganizaciones que afectan al brazo derecho (ver figura 3.11).

Para el filtro 2, cabe destacar que, presumiblemente, las bandas EcoRI de 12.0, 6 y 4.7 kbp del DNA genómico son las homólogas a pME119. La banda de 1.6 kbp EcoRI correspondiente a pME177 no se observa en el DNA de la genoteca. El patrón de

restricción HindIII es más claro, pues la banda característica de pME177 de 4.1 kbp se presenta con la misma intensidad tanto en el DNA genómico y como en el de la genoteca, mientras que la banda de 8.5 kbp HindIII presente en la genoteca corresponde a un cruce de la banda de recombinación. Cabe pensar, por lo tanto, que no se ha producido amplificación ni reordenación aparente en el caso de este gen.

Los resultados anteriores indican que la genoteca está especialmente enriquecida en una serie de secuencias que, en las condiciones de severidad empleadas en los procesos de búsqueda, no se pueden diferenciar de las homólogas a pME177. De ahí que, en todos los casos, se aislen clones genómicos homólogos a pME119 con la sonda pME117 o pME177. El aislamiento del clón genómico correcto para la sonda pME177 es posible empleando esta genoteca, puesto que contiene el gen correspondiente. No obstante, tal aislamiento resultaría difícil, pues sería necesario caracterizar un número de clones elevado (más del doble de los ya analizados).

3.4 PREPARACION DE UNA GENOTECA ENRIQUECIDA EN UN FRAGMENTO DE RESTRICCIÓN GENÓMICO

A partir de los resultados anteriores, y conociendo las fragmentos de restricción del genoma que contienen los dos genes en estudio se decidió abordar la búsqueda del genómico homólogo a pME177 construyendo una genoteca parcial. Una genoteca parcial se construye a partir de una colección de fragmentos de DNA seleccionados por algún criterio, por ejemplo por el tamaño después de una restricción completa del genoma. Este procedimiento permite construir una genoteca parcial a partir de los fragmentos de DNA genómicos aislados de un gel de agarosa, o fraccionados en un gradiente de sacarosa.

3.4.1 FUNDAMENTO

El gen pME119 está incluido en un fragmento de restricción HindIII de 3.1 kbp, claramente diferenciable por electroforesis en gel de agarosa del fragmento de 4.1 kbp que contiene el gen pME177. Así, a partir de una restricción completa de DNA genómico se pueden separar por electroforesis en gel fragmentos de diferentes tamaños, y aislar como una fracción separada una región estrecha que contenga los fragmentos de 4.1 kbp, pero no los de 3.1 kbp. De esta manera se puede construir una genoteca parcial, que contendrá fragmentos genómicos positivos frente a pME177 y negativos frente a pME119, con lo que se evita el problema del cruzamiento de señales.

Para poder estimar la cantidad de recombinantes (plasmídicos o bacteriofágicos) que sería necesario obtener para cubrir con seguridad la totalidad de los fragmentos aislados dentro de cada clase de tamaños se procedió a densitometrar negativos de fotografías de geles en los que se habían separado electroforéticamente alícuotas de DNA de endospermo digerido con HindIII. Los perfiles densitométricos obtenidos se representan en

la figura 3.22. A partir de estos perfiles se determinó que los fragmentos de restricción HindIII-HindIII del DNA de endospermo cuyos tamaños estaban comprendidos entre 5.0 y 3.5 kbp correspondían al 12.8% del genoma. Así pues, el troceamiento en 6 tiras de la banda de DNA comprendida entre los marcadores de 5 y de 3.5 kbp debía dar como resultado una distribución de aproximadamente un 2% del genoma para cada tira. Es decir, la complejidad de las secuencias de DNA aisladas en cada una de las tiras debía ser de 1.0×10^8 bp aproximadamente (pues la complejidad del genoma del maíz es de 5×10^9 bp (Bennet y Smith, 1976; Pedersen et al., 1980). Para el cálculo del número de recombinantes necesarios, con un inserto de 4 kbp, que permitan la clonación de un fragmento de DNA determinado, con una probabilidad de 0.99, se aplicó la ecuación siguiente (Maniatis et al., 1982), que fija el número de recombinantes en 115000.

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln\left(1 - \frac{\text{long.ins.}}{\text{(complejidad)}}\right)}$$

donde : P : probabilidad de hallar la secuencia (P=0.99)
 long.ins. : longitud del inserto en bp (4×10^3)
 complejidad : de la secuencia en bp (1×10^8)

Figura 3.22 : Estimación del porcentaje de genoma de maíz comprendido en cada clase de tamaños después de restricción HindIII. Densitometrado.

A : Gel de agarosa mediano 0.8 %. DNA genómico de maíz (W64A) digerido con HindIII (10 μ gr).

B : Densitometrado de un negativo, digestión HindIII del DNA genómico, y de los marcadores de peso molecular lambda cI857 HindIII + EcoRI + lambda cI857 HindIII.

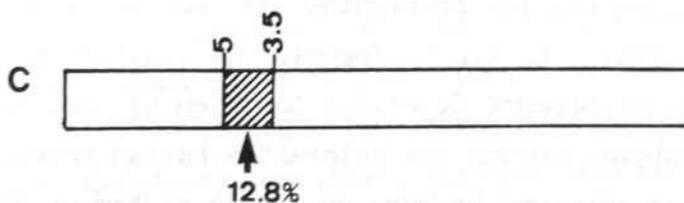
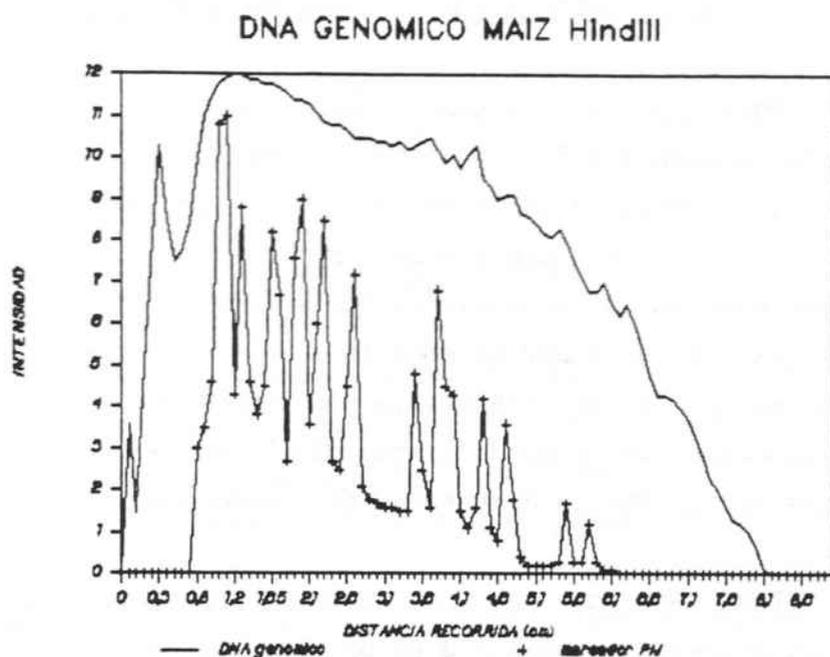
C : Representación del porcentaje de DNA genómico de maíz digerido con HindIII que se localiza entre las bandas de 5 y 3.5 kbp (12.8 %).

D : Porcentaje de genoma de maíz fragmentado con HindIII que se localiza dentro de cada clase de tamaños.

E : Posición de los marcadores de peso molecular (lambda cI 857 HindIII + EcoRI + lambda cI857 HindIII).



B



D

	pico	intervalo	porcenta.	
1	0	2.35	0.8	
2	2.36	8	3.9	
3	8.01	13.4	15.1	
4	13.41	15.15	2.0	
5	15.16	16.65	2.5	
6	16.66	20.45	10.9	
7	20.46	24.95	3.6	
8	24.96	28.65	7.8	
9	28.66	31.75	2.7	
10	31.76	34.6	2.2	
11	34.61	38.6	8.9	
12	38.61	41.55	2.7	
13	41.56	44.9	7.3	
14	44.91	50.65	8.8	
15	50.66	57.15	6.7	
16	57.16	61.5	2.8	
17	61.51	65.85	5.2	
18	65.86	69.25	1.0	
19	69.26	73.75	3.1	
20	73.76	87.15	0.3	
21	87.16	48.25	1.7	

E

longitud	posición
23130-21226	1.07
9416	1.34
6557	1.67
5148	2.04
4973	2.3
4361	2.65
4268	3.22
3530	3.54
2322	3.85
2027	3.96
1904	4.39
1584	4.72
1375	4.9
947	5.53
831	5.76

3.4.2 PREPARACION DEL FRAGMENTO DE RESTRICCION

Para poder aislar una cantidad manipulable, de aproximadamente 2-5 μ gr de DNA en cada una de las tiras (2% del total) se debían digerir de 100 a 500 μ gr de DNA de endospermo con HindIII. Se digirieron un total de 500 μ gr de DNA de endospermo en las condiciones que se describen en el ap. 2.4.4. Una alícuota de 5 μ gr se sometió a electroforesis en minigel de agarosa 0.5 %, se transfirió a nitrocelulosa y se comprobó, por hibridación con la sonda lambda cI857 marcada con 32 P por 'nick translation' que la digestión había sido completa.

Los 495 μ gr de DNA genómico restantes se sometieron a electroforesis preparativa en un gel grande de agarosa 0.8% de bajo punto de fusión (ver ap. 2.7.3), en el que se incorporaron como marcadores los fragmentos de restricción EcoRI+HindIII de lambda cI857. La electroforesis se realizó a 4°C a 50 V, y en ausencia de bromuro de etidio tanto en el gel como en el tampón de la cubeta. Cuando los colorantes habían penetrado unos 5 cm en el gel se adicionó bromuro de etidio al tampón de la cubeta. Una vez finalizada la electroforesis se visualizó el DNA por irradiación con luz UV de onda larga (302 nmt) y se cortaron 4 tiras entre 5 y 3.5 kbp (entre los fragmentos 2 y 5 del marcador) de una anchura equivalente. Cada una de estas tiras se colocó en el interior de un tubo de policarbonato estéril que se conservó, protegido de la luz, a 4 °C hasta la elución del DNA.

El DNA de las tiras 1 a 4 se eluyó del gel de agarosa por fusión de ésta y separación por medio de un "elutip" (ver ap. 2.7.3). El DNA de cada banda se resuspendió en 20 μ l. En un minigel de agarosa 1% se sometieron a electroforesis alícuotas de 1 μ l de cada una de las bandas. Este gel se transfirió a nitrocelulosa y se hibridó con la sonda PstI-BamHI de pME177, en las condiciones descritas en el ap. 3.2.2. Después de exposición autorradiográfica de 17 d a -70°C con una pantalla amplificadora

se observó que la fracción que presentaba señal positiva a la sonda PstI-BamHI de pME177 es la que correspondía a la tira 3 (ver figura 3.25).

3.4.3 PRIMERA APROXIMACION : CLONAJE EN PLASMIDO

La necesidad de obtener un número elevado de recombinantes con insertos del mayor tamaño posible (para que una genoteca de DNA genómico de un organismo superior como es el maíz fuera representativa), descartó el uso de los plásmidos como vectores, a causa, fundamentalmente, de su limitada eficiencias de transformación. Por lo general los plásmidos se emplean de modo eficiente para la preparación de genotecas representativas de organismos con baja complejidad genómica (como es el caso de las bacterias), o bien como vectores de clonaje de secuencias expresadas (como ocurre para el DNA de doble cadena obtenido a partir de mRNA). Sin embargo, se han descrito construcciones plasmídicas de genotecas parciales, enriquecidas en la secuencia de interés. Nicholls y col. (1985) describieron un método simple para clonar un fragmento genómico cuyas dianas flanqueantes en el genoma son conocidas. El método se basa en la digestión del DNA genómico con los enzimas que cortan alrededor del fragmento de interés, pero no en el interior de la secuencia que se desea estudiar. De ese modo se reduce la cantidad de DNA genómico en la fracción de tamaños grandes así como la complejidad de la secuencia en la banda que se aísla. Esta técnica está especialmente adaptada para el aislamiento repetitivo de mutantes y de variedades polimórficas del mismo locus (Higgs et al., 1983; Collins et al., 1984; Hill et al., 1985; Nicholls et al., 1985). Así, Nicholls (Nicholls et al., 1985) describe estimas teóricas del número de fragmentos de restricción de 6.8 kbp del genoma haploide humano (3×10^9 bp) cuando se digiere con varios enzimas de restricción (que reconocen dianas de 6 nucleótidos). Con uno sólo, el número de fragmentos sería 88000, pero cuando son 6 los enzimas empleados el número de fragmentos sería de 28, y si

aquellos son 8 se obtendría un fragmento único.

3.4.3.1 Diseño del clonaje

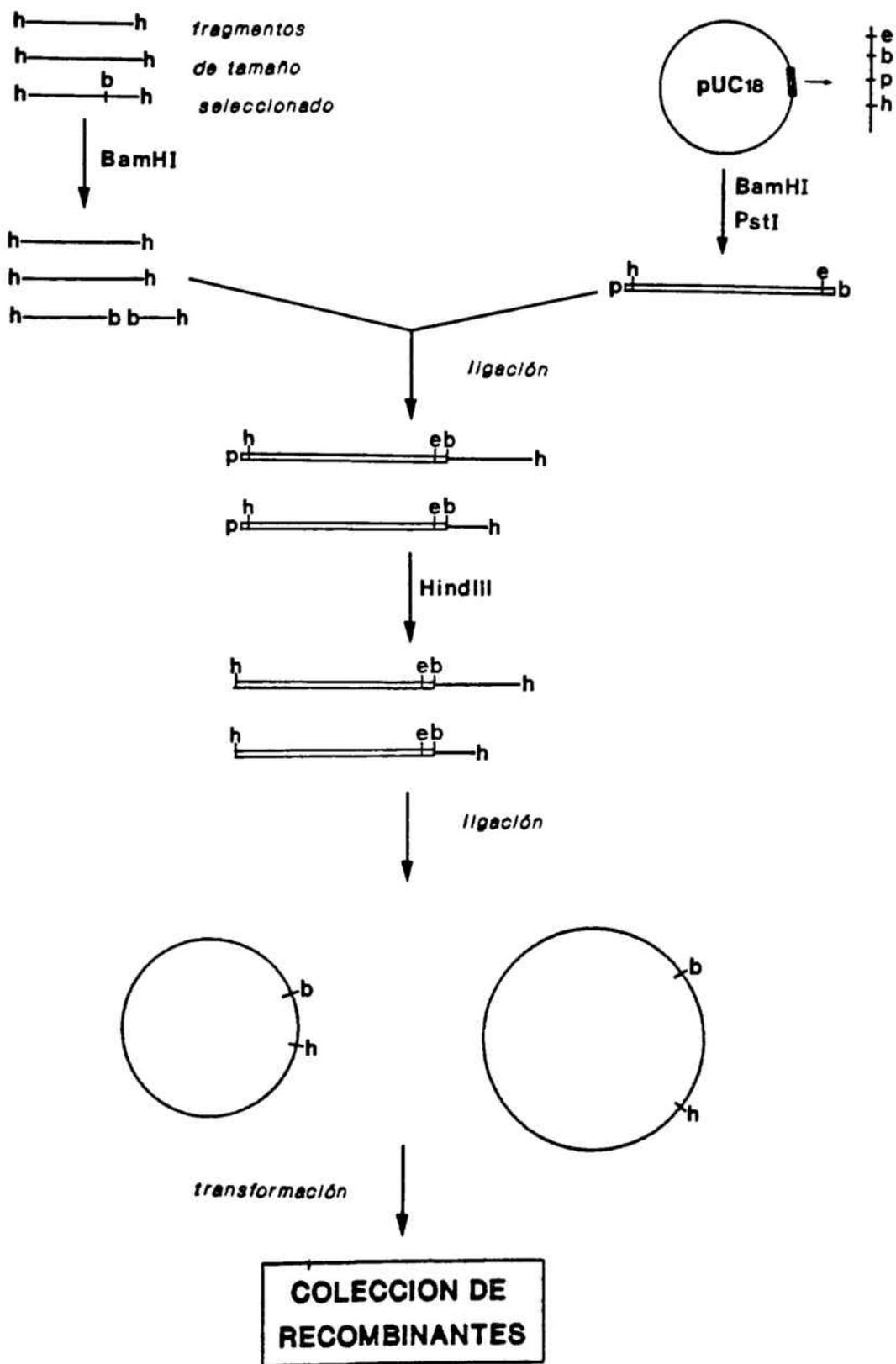
En nuestro caso, no se disponía de información sobre las dianas flanqueantes pero sí se sabía que el cDNA homólogo, pME177, presenta una diana BamHI. A partir de la asunción de que esta diana podía mantenerse en el clon genómico, se proyectó cortar parte del DNA purificado de la fracción 4 con BamHI y, seguidamente, realizar un clonaje dirigido hacia las dianas HindIII - BamHI del plásmido pUC18 (ver figura 3.23). De este modo, el número de recombinantes necesario debía ser mucho menor, si bien se obtendría el fragmento genómico troceado.

3.4.3.2 Construcción de la genoteca en pUC18.

Búsqueda con la sonda PstI-BamHI de pME177.

Se digirieron 200 ng de DNA de la fracción 3 con un exceso (10 veces) del enzima BamHI. El vector pUC18 se digirió completamente con los enzimas PstI y BamHI y se desfosforiló (ver ap. 2.4.1, 2.4.2 y 2.9.3.1). Se mezclaron 200 ngr de fragmento digerido y 100 ngr de vector cortado y desfosforilado, y se precipitó con etanol. La ligación se realizó en 30 µl con T4 DNA ligasa (ver ap. 2.12.3). Los productos de ligación se precipitaron con acetato sódico y etanol y se resuspendieron en 50 µl de agua. Se digirió con un exceso (10 veces) del enzima HindIII. Después de eliminar el enzima y precipitar se resuspendió en 400 µl de agua y se ligó con T4 DNA ligasa para cerrar el plásmido. Se precipitaron los productos de ligación y se resuspendieron en 20 µl de agua.

Figura 3.23 : Procedimiento de construcción de una genoteca enriquecida en fragmentos genómicos que contienen el gen de zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) de maíz W64A en plásmido pUC18 (b = BamHI, e = EcoRI, h = HindIII, p = PstI).



Con una alícuota de la ligación se transformaron células competentes E. coli HB101 preparadas según el protocolo de alta eficiencia de Hanahan (1985) (ver , ap. 2.11.2). Con toda la ligación se obtuvieron 1215 recombinantes.

Después de repicar los recombinantes se prepararon réplicas en nitrocelulosa de las colonias (ver ap. 2.8.6). Estas réplicas se hibridaron con la sonda PstI-BamHI de pME177, en las condiciones descritas en el ap. 2.10.4. Después de una exposición autorradiográfica de 12 h a -70°C con una pantalla amplificadora se observaron muchas señales positivas. Se escogieron las 12 señales más intensas. Se había observado en otros experimentos en el laboratorio que, al hibridar sobre colonias de bacterias, muchas de ellas daban señal artefactual. Sin embargo, dado que en el presente experimento parecían distinguirse colonias cuya señal era más intensa que las demás se consideró que tales colonias podían ser positivas.

Se efectuó una minipreparación de DNA (ap. 2.3.3.2) de todos los recombinantes positivos. La digestión de este DNA con HindIII y BamHI liberó insertos de tamaños que oscilaron entre 0.32 y 2.3. Transferido el gel a nitrocelulosa e hibridado con la sonda PstI-BamHI de pME177 no apareció señal positiva en ningún caso. Así pues, los recombinantes considerados positivos, en realidad eran artefactuales.

3.4.4 SEGUNDA APROXIMACION : CLONAJE EN BACTERIOFAGOS

Los bacteriófagos, junto con los cósmidos son los vectores de elección en la preparación de las genotecas de organismos superiores debido a su capacidad de clonaje y a la eficiencia del proceso de transfección. Así entraba dentro del margen de lo posible la obtención de 120000 recombinantes a partir del DNA de la fracción 3.

3.4.4.1 Diseño del clonaje

El vector escogido fue lambda NM1150 (Murray, 1983). Se trata de un bacteriófago lambda (ver ap. 2.1.2 y figura 2.3) que presenta dos dianas únicas (EcoRI y HindIII) en el interior del gen *imm434*. Para crecer requiere una cepa receptora *supF*, y en nuestro caso se empleo *E. coli* Y1090. Es un vector de inserción de 38727 bp que admite insertos desde 0 hasta 8.5 kbp. La selección de los recombinantes se puede realizar por siembra sobre una cepa lisogénica para un bacteriófago del grupo de inmunidad 434. La inserción de un fragmento de 4 kbp debería formar bacteriófagos recombinantes de 42.7 kbp. Es conocido que la eficiencia de empaquetamiento del bacteriófago lambda decrece en casi un 10% respecto al tipo salvaje por cada kbp de diferencia respecto a éste. De este modo, los recombinantes se empaquetarán de modo preferente y se puede obviar la selección sobre la cepa lisogénica.

3.4.4.2 Preparación del DNA del vector

El bacteriófago fue cedido por el Dr. A. Boronat en forma de bacteriófago bandeado en cloruro de cesio. Se tituló el lisado sobre *E. coli* Y1090, y se empleó para preparar un crecimiento en 1 litro de medio LB tal como se describe en el ap. 2.3.4.2. El rendimiento obtenido de la purificación resultó ser de 10 a 20 veces superior al que se consigue con lambda Charon35. Se obtuvieron 5.4 mgr de 1 litro de cultivo.

Una alícuota de DNA del vector lambda NM1150 de 10 µgr fue ligada por los extremos cos por incubación a 42°C en 0.1 M Tris pH 8.0 10 mM MgCl₂ 1 h, completando hasta el tampón de ligación (ver ap. 2.12.3) y añadiendo T4 DNA ligasa, durante 2 h a 37 °C. Posteriormente fue digerido el DNA con un exceso (5 veces) del enzima HindIII, tal como se describe en el ap. 2.4.1, y desfosforilado como se describe en el ap. 2.9.3.1.

3.4.4.3 Construcción de la genoteca enriquecida en lambda NM1150

Se mezclaron 400 ngr de vector (lambda NM1150 HindIII desfosforilado) con 90 ngr de inserto (fracción 3). La muestra se llevó hasta un volumen de 9 µl. Se separó 1 µl que se conservó a -20°C como material de control previo a la ligación. La solución de ligación se calentó 10 min a 65°C y se colocó en hielo. Se añadió 2 µl de tampón de ligación (ver ap. 2.12.3) y 0.5 µl de T4 DNA ligasa (NEN). La solución se incubó en un baño de agua durante 22 h en un gradiente de temperatura de 13°C hasta 20°C. Una alícuota de 1 µl de la solución de ligación se sometió a electroforesis en minigel de agarosa 1% simultáneamente al control de ligación (ver figura 3.25). La solución de ligación se mantuvo a -20°C hasta el momento en que se procedió al empaquetamiento "in vitro".

El empaquetamiento "in vitro" se realizó en dos experimentos separados, con 5 µl de la solución de ligación tal como se describe en el ap. 2.12.4.2.2. Los extractos de empaquetamiento que se emplearon fueron los descritos en el ap. 2.12.4.1. En el primer empaquetamiento se consiguieron 45000 u.f.p. y en el segundo 72000 u.f.p. Se obtuvieron un total de 117000 u.f.p.

Para evitar la caída en el título se plaqueó inmediatamente la totalidad de los recombinantes a razón de 2000 u.f.p./placa de 9 cm ø sobre la cepa E. coli Y1090.

Figura 3.24 : Procedimiento de construcción de una genoteca enriquecida en fragmentos genómicos que contienen el gen de zeina_II de 16 kD (Z16, Zc1) de maíz W64A en el vector fágico lambda NM1150 (c = secuencias cos, b = BamHI, h = HindIII).

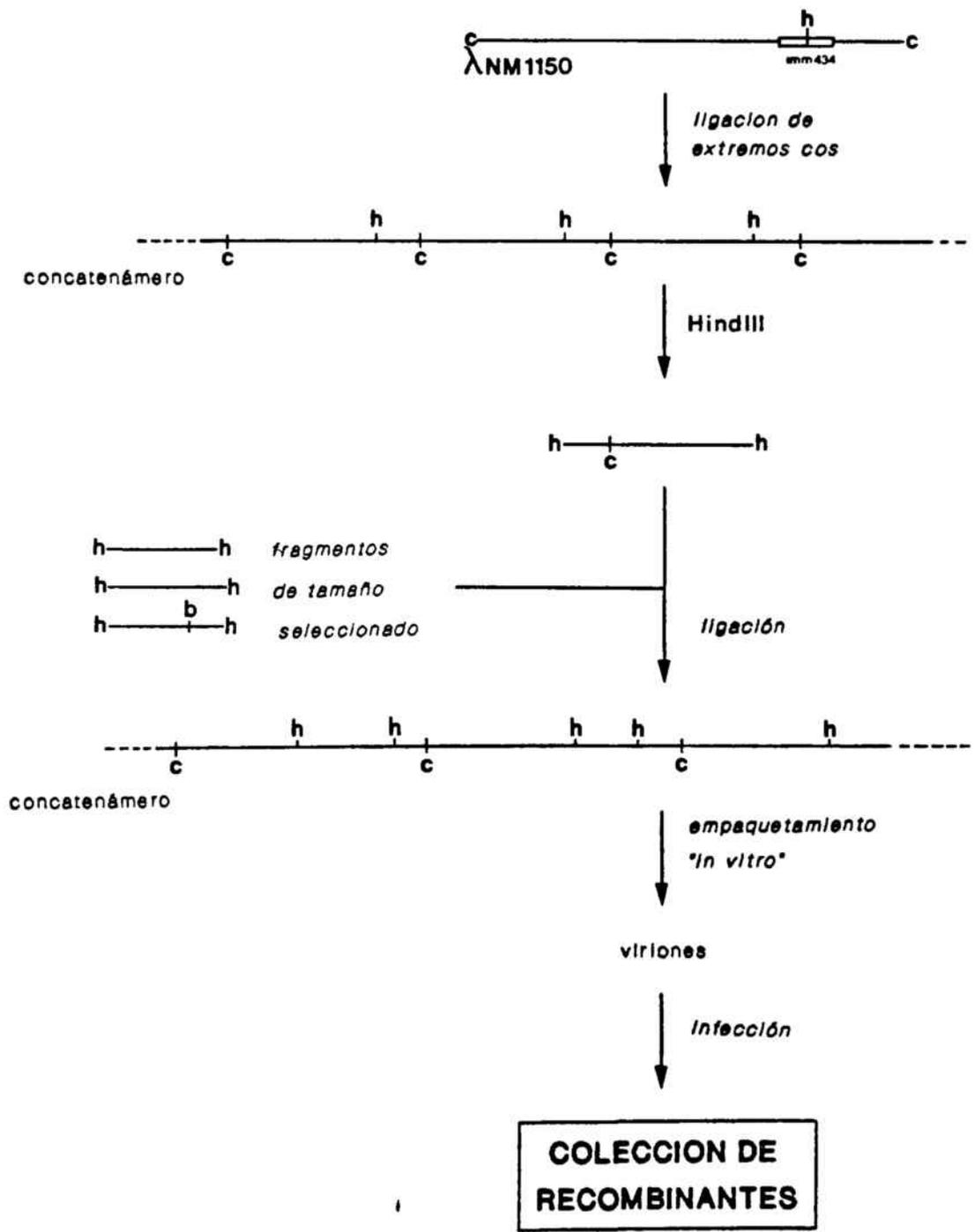


Figura 3.25 : Construcción de una genoteca de maíz W64A enriquecida en los fragmentos que contienen el gen de zeina-II de 16 kD (Z16, Zc1), en la diana HindIII del vector lambda NM1150.

A : Gel de agarosa 0.8 %. Fragmentos de restricción HindIII del DNA genómico de maíz. Se indica la posición de los marcadores de peso molecular de 5.0 y 3.5 kbp que delimitan una zona que se fragmentó en cuatro partes, f1 a f4.

B : Minigel de agarosa 0.8 %. Alícuota de las fracciones f1 a f4 eluidas de un gel preparativo. m es marcador de peso molecular lambda cI857 HindIII + EcoRI.

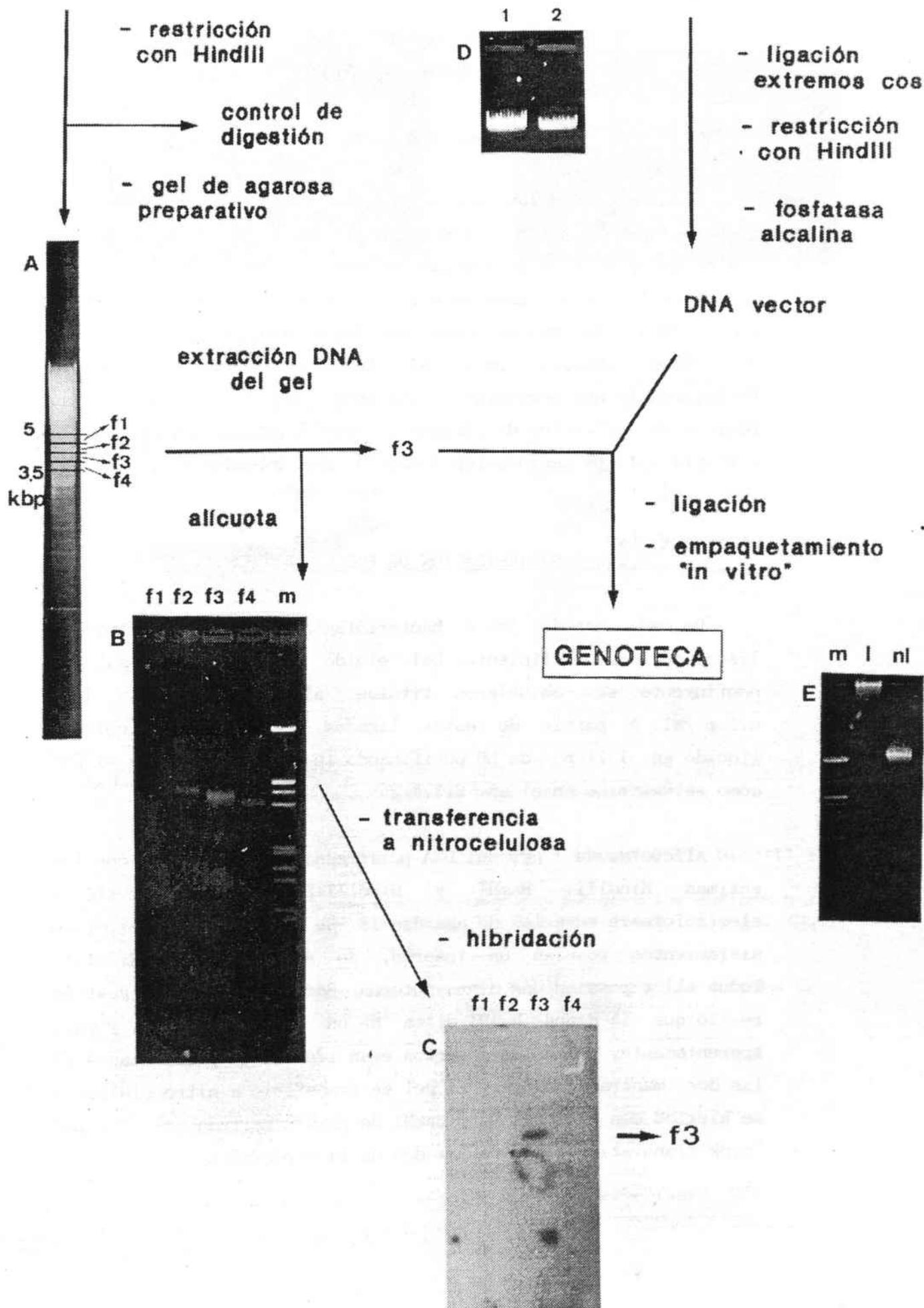
C : Autoradiografía del filtro réplica del gel B después de hibridar con la sonda PvuI-XbaI de p22.3 marcada por "random primer" (exposición de 17 d a -70°C con pantalla amplificadora).

D : Gel de agarosa 0.5 %. Control del estado del DNA del vector lambda NM1150 (2) comparado con el marcador de peso molecular lambda cI857 (1).

E : Control de ligación. Minigel de agarosa 0.6 %.
m : marcador peso molecular lambda cI857 HindIII + EcoRI
nl : DNA del vector + DNA de f3, antes de ligar
l : DNA del vector + DNA de f3, después de ligar

DNA maíz (W64A)

DNA vector
(lambda NM1150)



3.5. BUSQUEDA DEL FRAGMENTO GENOMICO HOMOLOGO

AL CLON CDNA PME177

3.5.1 BUSQUEDA

De cada una de las placas de la genoteca enriquecida se obtuvo una réplica en nitrocelulosa como se describe en el ap. 2.8.5. Estos filtros se hibridaron con la sonda PstI-BamHI de pME177 en las condiciones de hibridación y lavado descritas en el ap. 2.10.4. En exposiciones autorradiográficas de 12 h se observaron señales positivas intensas, entre las que se escogieron 14 que presentaban una señal más fuerte (Z1 a Z14). Después de dos ciclos de plaqueo y repurificación (ver ap. 3.1.1. y figura 3.1) se mantuvieron 5 señales muy intensas (Z2, Z3, Z9, Z10 y Z14).

3.5.2 CARACTERIZACION DE LOS CLONES POSITIVOS

De cada una de los 5 bacteriófagos aislados se preparó un lisado de título suficiente. Del eluido de una placa a lisis confluyente se obtuvieron títulos alrededor de 3×10^{10} u.f.p./ml. A partir de estos lisados se realizó un cultivo líquido en 1 litro de LB purificando los bacteriófagos y el DNA como se describe en el ap. 2.3.4.2.

Alícuotas de 1 μ gr del DNA purificado se digirieron con los enzimas HindIII, BamHI y HindIII+BamHI y se sometió a electroforesis en geles de agarosa 1%. Se confirmó que los cinco aislamientos poseían un inserto, de 4.1 kbp HindIII-HindIII. Todos ellos poseían una diana interna BamHI. La doble digestión reveló que la diana BamHI dista de un extremo 2,5 kbp, y que, aparentemente, todos los insertos eran idénticos y orientados de las dos maneras posibles. El gel se transfirió a nitrocelulosa y se hibridó con la sonda PstI-BamHI de pME177 marcada con 32 P por "nick translation". Los resultados de la exposición

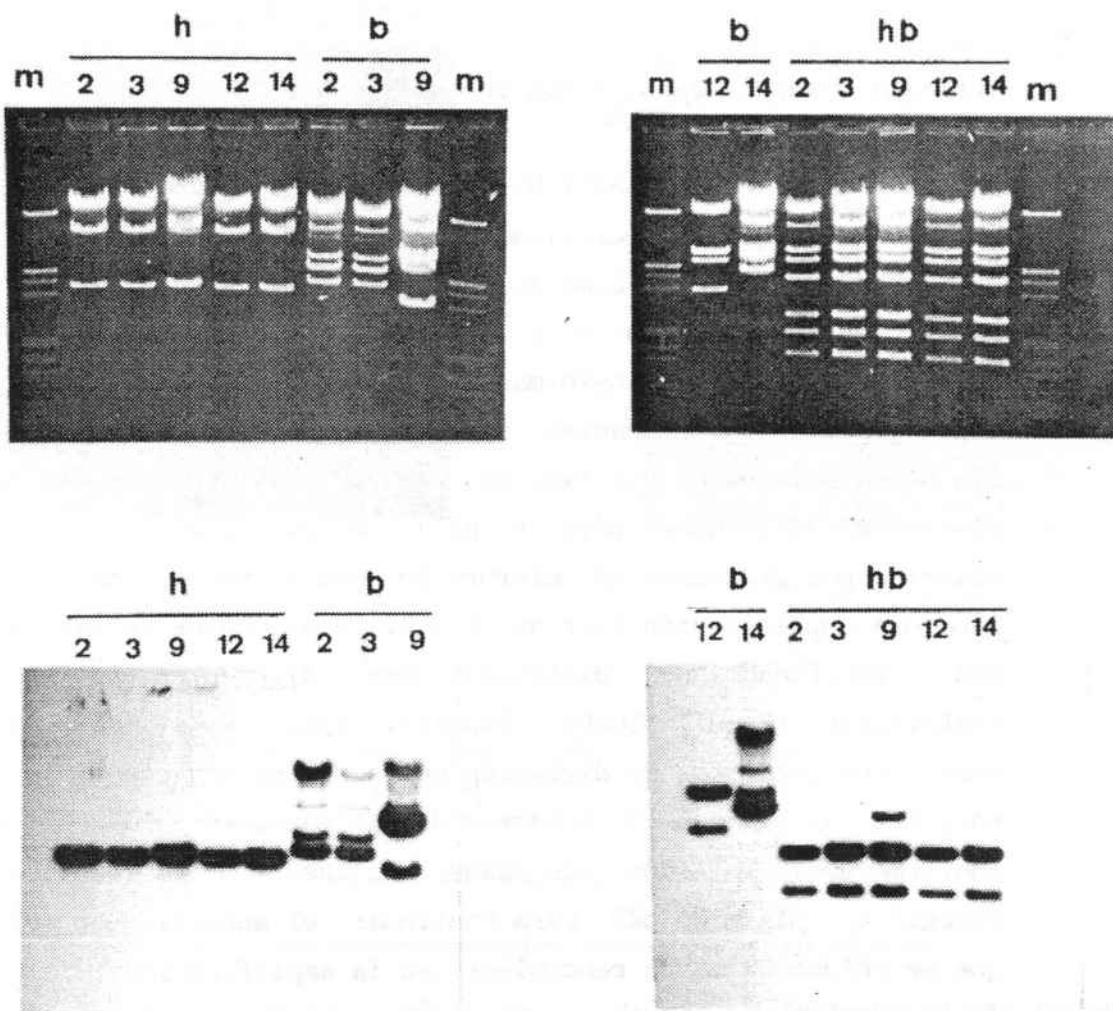


Figura 3.26 : Caracterización de los aislamientos Z2, Z3, Z9, Z12 y Z14, positivos a la sonda PstI-BamHI de pME177.

A : Geles de agarosa medianos 0.7 %

m : marcador de peso molecular lambda cI857 HindIII + EcoRI

y los productos de restricción para los enzimas h : HindIII y b : BamHI de los aislamientos 2 : Z2, 3 : Z3, 9 : Z9, 12 : Z12 y 14 : Z14.

B : Autoradiografía de los filtros de réplica después de hibridar con la sonda PstI-BamHI de pME177.

autorradiográfica se muestran en la figura 3.26.

Los fragmentos HindIII-HindIII de 4 kbp de los aislamientos Z2, Z3, Z10 y Z14 se purificaron a partir del gel por la técnica de DEAE celulosa, tal como se describe en el ap. 2.7.2. Estos fragmentos se clonaron en la diana HindIII del vector pUC18 (ver ap. 2.12.3) y se transformaron células competentes (ver ap. 2.11.3). Los recombinantes se comprobaron mediante el uso de minipreparaciones de DNA (ver ap. 2.3.3.2). Así se obtuvieron los plásmidos pZ2, pZ3, pZ10 y pZ14. Se purificó el DNA de cada plásmido por gradiente en cloruro de cesio después de llevar a cabo una amplificación (ver ap. 2.3.3.1). Alícuotas de 0.5 µgr de DNA purificado se digirieron con diferentes enzimas de restricción (BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, PstI, SacI, SallI y XbaI). Los productos de digestión se sometieron a electroforesis en geles de agarosa 1%. A partir de los patrones de digestión se confirmó que, en todos los casos, el inserto era idéntico. Se escogió el plásmido pZ3 para continuar el análisis por ser del que se obtuvo un mayor rendimiento en la amplificación.

Diversas digestiones, sencillas y dobles, con los enzimas de restricción antes citados, además de digestiones con BglII, HinfI, KpnI, NcoI, PvuI, SmaI y XhoI, permitieron definir un mapa físico del inserto del plásmido pZ3 (ver figura 3.27).

Figura 3.27 : Mapa de restricción del inserto del plásmido pZ3

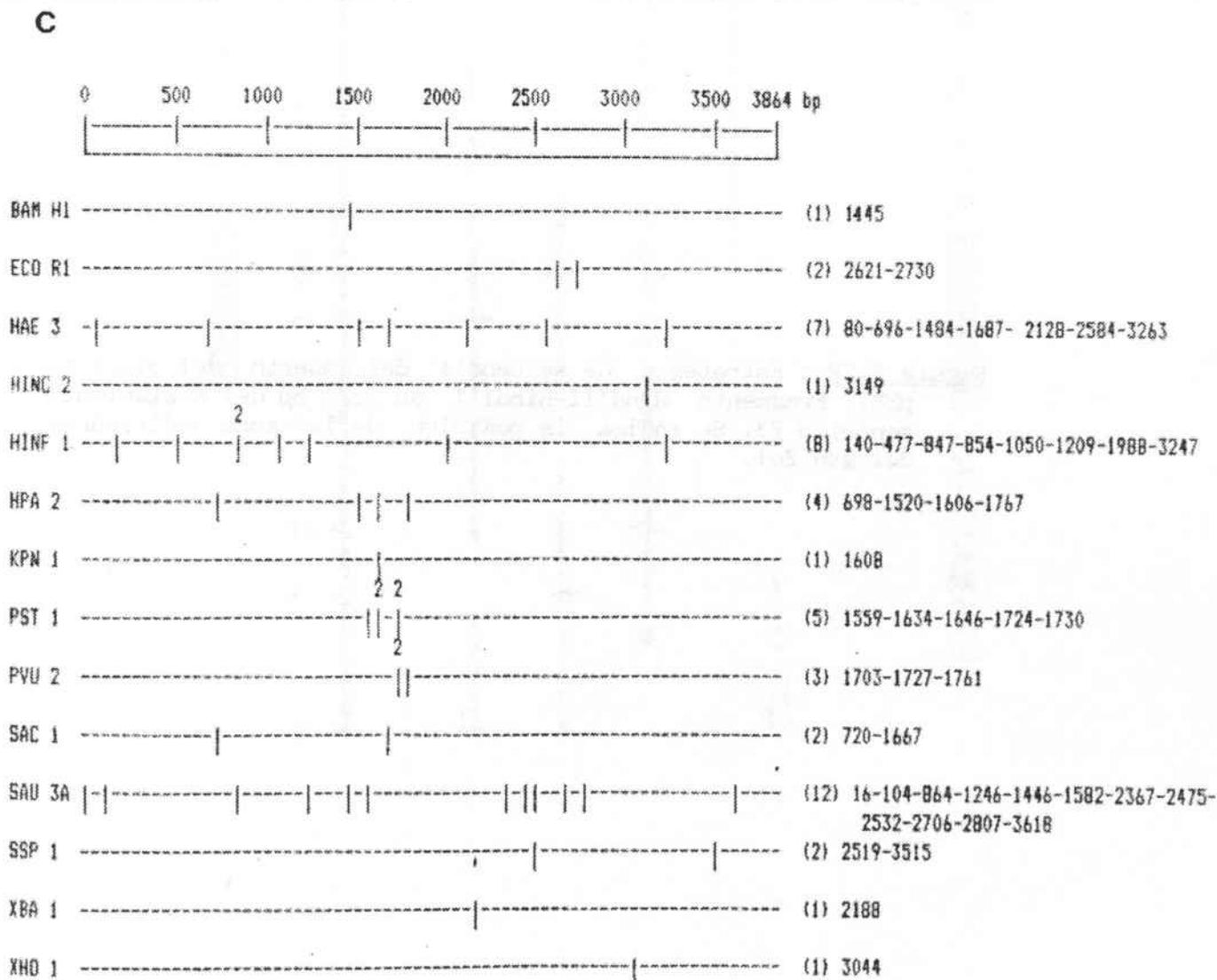
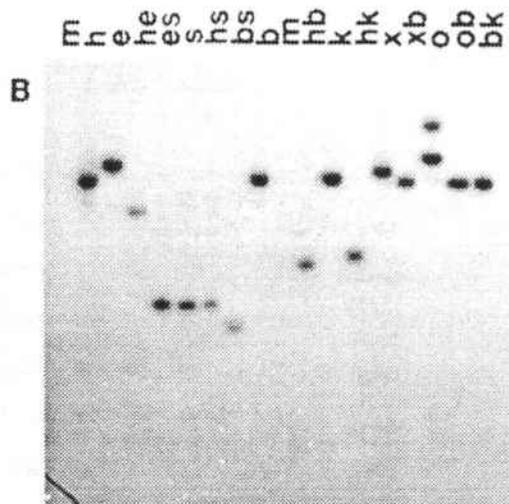
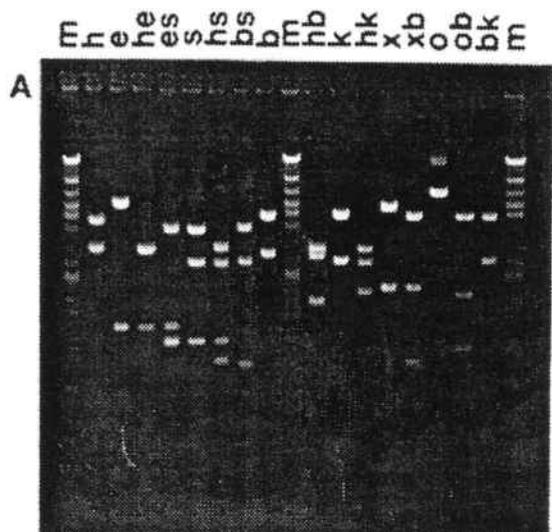
A : Gel de agarosa 0.8 %

m : marcador de peso molecular lambda ci 857 HindIII + EcoRI + lambda ci857 HindIII

y los productos de restricción del plásmido pZ3 para los enzimas b : BamHI, h : HindIII, e : EcoRI, k : KpnI, s : SacI, x : XbaI, o : XhoI.

B : Autorradiografía del filtro réplica del gel hibridado con la sonda PstI-BamHI de pME177 marcada por 'nick translation'

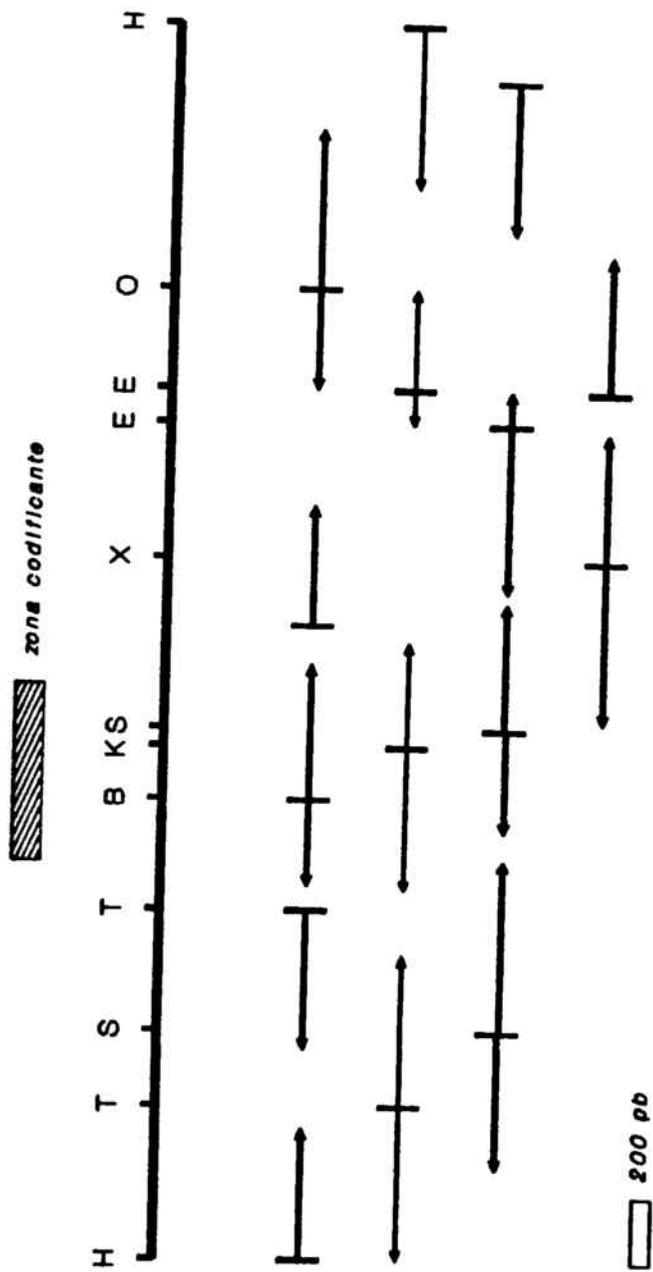
C : Localización física de las dianas de restricción para algunos enzimas. La posición exacta se ha obtenido a partir del estudio de la secuencia de nucleótidos (figura 3.28).



3.5.3 SECUENCIA DEL INSERTO DEL PLASMIDO PZ3

Conocido el mapa físico del inserto se procedió a secuenciar la totalidad de éste por el método de Sanger (ver ap. 2.13) y, para ello, se obtuvieron los subclones necesarios en M13mp18/19 por clonaje dirigido (ver ap. 2.12). Como isótopo trazador se empleó ^{35}S en forma de $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP. Los geles empleados tenían un gradiente de espesor de 0.25 a 0.5 mm tal como se describen en el ap. 2.5.3. Con estos geles y el marcaje con ^{35}S fue posible leer entre 450 y 500 bp por gel y clon en dos cargas sucesivas. La secuencia determinada del inserto del plásmido pZ3 (3870 bp) se reproduce en la figura 3.31.

Figura 3.28 : Estrategia de secuencia del inserto del plásmido pZ3. Fragmento HindIII-HindIII de 3870 bp del aislamiento genómico Z3. Se indica la posición de la zona codificante del gen Zc1.



ESTRATEGIA DE SECUENCIA DEL INSERTO DE pZ3

10	20	30	40	50	60
AAGCTTTTCA	CCACCCAGTG	TGATCGCATA	TCCAATACTC	GTTAAGAAGA	AGAATGAGAG
70	80	90	100	110	120
CTGGAGTATG	TGTGTCGATT	ACATGGGCCA	TAACAAGGTG	TGTCCAAAAG	ATCCACTACA
130	140	150	160	170	180
ATGCACATTC	GAGCCTAGCA	ATCAGGATTC	AAATGGACAC	CGAGATGATG	GACACAACGA
190	200	210	220	230	240
TGTATACACA	AATCCAACAT	GGTTTGGTTG	AGCATGTGTG	GGGCGTAATC	ATCATTAGAT
250	260	270	280	290	300
TTATGTAATT	TTCTATTAAT	TATTATGTAA	TTTTCTAATT	GTAATGTACT	TTTCTTTTAA
310	320	330	340	350	360
TTAGTATACA	CTTTGTAATT	TTTAATTTAA	TAAAAATCTA	TTATATATAT	ATTGTATGAT
370	380	390	400	410	420
TTGTAAGCGT	TAAACAATCT	AAGTGATTAC	TTAATTCTGA	AATATAAAAG	CTGATGTGCC
430	440	450	460	470	480
TGTGAGCCGA	GGCTATAACC	TGTGTAGGCT	ATACACTGGA	GCATTAGGGA	CGAGAGTACG
490	500	510	520	530	540
TGGAGTCGAG	AGCTGATGTG	GCAAGTGCGA	GAAAGTGATG	GTGCACTGGC	AATAGTAAAG
550	560	570	580	590	600
ACGGATTGTG	ACTAGGCTCA	AGGCGCCACC	ACCACTGTCT	AAAACAAGTC	ACACAAGTTT
610	620	630	640	650	660
CAAACGTCTT	CTTGCCGTGT	CTCACGAATT	GCAACATTCT	TGTCGGAAGA	GCCACTGTAT
670	680	690	700	710	720
TCACGGGTAA	TCTCAGCACG	TTATAAAGTG	GTGAGGAACG	CGGCCGGAAC	AACCATTGGC
730	740	750	760	770	780
ATGTAGAGCT	CCATATATGA	GTTGGTGTTA	TCCACCACAA	CTCGCAGAAC	ATCACAAAAT
790	800	810	820	830	840
GTACATCAAG	CAGCGATTAA	TTGGGTGAGA	AACAAATCGG	GCGTCTCTCC	GTGTACAATG
850	860	870	880	890	900
AAATATAATG	GTGAGTCACG	AGTCACGCTG	ATCTGATGTA	TATATGCTAA	TAGCTCGCAC

Figura 3.29 : Secuencia del inserto del plásmido pZ3. Fragmento HindIII - HindIII de 3870 bp que contiene el gen de zeina-II de 16 kD (Z16, Zc1). Se ha subrayado la secuencia codificante.

910 920 930 940 950 960
 GACATTGCAA ACAACTCATA CCACTACATT ACAGAGTTAG TTTCGTGAAA AGCAAGAGTA
 970 980 990 1000 1010 1020
 GGACGGAGAG GAAAATAATC CTTGACGACG TGCACATGAG CCACACGCAA GAGTACTGAA
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 TAAATCCAGA TGAACCCCTCC AAAAGTGAAT GAGATGAGTC ATGTATACAT TTGGCAAGAA
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 ACCGTAGAAG CTACCGCCAT CGATTTTCATC ATAGAAGAAG AAATTGTGGT AATCGGAAAG
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 CTATAAATAA CCGTCTATGC CTATGGCACT TCTCCACCAC CACCACTGGA CGTCAGCCTA
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GCAATTAGCT CATCGACTCC AGATTGGAGA ACTCGACACC ATGAAGGTGC TGATCGTTGC
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 CCTTGCTCTC CTGGCGCTCG CTGCGAGCGC CGCCTCCAGT ACAAGCGGCG GCTGTGGCTG
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 CCAGACACCA CGTTTTTCATC TACCGCCTCC GTTCTATATG CCGCCTCCGT TCTATCTGCC
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 GCCGAGCAG CAGCCGCAGC CATGGCAATA CCCCACTCAA CCACCGCAGC TAAGCCCCTG
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 CCAGCAGTTC GGATCCTGCG GCGTCGGCAG CGTCGGCAGC CCGTTCTCTGG GCCAGTGCCT
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 CGAGTTCCTG AGGCACCAGT GCAGCCCGGC GGCGACGCCC TACGGCTCGC CACAGTGCCA
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 GGCGCTGCAG CAGCAGTGCT GCCACCAGAT CAGGCAGGTG GAGCCGCTGC ACCGGTACCA
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 GGCGACATAC GGTGTGGTCC TGCAGTCCTT CCTGCAGCAG CAGCCGCAAG GCGAGCTCGC
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 GGCGCTGATG GCGGCCCAGG TAGCGCAGCA GCTGACGGCG ATGTGCGGTC TGCAGCTGCA
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 GCAGCCAGGT CCCTGCCCTT GCAACGCAGC TGCCGGCGGT GTCTACTACT GAGGAAACTA
 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 TGTACTGTAG TAATAATGTA ATGGAGCCGC TGACTAGCTA CCTATAGCTA GTTCACTCGT
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 TTAGCGGCGA TGAGTAACGG AGTGTACCCC ATCACCATGG GTGGCAGTGT GAGCAATGAC

1930	1940	1950	1960	1970	1980
CTGAATGAAC	CATTGAAATG	GAAAGGAATA	ATATATAGGG	AAAAAGGATG	TTTGGAAACT
1990	2000	2010	2020	2030	2040
GATAGTTGGT	TCTGAGTCTT	GCTATCGAGG	ATGGGAGATA	CAACTCTTTT	ATTTAAGGAG
2050	2060	2070	2080	2090	2100
GGATGAGAGA	AATGTTGGTG	GTCACTAAAA	AAAGGAGGGA	TGTTGGGGGA	TTGCTCGAGG
2110	2120	2130	2140	2150	2160
CAAAAAGAAA	GTATACTAAT	ACTAGATATG	GTAGGCCCTT	CGTTGCCACG	GAAGTTAAAA
2170	2180	2190	2200	2210	2220
ATTAGTAAAA	CATATATATA	CCGAACACCA	TGGTCTAGAC	AATGCTAGTG	AAACTGAAAT
2230	2240	2250	2260	2270	2280
AAAAATAGCT	ACATAATTGC	TTAAATAGTT	ATACAACCTG	TAGCACAAAC	AAAACAAAGT
2290	2300	2310	2320	2330	2340
TGGGCATAAC	GTTAAGTGAC	ACTTCTCTTG	TATCAGGCTT	GGACTATGTC	CTGGCTAATG
2350	2360	2370	2380	2390	2400
CTTGTAGCCT	TTGAACATTA	TCAGGACCCA	TTGATCACTA	CACTCTACTT	GCACTATAGC
2410	2420	2430	2440	2450	2460
AATCTCCAAA	TCCTTAGGTG	GTGGGGGCAT	CTGTTTCATG	ATTTATGGAG	CATCATTAT
2470	2480	2490	2500	2510	2520
CCTGCAAACA	TTTTGCATGG	GATCAGGACT	TGCATATCAC	AACTGTTGAA	TTTGGACAGA
2530	2540	2550	2560	2570	2580
ATAAAATATT	TTGTGTAGAT	CAAAGAAGTC	CCAATGATGT	TTTTGGCAAG	GTGTGCATTT
2590	2600	2610	2620	2630	2640
GTGTTTCTAG	GCCTTTTAAT	GGCAGTGAAC	TTCCTATAAG	ATTTTAGAAT	TCCTGACAGC
2650	2660	2670	2680	2690	2700
TAAAAAATA	AGAAAACTTC	TTCATGGTAG	TAAGTAGCAG	CAAGCGGCAC	TATATGAAAG
2710	2720	2730	2740	2750	2760
ATAAACTAA	TGATCCTAAA	AAGAGCTAGC	AGATTGAATT	CTACATAGAA	TGTCTTACTG
2770	2780	2790	2800	2810	2820
TTGTCAAGCG	TCGAAGACCA	GATTTGGATA	GCAAGAATGT	AAACTTAAAT	GTGATCTCAG
2830	2840	2850	2860	2870	2880
TTTGGTAGTC	CCTTCAACAC	TGCCAAAAGG	AGTATATTCC	TGAATTGCGA	CAGGCATATA
2890	2900	2910	2920	2930	2940
GGATGCATGC	CCATGATAAA	GAAAAAAAAT	CTCTTATATG	CTATGAAAAA	TGTAGGCATC

2950	2960	2970	2980	2990	3000
TAATAACAAA	TGGGACTGAA	TGTTTTAGAT	GAATATATCA	CTTCAAAAAGA	TTTTAAATAA
3010	3020	3030	3040	3050	3060
GTGCAATAAC	AATTCAAAAC	ACACTCTTTC	AAAATTCTGA	GTATATTATC	TCGAGTTTGG
3070	3080	3090	3100	3110	3120
CACAACAGAG	AGATGTTATC	CTGTATCCAT	GGAAAGAAAT	TAGCCACAAA	TAAATAAACT
3130	3140	3150	3160	3170	3180
AACTACTACGA	AACATAGAGC	ACGTTGATTA	GAAAGTCAAC	AAGAAAATGC	AGGCAATTTG
3190	3200	3210	3220	3230	3240
CACCCACGAA	CACTTAGAAA	GTAAAAAGGT	TATCTGTGAA	TTAGTTTTCGA	GGATTTTCAGA
3250	3260	3270	3280	3290	3300
AACCGCCACA	ACGATTCCGC	TCACCCATGG	CCATGTTGTT	AGAGTTGATG	TCCTCATTTT
3310	3320	3330	3340	3350	3360
CATATGAGAA	GCCTCACCGT	GGGCTGAGCA	AAGGCAAAAC	AGAGCAACTC	GTTATCTTTG
3370	3380	3390	3400	3410	3420
GTTTACGTAC	CTCTCCTTTT	CTCTCTCTTT	GTAAACAATA	GAGGCATTAA	CCATCCATTG
3430	3440	3450	3460	3470	3480
CTAGCCTCCT	CTTCTTTAGC	CTTTACACGG	CAACATGCAA	CCTCTCACAT	GGTGTAGCAG
3490	3500	3510	3520	3530	3540
TCATTAGAAA	ACACTATGTA	CAATACTAAA	GAATAATGAC	AATATTATGG	ATAAAGAAAC
3550	3560	3570	3580	3590	3600
CCATATATTG	GATGTATATG	TAACCAGGTA	GACAGTTCAG	ACCAAGAATG	TAAACATGAG
3610	3620	3630	3640	3650	3660
CCATAGCATG	CAAAAAGAAG	ACAGATCGTA	TGACGAGAAG	AGCATGACCC	CGTAAGTAGC
3670	3680	3690	3700	3710	3720
ACCTTTGTCA	GATGGACTGC	AACAGCAACT	CTAAATCAGG	GACAACAAGC	ACTTCCAATC
3730	3740	3750	3760	3770	3780
GAGCAAGATA	TCTGCATGAA	CAGATAAATC	AATATGCATC	TCATCAAAAAG	ACCGTATATG
3790	3800	3810	3820	3830	3840
ACCTATTTTA	TGAAATAGGA	ATGTACCTTC	CGTAACAGGA	GGAACTCCGC	TAATTATAGC
3850	3860	3870			
AGCCAAACAG	TGTCAGTTAA	GCTTAAGCTT			

3.6 DETERMINACION DEL NUMERO DE COPIAS DE LOS GENES CORRESPONDIENTES A PME119 Y PME177

3.6.1 FUNDAMENTO

Este tipo de experimentos implica la separación electroforética de fragmentos de restricción de DNA genómico y, en paralelo, de cantidades variables de un DNA marcador del que se desea conocer el número de copias en dicho DNA genómico. A partir de los tamaños del genoma y del DNA marcador, es posible establecer el número de copias de dicha secuencia por genoma haploide por medio de la siguiente relación :

$$X = \text{kbp de genoma} / \text{kbp de marcador} = \mu\text{gr genoma} / \mu\text{gr marcador}$$

A partir de esta relación se deduce que los μgr de DNA genómico a cargar en el gel, divididos por la relación X determinarán la cantidad de DNA marcador correspondiente a una copia por genoma haploide. A partir de esta cantidad se podrán establecer las correspondientes a los diferentes números de copias de DNA marcador que se quieran establecer en el ensayo. Es muy importante en este tipo de ensayo conocer de forma muy precisa las concentraciones de cada una de las soluciones de DNA de las que partimos.

Una vez el DNA ha migrado lo suficiente a través de un gel, se transfiere a un filtro de nitrocelulosa y se hibrida con la sonda de DNA apropiada. El estudio de las intensidades de la señal en la autorradiografía para los diferentes carriles permite determinar el número aproximado de copias del DNA sonda por genoma haploide.

3.6.2 RECONSTRUCCION GENICA

Para la reconstrucción génica del gen de pME119 se empleó el
280 resultados

plásmido p268C digerido con HindIII, de modo que libera un fragmento de 3.1 kbp y el vector de 2.7 kbp. Para el gen de pME177 se empleó el plásmido pZ3 digerido con HindIII que libera la banda de 4 kbp y el vector de 2.7 kbp.

Se partió de DNA de endospermo digerido con HindIII y comprobado. Se determinó su concentración por absorción óptica a 260 nm. Los plásmidos pZ3 y p268 C, de concentraciones conocidas por absorción a 260 nm, se digirieron con HindIII. Una vez comprobada la digestión se procedió a preparar el gel de la reconstitución.

La relación X para una banda de 1 kbp es de 5×10^6 para un tamaño de genoma como el del maíz de 5×10^6 kbp (Bennet y Smith, 1976; Pedersen et al., 1980). Así por cada 10 μ gr de DNA genómico de maíz 2 pgr corresponden a una kbp que se encuentra en copia única.

En el gel de reconstitución génica que se muestra en la figura 3.30 para el gen de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) se cargaron en carriles paralelos 10 μ gr de DNA de endospermo HindIII y 10.4, 20.8, 31.2 pgr de p268C HindIII (corresponden a 1, 2 y 3 copias por genoma haploide). En el gel de reconstitución génica para el gen de zeina-II de 16 kD (Z16, Zc1) se cargaron en carriles paralelos 10 μ gr de DNA de endospermo HindIII y 13.4, 26.8 y 40.2 pgr de pZ3 HindIII (corresponden a 1, 2, y 3 copias por genoma haploide). Se trataba de geles medianos de agarosa 1%. Una vez transferido el gel a nitrocelulosa como se describe en el ap. 2.8.1.2 se hibridó cada uno de ellos con la sonda correspondiente, en las condiciones descritas en el ap. 3.2.2. Los resultados, que se muestran en la figura 3.30, indican que los dos genes están representados por una única copia por genoma haploide.

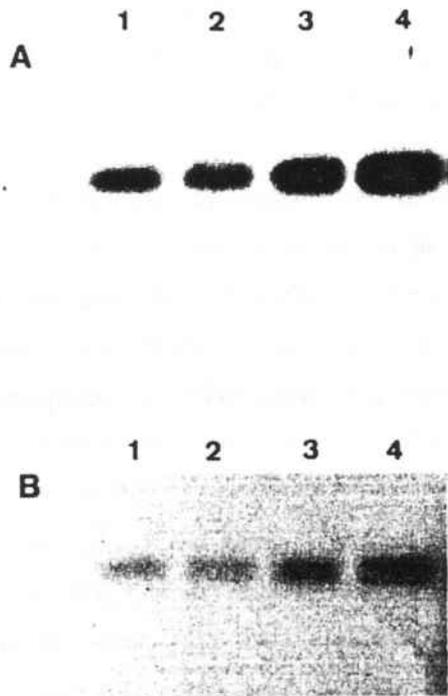


Figura 3.30 : Reconstrucción genómica de los genes correspondientes a los clones cDNA pME119 y pME177.

A: sonda PvuI-XbaI de p22.3.

- 1 : 10 μ gr DNA endospermo maíz W64A HindIII
- 2 : 10.4 pgr p268C HindIII (1 copia)
- 3 : 20.8 pgr p268C HindIII (2 copias)
- 4 : 31.2 pgr p268C HindIII (3 copias)

B: sonda BamHI-PstI de pME177.

- 1 : 10 μ gr DNA endospermo maíz W64A HindIII
- 2 : 13.4 pgr pZ3 HindIII (1 copia)
- 3 : 26.8 pgr pZ3 HindIII (2 copias)
- 4 : 40.2 pgr pZ3 HindIII (3 copias)

3.7 LOCALIZACION CROMOSOMICA DE LOS GENES CORRESPONDIENTES A PME119 Y PME177

Los genes de zeínas en el maíz se encuentran localizados en tres "clusters" en los cromosomas 4,7 y 10 (ver ap. 1.4.2.4.4). Asimismo se han localizado los loci de diferentes mutantes que afectan a la expresión de las proteínas de reserva en el maíz (ver ap 1.4.2.4.4). Se ha observado que estos loci mapan muy cercanos o en el interior de los "clusters" que agrupan a los genes estructurales de zeínas.

3.7.1 FUNDAMENTO

Partiendo de la premisa de que los genes estructurales de las proteínas de 28 kD y 16 kD deberían encontrarse cerca de estos "clusters" se diseñó el experimento que se describe a continuación para averiguar su localización cromosómica. La técnica fue empleada fue la clásica de "marcar" un cromosoma con una determinada característica genética, y averiguar para el gen en estudio si existe póliformismo en la longitud de los fragmentos de restricción genómicos. Este análisis es asequible siempre que el patrón de restricción genómico no sea excesivamente complejo.

Las variedades que se han empleado se han obtenido transfiriendo la característica mutación de la variedad originaria donde se observó y fijó a la variedad en cuestión. Para transferir la mutación de una variedad A a una variedad B se cruzan éstas. Del cruce de las variedades A (n n) y B (+ +) se obtienen la totalidad de descendientes (F1) son heterocigotos (+ n), con un 50% del genoma procedente de cada progenitor. Por autofecundación de la F1 1/4 de los descendientes presenta la mutación en homocigosis (n n). Cruzando éstos con la variedad B (+ +) se obtiene una F2 donde la totalidad de la descendencia es heterocigota (+ n) y presenta un 75 % del genoma procedente del

progenitor B y un 25 % procede del progenitor A. Después de unos 6 cruces se obtiene una F6 en la que la descendencia, heterocigota (+ n) presenta el 98.4 % del genoma de la variedad B y sólo el 1.6 % del genoma de la variedad A. Por autofecundación de los individuos de la F6 se obtienen mutantes (n n). De este modo se obtiene la variedad B mutada : B (n n). El proceso de transferencia de un mutante de una a otra variedad es más sencillo si presenta codominancia pues se manifiesta el carácter mutante ya en el heterocigoto, no siendo necesario realizar la autofecundación para seleccionar los mutantes.

Cuando se analiza el patrón de restricción genómico para la variedad normal y la mutante puede ocurrir que sea idéntico entre ambas, o que presente diferencias. Si presenta diferencias, es decir, si existe polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción genómicos correspondientes al gen en estudio indica con certeza que el gen marcador, mutante, y el gen en estudio se encuentran en el mismo cromosoma, y además muy próximos entre sí. Esta interpretación se basa en que si la distancia entre los loci fuera elevada (aprox. 50% de frecuencia de recombinación) o bien se encontraran en diferente cromosoma no se habrían heredado conjuntamente a través de los cruces en el proceso de transferencia de la mutación, y no se observaría la correlación entre presencia de la mutación y de una longitud concreta de fragmento de restricción genómico.

En el "Istituto Sperimentales per la Cerealicultura" de Bérgamo. Italia, se han preparado gran cantidad de variedades de maíz con los diferentes marcadores genéticos que se ha descrito que afectan la expresión de las proteínas de reserva en esta especie, tales como opaco-2, opaco-7, floury-2, mucronate, etc (ver ap. 1.4.2.4.4). El Dr. Natale DiFonzo cedió a nuestro laboratorio una colección de estas variedades, que se listan en la tabla 3.4.

variedad	genotipo	numero colección
W64A	+ +	10.140
W64A	o2 o2	10.141
W64A	f12 f12	10.142
W22	+ +	10.144
W22	o2 o2	10.143
W22	o7 o7	10.145
W22	f12 f12	10.146
B37	+ +	10.147
B37	o2 o2	10.148
B37	f11 f11	10.149
B37	f12 f12	10.150
B37	De-b30	10.151
B37	Mc	10.122
B37	o2 o2 / Mc	10.119
A69Y	+ +	10.152
A69Y	o2 o2	10.153
A69Y	f12 f12	10.154
A69Y	wx wx	10.118
Lo876	+ +	10.155
Lo876	o2 o2	10.156
B73	+ +	10.157
B73	o2 o2	10.158
Mo17	+ +	10.159
Mo17	o2 o2	10.160
A632	+ +	10.161
A632	o2 o2	10.162
F222	f12 f12	10.163
A374	f12 f12	10.164
Ob26I	f12 f12	10.165
A239	f12 f12	10.166
IHP -	+ +	10.120
ILP	+ +	10.121

y los cruces :

1. ((38.11 + + x A69Y o2 o2) x A69Y o2 o2)
 - semillas normales 10.138
 - semillas opacas 10.137
2. ((B41 + + x A69Y o2 o2) x A69Y o2 o2)
 - semillas normales 10.134
 - semillas opacas 10.139
3. ((W64A + + x A69Y o2 o2) x A69Y o2 o2)
 - semillas normales 10.135
 - semillas opacas 10.136

Tabla 3.4 : Lista de variedades de maíz y sus mutantes cedidos por el Dr. Natale DiFonzo ("Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura", Bergamo, Italia).

3.7.2 PREPARACION DEL DNA GENOMICO

Para obtener DNA genómico de cada una de las variedades se hicieron germinar las semillas en cubetas con tierra de jardinería a 29°C. Cuando el tallo empieza a despuntar se establecieron fotoperíodos de 9 h de luz a 31°C y 15 h de oscuridad a 24°C. A los 8 d de sembrar las semillas se cortan los tallos y después de lavados en agua se congelan en nitrógeno líquido, conservando el material congelado a -70°C hasta la extracción de DNA genómico.

La purificación de DNA se realizó como se describe en el ap. 2.3.1. Una alícuota de 30 µgr de DNA purificado se digirió con el enzima EcoRI en las condiciones descritas en el ap. 2.4.4. Después de comprobar que la digestión fuera completa se sometieron a electroforesis alícuotas de 10 µgr en geles grandes de agarosa 0.8%.

3.7.3 "SOUTHERN" GENOMICO

El primer grupo de variedades que se probaron fueron las que en la tabla 3.4 se señalan con (*). Corresponden a la comparación de los genotipos normales con los opaco-2. Así se compararon en las variedades W64A, W22, B37, Mo17, Lo786, A632 y B73. Asimismo se compararon las semillas normales y mutantes de los cruces que se describen en la tabla 3.4.

Se realizaron 2 geles idénticos para cada serie de DNAs, y se transfirieron a nitrocelulosa tal como se describe en el ap. 2.8.1.2. En total se prepararon 4 filtros. El filtro 1 y el 3 se hibridaron con la sonda PvuI-XbaI de p22.3 y los filtros 2 y 4 con la sonda PstI-BamHI de pME177, en las condiciones descritas en el ap. 3.2.2. Los resultados se muestran en la figura 3.31.

Se puede observar en la figuras 3.31 que el fragmento de
286 resultados

restricción genómico EcoRI difiere entre las diferentes variedades, entre los tamaños de 30, 20, 10, 7, 6 y 4.5 kbp para la sonda PvuI-XbaI de p22.3 y entre los tamaños 20, 6 y 4.5 para la sonda PstI-BamHI de pME177.

Para la sonda PvuI-XbaI de p22.3 no se aprecian diferencias entre las variedades salvajes (+ +) y las mutantes opaco-2 (o2 o2) W64A, B37, Lo876, A632 y B73. Hay diferencias en las variedades A69Y, W22 y Mo17. Los cambios observados se pueden resumir:

A69Y :	banda de 20 kbp se mantiene
	banda de 10 kbp desaparece
B73 :	banda de 30 kbp pasa a 20 kbp
W22 :	banda de 30 kbp pasa a 20 kbp
	banda de 10 kbp pasa a 6 kbp

Figura 3.31 : Localización cromosómica de los genes de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) y de zeína-II de 16 kD (Z6, Zc1).

A : Geles de agarosa grandes 0.7 %.

1 : Gel 1.

n : fenotipo normal

o : fenotipo opaco

7047/o2R : (38.11++ x A69Yo2o2) x A69Yo2o2

7048/o2R : (B41++ x A69Yo2o2) x A69Yo2o2

7051/o2R : (W64A++ x A69Yo2o2) x A69Yo2o2

+ : genotipo + +

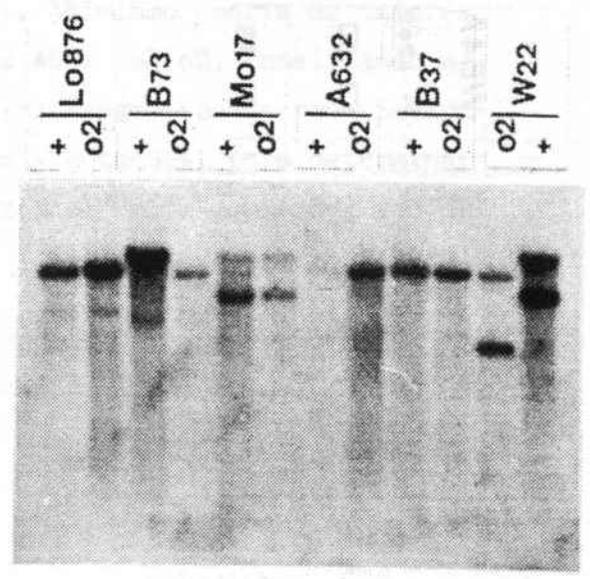
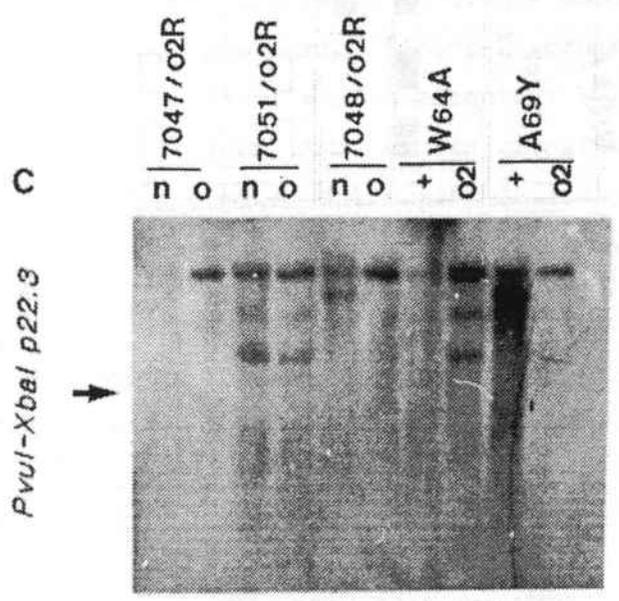
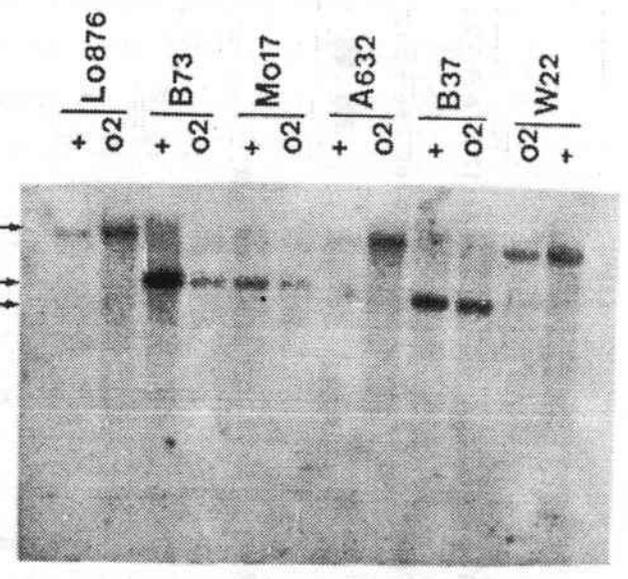
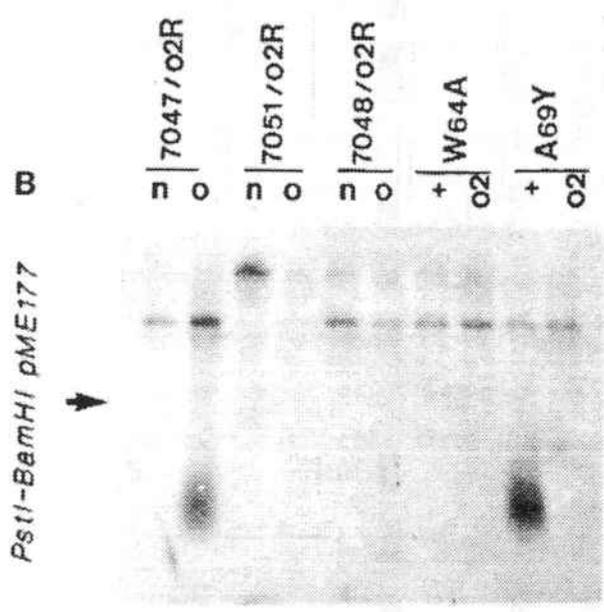
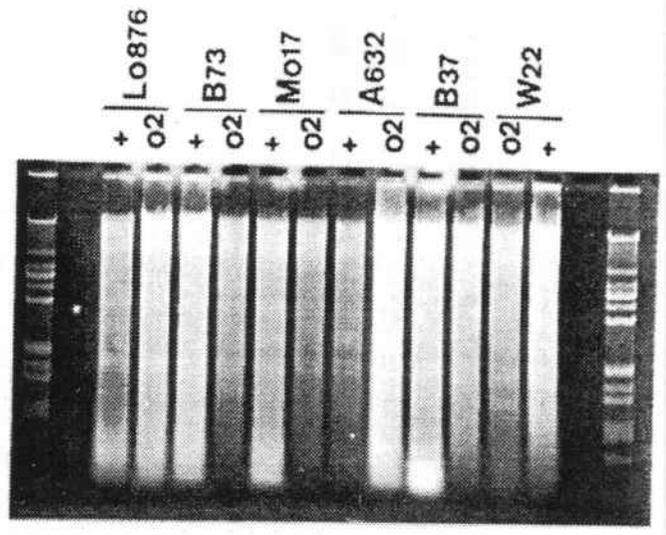
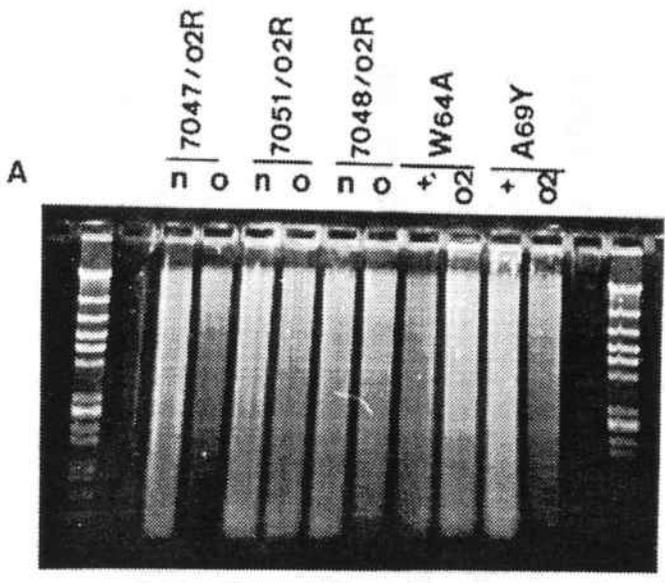
o2 : genotipo o2o2

2 : Gel 2.

B : Autoradiografía de los filtros de réplica después de hibridar con la sonda PstI-BamHI de pME177.

C : Autoradiografía de los filtros de réplica después de hibridar con la sonda PvuI-XbaI de p22.3.

D : Esquema de los resultados (pág. sig.)



D

290 resultados

W64A A69Y L0876 B73 M017 A632 B37 W22 7047 7048 7051
 ++ 0202 ++ 0202 ++ 0202 ++ 0202 ++ 0202 ++ 0202 ++ 0202 n O2 n O2 n O2

20

6

4.5

Zc1

W64A A69Y L0876 B73 M017 A632 B37 W22 7047 7048 7051
 ++ 0202 ++ 0202 ++ 0202 ++ 0202 ++ 0202 ++ 0202 ++ 0202 n O2 n O2 n O2

30

20

10

7

6

4.5

Zc2

En la bibliografía se ha descrito que en la variedad W22 el número de genes que codifican para 28 kD es de dos copias (Rubenstein, com. personal, Prem Das y Messing, 1987). Los resultados en esta variedad parecen indicar que ambas copias se encontrarían localizadas en el cromosoma 7, cerca del locus opaco-2. Estos resultados se confirman en el caso de la variedad B73, con una sola copia. A partir de los resultados de la variedad A69Y podemos afirmar que una de las dos copias se encuentra ligada al locus opaco-2, sin poder decir nada de la otra copia. Estos resultados son confirmados por el cruzamiento (B41 + + x A69Y o2 o2) x A69Y o2 o2) (7048) : todas las semillas normales presentan el aspecto de A69Y + + y todas las que son opacas sólo presentan la banda de 20 kbp.

Para la sonda PstI-BamHI de pME177 no se han observado diferencias en las bandas de restricción entre los genotipos normales (+ +) y mutantes (o2 o2) de cada variedad. Se puede concluir en este caso que no está ligado al locus opaco-2.

A continuación conviene analizar otra serie de mutantes, comparados con los genotipos normales, para las diferentes variedades disponibles. El mutante de mayor interés por cubrir otro cromosoma en el que mapan bastantes genes estructurales de zeínas sería floury-2 (cromosoma 4). Asimismo sería de interés realizar el cruzamiento : W22 + + x A69Y o2 o2, analizando el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción genómicos entre las semillas normales y mutantes, para determinar la distancia entre el locus opaco-2 y el de la copia del gen de 28 kD residente en el cromosoma 7.

3.8 ESTUDIO DE LAS SECUENCIAS

3.8.1 SECUENCIA GENOMICA DE ZC2

La secuencia nucleotídica del clon genómico p268C, de 2975, comprende 1709 nucleótidos de zona flanqueante 5' (nucleótidos 1 a 1709). El inicio de transcripción se sitúa en el nucleótido 1710 y la región codificante comprende desde este nucleótido hasta el 2367 (+658). El triplete de paro (TGA) se localiza en la posición 2370 (+660) y la región flanqueante 3' se extiende 606 bp hasta el nucleótido 2975 (+1266).

La región codificante coincide totalmente con la ya determinada en el laboratorio del clon genómico p22.3 (Boronat et al., 1987), y presenta algunas diferencias con respecto a las secuencias conocidas de clones cDNA (pME119, pME125 y pME792, Prat, 1986) (ver figura 3.32). Estas diferencias afectan a la secuencia nucleotídica pero no a la secuencia de aminoácidos de la proteína, es decir, son cambios conservativos, con la excepción del cambio puntual en la posición +447 del clon cDNA pME792 que produce el cambio de serina (S) por alanina (A) del aminoácido 150 en la secuencia de la proteína deducida.

El análisis de 6 clones cDNA diferentes de la familia de proteínas homóloga a pME119 por S. Prat (Prat, 1986) indica la existencia, en la variedad híbrida E10, de 3 tipos diferentes de genes, cuyos mapas de restricción difieren en la presencia o no de una diana PstI y una o más dianas HaeIII. A nivel nucleotídico se traduce en la existencia de unos pocos cambios puntuales.

El hecho de que siempre que se ha aislado un gen de Zc2 de la variedad W64A (lambda-ZG1, lambda 268, lambda 289, lambda 302) su secuencia ha resultado ser idéntica, ratifica la conclusión, a partir de los experimentos de reconstrucción genómica (ver ap. 3.6, y figura 3.30), de que, en esta variedad, se trata de un gen único.

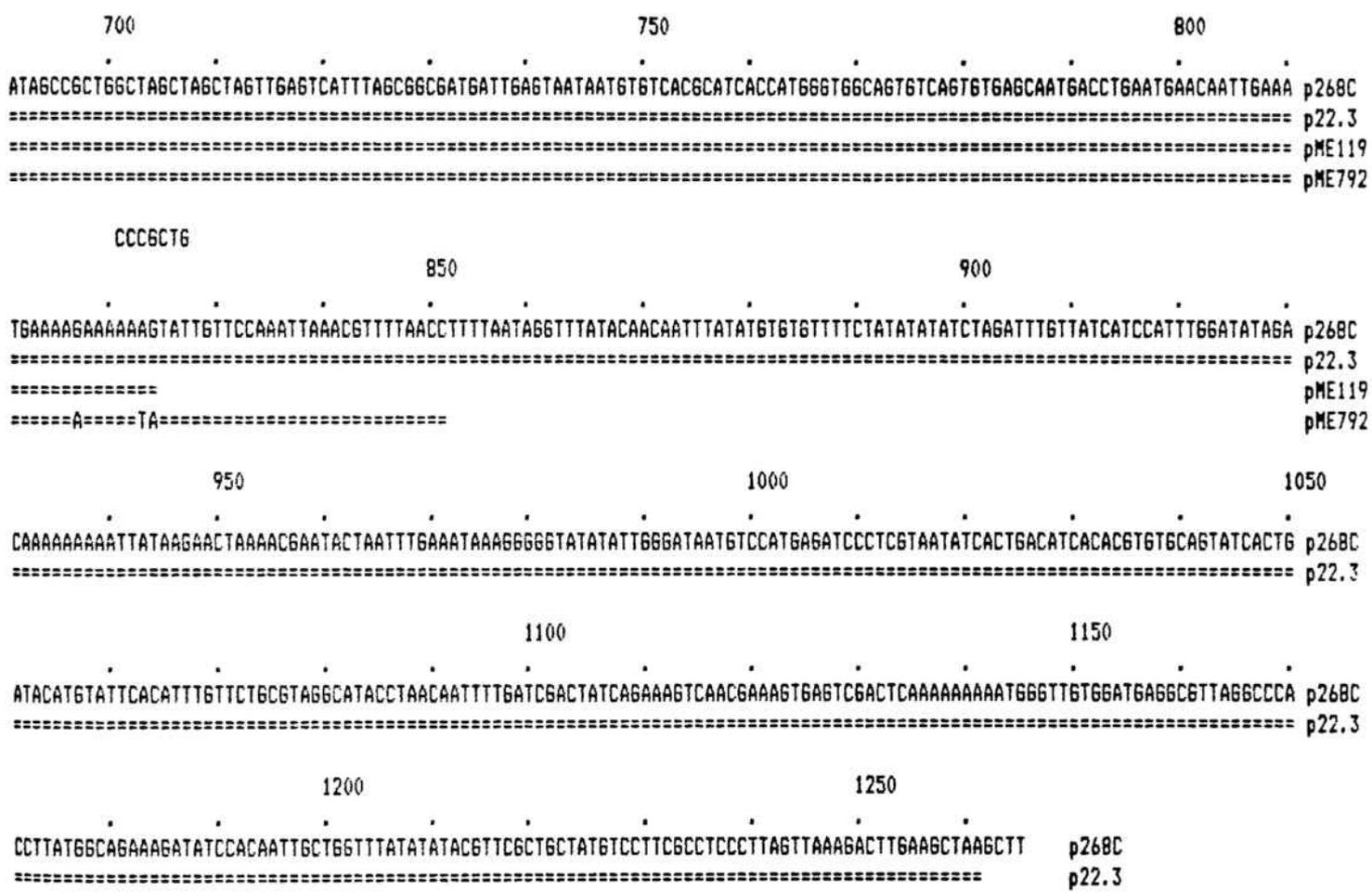


Figura 3.32 : Alineación de las secuencias conocidas de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2). Se comparan las secuencias de los clones genómicos p268C, p22.3 (Boronat et al., 1987), pME125, pME119 y pME792 (Prat, 1986).

3.8.2 SECUENCIA GENOMICA DE ZC1

El inserto del plásmido pZ3, de 3870 bp, presenta una zona flanqueante 5' de 1238 bp. La zona codificante se extiende desde el nucleótido 1239 a 1787 (+1 a +549). El triplete de paro (TGA) se localiza en el nucleótido 1788 (+550). La región flanqueante a 3' se extiende 2083 nucleótidos desde 1788 (+550) hasta 3870 (+2633).

La secuencia del inserto del plásmido pZ3 es la primera descripción de una secuencia genómica de zeínas-II de 16 kD (Z16, Zc1). Hasta el momento sólo se conocía la secuencia del clon cDNA "full length" pME177 (Prat, 1986). Dicho clon cDNA se aisló en el laboratorio a partir de una biblioteca de clones cDNA de endospermo de maíz de la variedad doble híbrida E10, 15 a 20 días después de la polinización. Comparando dichas dos secuencias se confirma que coinciden completamente. Este hecho es completamente desacostumbrado en las secuencias que se conocen en la actualidad de genes de proteínas de reserva en plantas. La existencia, en la mayor parte de las familias de proteínas de reserva de plantas, de un gran número de genes con pequeñas diferencias a nivel de secuencia dificultan considerablemente el aislamiento de clones cDNA y genómicos con una coincidencia completa de sus secuencias nucleotídicas.

3.8.3 COMPARACION DE LAS SECUENCIAS DE LOS GENES ZC1 Y ZC2

En las figuras 3.33 y 3.34 se representan los clones genómicos de zeínas-II de 16 kD (Z16, Zc1) y de glutelinas-2 de 28 kD (G2, Zc2), y se indican las zonas de homología. La homología ya descrita en las regiones codificantes (Prat, 1986; figura 3.17) se extiende hacia la región flanqueante 5' y hacia 3'.

Las regiones codificantes de ambos genes se pueden alinear muy bien tanto en la región 5' (83 % de +1 a +147, de pZ3), como en la región 3' (79 % de +205, diana BamHI en pZ3, a +548). Sin embargo, la existencia de dos inserciones de 78 y 48 bp en la parte media de la secuencia reducen la homología global de la zona. Comparando las secuencias de aminoácidos deducidas se puede observar, como describe Prat (Prat, 1986) (ver figura 3.17), que una primera región de 11 aminoácidos que incluye dos cisteínas está muy conservada entre las dos proteínas, seguida de un hexapéptido (Pro-Pro-Val-His-Leu) que se repite 8 veces en la proteína glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) y sólo dos en la proteína zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1). Una tercera región conservada rica en Pro y no repetida (11 aminoácidos) la proteína glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) presenta una cuarta región formada por un octapéptido repetido dos veces precedido de un tetrapéptido que se corresponde a un tiempo a la mitad del octapéptido repetido. Esta región no se encuentra en la proteína zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) donde sólo se encuentra una copia única, ligeramente modificada del octapéptido. A partir de este punto las secuencias se alinean fácilmente, diferenciándose dos dominios. En el primero la secuencia es rica en cisteína y con un cierto grado de homología interna, y un segundo dominio en el que, a pesar de que los cambios de aminoácidos son frecuentes no varía su composición global, estando especialmente bien conservados los residuos cisteína.

Prat (Prat, 1986) comparando las secuencias flanqueantes de los clones cDNA pME119 y pME177 ya describe una homología importante especialmente en la región 3'. Cuando se comparan las secuencias flanqueantes 5' de las secuencias de p268C (1711 bp) y pZ3 (1235 bp) se aprecia que la homología se extiende hasta -935 en p268C y -923 en pZ3. La homología se concentra en tres zonas. La primera, de 243 nucleótidos (zona A), adyacente a la zona codificante presenta un 72.4 % de homología. Una inserción de 93

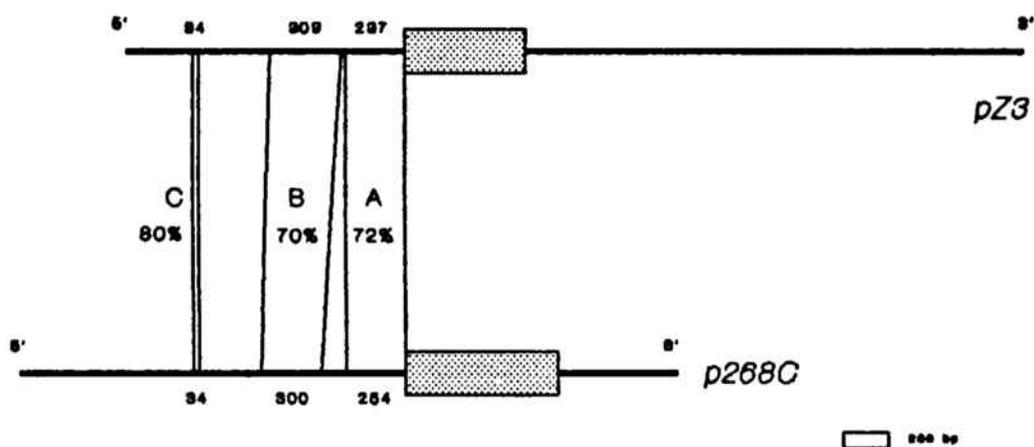


Figura 3.33 : Comparación de las secuencias flanqueantes 5' ("upstream") de los genes de zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) y glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2). Se indica la posición de las zonas de homología respecto a la región codificante (recuadro), su longitud y el porcentaje de homología.

-923 ATTTTAAATTAATAAAAAATCTATTATATATAT -889 p23

 -935 ATGTTTTATAAACAAAATTTATCATATATATAT -901 p268C

ZONA C (80 %)

-565 AAGTTATAAAGTGGTGAAGAACGCGCCGGAACAACCATG6CATGTAGAGCTCCATATATGAGTTGGTGTATCCACCACAACCTCGCAGAACATCA CAAAATGTACATCAAGCAGCSA

 -655 AAGTCCTTAAATGTTGAGGAACACGAACAACCATGCATTG6CATGTAAAGCTCCA AGA ATTCGTTGT ATCCTTAACAACCTCACAGAACATCAACCAAATGCA CBTCAAGGG

-446 TTAATTGGGTGAGAAACAATCG66CG TC TCTCCGTGTACAATGAAATATAATG GTGAGTCACGAG TCACGCTGATCTGATGTATATATGCTAATAGCTCGCAGCATTGCAAA

 -542 T A TTGGSTAAGAACAA TCAACAATCCTCTCTGTGTGCAAGAAACACGGTGTGAGTCATGC CGAGATCATACTCATCTGAT ATACATGCTTACAGCTCACAGACATTACAAA

 .c .a .b
 .p

-331 CAACTCATACCCTACATTACAGAGTTAGTTTCGTGAAAAGCAAGAGTAGGACGGAG AGGAAAATAATCCTTGAGC

 -428 CAACTCATAT TGCATTACAAGATCGTTTCATGAAAATAAAA TAGGCCGGAACAGGACAAAATCCTTGAGCGTGAAAAGTAAATTTACAACAAAAAAAAGCCATATGTCAGC

 .a .b .c .r
 coreSV40 .L 7 A J .- 11 - L 7 B J

-255 ACST G C ACATGABCCACCACGCAAGABTACTGAAATAATCCAGATGAACCCCTCCAAAAG T G AATGAGA TGAG

 -312 TAAATCTAATTCGTTTTACGTAGATCAACAACCTGTAGAAAGGCAACAAC TAGGCCACGCAAGATACAGAAATGATCCAGATGAACCATCGACGTGCTACGTAAGAGAGGTGAC

-183 TCATG TATACATTTGGCAAGAAACCGT A GAAGC TACCAGCATC GATTTCATCATAGAAAGAAATGTTGGTAATCGG AAAGCTATAAATAACCGTCT ATGCTATGGCAC

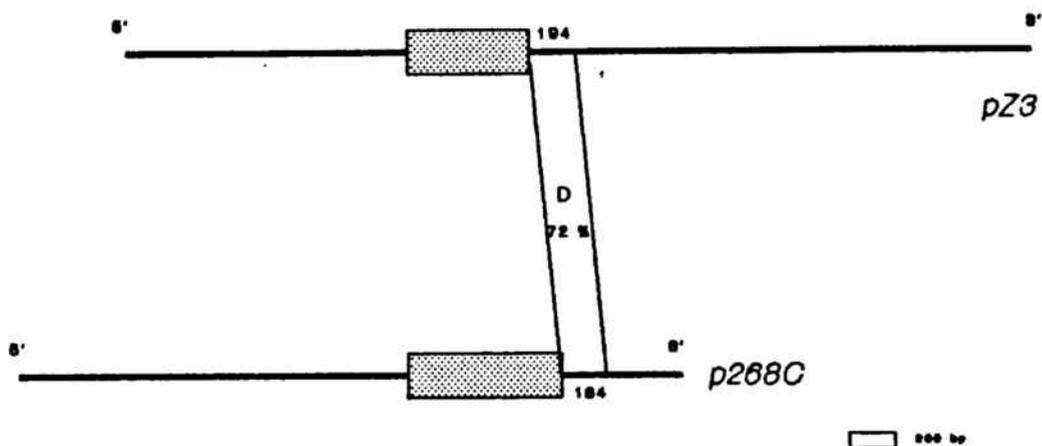
 -195 GAGTCATATACATTTGGCAAGAAACCATGAAGCTGCTACAGCCGCTCTCGGTGGCATAAGAACACAAGAAATGTTGTTAATTAATCAAGCTATAAATAACGCTCGCATGCTGTC CAC

 CAAT TATA

-72 TTCTCCACCACCACCCTGAGCTCAGCCTAGCAATTAGCTC ATCGACTCCAGATTGGAGAA C TCAGACCCatg p23

 -76 TTCTCCATCACCACCCTG6 BTCTTCAGACCA TTAGCTTTATCTACTCCAGAGCAGAAAGAACCCGATCGACACCatg p268C

 s



+549	TGAGGAAACTATGTAAGTAAATAATGTAATGGAGCCGCTGACTAGCTACCTATAGCTAGTTCACTCGTTTAGCGCGATGATTGACGGATAATGTGTG	pZ3		
+669	TGAGGAAACTATGCTGTAGTAT	AGCCGCTGGCTAGC	TAGCTAGTTGAGTCATTTAGCGCGATGATTGAGTAAATAATGTGTG	p268C
+650	TCACCCATCACCATGGGTGG	CAGTGTGAGCAATGACCTGAATGAACCATTTGAAATGAAAGGAATAA	TATATAGGGAAAAAGGATGTTTGGAAA	pZ3
+753	TCACGCATCACCATGGGTGGCAGTGTCAAGTGTGAGCAATGACCTGAATGAACAATTTGAAATGAAAGAAAAAGTATTGTTCCAAATTAACGTTTAAACC			p268C

Figura 3.34 : Comparación de las secuencias flanqueantes 3' ("downstream") de los genes de zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) y glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2). Se indica la posición de la zona de homología respecto a la región codificante (recuadro), su longitud y el porcentaje de homología.

nucleótidos en la secuencia de p268C la separa de la segunda zona de homología de 317 bp (zona B) con 70.7 %. La tercera región, distal, es de 35 bp (zona C) y presenta un 80.0 % de homología.

En la región 3' flanqueante se pueden alinear 184 nucleótidos (zona D) (ver figura 3.34) de p268C con 194 nucleótidos de pZ3 con una homología global del 72%. Dentro de esta región se encuentran las tres señales posibles de poliadenilación que se han descrito (Prat, 1986; Boronat et al, 1987).

La secuencia nucleotídica de la región codificante de estos genes es especialmente rica en nucleótidos G + C, presentando valores de 60,2 % para Zc2 y de 59,4 para Zc1. En la figura 3.35 se presentan los perfiles de riqueza en nucleótidos A+T de las dos secuencias. Estos perfiles se han obtenido mediante un programa escrito en GWBASIC version 3.2 de Microsoft que calcula la frecuencia de nucleótidos para ventanas de tamaño variable, escogidas de 30 bp, que se desplazaban por la secuencia con una cadencia variable, elegida de 10 bp. El gráfico se realizó mediante el programa LOTUS versión 2.0. Se puede observar la similitud entre los perfiles de ambas secuencias, destacando la gran riqueza en secuencias ricas en A+T flanqueantes, especialmente a 5'. La región codificante se observa claramente como la parte deprimida del perfil.

3.8.4 SEÑALES "CONSENSO" IMPLICADAS EN LA REGULACION DE LA EXPRESION GENICA

En la secuencia flanqueante a 5' del gen de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) (p268C) se localiza en la posición -70 el punto de inicio de transcripción determinado por protección a la nucleasa S1 (Boronat et al., 1987). Esta zona presenta elevada homología entre los dos genes (91 % en los 34 nucleótidos del entorno) tal como se observa en la figura 3.33. La secuencia del

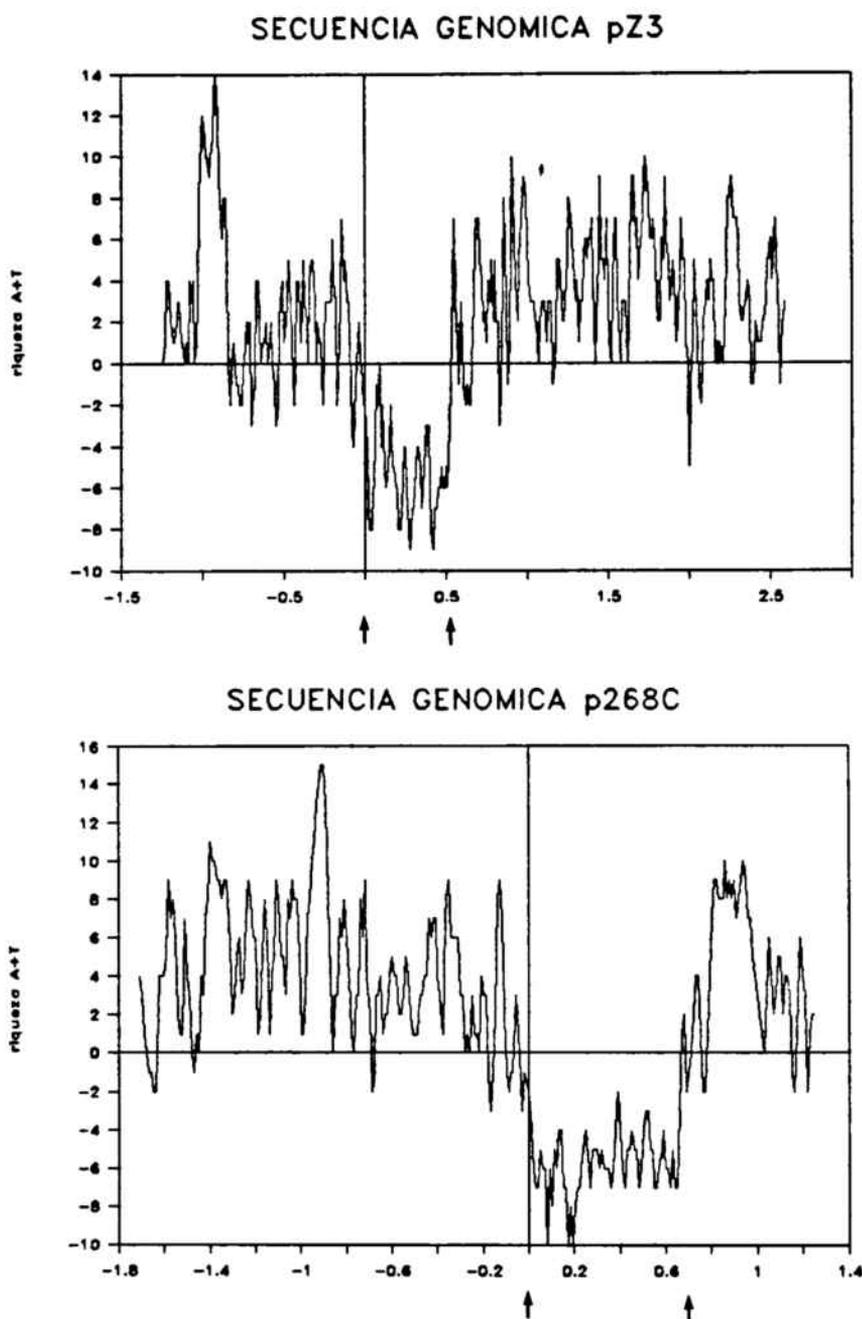
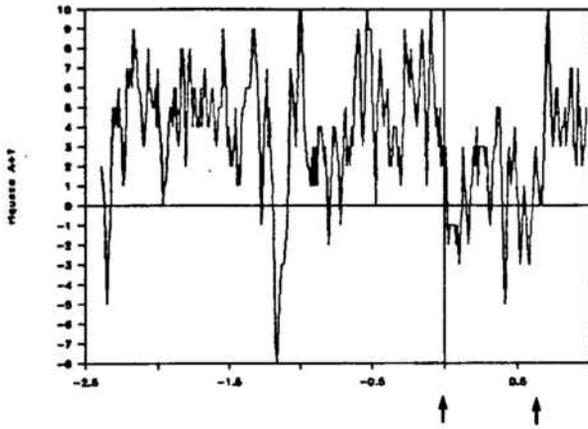
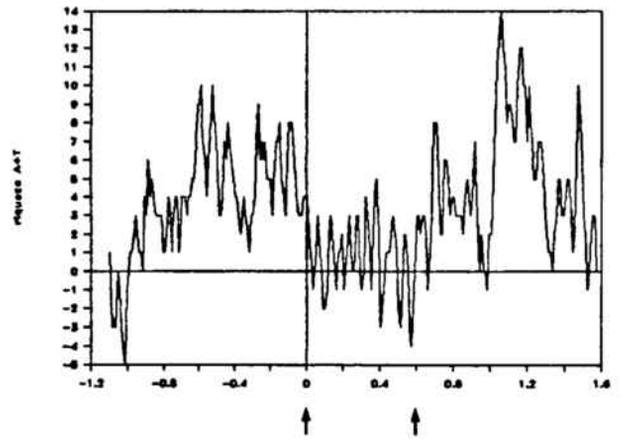


Figura 3.35 : Perfiles de riqueza en nucleótidos A+T de las secuencias de los genes de zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) (pZ3) y glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) (p268C), y de los clones genómicos AB11 (Z19, Zd1), pMS2 (Z19, Zd1), Z7 (Z22-21, Zd2), ZA1 (Z22-21, Zd2) y Z15A (Z15, Zb). La escala del eje X está en kilobases respecto al inicio de traducción. Entre dos flechas se sitúa la zona codificante.

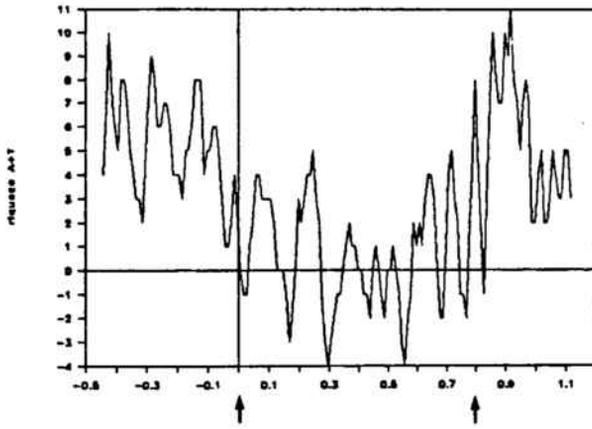
SECUENCIA GENOMICA AB11



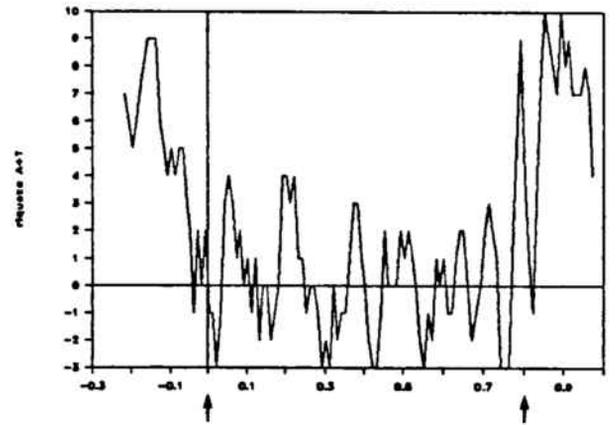
SECUENCIA GENOMICA PMS2



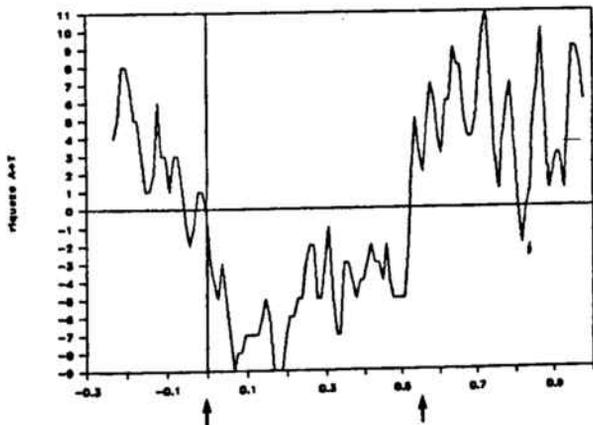
SECUENCIA GENOMICA Z7



SECUENCIA GENOMICA ZA1



SECUENCIA GENOMICA Z15A



clon cDNA pME177 se inicia en la posición -65, a 1 nucleótido del punto donde se podría esperar que se iniciara la transcripción (posición -66) por homología con el gen de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2).

La secuencia TATAAATA localizada en el gen zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) en las posiciones de -100 a -92 y en el gen glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) en las posiciones de -104 a -96 es la consenso descrita como 'caja TATA' en genes de proteínas de reserva en cereales (Joshi, 1987). En los dos genes se encuentra en una zona en que alinean perfectamente. En esta misma zona se localiza la secuencia CATAAG en glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) (-141 a -136), y CATCAT en zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) (-135 a -130) 'caja CAAT'.

Por comparación con las secuencias flanqueantes a 5' de otros genes del maíz e incluso del trigo en el laboratorio se ha descrito un elemento de secuencia que se ha denominado '7-11-7' (Boronat et al., 1987) y que consta de dos heptanucleótidos conservados separados por 11 nucleótidos no conservados (ver figura 3.37). Este elemento, presente en la secuencia del gen glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) (posición -340 a -314) no se encuentra en la secuencia del gen zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1). Esta secuencia forma parte de la inserción que en el gen glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) separa las dos zonas de homología A y B a 5' de la zona codificante (ver figura 3.33).

La secuencia "core" del "enhancer" del virus SV40 (GTGGAAAG se localiza con tan sólo un cambio (en el 4º nucleótido en los dos casos) en las regiones 5' tanto del gen zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) (-298 GTGAAAAG -291) como del gen glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) (-355 GTGtAAAAG -348). Esta secuencia se ha descrito también en otros genes de proteínas de reserva del maíz (Maier et al., 1987). En el caso del gen glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) esta secuencia se encuentra localizada adyacente a dos secuencias

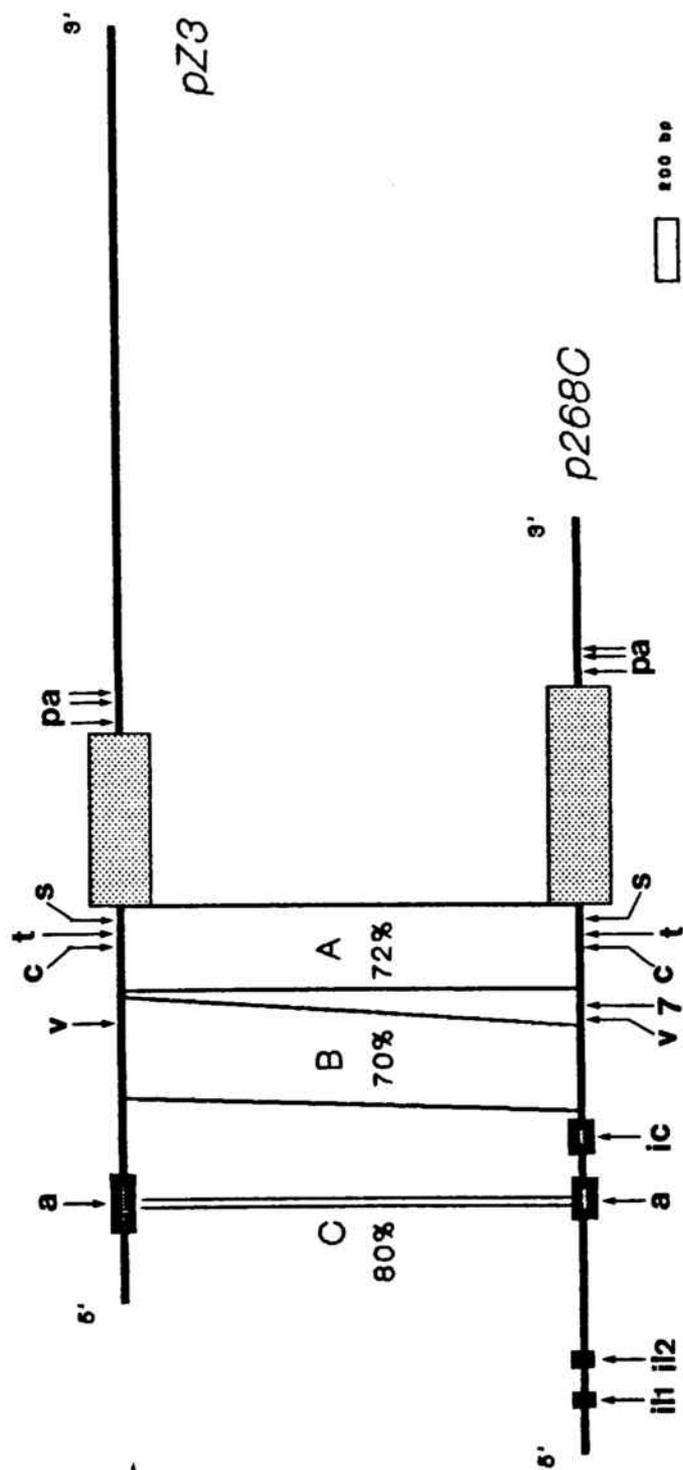
repetidas invertidas que podrían dar lugar a una estructura apareada ("hairpin loop") (figura 3.37). Este hecho se describió inicialmente en un gen de zeínas (Maier et al., 1987) y se denominó "zein box" o caja de zeínas. En el caso del gen zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) no es tan evidente la posibilidad de que se formen este tipo de estructuras, localizándose, por análisis de las secuencias invertidas existentes y cálculo de las estabilidades posibles que se describen en la figura 3.36.

El gen glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) presenta a 5' otras secuencias invertidas repetidas que dan lugar a otras tres posibles estructuras apareadas ("hairpin loop"). La mayor, con una longitud apareada de 47 nucleótidos y una estabilidad teórica de -47 Kcal/mol la hemos denominado invertido cercano (-762 a -718 y -713 a -666) (ic, figura 3.36). Otras dos secuencias que pueden aparearse se han denominado invertidos lejanos 1 y 2 (il1 y il2; figura 3.37) (posiciones il1 : -1309 a -1297 y -1294 a -1283; il2 : -1202 a -1190 y -1183 a -1170). Las estabilidades de estas dos estructuras son menores, de -7.8 y -6.6 Kcal/mol respectivamente. En la secuencia 5' del gen zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) no se han observado secuencias invertidas tan largas ni que generen estructuras de estabilidad equivalente.

Toda la región a 5' de ambos genes es rica en los nucleótidos A+T, pero hay una zona en cada uno de los genes en que esta riqueza es muy alta. En el gen zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) comprende 184 nucleótidos (-1015 a -831) con una riqueza del 84.7 %. En el gen glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) esta zona es de 120 nucleótidos (-969 a -850) con un 84 %. Dentro de esta última se localiza una secuencia de 21 parejas AT. Estas dos zonas alinean a lo largo de 34 nucleótidos que presentan un 80 % de homología (zona C, figura 3.33). Dentro de estas regiones ricas en A+T existen secuencias invertidas repetidas largas que pueden generar estructuras apareadas de 15 a 22 nucleótidos y con estabilidades entre -11.6 y -29.4 Kcal/mol.

Figura 3.36 : Localización de los elementos de secuencia posiblemente implicados en la regulación de la expresión de los genes zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) y glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2).

pa : señales de poliadenilación
s : inicio de transcripción, punto de protección S1
t : TATA box
c : CAAT box
l : elemento "7-11-7"
y : secuencia similar al "core" del "enhancer" de SV40
ic : invertido cercano
a : zona rica en nucleótidos A+T
il1 : invertido lejano 1
il2 : invertido lejano 2
A, B y C : zonas de homología a 5' de los dos genes.



1. inicio de transcripción

Zc1 -72 ttctCCACCACC -60
 Zc2 -76 ttctCCATCACC -64

2. "TATA box"

Zc1 -103 agcTATAATAAccg -89
 Zc2 -107 agcTATAATAAccg -93

3. "CAAT box"

Zc1 -138 tttCATCATaga -127
 Zc2 -144 tggCATAAGaac -133

4. "7-11-7"

Zc1 - inexistente
 Zc2 -339 CAACAAAAaaagccatATGTCAA -314 p268C
 Zd2 -211 GATGAAAccgataactaaATGTCGA -187 23 kDa | Maiz
 Zd1 -210 CAACAAAgtaatcactaaATGTCAA -186 19 kDa |

 -582 ATGTAAAcggattcgatGAGTCAT -558 LMW |
 -307 ATGTAAAgtaataaggtGAGTCAT -283 Glutenin | Trigo
 -518 ATGTAAAggaatttgacGAGTCAT -494 α / β
 -316 CTGTAAAgtaataagatGAGTCAT -292 gliadin |

5. "Core" SV40

Zc1 -298 GTGtAAAG -291
 SV40 GTGGAAAG
 Zc2 -355 GTGaAAAG -348

6. "Hairpin loop" asociado al "core" de SV40

Zc1 b. 37 bp apar. 6/8
 C-G 75 %
 A-T ΔG° -2.0 Kcal/mol
 T
 T
 G-C
 C-G
 A-T
 -387 CTCGC-GAAAAGCAAG -285

A. 82 bp apar. 6/6
 A-T 100 %
 G-C ΔG° +4.0 Kcal/mol
 C-G
 A-T
 C-G
 -391 GAGT-AAAAGCAA -288

c. 58 b apar. 17/24
 T-A 71 %
 G-C ΔG° -7.4 Kcal/mol
 A-T
 G-C
 T-A
 T
 A
 G-C
 G-C
 T-A
 A C
 A-T
 T-A
 A C
 T-A
 A-T
 A-T
 A A
 G-C
 T-A
 A G
 A A
 C-G
 -412 GTGTA-TTTCGAAAAGCAAGAG -285

Zc2

A T apar. 8/9
 A C 88.8 %
 A A ΔG° 2.2 Kcal/mol
 A-T
 A-T
 C-G
 A-A
 G-C
 G-G
 A-T
 C-G
 -383 GGCCGAA-TAAAGTA -346

7. Secuencias invertidas

Zc2. Invertido cercano (ic)

apar. 38/49
 78 %
 ΔG° -47 Kcal/mol

A A
 A-T
 A-T
 C-A
 T-A
 G A
 A-T
 T-A
 C-G
 C A
 T-A
 T G
 C-G
 T-A
 C-G
 A-T
 A-T
 A-T
 T-A
 T-A
 A-T
 G-C
 C-G
 A A
 A-T
 A-TTC
 T
 C
 G-C
 G-C
 T-A
 T-A
 G T
 G-C
 G-C
 G-C
 A C
 A-T
 A-T
 G-C
 C-G
 T-A
 A-T
 G-C
 G-C
 T-A

-769 TTACGTC-GGTGCAA -661

Zd1

T
 A C apar. 9/10
 T G
 C T
 G T
 T-A
 G-C
 T-A
 T-A
 A C
 T-A
 A-T
 C-G
 A-T
 C-G
 ATCCAAGCAA-TAAAGGTATT

Zd2

A
 T A apar. 4/7
 C G
 G G
 G T
 T T
 G G
 A-T
 T C
 T-A
 T T
 T G
 A-T
 C-G
 AATGGAA-TAAAGGT

Invertido lejano 1 (i11)

apar. 11/12
 92 %
 ΔG° -7.8 Kcal/mol

T
 A G
 T-A
 G-C
 G-C
 A-T
 A-T
 G-C
 T-A
 A-T
 T-A
 T-A
 A C

-1313 TATG-CTTC -1280

Invertido lejano 2 (i12)

apar. 10/11
 91 %
 ΔG° -6.6 Kcal/mol

T A
 A G
 C C
 T A
 T T
 A-T
 A-T
 T G
 T-A
 C-G
 T-A
 T-A
 G-C
 T-A
 T-A

-1206 TGCC-GTCC -1167

En las regiones 3' de ambos genes se localizan las secuencias de poliadenilación, de las que describimos 3 por homología a las secuencias consenso descritas en plantas (Heidecker y Messing, 1986). En el gen zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) se posicionan a 23, 141 y 164 nucleótidos del final de la región codificante (posiciones +572, +690 y +713 respectivamente). En el gen glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) lo hacen a 84, 140 y 153 nucleótidos del final de la región codificante (posiciones +743, +799 y +812 respectivamente). Las secuencias se detallan en las figuras 3.34 y 3.37. La segunda en posición (AATGAA) es la que posiciona de modo análogo entre ambos genes (ver figura 3.34).

Actualmente se han descrito una serie de secuencias que interaccionan con factores proteicos implicados en la regulación de la expresión de los genes. Para algunos de los factores proteicos descritos se han podido determinar ya las secuencias exactas de interacción, especialmente en bacterias, virus y animales (revisión en Jones et al., 1988). A nivel de vegetales no hay apenas información, con la excepción de secuencias de interacción de la leghemoglobina de soja y de las lectinas. Se intentaron localizar estas secuencias en las regiones 5' de los dos genes en estudio. Las secuencias que se buscaron se detallan en la tabla 3.5. Sobre el gen zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) se localiza sólo una secuencia de reconocimiento de AP1 (Lee et al., 1987) en la posición -391 a -387 (ver figura 3.33, "p"). En la secuencia del gen glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) se localizan dos secuencias AP1 (Lee et al., 1987) en las posiciones -490 a -485 y -185 a -181, y dos secuencias CREB (Montminy et al, 1986) en las posiciones -262 a -255 (invertida) y -52 a -46 (directa). El factor AP1 se une al enhancer del virus SV40, y el factor CREB está implicado en la interacción con los promotores de adenovirus.

3.8.5 COMPARACION DE LAS SECUENCIAS DE LAS PROTEINAS Y LOS GENES Zc1 Y Zc2 CON OTRAS PROTEINAS DE RESERVA DESCRITAS EN PLANTAS

En los últimos años, debido al fuerte desarrollo de las técnicas para determinar las secuencias de DNA se ha observado un aumento progresivo de la cantidad de información almacenada en los bancos de secuencias de DNA. A partir del estudio de estas secuencias se han podido hipotetizar y en ocasiones verificar relaciones evolutivas, antes imposibles de determinar.

Uno de los problemas más importantes en investigación a nivel molecular es determinar el grado de parentesco entre dos secuencias de DNA. La localización de motivos determinados de una secuencia dentro de otra o la determinación de la similitud entre dos cualesquiera de ellas son problemas análogos al que representa detectar una palabra en un texto o señales en presencia de ruido.

Una relación similar sería la comparación de dos secuencias de igual longitud. En este caso se puede determinar la similitud comprobando, nucleótido a nucleótido, si se corresponden los motivos. Frecuentemente la realidad es más complicada y supone obtener alineaciones óptimas entre secuencias de longitudes diversas. Para transformar una secuencia en otra cabe suponer que la segunda deriva de la primera a partir de un conjunto de inserciones y deleciones. Nucleótidos que faltan en una secuencia son simultáneamente nucleótidos de más en la otra. Por este motivo algunos autores (Collins y Coulson, 1987) se refieren al mecanismo como "indel", que incluye ambos procesos.

El problema se reduce, pues, a obtener una serie determinada de "indels" que posibiliten el alineamiento entre dos secuencias. El patrón finalmente obtenido deberá ser óptimo, es decir, el que incluya el menor número posible de "indels" para poder alinear las secuencias. Paralelamente será necesario penalizar

adecuadamente la aparición de "indels" para obtener un valor que nos represente la homología, la distancia evolutiva o el índice de similitud entre las dos secuencias. Asimismo, será necesario que la distancia evolutiva calculada se ajuste a los axiomas de una métrica (ver Cuadras, 1981) con el fin de obtener, posteriormente, relaciones amplias entre muchas secuencias y poder realizar análisis de "cluster" y construir dendogramas.

Con objeto de medir la similaridad entre secuencias tanto de DNA como de proteínas Ll. Montoliu (C.I.D., C.S.I.C.) programó en lenguaje BASIC un algoritmo descrito por P.H. Sellers (Sellers, 1974). Dicho autor define el concepto de distancia evolutiva entre secuencias como el menor número de mutaciones (los "indels" antes citados) por las cuales dos secuencias se pueden hacer equivalentes. Demuestra que esta definición se ajusta a los axiomas de una métrica, incluyendo la desigualdad triangular. El programa COMPARA, en lenguaje BASIC versión GWBASIC versión 3.2 y posteriormente compilado con IBM-PC Basic Compiler versión 2.0. La ultrametrización de las distancias calculadas se realizó mediante un algoritmo UPGMA ("Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages") (Sokal y Michener, 1958) (para descripción ver Cuadras, 1981) contenido en el grupo de programas LAWI escritos en lenguaje FORTRAN de Microsoft versión 4.0 cedidos por el Dr. J. Lleonart del Instituto de Ciencias del Mar del C.S.I.C. Los dendogramas se realizaron mediante el programa DENDO3 escrito en FORTRAN de Microsoft versión 4.0 con las rutinas gráficas del paquete PLOT88 cedido por B. Campos, del Instituto de Ciencias del Mar del C.S.I.C.

Las secuencias que se compararon se listan en la tabla 3.5. Se trata de una colección de las secuencias de DNA que se han publicado de las proteínas de reserva del maíz, de alguna secuencia de gliadinas (Okita, 1984), del inhibidor de tripsina de la cebada (Odani et al, 1983), dos inhibidores de alfa amilasa del trigo (Richardson, 1981; Maeda et al., 1985), de la subunidad

pequeña y grande de la proteína de almacenamiento del ricino (Ricinus communis) (Sharieff y Li, 1982), de una glutenina de alto peso molecular (Forde et al., 1985) y de una napina 1.7 S de nabo (Brassica napus) (Ericsson et al., 1986).

El dendograma de la comparación de estas proteínas se encuentra representado en la figura 3.37. Se analiza en la discusión.

GENES Y cDNAs AISLADOS DE PROTEINAS DE RESERVA DE MAIZ

tipo	cDNA/gen	código	variedad	zona 5'	tamaño codificante	zona 5'	Referencias
Za	cDNA	10kz-1	W22	21	453 (151)	96 570	Kirihara et al (1988)
Zb	cDNA	cZ15A3	W64A	154	543 (181)	148 849	Marks et al. (1985)
	gen	gZ15a	B1.Mx.S	233	543 (181)	464 1240	Boston y Larkins (1986)
Zc c1	cDNA	pME177	E10 (h)	65	552 (184)	194 811	S. Prat (1986)
	gen	pZ3	W64A	1709	552 (184)	2072 3862	M. Reina (no publicado)
c2	cDNA	pME119	E10 (h)	11	672 (226)	153 836	Prat et al. (1985)
	cDNA	pME125	E10 (h)	67	480 i	- 547i	Prat et al. (1985)
	cDNA	pME792	E10 (h)	-	512 i	187 699i	Prat et al. (1985)
	cDNA	RSP	W64A	-	672 (226)	161 833	N. DiFonzo (com. pers.)
	gen	p22.3	W64A	555	672 (226)	590 1817	Boronat et al. (1987)
	gen	p268C	W64A	1238	672 (226)	594 2975	M. Reina (no publicado)
Zd d1	cDNA	cZ19A2	W64A	-	693 i	81 774i	Marks et al. (1985)
	cDNA	cZ19B1	W64A	57	705 (235)	88 850	Marks et al. (1985)
	cDNA	cZ19C1	W64A	41	717 (239)	101 859	Marks et al. (1985)
	cDNA	cZ19C2	W64A	46	717 (239)	81 844	Marks et al. (1985)
	cDNA	cZ19D1	W64A	35	723 (241)	91 849	Marks et al. (1985)
	cDNA	A20	IHP	111	723 (241)	91 849	Geraghty et al. (1982)
	cDNA	A30	IHP	2	705 (235)	87 794	Geraghty et al. (1982)
	gen	ze19	W64A	918	705 (235)	516 2139	
	gen	z4	W22	458	804 (268)	102 1364	Hu et al. (1982)
	gen	gz19AB1	B1.Mx.S	945	708 (236)	1285 2938	Pedersen et al. (1982)
	gen	pMS2	A619 (h)	1094	702 (234)	898 2694	Langridge et al. (1985)
	gen	pMS1	A619 (h)	1554	-	- 1554	Langridge et al. (1985)
	gen	AB11	W64A	2388	705 (235)	298 3391	Kriz et al. (1987)
d2	cDNA	cZ22A1	W64A	67	792 (263)	38 897	Marks y Larkins (1982)
	cDNA	cZ22B1	W64A	13	801 (267)	77 891	Marks y Larkins (1982)
	cDNA	cZ22C2	W64A	-	787 i	153 940i	Marks et al. (1985)
	cDNA	B49	IHP	-	370 i	97 467i	Geraghty et al. (1982)
	cDNA	pCM1	W64A	59	801 (267)	83 943	Embo Data Lib.
	gen	ZA1	W64A	217	798 (265)	203 1218	Embo Data Lib.
	gen	pML1	A619	1175	128 i	- 1303i	Langridge y Feix (1983)
	gen	Z7	W22	444	801 (267)	342 1587	Kridl et al. (1984)

Tabla 3.5 : Clones genómicos y cDNA codificantes para proteínas de reserva aislados en el maíz

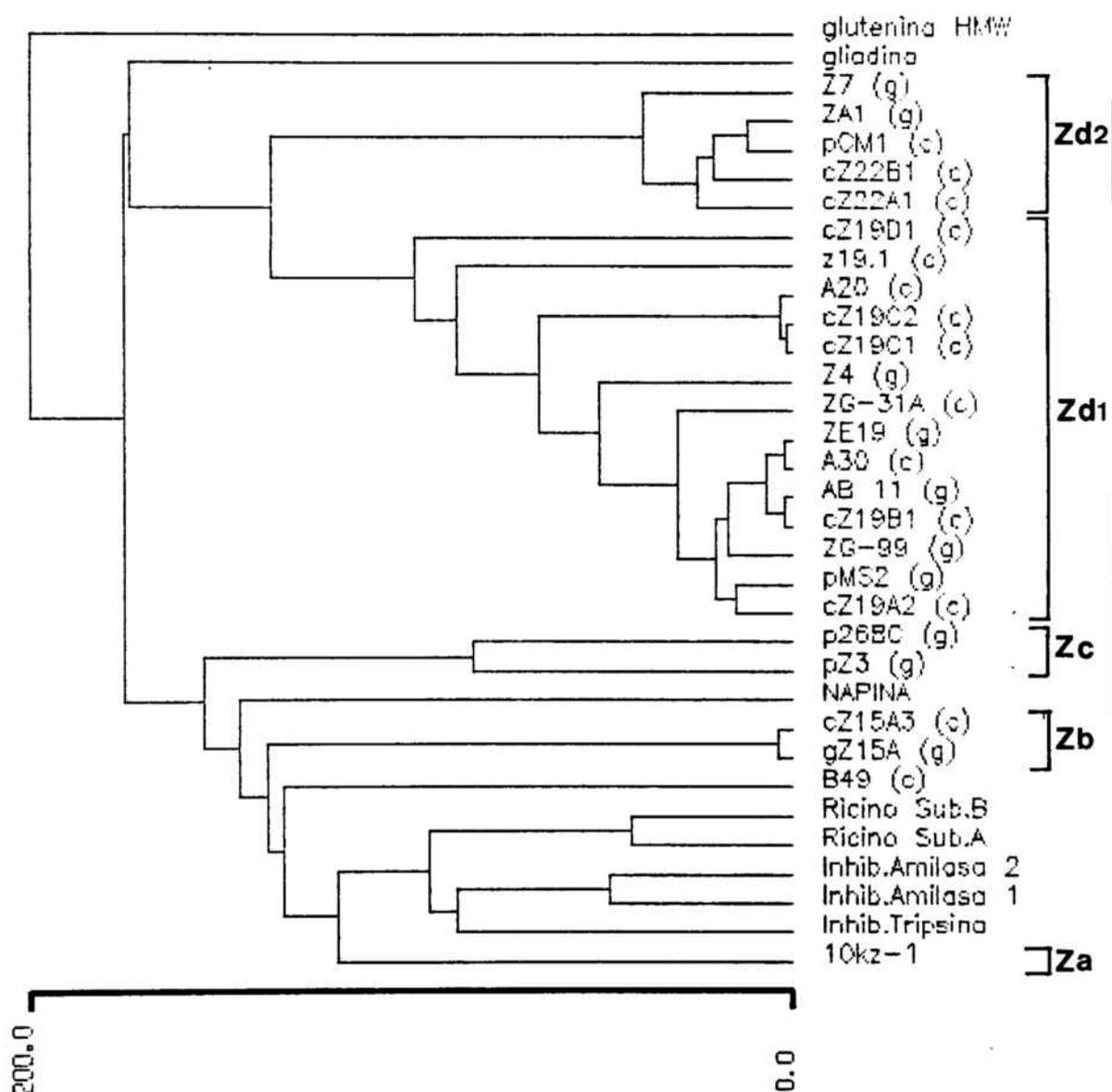


Figura 3.37 : Dendrograma de clasificación de las proteínas de reserva conocidas del maíz, así como de otras de cebada (inhibidor de tripsina), de trigo (inhibidores de alfa-amilasas, gliadina y glutenina de alto peso molecular), de ricino (dos subunidades de proteínas de reserva 2S) y de nabo (napina 1.7S), mediante la determinación de la distancia evolutiva entre ellas tal como se describe en el texto.

4. DISCUSSION

Actualmente empiezan a ser dilucidados algunos de los mecanismos que regulan la expresión de los genes en unos pocos sistemas animales. El estudio de los sistemas vegetales, tal y como ya se ha descrito (ver introducción) está considerablemente retrasado respecto a los anteriores debido, fundamentalmente, a que el número de genes clonados, y el de sistemas en estudio es mucho más reducido.

La primera etapa para entender los mecanismos implicados en la regulación de un proceso biológico es la determinación de sus elementos, de su estructura e interrelaciones. En el modelo que se estudia en esta Tesis, las proteínas de reserva del maíz, era necesario conocer los diferentes genes estructurales que codifican para los polipéptidos analizados.

A pesar de que el concepto de proteínas de reserva estaba claramente definido (ver ap. 1.2) sólo se consideraban proteínas de reserva en el maíz a los polipéptidos que hemos denominado zeínas clásicas (ap. 1.4.2.4.1). Atendiendo a la definición de las proteínas de reserva dada por Messing (Messing, 1987 : "aquellas proteínas hidrofóbicas que se expresan coordinadamente durante el desarrollo del endospermo, se acumulan en el interior del cuerpo proteico y, predominantemente, están compuestas por prolina y aminoácidos nitrogenados") se han de considerar como proteínas de reserva todas aquellas que se acumulan en el interior del cuerpo proteico.

El aislamiento de los cuerpos proteicos del endospermo del maíz por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y el análisis de sus componentes proteicos por electroforesis en poliacrilamida-SDS (R. Farias, comunicación personal) revela que está compuesto por 6 componentes mayoritarios de peso molecular aparente 28, 22-21, 19, 16, 15 y 10 kD.

Una de las proteínas objeto de esta Tesis, la clásicamente

denominada glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) (ap. 1.4.2.4.2) no fue considerada como proteína de reserva hasta hace unos años a pesar de que Vitale y col. (Vitale et al., 1982) ya describieron que la proteína glutelina-2 se encontraba asociada con los cuerpos proteicos. Ludevid y col. (Ludevid et al., 1984) demostraron, empleando técnicas de inmunocitoquímica en microscopía electrónica, la presencia de la proteína de 28 kD (G2, Zc2) en la zona periférica interior del cuerpo proteico. La secuencia aminoacídica de la proteína, deducida a partir de un clon cDNA, pME119, descrito en el laboratorio por Prat y col. (Prat et al., 1985) corresponde a una proteína de reserva característica de monocotiledóneas.

La primera clasificación de las proteínas de reserva se basaba en las propiedades de solubilidad (Osborne y Mandel, 1914; Landry y Moureaux, 1980) y se ha revelado confusa y contradictoria. Si se combinan las propiedades de extracción con la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida-SDS se obtiene una clasificación (Messing, 1983) que, apropiada para el estudio de las proteínas, no informa de las posibles relaciones de homología entre los elementos de un mismo o diferente grupo.

Las dos proteínas cuyos genes son objeto de estudio en esta Tesis, glutelina-2 de 28 kD y zeína-II de 14 kD, no se habían considerado nunca relacionadas. Una de ellas se obtenía en el proceso de fraccionamiento en la fracción zeínas-II y la otra en la fracción glutelinas-2.

En la preparación de anticuerpos policlonales contra la proteína glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) ya se detectó en el laboratorio la existencia de una reacción cruzada contra la proteína zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) (Ludevid et al., 1984), suponiendo la presencia de determinantes antigénicos comunes. El aislamiento de los clones cDNA pME119 y pME177 (Prat et al., 1985; Prat, 1986) se realizó empleando como sonda estos

anticuerpos. Cuando se comparan las secuencias aminoacídicas de ambas proteínas deducidas de los clones cDNA se observa una considerable relación entre ellas. Se ha postulado (Prat, 1986) que ambas proteínas formarían parte de una familia multigénica en el maíz, probablemente pequeña, cuyos genes se habrían formado a partir de unos genes ancestrales (Kriz et al., 1985; Reeck y Hedgcoth, 1985) por adición de secuencias repetitivas flanqueantes y por la acción de mecanismos mutacionales tales como los elementos transponibles. Las mutaciones puntuales pueden oscurecer los efectos de tales fenómenos sobre las secuencias nucleotídicas. Las diferencias entre los pesos moleculares aparentes de las dos proteínas son debidas probablemente a la existencia de regiones repetidas ricas en prolina en la glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2).

Estas proteínas no presentan homología de secuencia con las zeínas clásicas, pero sí lo hacen con otras proteínas de reserva de plantas como por ejemplo las α , β y γ -gliadinas y las γ -secalinas (Prat, 1986).

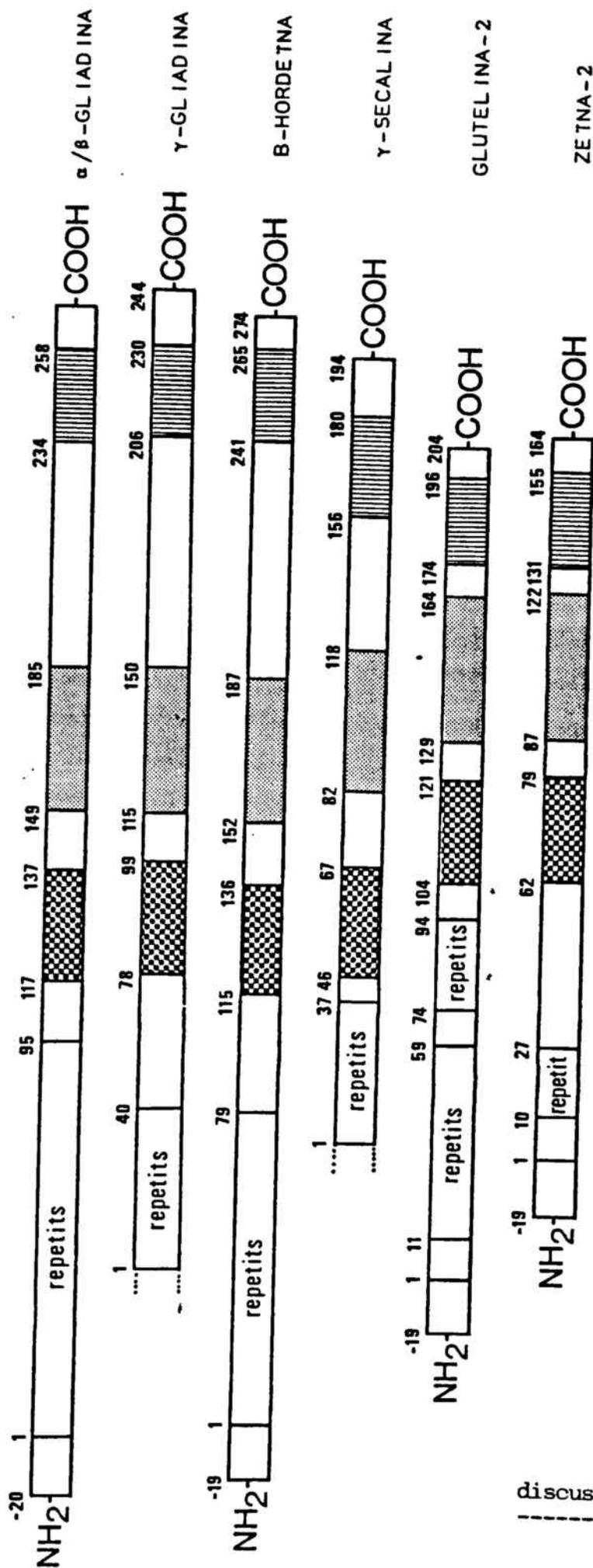
En muchos aspectos la estructura de los mRNAs de las proteínas glutelina-2 de 28 (G2, Zc2) y zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) se parecen más a los mensajeros de las prolaminas de los demás cereales que a las zeínas. La riqueza en los nucleótidos G+C de estos mensajeros (ver figura 3.35), la longitud de la región 3' no codificante, así como la distribución de las señales de poliadenilación en esta región es más parecida a la observada en los clones cDNA de gliadinas y hordeínas que en los de las zeínas (Kasarda et al., 1984a; Rafalski et al., 1984; Kreis et al., 1985b; Forde et al., 1985c). Al mismo tiempo la localización en el extremo N-terminal de las regiones repetidas de la proteína glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) es característica de la mayor parte de las prolaminas ricas en azufre de trigo, cebada y centeno. Las regiones repetidas de las zeínas, en cambio, se encuentran situadas en la parte central de la molécula (Viotti et

al., 1985).

Kreis y col. (Kreis et al., 1985b) han descrito tres regiones de homología en el dominio C-terminal de las prolaminas ricas en azufre de trigo, cebada y centeno. Cuando se comparan las secuencias de aminoácidos de la glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) y de la zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) con gliadinas y hordeínas se observan regiones idénticas a las descritas por estos autores. Estas regiones están centradas en torno a residuos cisteína (región A), QQQQQ (región B) y MC (región C), y curiosamente se observan en la proteína zeína-II de 15 kD (Z15, Zb) descrita por Marks y col. (Marks et al., 1985a; 1985b).

Asimismo se han encontrado regiones de secuencia homóloga en las regiones conservadas A, B y C en otras proteínas de la semilla, tales como los inhibidores de tripsina y de alfa-amilasas de cereales (Odani et al., 1983) y las globulinas 2S de dicotiledoneas (Sharief y Li, 1982; Crouch et al., 1983) (figura 4.1).

Figura 4.1: Esquema comparativo de la estructura de las α / β -gliadinas, δ - gliadinas, B-hordeínas, γ - secalinas y de las proteínas glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) y zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1). Las secuencias se han numerado de acuerdo con los autores originales. Tomado de Prat (1986).



Todas estas relaciones se destacan en el dendograma de la figura 3.37. De éste podríamos resaltar :

1. Las proteínas consideradas como zeínas clásicas se agrupan en dos grandes grupos. El primero de ellos, el menor, comprende aquellas proteínas de entre 242 y 245 AA, que denominamos Zd2. El segundo grupo, bastante mayor y heterogéneo, comprende a la mayor parte de las secuencias descritas con tamaños entre 213 y 217 AA a las que hemos agrupado bajo la denominación Zd1.

2. El resto de las secuencias descritas en el maíz se localizan en un grupo heterogéneo que comprende tanto a aquellas de peso molecular aparente de 10 KDa, que denominamos zeínas-a (Za) como a las descritas por Larkins como zeínas ricas en aminoácidos azufrados , que denominamos zeínas-b (Zb), y a las dos proteínas cuyos genes se estudian en este trabajo, que denominamos zeínas-c (Zc).

3. Las secuencias de proteínas no de maíz que se han comparado se localizan en este grupo heterogéneo, aunque los valores de distancia evolutiva son elevados. Es de destacar, sin embargo, que las zeínas a, b y c estén más próximas a secuencias proteicas como las de los inhibidores de alfa amilasa de trigo o de tripsina de cebada, o incluso a las subunidades de proteínas de reserva del nabo o del ricino que a las otras proteínas de reserva del maíz, Zd1 y Zd2.

Estructura del gen codificante para glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2)

En el laboratorio se aisló un fragmento del genoma de maíz de la variedad W64A, clon genómico ZG1 y se secuenció una parte, plásmido p22.3 (Boronat et al., 1987) que contenía el gen

correspondiente a la glutelina-2 de 28 kD del maíz, simultáneamente a la primera etapa del trabajo descrito en esta Tesis. Comparando la secuencia del clon genómico con la ya conocida del clon cDNA de la variedad doble híbrida E10 pME119 (Prat et al., 1985) se observaron tan sólo tres cambios puntuales en el interior de la región codificante (posiciones +31, +393 y +582) que no producen cambio alguno en la secuencia de la proteína.

Los aislamientos que se han realizado de clones genómicos de la variedad W64A (ap. 3.1) codificantes para una glutelina-2 de 28 kD (#268, #289 y #302), figuras 3.13 y 3.14) presentan el mismo patrón de restricción que el descrito ZG1 (figura 3.16) (Boronat et al., 1987; Gallardo et al., 1988). La secuencia establecida del inserto del plásmido p268C, de 2975 nucleótidos, muestra una identidad completa con la secuencia del plásmido p22.3 (figura 3.32). Este resultado viene a apoyar la conclusión obtenida de los experimentos de reconstitución génica (ap. 3.6) por los cuales el número de genes de glutelina-2 por genoma haploide es de uno: siempre que se ha aislado el gen de la variedad W64A la secuencia obtenida ha sido la misma.

La región secuenciada del entorno genómico del gen de glutelina-2 tienen una longitud de 2975 residuos, de los cuales 1709 corresponden a la región flanqueante a 5'. Del total de residuos, 660 son de la región codificante y 606 corresponden a la zona 3' flanqueante. El clon genómico previamente aislado en el laboratorio, ZG1, presentaba una región flanqueante 5' más corta (595 nucleótidos). La media de las zonas flanqueantes a 5' de las secuencias genómicas descritas en la bibliografía, por ejemplo de las secuencias genómicas referenciadas en la tabla 3.5, es de 941 residuos, con mínimos de 217 en el clon ZA1 y máximos de 2388 en el clon genómico ZAB11 (Kriz et al., 1987). Es en una zona entre 0.2 y 1.5 kb hacia 5' donde se han descrito la presencia de los promotores en este tipo de genes (Langridge y

Feix, 1983).

Un resultado sorprendente, y preocupante, es el hecho de haber aislado 22 de 27 bacteriófagos que presentaban señal positiva a la sonda pME119 con señales de haber sufrido un proceso de recombinación que afecta al inserto y al brazo derecho del vector (ap. 3.1.1.3 y 3.1.1.2, figuras 3.3 a 3.10). Estos bacteriófagos se obtuvieron de una genoteca construida sobre una cepa de E. coli de genotipo rec A⁻, empleando un vector, lambda Charon-35, especialmente diseñado para poder crecer sobre cepas recA⁻ a fin de reducir la probabilidad de recombinación de las secuencias de DNA clonadas. En el maíz hay una gran cantidad de DNA repetitivo, como es característico del genoma de muchas plantas, y es importante tomar este tipo de precauciones.

Se observa que la recombinación descrita se produce siempre que la región 5' del gen de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) se encuentra orientada hacia el brazo derecho del vector, y a una distancia corta. Por el tamaño medio de los insertos y el que se seleccionó en la construcción de la genoteca podríamos estimar esta distancia entre pocos nucleótidos y 2 kbp. Es de resaltar el aislamiento #302, que presenta la orientación que hemos descrito como 'sensible a la recombinación' pero en el que la región 5' del gen de glutelina-2 dista aproximadamente 7 kbp del brazo derecho del vector. En este caso el inserto no presenta evidencias de haber recombinado.

Se han descrito elementos de secuencia dentro del bacteriófago lambda que activan la recombinación (Murray, 1983). Mutantes que afectan a estas secuencias (Chi⁺) se aislaron como placas grandes a partir de bacteriófagos que tenían deleccionados los genes red y gam (Henderson y Weil, 1975). Las secuencias Chi estimulan la recombinación por el sistema recBC del huésped. Se ha descrito que estas secuencias causan recombinación sobre una región de algunas kilobases situadas asimétricamente a su

alrededor (Hendrix, 1983). Se ha descrito una secuencia consenso para las secuencias Chi como GCTGGTGG (Smith, 1983). Mutaciones que crean o inactivan los punto Chi son cambios de un único nucleótido del octámero (Schultz et al., 1981). Una búsqueda de estas secuencias sobre la región 5' conocida del gen da como resultado la ausencia de secuencias homólogas. No es de descartar, sin embargo, que pudiera presentarse en la zona 5' no secuenciada éste u otro motivo que fuera el responsable de la recombinación observada. Es de destacar que este fenómeno que hemos observado presenta una orientación específica, se produce únicamente en una orientación del inserto, tal y como se ha descrito para las secuencias Chi las cuales, curiosamente, activan la recombinación dependiendo de su correcta orientación respecto a las secuencias cos del bacteriófago (Faulds et al., 1979).

Profundizando en las propiedades que confiere el genotipo Chi⁺ a un bacteriófago que como los recombinantes en el caso de lambda Charon-35 (figura 2.2 y tabla 2.2) (Loenen y Blattner, 1983) tienen un fenotipo red⁻ gam⁺, les permite resolver con mayor eficiencia la encapsidación de los dímeros formados en el proceso de replicación por la vía "theta". El aumento de la eficiencia, muy disminuida en estos bacteriófagos por no ser posible la transición de la vía "theta" de replicación a la vía denominada de "círculos rodantes", en el empaquetamiento podría ser la responsable de que, en la amplificación de la genoteca, en placas de cultivo, así como en el crecimiento en medio líquido previo a la purificación del DNA de la genoteca (ap. 3.3.1) la población de bacteriófagos recombinados creciera diferencialmente respecto a los demás, generándose la amplificación específica de las secuencias homólogas al clon cDNA pME119 en la genoteca. Esta posible explicación de la amplificación diferencial es puramente hipotética dado que no se dispone de confirmación experimental alguna. La secuenciación de las zonas comprendidas entre la diana EcoRI a 5' del gen y la diana HindIII anómala sobre el brazo

derecho del vector (figura 3.11), así como estudios genéticos y de eficiencia en el empaquetamiento del bacteriófago 'in vivo' podrían aclarar las causas.

La genoteca antes citada (figura 1.6) ha sido repetidamente empleada en el laboratorio para el aislamiento de clones genómicos homólogos tanto a clones cDNA de expresión específica en ciertos tejidos de la planta del maíz (por ej. Stieffel, 1988), que no han podido ser aislados, como a clones correspondientes a tubulinas del maíz y a histonas que sí han sido localizados. En ningún caso se han observado indicios de fenómenos de recombinación que afectaran a inserto o a vector.

La gran homología entre la secuencia de los clones pME117 y pME119 (figura 3.17) combinada con la amplificación diferencial de las secuencias homólogas al segundo hacían casi imposible el aislamiento de los clones genómicos correspondientes al clon pME177. Cuando en el laboratorio Prat (Prat, 1986) consiguió el aislamiento de un clon cDNA completo homólogo y determina su secuencia ya se dispone de un fragmento de secuencia, correspondiente a la región 5' del cDNA (N-terminal) donde la divergencia es muy superior. El uso de esta sonda nos permitió diferenciar, en hibridaciones de elevada severidad, entre las dos secuencias. De este modo se pudo abordar el estudio a nivel de organización genómica.

Desde hace unos años diversos autores han demostrado la existencia de fenómenos de amplificación de genes concretos o de zonas específicas de genoma, aparentemente relacionados con aspectos de expresión génica, funcionalidad estructural, etc... (Borst, 1984). En el corion de *Drosophila* se produce amplificación específica de los genes de las proteínas del corion durante la oogénesis (Spardling y Mahowald, 1980). De la misma forma, la formación de un macronúcleo en los ciliados implica una amplificación selectiva de parte del repertorio genético presente

en el micronúcleo (Stark y Wahl, 1984).

En plantas se ha descrito una amplificación del DNA de los núcleos del endospermo en el maíz entre los días 10 y 18 después de la polinización (ap. 1.2) (Kowles y Phillips, 1985), aunque no hay datos que apoyen la existencia de procesos de amplificación específica o diferencial de un gen o grupo de genes (Kowles y Phillips, 1988).

A partir del estudio de las intensidades relativas de las bandas de hibridación genómicas homólogas a pME177 y pME119 en restricciones HindIII, EcoRI y BamHI de DNA de endospermo y de embrión (figura 3.19) se observa la ausencia de amplificación específica para estas secuencias. Esto coincide, referido a pME119, con los resultados obtenidos en el laboratorio por Gallardo y col. (Gallardo, 1986; Gallardo et al., 1988). A pesar de que en el endospermo la tasa de síntesis es muy elevada e inexistente en el embrión (Sánchez-Martínez et al., 1987) los resultados obtenidos en este trabajo descartan la existencia de amplificación génica específica asociada a la expresión tanto de los genes de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) y de zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1). Estos resultados coinciden con los descritos por otros autores así como con los referidos a zeínas homólogas a los clones cDNA A20 y B49 (Geraghty et al., 1982) descritos por Gallardo (Gallardo, 1986).

Otro fenómeno que se ha descrito asociado a la transcripción de genes en momentos determinados del desarrollo es la transposición de secuencias específicas. Un ejemplo de este tipo ha sido descrito en el parásito unicelular Trypanosoma brucei en el cual la activación de ciertos genes codificantes de proteínas de superficie implica una transposición duplicativa de los mismos hacia un lugar concreto de expresión (De Lange et al, 1983). Del mismo modo, el tipo de apareamiento en levaduras viene determinado por fenómenos de reorganización de los genes

implicados (Nasmyth, 1983). Los resultados coincidentes para las restricciones BamHI y HindIII de DNA genómico de la variedad W64A en endospermo y embrión (figura 3.17) indican que tampoco parecen existir fenómenos de reorganización genómica que afecten a las secuencias homólogas al clon pME119 en coincidencia con lo descrito por Gallardo (Gallardo, 1986) y al clon pME177. Sin embargo, hay una diferencia entre ambos tejidos a nivel de la restricción EcoRI. Así, una banda intensa de 13 kbp presente en el DNA de endospermo está ausente en el DNA de embrión, mientras que, por el contrario, en éste aparece una banda de 5.8 kbp no detectada en el endospermo. En el clon genómico ZG1 (Boronat et al., 1987) el inserto EcoRI-EcoRI era de aproximadamente 12 kbp (figura 3.2) y el gen de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) se encuentra en el interior de un fragmento EcoRI-EcoRI de 5.8 kbp. Una posible interpretación que podría explicar la presencia de bandas de hibridación diferentes en las digestiones de los DNAs de endospermo y de embrión con el enzima EcoRI sería la existencia de una metilación diferencial en ambos tejidos, la cual afectaría de forma concreta a la diana de restricción de dicho enzima. Esta interpretación se apoyaría en tres argumentos. En primer lugar la actividad de la endonucleasa EcoRI resulta inhibida cuando la citosina presente en la diana de restricción GAATTC se encuentra en forma de 5-metilcitosina (tabla 2.6) (Kessler et al., 1985). En segundo lugar se conoce que en el maíz una relativamente elevada proporción de las citosinas (26%) se encuentran metiladas, principalmente las implicadas en los dinucleótidos GC y en los trinucleótidos CXG (Shapiro, 1976; Gruenbaum et al., 1981). En tercer lugar se ha descrito (Gallardo, 1986; Gallardo et al., 1988) que el patrón de metilación del DNA de endospermo es considerablemente distinto al encontrado en el embrión.

Estos datos parecen señalar la existencia en el genoma del maíz de una diana EcoRI adyacente a un gen de glutelina-2 metilada a nivel de la citosina en el DNA del endospermo,

estando, por el contrario, demetilada en embrión. Dicha diana, localizada en el interior el fragmento EcoRI-EcoRI de 13 kbp detectado en la hibridación de DNA de endospermo digerido con EcoRI (figura 3.17), podría ser digerida en embrión en caso de que ésta estuviera demetilada, con lo que debería observarse una banda de tamaño menor que correspondería a la de 5.8 kbp. Esto se ha confirmado (Gallardo et al., 1988) mediante determinación en DNA genómico de endospermo y embrión de los fragmentos de restricción HindIII-EcoRI homólogos a pME119. La diana metilada en endospermo se sitúa a 3' del gen de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2). Estos hechos permiten descartar otra de las hipótesis propuestas por Gallardo (Gallardo, 1986) para explicar esos resultados, consistente en un fenómeno de microrreorganización en torno a la diana EcoRI y que no afectaría al tamaño de los fragmentos de restricción genómicos HindIII y BamHI.

Es importante puntualizar dos cosas respecto al aislamiento del bacteriófago ZG1 y la obtención del plásmido p22 que contiene el fragmento EcoRI de 5.8 kbp que incluye el gen de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) (figura 3.2) (Boronat et al., 1987). En primer lugar la genoteca de la que se obtuvo el aislamiento fue realizada a partir de DNA de grano de maíz de la variedad W64A, incluyendo, por lo tanto, tanto DNA de endospermo como de embrión. En segundo lugar, una vez obtenidos los bacteriófagos recombinantes las posibles metilaciones presentes en los insertos genómicos se perderían en el proceso de replicación en E. coli.

Sobre el papel que tiene la metilación en la regulación de la expresión génica, descrita como un elemento represor de ésta (Cooper, 1983; Doefler, 1983; Bird, 1984), no hay acuerdo. En la actualidad se han descrito resultados contradictorios. Así se pueden citar resultados de Nick y col. (Nick et al., 1986) en los que se describe una total ausencia de metilación en secuencias potencialmente metilables que se encuentran próximas al gen de la alcohol deshidrogenasa en tejidos de hoja de maíz. Según estos

autores, dado que en estos tejidos no se expresa el gen de la alcohol deshidrogenasa, ello indicaría que la metilación no está implicada en la represión de su expresión.

Una propiedad significativa de todas las proteínas de reserva descritas es el hecho de formar familias multigénicas (Wilson, 1983). Además, estas familias de proteínas son sintetizadas coordinadamente durante el desarrollo de la semilla. La elevada microheterogeneidad observada en las fracciones de zeínas-I de alto peso molecular por electroforesis bidimensionales en poliacrilamida-SDS (Righetti et al., 1977; Hagen y Rubenstein, 1980; Hurkmann et al., 1981) se ha podido comprobar que es debido a la existencia en el maíz de un elevado número de genes que oscila, según los autores, entre 30 y 100 por genoma haploide (Viotti et al., 1979; Wienand y Feix, 1980; Hagen y Rubenstein, 1981; Burr y Burr, 1982; Pedersen et al., 1982; Viotti et al., 1982). Sin embargo no todas las secuencias que codifican para estas zeínas representan genes activos. Algunos de los genes descritos presentan una corta pauta de lectura abierta debido a un codón de terminación próximo al lugar de inicio de la traducción y por ello han sido interpretados como pseudogenes (Spena et al., 1983; Kridl et al., 1984).

En contraste con las anteriores, las zeínas clásicas de bajo peso molecular, así como la glutelina-2 se ha observado que están representadas cada una de ellas por polipéptidos de un único punto isoeléctrico (Hurkman et al., 1981; Marks et al., 1985a). Resultados recientes de Kirihara y col. (Kirihara et al., 1988) describen que la zeína-II de 10 kD (Z10, Za) purificada presenta, en geles de isoelectroenfoque, diferentes bandas, si bien se desconoce en la actualidad si se trata de diferentes formas de la proteína o bien de artefactos de la purificación. Asimismo, estos autores describen microheterogeneidad en la secuencia N-terminal de esta zeína, pero esto no se ha podido confirmar con el aislamiento de diferentes clones cDNA. Todos los clones

secuenciados corresponden a la misma secuencia. La microheterogeneidad observada se explica por variaciones alélicas. El número de copias del gen por genoma haploide se ha estimado por técnicas de reconstrucción génica entre 1 y 2.

Pedersen y col. (Pedersen et al., 1986) han descrito que en el genoma haploide del maíz sólo se encuentran 1 a 2 copias de secuencias homólogas al clon cDNA codificante para la zeína-II de 15 kD (Z15, Zb) que aislaron Marks y col. (Marks et al., 1985a).

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Gallardo, 1986; Boronat et al., 1987; Gallardo et al., 1988) indican la presencia de 1 a 3 copias por genoma haploide de secuencias homólogas al clon cDNA pME119. Este intervalo se debe a la precisión con la que es posible medir las cantidades de DNA genómico y estimar la longitud total del genoma del maíz. Cuando se extreman las precauciones en la determinación exacta de la cantidad de DNA, tanto del DNA genómico como del DNA del plásmido que se emplea como referencia en el experimento de reconstrucción génica, se pueden ajustar más las estimaciones. Los resultados que se describen en el ap. 3.6.2 (figura 3.30) parecen indicar que el número de copias de este gen en la variedad W64A es de 1 por genoma haploide. Sin embargo, en otras variedades como por ejemplo W22 (Prem Das y Messing, 1987) el número es de 2 por genoma haploide. Estos dos genes se han aislado, localizándose en un fragmento Eco RI de 12 kbp duplicado en tándem y son virtualmente idénticos, con una única diferencia en la zona 5' que se ha analizado por una longitud de 2800 nucleótidos, una inserción del dinucleótido TA en la posición -860 en una zona rica en A+T. Una diferencia notable es la presencia de una inserción de 1.8 kbp a 980 bp a 3' del codón de pasro del segundo gen del tándem. Esta inserción presenta las características de un elemento transponible como una secuencia de inserción duplicada en los extremos y la presencia de secuencias repetidas en la secuencia (Walbot y Messing, 1987). Empleando sondas

oligonucleotídicas se ha podido comprobar que en los endospermos de las variedades W22 y W23 es el segundo gen el que presenta una actividad superior (Prem Das y Messing, 1987).

En el laboratorio Prat y col. (Prat et al., 1985; Prat, 1986) aislaron varios clones cDNA codificantes para esta proteína, en la variedad doble híbrida E10. Estos clones se podrían agrupar en tres grupos, con pequeñas diferencias entre ellos (ver fig. 3.32). Las diferencias, a nivel nucleotídico no producen cambios en la secuencia de aminoácidos, con una única excepción en la posición +449 (referido a la región codificante) del clon cDNA pME792 que produce el cambio de serina por alanina. Estas diferencias podrían reflejar tanto polimorfismo alélico como la presencia de más de un gen en esta variedad (E10). Es de resaltar que una de las secuencias descrita por Prat y col. (Prat et al., 1985) en la variedad E10 es completamente idéntica a la descrita como clon ZM15 por Wang y Esen (Wang y Esen, 1986) en la variedad híbrida SSA 419.

El número de copias de secuencias homólogas al clon cDNA pME177 se ha establecido en 1 (ap. 3.6, figura 3.30), en coincidencia con lo observado con las secuencias homólogas al clon cDNA pME119. Hay que destacar que las diferentes secuencias de clones cDNA homólogos a éste han sido siempre idénticas (Prat, 1986).

A partir de lo anteriormente descrito se podrían clasificar los genes de zeínas, entendiendo como tales a las proteínas de reserva del maíz y por tanto incluyendo a la glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2), en dos grupos diferentes según formaran parte o no de familias multigénicas. En el primer grupo se localizarían los genes que codifican para las zeínas clásicas de alto peso molecular, las denominadas Z22-21 (Zd2) y Z19 (Zd1). En el segundo grupo se localizarían las zeínas de bajo peso molecular: Z16 (Zc1), Z15 (Zb) y Z10 (Za) así como la glutelina-2 de 28 kD

(G2, Zc2). codificadas por genes únicos o por familias oligogénicas.

A pesar de que no es posible presentar un modelo de distribución genómica concreto para los genes de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) y para los de zeínas-II de 16 kD (Z16, Zc1) en la variedad W64A, si se pueden establecer ciertas conclusiones sobre su posible organización en el genoma. El gen de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) se encontraría incluido en un fragmento de restricción de 5.8 kbp para EcoRI y de 3.1 kbp para HindIII. En el caso del gen de zeínas-I estos tamaños varían, siendo de 18 kbp para EcoRI, de 1.6 kbp para BamHI y de 4.1 kbp para HindIII.

En ambos casos existe polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción genómicos para el enzima EcoRI entre las diferentes variedades que se han analizado (tabla 3.4). Así, para el gen de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) se pueden observar longitudes de aproximadamente 30, 20, 10 y 6 kbp, y de 20, 6 y 4.5 kbp para el gen de zeínas-II de 14 kD. Este polimorfismo nos ha permitido determinar (ap. 3.7, figura 3.31) la localización de la copia única del gen de glutelina-2 en las variedades W64A y B73 en el cromosoma-7, cerca del lugar que ocupa el locus opaco-2. Una de las dos copias de este gen que se han descrito en la variedad A69Y estaría localizada, de modo análogo a la anterior, en el cromosoma 7 cerca del locus opaco-2, aunque no podemos concluir nada de la otra copia.

Respecto al gen de la zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) no se ha podido localizar variedad alguna que presente polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción entre la línea normal y la mutante homocigota o2o2. Debido a que se observa polimorfismo en las longitudes de los fragmentos de restricción EcoRI para las secuencias homólogas a pME177 y no se observan diferencias en las longitudes entre las bandas normales y mutantes cabe pensar que ambos genes, opaco-2 y zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1), no están

ligados, aunque los resultados no son concluyentes. Soave y Salamini (Soave y Salamini, 1983) han descrito la localización del gen estructural de una zeína de peso molecular aparente 16 kD en el brazo corto del cromosoma 7, cerca del locus opaco-2 y de la región del cromosoma donde se encuentran agrupados genes estructurales de zeínas Z19. La asignación del cromosoma se realizó por estudio de los polimorfismos de isoelectroenfoque entre variedades de maíz y es posible que no se trate del mismo polipéptido codificado por el clon cDNA pME177.

Nuestros resultados coinciden plenamente con los recientemente publicados (Murray et al., 1988) que describen la localización, mediante RFLP ("Restriction Fragment Length Polimorphism"), de un gen codificante para la zeína-II de 15 kD (Z15, Zb) en el cromosoma 6, y para la glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) en el cromosoma 7.

Es interesante el hecho de que los genes de las proteínas de reserva se localicen agrupados en sólo unos pocos puntos del genoma, y que en estas zonas se agrupen genes estructurales que codifican para diferentes tipos de polipéptidos. Adyacentemente a los genes estructurales se encuentran algunos loci génicos que controlan su expresión, pero no sólo de los cercanos sino incluso de los localizados sobre otros cromosomas. Es el caso de los loci opaco-2 (O2), endospermo defectivo B30 (De-B30) y floury-2 (F12), localizados los dos primeros en el cromosoma 7 y el último en el cromosoma 4. Otros dos loci, asimismo implicados en la regulación de las zeínas como son opaco-7 (O7) y opaco-6 (O6) mapan respectivamente en los cromosomas 10 y 8 (ap. 1.4.2.4.4, tabla 1.6, figura 1.3).

Aislamiento del gen de zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1)

La determinación del patrón genómico de restricción para las secuencias homólogas al clon cDNA pME177 permitió abordar,

empleando técnicas de construcción descritas recientemente (Nicholls et al., 1985), el aislamiento del gen codificante para la zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1). En la construcción de la genoteca enriquecida en los fragmentos de secuencia homólogos a pME177 se intentaron dos estrategias tal como se describe en el ap. 3.4. La estrategia que resultó la adecuada suponía el clonaje de fragmentos purificados desde gel de una restricción de DNA de endospermo con el enzima HindIII, en un bacteriófago lambda NM1150 (Murray, 1983). A partir de esta genoteca formada por un número de recombinantes suficiente para que, teóricamente, todos los fragmentos HindIII de alrededor de 4 kbp del genoma del maíz se pudieran localizar con una probabilidad de 0.99 (ap. 3.4.1) se aislaron 5 clones, denominados Z2, Z3, Z10 y Z14. Como se ha descrito (ap. 3.5.4) todos ellos eran idénticos, presentes en las dos orientaciones posibles. El número de clones positivos aislados, 5, cuando esperábamos de 1 a 2 parece indicar que determinamos por exceso la cantidad de DNA genómico de endospermo que formaba parte de la clase de tamaño de alrededor de 4 kbp después de restricción HindIII. Esto se puede atribuir tanto a la aproximación cometida en el cálculo del tamaño del genoma del maíz como, en la práctica, el aislamiento de las diferentes bandas del gel preparativo.

La resolución del mapa físico del inserto del aislamiento Z3 (figura 3.27) y de su secuencia nucleotídica (figuras 3.28 y 3.29, ap. 3.5.3) permitieron determinar exactamente su longitud en 3870 nucleótidos, de los cuales 1238 corresponden a la región 5' flanqueante, 549 a la región codificante y 2083 a la región 3' flanqueante.

La secuencia del inserto del plásmido pZ3 es la primera descripción de una secuencia genómica de este gen. Hasta el momento sólo se conocía la secuencia del clon cDNA pME177 (Prat, 1986). Cuando se comparan ambas secuencias se observa una coincidencia absoluta. Este hecho es completamente

desacostumbrado en las secuencias que se conocen en la actualidad de proteínas de reserva en plantas. La existencia en la mayor parte de las familias de genes de proteínas de reserva en plantas de un número elevado de genes con pequeñas diferencias a nivel de la secuencia dificultan considerablemente el aislamiento de clones cDNA y genómicos con identidad de secuencia. Se han descrito pocos casos en la bibliografía en las que un clon genómico y un clon cDNA codificantes para el mismo tipo de polipéptido presente casi identidad. Uno de ellos (figura 3.32) es entre los clones cDNA A30, aislado de la variedad "Illinois High Protein" (IHP) (Geraghty et al., 1982) y el clon genómico zE19, aislado de la variedad W64A. Entre las dos secuencias sólo existen dos cambios a nivel aminoacídico producidos por dos diferencias en la secuencia de nucleótidos.

Las zeínas-II de 15 kD (z15, Zb) están representadas por genoma haploide de maíz con 1 ó 2 copias. Los clones cDNA (Marks y Larkins, 1985a) y genómico (Boston y Larkins, 1986) se han aislado de dos diferentes variedades, W64A y BMS respectivamente, presentando seis diferencias a nivel nucleotídico que producen 3 cambios de aminoácidos en la secuencia proteica.

Cuando comparamos las secuencias nucleotídicas de los clones p268C y pZ3 destaca el hecho de que las secuencias codificantes son especialmente ricas en nucleótidos G+C (figura 3.35). Comparando los perfiles de riqueza en A+T se notan grandes diferencias entre los dos genes descritos y los clones genómicos de las zeínas clásicas.

La homología que se ha descrito entre las secuencias codificantes de los clones cDNA pME119 y pME177 (figura 3.17) (Prat, 1986) se extiende a las regiones flanqueantes en el genoma. En la secuencia 5' se extiende la región de elevada homología, del 70%, hasta -565 en pZ3 y -655 en p268C. Más alejado se encuentran pequeñas zonas de secuencia conservada como

entre -993 y -829 de pZ3 y entre -935 y -901 de p268C, 34 nucleótidos con un 80% de secuencia conservada. Estas zonas de homología las hemos denominado A, B y C (ap. 3.8.3, figura 3.33).

Se han comparado las secuencias flanqueantes a 5' de los dos genes estudiados con las descritas por Joshi (Joshi, 1987) como señales consenso de regulación en plantas. El inicio de transcripción del gen de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) ha sido localizado por mapado con nucleasa S1 (Boronat et al., 1987), aproximadamente alrededor de la posición -70 respecto al inicio de traducción. Una comparación de la secuencia que rodea al inicio de transcripción, ATCACCA, con las secuencias consenso descritas, ATCATCA (Joshi, 1987), muestra elevada coincidencia. En el caso del gen de la zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) no se ha localizado el inicio de transcripción experimentalmente. La secuencia que se ha propuesto como inicio de transcripción, ACCACCA, se ha escogido por tres motivos. El primero de ellos es la homología con la secuencia consenso descrita. El segundo es la elevada homología con el gen de glutelina-2, gen relacionado, en la zona donde se esperaría. El tercer motivo es que el clon pME177 es, por su tamaño una copia completa del mRNA de dicho gen, y su secuencia solapa con la del inserto de pZ3 hasta la posición -65. En su estudio comparativo de secuencias flanqueantes 5' en plantas Joshi (Joshi, 1987), ante la ausencia de evidencia experimental del inicio de transcripción en la mayor parte de los genes descritos en la bibliografía asigna éste según verifiquen dos de los tres criterios siguientes: homología con la secuencia consenso descrita en eucariotas (Breathnach y Chambon, 1981), homología con las secuencias de genes estrechamente relacionados que sí se han mapado mediante nucleasa S1 o "primer extension", y que la distancia entre la secuencia que forma la posible "TATA box" y el inicio de transcripción propuesto esté comprendida entre 25 y 30 nucleótidos. En el caso del gen de zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) que describimos se cumplen las tres premisas.

La determinación de la secuencia "TATA box" en un gen determinado se debe realizar mediante pruebas funcionales, es decir, demostrando que la ausencia o el cambio de ciertos nucleótidos de la secuencia propuesta impiden la transcripción del gen es cuestión. Hasta el momento presente se han realizado pocos estudios funcionales de los promotores de plantas, debido fundamentalmente al problema de la transformación en estos sistemas. Así pues, la mayor parte de las secuencias que se describen como "TATA box" en la bibliografía son hipotéticas y no verificadas experimentalmente. A partir del estudio de dichas secuencias se ha propuesto un consenso general en plantas (tcacTATATATAg), aunque presenta variaciones dependiendo del grupo de genes que se considere, por ejemplo, tcccTATAAATTa es la consenso propuesta para las proteínas de reserva de dicotiledóneas y taacTATAAATAg la consenso propuesta para las proteínas de reserva de cereales (Joshi, 1987). En el caso de los dos genes en estudio se encuentran secuencias similares a las descritas; concretamente, en la secuencia de p268C se encuentra la secuencia TATAAATA entre los nucleótidos -104 a -96, y en la secuencia de pZ3 la misma secuencia entre las posiciones -100 a -92. Esta secuencia dista del punto propuesto como inicio de transcripción 26 y 25 nucleótidos respectivamente en las secuencias de p268C y pZ3. Esta misma secuencia "TATA box" se localiza en genes de zeínas en una posición similar respecto al inicio de traducción, como por ejemplo en el clon genómico pML1 (Brown et al., 1986) tal como describen Boronat y col. (Boronat et al., 1987).

La secuencia consenso para la "CAAT box" o "AGCA box" (Benoist et al., 1980) en animales es GGC/TCAATCT. Del estudio de los genes de plantas se ha propuesto una secuencia consenso bastante indeterminada C/TAN₍₂₋₅₎G/TNGAN₍₂₋₄₎C/TC/T (Messing et al., 1983). Las secuencias descritas para los genes de zeínas y de otras proteínas de reserva de plantas tienen una homología muy

limitada con la secuencia consenso. Las secuencias "CAAT box" que se han propuesto como tales en los genes de zeínas-II y de glutelina-2 lo han sido por su parecido, escaso, con la secuencia consenso, y por su posición respecto al inicio de transcripción.

Los genes de zeínas presentan secuencias "CAAT box" y "TATA box" consenso típicas de los promotores eucariotas dentro de los primeros 180 nucleótidos a 5' del codón de inicio (Langridge et al., 1983; Pedersen et al. 1986; Kriz et al., 1987). La transcripción desde este promotor en las zeínas forma un mRNA de aproximadamente 900 nucleótidos (Langridge et al., 1982; Kriz et al., 1987). La mayor parte de estos transcritos presentan extremos 5' que se localizan aproximadamente a 40 a 65 nucleótidos del codón de inicio de traducción (Langridge et al., 1983; Kriz et al., 1987). En los transcritos de las zeínas de menor peso molecular, por ejemplo en las zeínas-II de 15 kD (Z15, Zb), se ha encontrado variación en la longitud de la secuencia 5' no traducida (Marks et al., 1985a; Boston y Larkins, 1986).

Además de los transcritos de 900 nucleótidos se han localizado transcritos de tamaños variados, 1800, 2800 y 3800 nucleótidos, que se han descrito como probables precursores del mRNA de menor tamaño (Langridge et al., 1982). Sin embargo el mapeo del inicio de transcripción en esos casos sugiere la presencia de un promotor localizado aproximadamente a 1 kb a 5' del inicio de traducción (Langridge y Feix, 1983; Boston y Larkins, 1987; Kriz y Boston, 1987). El análisis de la secuencia en esta región permite reconocer promotores típicos de eucariotas.

La cantidad de transcrito que se produce desde cada uno de los dos promotores es una cuestión aún no resuelta (Langridge et al., 1982; Langridge y Feix, 1983; Boston et al., 1986; Boston y Larkins, 1987; Kriz et al., 1987). La transcripción 'in vitro' de un clon genómico de zeínas de 22-21 kD (Z22-21, Zd2) en un

extracto de vesículas germinales de oocitos de Xenopus laevis produce RNA desde ambos promotores, aunque parece que el preferente es P2, el más cercano a la región codificante. En un extracto nuclear de células HeLa, el mismo clon genómico transcribe exclusivamente desde el promotor lejano P1 mientras se encuentre presente, y desde P2 cuando P1 está ausente (Langridge y Feix, 1983). En experimentos de "run-off" empleando núcleos de endospermo de maíz no se detecta transcripción desde el promotor lejano de un gen de zeínas de 19 kD (Z19, Zd1) (Boston et al., 1986).

Los estudios realizados 'in vivo' tampoco han permitido establecer una clara preferencia por una de las dos regiones promotoras. Un gen de zeínas de 22-21 kD (Z22-21, Zd2) transformado en células de levadura produce transcritos iniciados en P2, promotor cercano, mientras que en el caso de un gen de zeínas de 19 kD (Z19, Zd1) se detectan transcritos iniciados tanto desde P1 como desde P2 (Langridge et al., 1984; Coraggio et al., 1986). Algunas secuencias genómicas a las que se ha deleccionado en el promotor P2 transcriben cuando se las inyecta en el núcleo del alga verde Acetabularia mediterranea (Brown et al., 1986). Sin embargo, a pesar de que en este sistema se ha detectado la proteína por inmunofluorescencia no ha sido posible analizar el RNA.

En la clase de zeínas de 15 kD (Z15, Zb) se ha descrito la posible presencia de dos promotores. Diversos experimentos de mapeo del inicio de transcripción con nucleasa S1 muestran que la mayor parte de los transcritos se inician entre 63 y 69 nucleótidos a 5' del inicio de traducción, mientras que se encuentra una pequeña cantidad de transcritos de longitud superior (Marks et al., 1985; Boston y Larkins, 1986). El análisis de la secuencia de un clon genómico de zeínas de 15 kD (Z15, Zb) permite identificar elementos "TATA box" en las posiciones -192, a 30 nucleótidos a 5' del sitio propuesto para

el inicio de transcripción lejano, y en -92, a 32 nucleótidos a 5' del inicio de transcripción cercano. Se han detectado 'in vitro' transcritos de diferente tamaño que se inician desde el promotor lejano (Boston y Larkins, 1986).

La búsqueda de otras secuencias en las zonas 5' que puedan estar implicadas en la regulación de los genes de las zeínas es de gran interés por la expresión coordinada que presentan estos genes. Cuando se comparan las regiones 5' flanqueantes de genes de proteínas relacionadas se encuentran homologías importantes en regiones amplias, como por ejemplo en la comparación de cinco genes de zeínas de 19 kD (Z19, Zd1) descrita por Kriz y col. (Kriz et al., 1987) donde la homología se extiende hasta la posición -823. Secuencias por encima de esta posición divergen y se hacen repetitivas. Se han descrito una serie de elementos de secuencia en las regiones flanqueantes de estos genes que, por su conservación en el motivo y en la distancia respecto al inicio de transcripción, podrían estar implicadas en la regulación.

Una secuencia de 15 nucleótidos (CACATGTGTAAAGGT) que se inicia en las posiciones -331 en los genes de zeínas de 19 kD (Z19, Zd1) y en la posición -340 en los genes de zeínas de 22-21 kD (Z22-21, Zd2) es común a todas las zeínas clásicas de alto peso molecular (Brown et al., 1986). Dentro de esta secuencia existe un heptanucléido altamente conservado (TGTAAG) similar al elemento central de la secuencia intensificadora ("enhancer") del virus SV40 (GTGGAAAG) (Gillies et al., 1983; Khoury and Gruss, 1983; Brown et al., 1986). Este elemento, que Thompson y Larkins (Thompson y Larkins, 1988) describen como 'elemento -300' también se encuentra en las zeínas de bajo peso molecular, por ejemplo la zeína-II de 15 kD (Z15, Zb) (Boston y Larkins, 1986), y en las secuencia de la glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) y de la zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) (ap. 3.8.3), así como en genes de proteínas de reserva de cebada y trigo (Brandt et al., 1985; Sugiyama et al., 1985; Boronat et al., 1987; Pedersen et al.,

1986; Colot et al., 1987). La presencia de esta secuencia altamente conservada en diferentes genes de función similar en especies divergentes sugiere un papel regulador.

Sobre esta secuencia, es de destacar el hecho de que en las zeínas de 19 kD (Z19, Zd1) se encuentra asociada a una secuencia invertida y repetida que podría formar estructuras "en lazo" ("hairpin loop") presentándose la secuencia intensificadora ("enhancer") en el codo. Estas secuencias invertidas son menos conservadas en las zeínas de 22-21 kD (Z22-21, Zd2). En el caso del gen de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) y de zeínas-II de 16 kD (Z16, Zc1) se pueden postular una serie de estructuras (ap. 3.8.3, figura 3.36) similares. Maier y col. (Maier et al., 1988) han descrito un factor proteico que se une de modo específico a una región de 18 nucleótidos (-339 a -318) asociada con las secuencias repetidas invertidas, y que la protege de la digestión con DNAsaI en un clon genómico de zeínas de 19 kD (Z19, Zd1).

Otro elemento, único en las zeínas de 19 kD (Z19, Zd1), similar a la secuencia de 15 nucleótidos conservada, de 21 nucleótidos (AAAGGTAAAGGTGTGTCACAC) se ha descrito localizada a 5' (-1214 a -1194) del promotor lejano P1 (Brown et al., 1986). Experimentos de retención en filtros ("filter-binding") demuestran una asociación de esta secuencia con proteínas nucleares extraídas del endospermo pero no de plántulas de maíz (Maier et al., 1988).

Se han descrito elementos de secuencia adicionales menos ampliamente conservados. Uno de ellos, descrito por nuestro grupo (Boronat et al., 1987) son dos heptanucleótidos conservados (CAACAAA y ATGTCAA) separados por una secuencia de 11 nucleótidos (figura 3.36), y se localiza tanto en el gen de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) como en las zeínas de 19 kD (Z19, Zd1) y en gliadinas y prolaminas de alto peso molecular en el trigo. Este elemento, presente en el gen de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2)

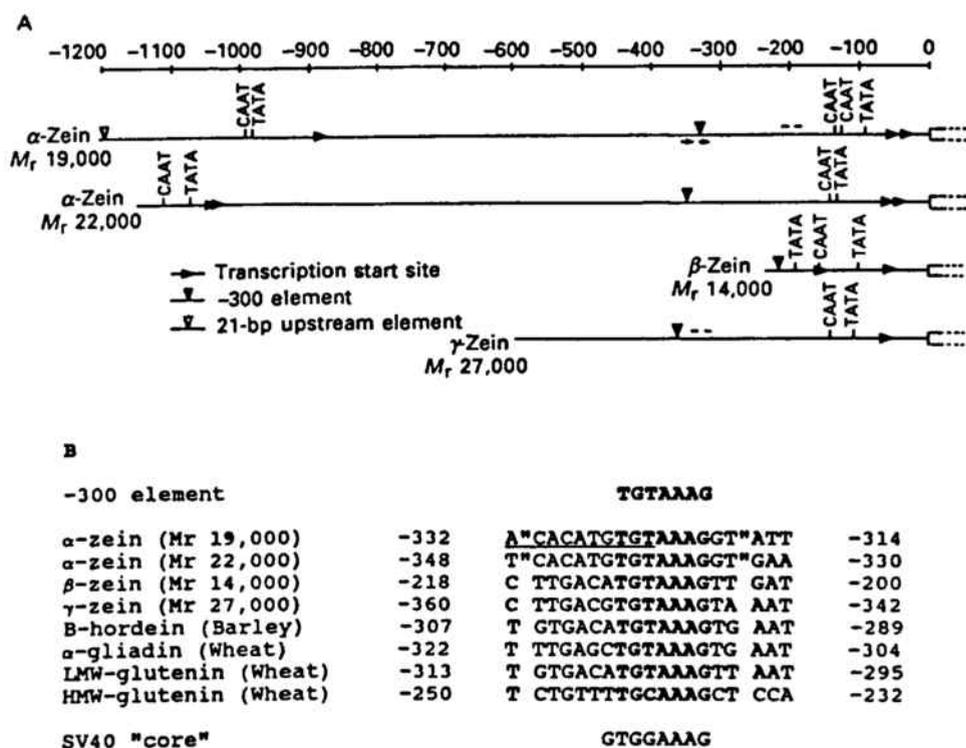


Figura 4.2 : Posición de los elementos reguladores potenciales en zeínas (tomado de Thompson y Larkins, 1988).

A : Posición de las secuencias conservadas en las regiones flanqueantes 5'. Flechas indican los dos repetidos directos de 10 bp en zeínas de 19 kD (Z19, Zd1). Las líneas representan el elemento 7-11-7.

B : Comparación de las secuencias flanqueantes del elemento -300. Se señalan los 15 nucleótidos conservados y los 7 del elemento 'enhancer'. Subrallado parte de la secuencia implicada en la estructura 'hairpin loop' en zeínas de 19 kD (Z19, Zd1).

está ausente en el gen de zeínas-II de 16 kD (Z16, Zc1) pues se localiza en la zona situada entre las regiones de homología A y B, inexistente en el segundo clon genómico (figura 3.33).

Una búsqueda de secuencias de reconocimiento de factores proteicos específicos de secuencia descritos sobre las regiones flanqueantes de los genes de zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) y de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) nos permite reconocer una secuencia AP1 (Lee et al., 1987) en el primero y tres secuencias, una AP1 y dos CREB (Montminy et al., 1986). El significado de estas secuencias relacionadas con factores proteicos específicos de secuencia en sistemas tan diferentes a las plantas como el virus SV40 y el adenovirus es desconocido. Podríamos destacar, únicamente, la secuencia AP1 que en ambos genes se localiza en una posición similar (figura 3.33).

A pesar de que es interesante el estudio de las secuencias flanqueantes, sus resultados son hipotéticos hasta que no se verifiquen en plantas modificadas. Idealmente, estos estudios deberían realizarse transformando plantas de maíz con genes de zeínas modificados. Recientemente Rhodes y col. (Rhodes et al., 1988) han descrito la posibilidad de recuperar plantas de maíz desde protoplastos transformados. A pesar de que esto abre una vía de experimentación, inexistente hasta el momento, se han de resolver problemas como la esterilidad de estas plantas para conseguir un buen sistema de estudio.

En la actualidad sólo se dispone de experimentos con plantas transgénicas en dicotiledoneas (girasol, tabaco, etc...). Así, en estos sistemas se ha conseguido evidencia del papel del promotor cercano P2 en la transcripción de los genes de zeínas. Estos experimentos se han realizado con dos aproximaciones diferentes: estudio de tejidos de plantas transformadas estables y el estudio de la expresión transitoria en protoplastos transformados.

Los primeros estudios sobre la expresión de las zeínas de 22-21 kD (Z22-21, Zd2), de 19 kD (Z19, Zd1) y de 15 kD (Z15, Zb) se realizaron sobre callos de girasol transgénicos (Matzke et al., 1984; Goldsbrough et al., 1986). Los tejidos de girasol producen transcritos de zeínas de tamaños similares a los descritos en el endospermo del maíz, pero no se ha podido detectar la síntesis de proteína. Un análisis de las delecciones en la zona 5' en los genes de zeínas de 22-21 kD (Z22-21, Zd2) y de 19 kD (Z19, Zd1) han permitido identificar una región que es importante para la transcripción del gen en el callo de girasol (Roussel et al., 1988). Mutantes de delección con tan solo 337 nucleótidos de zona 5' desde el inicio de transcripción son capaces de dirigir la transcripción en este sistema. Cuando esta región se reduce a 125 nucleótidos desde el inicio de transcripción sólo se detecta transcripción en 1 de 6 transformantes. Delecciones superiores producen una pérdida completa de la actividad transcripcional.

Los experimentos de expresión génica transitoria en protoplastos de zanahoria demuestran que, para permitir la transcripción de la cloramfenicol acetyl-transferasa (CAT), son suficientes 420 nucleótidos de la zona 5' de los genes de zeínas Z22-21 y Z19 (Boston et al., 1987). Ensayos similares con mutantes de delección que dirigen la expresión de un gen CAT producen transcripción en menor grado, pero detectable, con 79 o 125 nucleótidos de la zona 5' flanqueante (Roussel et al., 1988). Los mutantes de delección con actividad máxima presentan 337 nucleótidos de zona 5'. Como las dos secuencias consenso CAAT y TATA se localizan en la región de 125 nucleótidos (-76 y -118) se ha sugerido que algún elemento de secuencia localizado entre -337 y -125 sería el requerido para una transcripción más eficiente. El elemento -300 se localiza en esta región.

Los experimentos de transformación con tejido no diferenciado demuestran la presencia de secuencias requeridas

para una transcripción precisa de los genes clonados, pero no son capaces de dar respuesta a los requerimientos responsables de la especificidad de tejido de los genes de zeínas. Con la finalidad de analizar la expresión específica de los genes de zeínas clásicas de alto peso molecular, se han transferido éstos a plantas de petunia y tabaco mediante transformación con Agrobacterium tumefaciens. Un gen codificante para las zeínas de 19 kD (Z19, Zd1) con 945 nucleótidos de la región 5' y 1218 de la región 3' produce niveles detectables de transcritos de zeínas en la semilla de algunas plantas de petunia (Ueng et al., 1988). El mRNA se detectó en la ontogenia de la semilla durante el período del desarrollo del endospermo y posteriormente se redujo a niveles indetectables. Sin embargo, los transcritos de zeínas no se limitaron a la semilla, y, en algunas plantas, el nivel de mRNA en otros tejidos excede al de las semillas. Se pueden detectar en muchas plantas transformadas niveles bajos de mRNA de zeínas, pero no se ha podido encontrar la proteína en ningún tejido. Estos resultados son similares a los encontrados en tabaco con otro gen de zeínas de 22-21 kD (Z22-21, Zd2) que contenía 933 nucleótidos de la zona 5' y 3 kb de la zona 3' (Scherthaner et al., 1988). Como en petunia, en este caso se pudo detectar el mRNA en semilla, en niveles reducidos, pero no fue posible encontrar la proteína.

Thompson y Larkins (Thompson y Larkins, 1988) describen dos explicaciones posibles para la variación en la expresión de estos genes. Puesto que la familia multigénica de las zeínas de alto peso molecular es muy extensa y puede contener pseudogenes, entra dentro de lo posible que los genes estudiados sean estructuralmente incompletos y por ello incapaces de expresión correcta. Alternativamente el mRNA de zeínas o la proteína podría ser inestable en las plantas de tabaco o de petunia y por esto se observaría baja expresión de estos genes. Como última explicación proponen que los promotores de zeínas no sean reconocidos correctamente en las plantas transgénicas de tabaco o petunia.

Según estos mismos autores, la inestabilidad de la proteína no es una explicación adecuada puesto que se ha observado la acumulación de la proteína en las semillas de petunia y de tabaco transgénico cuando la región codificante se pone bajo el control de un promotor de dicotiledónea específico de la semilla (Hoffman et al., 1987; Williamson et al., 1988). La estabilidad de la proteína ha sido confirmada, asimismo, al emplear el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor con un gen de zeína (Schernthaner et al., 1988). En este caso la proteína se detecta en tallos y hoja así como en el endospermo de plantas de tabaco transgénicas.

Es interesante destacar que los resultados disponibles del análisis de los promotores de otros genes de proteínas de reserva de cereales mediante plantas transgénicas coinciden en que son regulados correctamente en plantas de tabaco transgénicas. Se ha descrito expresión específica de la semilla de un gen CAT dirigido por secuencias flanqueantes 5' de un gen de B-hordeínas de la cebada así como de dos genes de proteínas de reserva del trigo (Colot et al., 1987; Marris et al., 1988). Esto es especialmente importante debido a que las secuencias conservadas comunes a muchos genes de proteínas de reserva de cereales (figura 4.2) se encuentran en las zonas 5' empleadas en estas construcciones quiméricas. Sin embargo, la región 5' de un gen de zeínas de 19 kD (Z19, Zd1) que también incluye los elementos conservados produce niveles reducidos de actividad CAT en plantas transgénicas de tabaco, detectándose sólo un caso sobre once (Schernthaner et al., 1988). Si se aumenta la sensibilidad del ensayo empleando esta misma región 5' unida al gen de la β -glucuronidasa (GUS), gen testigo de gran sensibilidad, se detecta expresión en todas las plantas transgénicas, pero los niveles son reducidos. A partir de estos resultados, parece que las secuencias responsables del control temporal y especificidad de tejido de los genes de zeínas se localizan en esta región 5'.

Sin embargo, estas secuencias parecen ser reconocidas escasamente en las plantas transgénicas de tabaco, posiblemente debido a que los elementos necesarios para la actividad máxima, elementos que actuarían en trans, están ausentes en el sistema de las plantas transgénicas.

En la actualidad los resultados obtenidos con plantas dicotiledóneas transgénicas parecen descartarlas como modelo que permita el estudio y disección de los promotores de los genes de zeínas. Debido a la inexistencia de sistemas adecuados de transformación de maíz el estudio de los promotores de estos genes y de las secuencias responsables de su control temporal y de la especificidad de tejido parece dirigido a la transformación de protoplastos de endospermo.

Clasificación de los genes de las proteínas de reserva

La nomenclatura empleada para describir los diferentes grupos de proteínas de reserva en el maíz, como ya se ha descrito, es confusa. Propuesta a principios de siglo se basaba en las propiedades de extracción de las diferentes fracciones. En la actualidad el conocimiento de las secuencia de aminoácidos de gran número de polipéptidos, así como de las secuencias flanqueantes en el genoma y su posición en los cromosomas, permiten proponer una clasificación más acorde con su posible origen evolutivo.

Nuestro grupo ha propuesto una clasificación de las proteínas de reserva considerando como zeínas a todas las proteínas de reserva del maíz, incluidas en los cuerpos proteicos, las hemos agrupado en 4 grupos que hemos denominado Za, Zb, Zc y Zd. Se han tenido en cuenta los criterios :

1. La longitud de la proteína. El peso molecular aparente

del polipéptido en geles de poliacrilamida-SDS enmascara el tamaño real de la proteína, debido, fundamentalmente a su composición de aminoácidos, hidrofóbica, y a su estructura.

2. La secuencia del péptido señal. Se puede observar en la figura 4.4 que existen diferencias en el péptido señal.

3. La secuencia de los repetidos interiores, en la región codificante.

4. La naturaleza oligogénica o multigénica.

5. La existencia de homologías con otras proteínas de reservas de cereales.

Las clases Za y Zb corresponden a las denominadas zeínas de 10 y 15 kD (Z10 y Z15) respectivamente, representadas por los clones que describen Kirihara y col. (Kirihara et al., 1988) y Marks y col. (Marks et al., 1985a; 1985b).

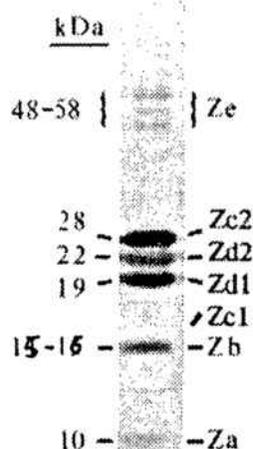
La clase Zc se subdivide en dos, Zc1 que corresponde a las zeínas de 16 kD representadas por el clon cDNA pME177 (Prat, 1986) y Zc2 que representa la denominada glutelina-2 de 28 kD. Ambas proteínas presentan un alto grado de homología. Estas tres primeras clases corresponden a genes únicos o familias oligogénicas.

El cuarto grupo, Zd, presenta una elevada heterogeneidad, siendo con mucho el más complejo. Representado por una familia multigénica, se puede dividir en dos grupos, que hemos denominado Zd1 y Zd2. Las proteínas Zd1 serían predominantemente de 19 kD (Z19) y las proteínas Zd2 serían predominantemente de 22-21 kD (Z22-21). Sin embargo, la clasificación por el tamaño no es excluyente. La asignación a uno u otro grupo se realiza por similitud con la secuencia de los repetidos internos, y otras características como la secuencia del péptido señal, con los clones de referencia Z7 (Kriz et al., 1984) para Zd2 y los clones cDNA A20 y A30 (Geraghty et al., 1982) para Zd2.

Peso molecular (kD)	teórico	Za	Zb	Zc1	Zc2	Zd1	Zd2
	SDS-PAGE	10	15	15	28	19	22
	longitud	129	160	154	204	213-219	242-245
		oligogénicas				multigénicas	

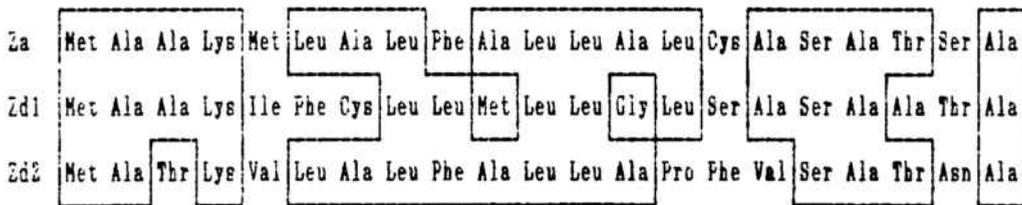
Figura 4.3 : Nomenclatura de las zeínas, referida al peso molecular teórico calculado a partir de la secuencia y del peso molecular aparente en geles de poliacrilamida SDS. Se indica la naturaleza de familias oligogénicas o multigénicas de los genes de cada una de las clases.

Figura 4.4 : Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las proteínas contenidas en los cuerpos proteicos de endospermo de maíz purificados por HPLC (R. Farias, comunic. personal)



Las zeínas clásicas de alto peso molecular, ahora denominadas por nosotros Zd (Zd1 y Zd2) no presentan homología con ninguna otra proteína de reserva de cereales descrita, excepto en la composición global de aminoácidos con las proteínas del sorgo (). Por ello, desde un punto de vista evolutivo, se ha considerado que las zeínas Zd podrían corresponder a 'nuevas zeínas' mientras que las zeínas Zb y Zc serían 'zeínas ancestrales'. Las zeínas Za presentan homologías en la secuencia del péptido señal con las zeínas Zd (figura 4.5)

A. NUEVAS ZBINAS



B. ZBINAS ANCESTRALES

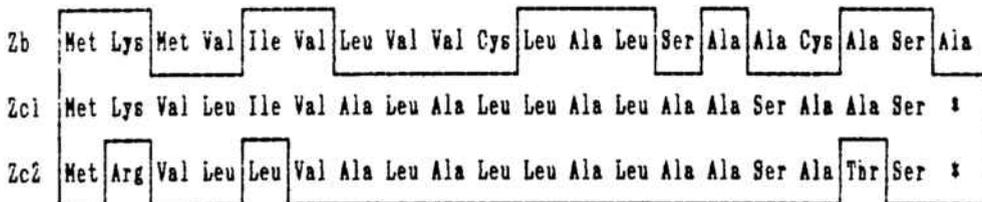


Figura 4.5 : Péptido señal de las diferentes clases de zeínas.

5. CONCLUSIONES

1. Se han aislado clones genómicos codificantes para las proteínas Zc2 (glutelina-2 de 28 kD, G2) de una genoteca de endospermo de maíz (*Zea mays* L.) de la variedad W64A. Los insertos se alinean cubriendo una región del genoma del maíz de 18.5 kbp, con la región codificante aproximadamente centrada.
2. La secuencia de nucleótidos que se ha realizado de un fragmento genómico HindIII-HindIII de 2975 nucleótidos ha permitido conocer una amplia zona de región flanqueante 5' del gen Zc2 que codifica para una glutelina-2 de 28 kD. La secuencia determinada es coincidente con la que se obtuvo en el laboratorio de un fragmento genómico HindIII-EcoRI de 1.9 kbp.
3. Dentro de la secuencia flanqueante al gen Zc2 (glutelina-2 de 28 kD, G2) se han encontrado evidencias de la existencia de un único promotor del gen, localizado alrededor de la posición -100.
4. En la búsqueda de clones genómicos codificantes para una zeína-II de 16 kD se obtuvieron evidencias de una reorganización específica que afectaba a las regiones genómicas homólogas al clon cDNA pME119. Este fenómeno sólo se ha observado en relación a estas secuencias y podría deberse a la existencia de secuencias Chi o similares en la zona 5' del gen Zc2 (glutelina-2 de 28 kD, G2). Esta hipótesis requiere una evidente confirmación experimental.
5. El número de copias del gen Zc2 (glutelina-2 de 28 kD, G2) en la variedad de maíz W64A es de 1 por genoma haploide. La expresión específica en el endospermo de maíz de los genes Zc2 que codifican para la glutelina-2 de 28 kD no están asociados a una amplificación específica de su secuencia en el genoma.

6. Se construyó una genoteca parcial de DNA de endospermo de maíz de la variedad W64A formada por 117000 recombinantes con un inserto de aproximadamente 4 kbp. De esta genoteca se aislaron 5 bacteriófagos cuyos insertos, idénticos, incluían un gen Zc1, que codifica para una zeína-II de 16 kD.
7. Se realizó la secuencia de nucleótidos de un fragmento genómico de 3870 nucleótidos, lo cual ha permitido conocer, además de la región genómica codificante, una amplia zona flanqueante de región 5' y 3' del gen Zc1. La coincidencia de la secuencia codificante genómica del gen en la variedad W64A con la descrita del clon cDNA pME177 de la variedad E10 permite concluir que se trata de un gen que carece de intrones. Asimismo es de destacar que es el primer caso descrito en el que hay una coincidencia total entre la secuencia de un clon genómico y el de un clon cDNA en el estudio de los genes de las proteínas de reserva de las plantas.
8. El número de copias del gen Zc1 (zeína-II de 16 kD, Z16) en la variedad de maíz W64A es de 1 por genoma haploide. La expresión específica en el endospermo de maíz de los genes Zc1 que codifican para la zeína-II de 16 kD no están asociados a una amplificación específica de su secuencia en el genoma.
9. La comparación de las regiones flanqueantes a 5' y 3' de los genes de glutelina-2 de 28 kD (G2, Zc2) y zeína-II de 16 kD (Z16, Zc1) permite definir 3 zonas de homología en la zona 5'. Las zonas A y B, con valores de alrededor al 70 % de conservación de la secuencia, se extienden hasta la posición -650. La tercera zona, C, de 34 nucleótidos con una conservación del 80 % se sitúa alrededor de la posición-920. En la región 3' la homología se extiende, con un valor

del 70 % de conservación de la secuencia, unos 190 nucleótidos. La elevada homología en la región codificante, así como en las regiones flanqueantes indican que estas dos proteínas se pueden agrupar como miembros de una familia de proteínas de reserva del maíz. Asimismo, las homologías que presentan con otras proteínas de reserva de las prolaminas de cereales nos permiten concluir que forman parte, con ellas, de una familia de proteínas de reserva de cereales, prolaminas ancestrales, a diferencia de las zeínas clásicas que se podrían considerar como proteínas de reserva aparecidas posteriormente, prolaminas recientes.

10. Se han localizado dentro de la región 5' de ambos genes una serie de elementos , alguno de los cuales están probablemente implicados en la regulación de la expresión temporal y/o específica de tejido que presentan.
11. En la región 3' de ambos genes se han localizado tres posibles señales de poliadenilación.
12. Se propone una clasificación y nomenclatura de las proteínas de reserva del maíz por la cual todas ellas se denominarían zeínas. Esta nomenclatura se basa en la totalidad de los conocimientos disponibles actualmente sobre estas proteínas y sus genes, y pretende ser la base para el establecimiento de superfamilias de las proteínas de reserva en monocotiledóneas que aclare el posible origen y relaciones evolutivas entre las diferentes formas conocidas.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abrol, Y. P.; Uprety, D. L.; Ahyja, V. P.; Naik, M. S. (1971). Aust. J. Agric. Res. 22: 197
- Adeli, K. H.; Altosaar, I. (1984). FEBS Lett 178: 193
- Altschul, A. M.; Yatsu, L. Y.; Ory, R. L.; Engleman, E. M. (1966). Annu. Rev. Plant. Physiol. 17: 113
- Argos, P.; Pedersen, K.; Marks, M. D.; Larkins, B. A. (1982). J. Biol. Chem. 257: 9984
- Autran, J.; Lew, E. J.; Nimmo, C.; Kasarda, D. D. (1979). Nature 282: 527
- Axtell, J. (1975). "Third Research Coordination Meeting of FAO/IAEA/GSF Seed Improvement Program" Hahnenklee, West Germany. - Baba, T.; Arai, Y.; Ono, T.; Munakata, A.; Yumaguchi, H.; Itoch, T. (1982). Carbohydr. Res. 107: 215
- Bartels, D.; Thompson, R. D. (1983). Nuc. Acids Res. 11: 2961
- Basha, S. M.; Pancholy, S. K. (1981). J. Agric. Food Chem. 29: 331
- Becker, A.; Gold, M. (1975). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 581
- Bennet, M. D.; Smith, J. B. (1976). Phil. Trans. R. Soc. London 274 : 28
- Benoist, C.; O'Hare, K.; Breathnach, R.; Chambon, P. (1980). Nuc. Acids Res. 8: 127
- Bietz, J. A.; Huebner, F. R.; Sandersen, J. E.; Walls, J. S. (1977). Cereal Chem. 54: 1070
- Bietz, J. A.; Wall, J. S. (1973). Cereal Chem 30: 537
- Bietz, J. A.; Paulis, J. W.; Wall, J. S. (1979). Cereal Chem 56: 327
- Bird, A. P. (1984). Nature 307: 503
- Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979). Nuc. Acids Res. 7: 1513
- Bolivar, F.; Rodríguez, R. L.; Greene, P. J.; Betlach, M. C.; Heynecker, H. L.; Boyer, H. W. (1977). Gene 2: 95
- Bonner, T. I.; Brenner, D. T.; Neufeld, B. R.; Britten, R. J. (1973). J. Mol. Biol. 81: 123
- Borst, P. (1984). Nature 309 : 580
- Boronat, A.; Martínez, M. C.; Reina, M.; Puigdomènech, P.; Palau, J. (1986). Plant Science 47: 95
- Boston, R. S.; Kodrzycki, R.; Larkins, B. A. (1986). En "Molecular Biology of Seed Storage Proteins and Lectins. Ninth Symposium in Plant Physiology", edit. Shannon L M y Crispeels M J. University of California USA, Riverside California. pp. 117 -126.
- Boston, R. S.; Larkins, B. A. (1986). Plant Molecular Biology 7: 71
- Boston, R. S.; Beckwar, M. R.; Ryan, R. D.; Goldsbrough, P. B.; Larkins, B. A.; Hodges, T. K. (1987). Plant Physiol. 83: 742
- Boston, R. S.; Larkins, B. A. (1987). En "Genetic Engineering : Principles and Methods" Vol. 9, edit. Setlow J - Hollaender A, Plenum Press, Nueva York. pp. 61-74.
- Boulter, D.; Derbyshire, E. (1978). En "Plant Proteins" edit. Norton G, Butterworths, Londres. pp 3-24.
- Boyer, H. W.; Roulland-Dossoix, D. (1969). J. Mol. Biol. 41: 459

- Brahic, M.; Haase, A. T. (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 6125
- Brandt, A.; Montembault, A.; Cameron-Mills, V.; Rasmussen, S. K. (1985). Carlsberg Res. Commun. 50: 333
- Breathnach, R.; Chambon, P. (1981). Annu. Rev. of Biochem. 50: 349
- Brink, R. A.; Cooper, D. C. (1947a). Bot. Rev. 13: 423
- Brink, R. A.; Cooper, D. C. (1947b). Genetics 32: 350
- Britten, R. J.; Kohne, D. E. (1966). Year Book Carnegie Inst. Washington 65: 78
- Britten, R. J.; Davidson, E. H. (1969). Science 165: 549
- Brown, J. S.; Wandelt, C. H.; Feix, G.; Neuhaus, G.; Schweiger, H. G. (1986). Eur. J. of Cell Biology 42 : 161
- Burr, B.; Nelson, O. E. (1973). Ann. N.Y. Acad. Sci. 210: 129
- Burr, B.; Burr, F. A. (1976). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 515
- Burr, B.; Burr, F. A.; Rubenstein, I.; Simon, M. N. (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 : 696
- Burr, F. A.; Burr, B. (1981). J. Cell. Biol. 90: 427
- Burr, B.; Burr, F. A.; Rubenstein, I.; Simon, M. N. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 696
- Burr, B.; Burr, F. A.; St John, T. P.; Thomas, M.; Davis, R. W. (1982). J. Mol. Biol. 154: 33
- Campos, N. (1988). Tesis Doctoral, Fac. Biología, Univ. Barcelona.
- Casey, R.; Davidson, E. (1977). Nuc. Acids Res. 4: 1538
- Charbonnier, L.; Terce-Laforgue, T.; Mosse, J. (1981). J. Agric. Food. Chem. 29: 968
- Clemens, M. J. (1984). En "Transcription and Translation : a practical approach", edit. Hames B D - Higgins S J, IRL Press, Oxford - Washington. pp. 211-230
- Cohen, S. N.; Chang, A. C. Y.; Hsu, L. (1972). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110
- Collins., J. F.; Coulson, A. F. V. (1987). En "Nucleic Acids and Protein Sequence Analysis : a practical approach", edit. Bishop M J - Rawlings C J, IRL Press, Oxford - Washington. pp. 323-358
- Colot, V.; Robert, L. S.; Kavanagh, I. A.; Bevan, M. W.; Thompson, R. D. (1987). EMBO J. 6: 3559
- Cooper, D. N. (1983). Human Genet. 64: 315
- Coraggio, I.; Compagno, C.; Martegani, E.; Ranzi, B. M.; Sala, E.; Alberghina, L.; Viotti, A. (1986). EMBO J. 3: 459
- Cox, K. H.; De Leon, D. V.; Angerer, L. M.; Angerer, R. C. (1983). Dev. Biol. 12 : 123
- Crouch, M. L. (1982). Planta 156: 520
- Crouch, M. L.; Tenbarger, K. M.; Simon, A. E.; Ferl, R. (1983). J. Mol. Appl. Genet. 2: 273
- Cuadras, M. C. (1981). "Métodos de análisis multivariante". Col. Lab. de Cálculo, n. 23. Eunibar, Barcelona.
- Dagert, M.; Ehrlich, S. D. (1979). Gene 6: 23
- Daniels, D. L.; Dewet, J. R.; Blattner, F. R. (1980). J. Virol. 33: 390

- Daniels, D. L.; Schroeder, J. L.; Blattner, F. R.; Szybalsky, F. R.; Sanger, F.; Coulson, A.; Hong, G.; Hill, D.; Petersen, G.; Blattner, F. (1983). En "Lambda II", edit. Hendrix D W - Roberts J W - Stahl F W - Weisberg R D, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York. pp. 519-676
- Davidson, E.; Jacobs, H. T.; Britten, R. J. (1983). Nature 301: 468
- Davis, L. G.; Dibner, M. D.; Battey, J. F. (1986). "Basic Methods in Molecular Biology", Elsevier, Nueva York Amsterdams Londres.
- Davis, R. W.; Botstein, D.; Roth, J. R. (1980). "Advanced Bacterial Genetics. A manual for Genetic Engineering", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Dean, C.; Den Elzen, P. V.; Tamaki, S.; Dunsmuir, P.; Bedbrock, J. (1985). EMBO J 4: 3055
- De Lange, T.; Liu, A. Y. C.; Van der Ploeg, L. H. T.; Borst, P.; Tromp, M. C.; Van Boom, J. H. (1983). Cell 34 : 8u91
- Denhardt, D. J.; Dressler, D.; Ray, D. S. (1979). "The single stranded phages", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Dennis, E. S.; Sachs, M. M.; Gerlach, W. L.; Finnegan, E. J.; Peacock, W. J. (1985). Nuc. Acids Res. 13: 727
- Derbyshire, E.; Wright, D. J.; Boulter, D. (1976). Phytochemistry 15: 3
- Dierks-Ventling, C. H. R. (1982). En "Embryonic Development: part B. Cellular aspects", edit. Liss A R, Nueva York. pp. 545-553
- Di Fonzo, N.; Fornasari, E.; Salamini, F.; Soave, C. (1977). Maydica 22: 77
- Di Fonzo, N.; Gentinetta, E.; Salamini, F.; Soave, C. (1979). Plant Sci. 14 : 345
- Di Fonzo, N.; Fornasari, E.; Salamini, F.; Reggiani, R.; Soave, C. (1979). J. Hered. 71: 397
- Di Fonzo, N.; Hartings, H.; Maddaloni, M.; Palau, J.; Salamini, F.; Thompson, R.; Motto, M. (1989). Comunicación M233 al "Third Molecular Biology Symposium", Los Angeles, California.
- Doefler, W. (1983). Ann. Rev. Biochem. 52: 93
- Domoney, C.; Casey, R. (1987). Planta 170: 562
- Duvick, D. N. (1951). Am. J. Bot. 42: 717
- Duvick, D. N. (1961). Cereal Chem. 38: 374
- Duvick, D. N. (1963). Proceedings of Seed Protein Conference U.S. Dept. Agric. Res. Serv.
- Dyer, T. A. (1979). En "Nucleic Acids and Proteins in Plants", vol II, edit. Parthier B - Boulter D, Springer-Verlag, Berlin. pp. 182-224
- Echols, H.; Murialdo, H. (1978). Microbiol. Rev. 42: 577
- Esen, A.; Bietz, J. A.; Paulis, J. W.; Wall, J. S. (1981). Cereal Chem. 58: 534
- Esen, A.; Bietz, J. A.; Paulis, J. W.; Wall, J. S. (1982). Nature 296: 678

- Fangman, W. L. (1978). *Nuc. Acids Res.* 5: 653
- Faulds, D.; Dower, N.; Stahl, M. N.; Stahl, F. W. (1979). :
- Faulks, A. J.; Shewry, P. R.; Mifflin, B. J. (1981). *Biochem. Genet.* 19: 841
- Fedoroff, N. V. (1989). *Cell* 56: 181
- Feinberg, A. P.; Vogelstein, B. (1983). *Anal. Biochem* 132: 6
- Feinberg, A. P.; Vogelstein, B. (1984). *Anal. Biochem.* (addendum) 137: 266
- Field, J. M.; Shewry, P. R.; Mifflin, B. J.; March, J. F. (1982). *Theor. Appl. Genet.* 62: 329
- Field, J. M.; Shewry, P. R.; Mifflin, B. J. (1983). *J. Sci. Food. Agric.* 34 : 262
- Fink, G. R. (1989). *Cell* 56: 141
- Forde, J.; Forde, B. G.; Fry, R. P.; Kreis, M.; Shewry, P. R.; Mifflin, B. J. (1983). *FEBS Lett* 162: 360
- Forde, B. G.; Kreis, M.; Williamson, M. S.; Fry, R. P.; Pywell, J.; Shewry, P. R.; Bunce, N.; Mifflin, B. (1985a). *EMBO J.* 4: 9
- Forde, B. G.; Heyworth, A.; Pywell, J.; Kreis, M. (1985b). *Nuc. Acids Res.* 13: 7327
- Forde, B. G.; Malpica, J. M.; Halford, N. G.; Shewry, P. R.; Anderson, O. D.; Greene, F. C.; Mifflin, B. J. (1985c). *Nuc. Acids Res.* 13: 6817
- Fornasari, E.; DiFonzo, N.; Salamini, F.; Reggiani, R.; Soave, C. (1982). *Maydica* 27: 185
- Fuchs, R.; Blakesley, R. (1983). *Methods in Enzymology* 100: 3
- Gallardo, D. (1986). *Tesina de Licenciatura, Facultad de Biologia, Univ. de Barcelona.*
- Gallardo, D.; Reina, M.; Rigau, J.; Boronat, A.; Palau, J. (1988). *Plant Science* 54: 211
- Garoff, H.; Ansorge, W. (1981). *Anal. Biochem.* 115: 450
- Geraghty, D. E.; Peifer, M. A.; Rubenstein, I.; Messing, J. (1981). *Nuc. Acids Res.* 9: 5163
- Geraghty, D. E.; Messing, J.; Rubenstein, I. (1982). *EMBO J.* 1: 1329
- Gillies, G. D.; Morrison, S. L.; Oi, V. T.; Tonegawa, S. (1983). *Cell* 33 : 717
- Goldberg, R. B.; Hoschek, G.; Vodkin, L. O. (1983). *Cell* 33: 465
- Goldberg, R. B. (1988). *Science* 240: 1460
- Goldberg, R. B.; Barker, S. J.; Pérez-Grau, L. L. (1989). *Cell* 56: 149
- Goldsbrough, P. B.; Gelvin, S. B.; Larkins, B. A. (1986). *Mol. Gen. Genet.* 202: 374
- Goldsmith, M. R.; Basehoar, G. (1978). *Genetics* 90: 291
- Groszmann, A.; Sprague, G. F. (1948). *J. Am. Soc. Agron.* 40: 88
- Gruenbaum, Y.; Naveh-Manly, T.; Cedar, H.; Razin, A. (1981). *Nature* 292: 860
- Gruissem, W. (1989). *Cell* 56: 161
- Hadzi-Taskovic Sukalovic, V. (1986). *Plant Physiol.* 67: 247
- Hagen, G.; Rubenstein, I. (1980). *Plant Science* 19: 217
- Hagen, G.; Rubenstein, I. (1981). *Gene* 13: 239

- Hames, B. D.; Higgins, S. J. (1985). "Nucleic acids hybridisation : a practical approach", IRL Press. Oxford Washington.
- Hanahan, D. (1983). J. Mol. Biol. 166: 557
- Hanahan, D. (1985). En "DNA Cloning : a practical approach" vol I, edit. Glover D M, IRL Press, Washington-Oxford. pp. 109-136
- Heidecker, G.; Messing, J. (1983). Nuc. Acids Res. 11: 4891
- Heidecker, G.; Messing, J. (1986). Annu. Rev. of Plant Physiol. 37: 439
- Helling, R. B.; Goodman, H. M.; Boyer, H. W. (1974). J. Virol. 14: 1235
- Henderson, D.; Weil, J. (1975). Genetics 79: 143
- Hendrix, D. W. (1983). En "Lambda II", edit. Hendrix D W - Roberts J W - Stahl F W - Weisberg R A, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York. pp. 13-19
- Hendrix, D. W.; Roberts, J. W.; Stahl, F. W.; Weisberg, R. A. (1983). "Lambda II", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Hentschel, C.; Birnstiel, M. L. (1981). Cell 25: 301
- Higgins, T. J. V. (1984). Annu. Rev. of Plant Physiol. 35: 191
- Hoffman, L. M.; Donaldson, D. D.; Bookland, R.; Rashka, D.; Herman, E. M. (1987). EMBO J. 6: 3213
- Hohn, H. (1979). Methods in Enzymology 68: 299
- Hohn, H.; Murray, N. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 3259
- Ho, N. W. Y. (1981). Electrophoresis 4: 168
- Hood, L.; Campbell, J. H.; Elgin, S. C. R. (1975). Ann. Rev. Genet. 9: 305
- Hu, N. T.; Peifer, M. A.; Heidecker, G.; Messing, J.; Rubenstein, I. (1982). EMBO J. 1: 1337
- Hurkman, W. J.; Smith, L. D.; Richter, J.; Larkins, B. A. (1981). J. Cell. Biol. 89: 297
- Ingle, D. D.; Beitz, D.; Hageman, R. H. (1965). Plant Physiol. 40: 835
- Ingversen, J.; Koie, B.; Doll, H. (1973). Experientia 29: 1151
- Jones, N. C.; Rigby, P. W. J.; Ziff, E. B. (1988). Genes and Development 2: 267
- Joshi, C. P. (1987). Nuc. Acids Res. 15: 6643
- Joubert, F. J. (1984). Phytochemistry 23: 957
- Kasarda, D. D. (1980). Ann. Technol. Agric. 29: 151
- Kasarda, D.; Autran, J. C.; Lew, E. J. L.; Nimmo, C. L.; Shewry, P. R. (1983). Biochim. Biophys. Acta 947: 138
- Kasarda, D. D.; Okita, T. W.; Bernardin, J. E.; Baecker, P. A.; Nimmo, C. H. C.; Len, E. J. L.; Dietler, M. D.; Greene, F. C. (1984a). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4712
- Kasarda, D. D.; Lafandre, D.; Morris, R.; Shewry, P. R. (1984b). Kulturpflanze 32: 41
- Keith, B.; Chua, N. H. (1986). EMBO J. 5: 2419
- Kessler, Ch.; Holtke, H. J. (1986). Gene 47: 1
- Kessler, C. H.; Neumaier, P.; Wolf, W. (1985). Gene 33: 1
- Khoo, U.; Wolf, M. J. (1970). Am. J. Bot. 57: 1042

- Kiesselbach, T. (1949). Nebr. Agric. Exp. Sta. Res. Bull. 161:1
- Kirihara, J. A.; Hunsperger, J. P.; Mahoney, W. C.; Messing, J. W. (1988). Mol. Gen. Genet. 211: 477
- Kirkman, M. A.; Shewry, P. R.; Mifflin, B. J. (1982). J. Sci. Food Agric. 33: 115
- Khoury, G.; Gruss, P. (1983). Cell 33 : 313
- Kowles, R. V.; Mc Mullen, M. D.; Phillips, R. L. (1986). En "Regulation of Carbon and Nitrogen reduction and utilization in maize", edit. Shannon J C - Knievel D P - Boyer C D, American Society of Plant Physiologist, Rockville, Maryland. pp. 189-206
- Kowles, R. V.; Phillips, R. L. (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7010
- Kowles, R. V.; Phillips, R. L. (1988). Int. Rev. Citol. 112: 97
- Kozak, M. (1981a). Nuc. Acids Res. 9 : 5233
- Kozak, M. (1981b). Cell 44: 283
- Kozak, M. (1984). Nuc. Acids Res. 12: 857
- Kreis, M.; Rahman, S.; Forde, B. G.; Pywell, J.; Shewry, P. R.; Mifflin, B. J. (1983). Mol. Gen. Genet. 191: 194
- Kreis, M.; Shewry, P. R.; Forde, B. G.; Forde, J.; Mifflin, B. J. (1985a). Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology 2: 253
- Kreis, M.; Forde, B. G.; Rahman, S.; Mifflin, B. J.; Shewry, P. R. (1985b). J. Mol. Biol. 183: 231
- Kridl, J. C.; Vieira, J.; Rubenstein, I.; Messing, J. (1984). Gene 28: 113
- Kriz, A. K.; Boston, R. S.; Larkins, B. A. (1987). Mol. Gen. Genet. 207: 90
- Kuhlemeier, C.; Green, P. J.; Chua, N. H. (1987). Ann. Rev. of Plant Physiol. 38: 221
- Lampe, L. (1931). Botanical Gaz. 151: 337
- Landry, J.; Moureaux, T. H. (1970). Bull. Soc. Chem. 52: 1021
- Landry, J.; Moureaux, T. H. (1980). J. Agric. and Food Chem. 28: 1186
- Langridge, P.; Pintor-Toro, J. A.; Feix, G. (1982). Mol. Gen. Genet. 187: 432
- Langridge, P.; Feix, G. (1983). Cell 34: 1015
- Langridge, P.; Brown, J. W. S.; Pintor-Toro, J. A. (1985). Eur. J. Cell. Biol. 39 : 257
- Larkins, B. A.; Dalby, A. (1975). Biochem. Biophys. Res. Commun. 66: 1048
- Larkins, B. A.; Hurkman, N. Y. (1978). Plant Physiology 62: 256
- Larkins, B. A. (1981). En "The biochemistry of Plants", edit. Stumpf P. K.- Conn E. E., Academic Press, Nueva York. pp. 449-489
- Larkins, B. A. (1983). En "Genetic Engineering of Plants. An Agricultural Perspective", edit. Kosuga T. - Meredith C. P. - Hollaender A., Plenum Press, Nueva York. pp. 93-118
- Larkins, B. A.; Pedersen, K.; Marks, M. D.; Wilson, D. R. (1984). Trends in Biochem. Sci. : 306
- Lee, L.; Tsai, C. Y. (1984). Plant Physiol. 76: 79
- Lee, W. A.; Haslinger, A.; Kavin, M.; Tjian, R. (1987). Nature

325: 368

- Le Moullec, J. M.; Akusjaervi, G.; Stalhandske, P.; Peterson, U.; Chambraud, B. (1983). *J. Virol.* 48: 127
- Lending, C. R.; Kriz, A. L.; Larkins, B. A.; Bracker, C. E. (1988). *Protoplasma* 143 : 51
- Lewis, E. D.; Hagen, G.; Mullins, J. I.; Mascia, P. N.; Park, W. D.; Benton, W. D.; Rubenstein, I. (1981). *Gene* 14: 205
- Lincoln, J. E.; Fischer, R. L. (1988). En "Temporal and Spatial Regulation of Plant Genes", edit. Verma D P S - Goldberg R B, Springer-Verlag, Vienna. pp. 155-167
- Li, W. H. (1983). En "Evolution of Genes and Proteins", edit. Nei M - Koehn R K, Sunderland-Sinauer. pp. 14-37
- Loenen, W. A. M.; Blattner, F. R. (1983). *Gene* 26: 171
- Loomis, W. F.; Gilpin, M. E. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2143
- Ludevid, M. D.; Torrent, M.; Martinez Izquierdo, J. A.; Puigdomenech, P.; Palau, J. (1984). *Plant Mol. Biol.* 3: 227
- Ludevid, M. D.; Martinez Izquierdo, J. A.; Armengol, M.; Torrent, M.; Puigdomenech, P.; Palau, J. (1985). *Plant Science* 41: 41
- Lycett, G. W.; Dealuney, A. J.; Croy, R. D. (1983). *FEBS Lett.* 153: 43
- Lycett, G. W.; Croy, R. R. D.; Shirsat, A. H.; Boulter, D. (1984). *Nuc. Acids Res.* 12: 4493
- Ma, Y.; Nelson, O. E. (1975). *Cereal Chem.* 52 : 412
- Maeda, K.; Kakabayashi, S.; Matsubara, H. (1985). *Biochim. Biophys. Acta* 828 : 213
- Maier, U. G.; Brown, J. J. W. S.; Toloczyki, C.; Feix, G. (1987). *EMBO J.* 6: 17
- Maier, U. G.; Brown, J. W. S.; Schmitz, L. M.; Schwall, M.; Dietrich, G.; Feix, G. (1988). *Mol. Gen. Genet.* 212: 241
- Mandel, M.; Higa, A. (1970). *J. Mol. Biol.* 53: 159
- Maniatis, T.; Jeffrey, A.; Van de Sande, H. (1975). *Biochemistry* 14: 3787
- Maniatis, T.; Fritsch, E. F.; Sambrook, J. (1982). "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Manickam, A.; Carlier, A. R. (1980). *Planta* 149: 234
- Manzocchi, L. A.; Daminati, M. G.; Gentinetta, E. (1980). *Maydica* 25 : 199
- Marks, M. D.; Larkins, B. A. (1982). *J. Biol. Chem.* 257: 9976
- Marks, M. D.; Pedersen, K.; Wilson, D. R.; Larkins, B. A. (1983). En "Advances in Gene Technology: molecular genetics of plants and animals", edit. Voellmy R. W. - Ahmady F. - Schultz J, Academic Press, Nueva York. pp. 369-381
- Marks, M. D.; Lindell, J. S.; Larkins, B. A. (1985a). *J. Biol. Chem.* 260: 16445
- Marks, M. D.; Lindell, J. S.; Larkins, B. A. (1985b). *J. Biol. Chem.* 260: 16451
- Marris, C.; Gallois, P.; Copley, J.; Kresis, M. (1988). *Plant Mol. Biol.* 10: 359
- Matzke, M. A.; Susani, M.; Binns, A. N.; Lewis, E. D.;

- Rubenstein, I.; Matzke, A. J. M. (1984). *EMBO J.* 3: 1525
- Mauro, V. P.; Nguyen, T.; Katinakis, P.; Verma, D. P. S. (1985). *Nuc. Acids Res.* 13: 239
 - Maxam, A. M.; Gilbert, W. (1980). *Methods in Enzymology* 65: 449
 - Ma y, Y.; Nelson, O. E. (1975). *Cereal Chem.* 52: 412
 - Mc Clelland, M. (1981). *Nuc. Acids Res.* 9: 5859
 - Mc Conaughy, B. L.; Laird, C. L.; Mc Carthy, B. J. (1969). *Biochemistry* 8: 3289
 - Mc Donell, M. S.; Simon, M. N.; Studier, F. W. (1977). *J. Mol. Biol.* 110: 119
 - Meinke, D. W.; Chen, J.; Beachy, R. N. (1981). *Planta* 153: 130
 - Meinkoth, J.; Wahl, G. (1984). *Anal. Biochem.* 138: 267
 - Mertz, E. T.; Bates, L. S.; Nelson, O. E. (1964). *Science* 145: 279
 - Messing, J.; Crea, R.; Seeburg, P. H. (1981). *Nuc. Acids Res.* 9: 309
 - Messing, J.; Vieira, J. (1982). *Gene* 19: 259
 - Messing, J.; Geraghty, D.; Heidecker, G.; Hu, N. T.; Kridl, J.; Rubenstein, I. (1983). En "Genetic Engineering of Plants. An Agricultural Perspective", edit. Kosuge T - Meredith C P - Hollaender A, Plenum Press, Nueva York. pp. 211-227
 - Messing, J. (1984). *Plant Mol. Biol. Reporter* 2: 32
 - Messing, J. (1987). En "Genetic Engineering" vol. 6, edit. Williamson R., Academic Press, London. pp. 1-46
 - Meyerowitz, E. M. (1989). *Cell* 56: 263
 - Miflin, B. J.; Field, J. M.; Shewry, P. R. (1983). En "Seed Proteins", edit Mossé J - Vaughan J, Academic Press, Nueva York. pp 255-319
 - Miflin, B. J.; Shewry, P. R. (1979). En "Seed Proteins Improvement in Cereals and Grain Legumes" Vol I, IAEA, Viena. pp. 137-158
 - Miller, E. C. (1919). *J. Agric. Res.* 18: 255
 - Montminy, M. R.; Sevarino, K. A.; Wagner, J. A.; Mondel, G.; Goodman, R. H. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6682
 - Mueckler, M.; Lodish, H. F. (1982). *Cell* 44: 629
 - Murray, N.; Murray, C. (1974). *Nature* 251: 476
 - Murray, N. E.; Brammer, W. J.; Murray, K. (1977). *Mol. Gen. Genet.* 150: 33
 - Murray, D. R. (1979). *Plant Cell Environ.* 2: 221
 - Murray, N. (1983). En "Lambda II", edit. Hendrix D W - Roberts J W - Stahl F W - Weisberg R D, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York. pp. 677-684
 - Murray, M.; Cramer, J.; Ma, Y.; West, D.; Romero-Severson, J.; Pitas, J.; DeMars, S.; Vilbrandt, L.; Kirshman, L.; McLeester, R.; Schiltz, J.; Lotzer, J. (1988). *Maize Genetics Coop Newsletter* 62: 89
 - Nagata, K.; Guggenheimer, R. A.; Enomoto, T.; Lichy, J. H.; Hurwitz, J. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6438
 - Naito, S.; Dube, P. H.; Beachy, R. M. (1988). *Plant Mol. Biol.* 11: 109
 - Nasmyth, G. (1983). *Annu. Rev. Genet.* 17 : 439
 - Nelson, O. E.; Mertz, E. T.; Bates, L. S. (1965). *Science* 150,

- Nicholls, R. D.; Hill, A. V.; Clegg, J. B.; Higgs, D. R. (1985). *Nuc. Acids Res.* 13: 7569
- Nick, H.; Bowen, B.; Ferl, R. J.; Gilbert, W. (1986). *Nature* 319 : 243
- Nielsen, H. C.; Beckwist, A. C.; Wall, J. S. (1968). *Cereal Chem.* 45: 37
- Norrander, J.; Kempe, T.; Messing, J. (1983). *Gene* 26: 101
- Odani, S.; Koide, T.; Ono, T. (1983). *J. Biol. Chem.* 258: 7998
- Okamuro, J. K.; Goldberg, R. B. (1988). En "The biochemistry of Plants" Vol 15, edit. Marcus A, Academic Press, San Diego.
- Okita, T. W. (1984). *Plant Mol. Biol.* 3: 325
- Okita, T. H. W.; Cheesbrough, V.; Reeves, C. H. D. (1985). *J. Biol. Chem.* 260: 8203
- Osborne, T. B.; Mandel, L. B. (1914). *J. Biol. Chem.* 18: 1
- Parks, W. D.; Lewis, E. D.; Rubenstein, I. (1980). *Plant Physiol.* 65: 98
- Payne, P. I.; Law, C. N.; Mudd, E. E. (1980). *Theor. Appl. Genet.* 58: 113
- Payne, P. I.; Holt, L. M.; Lawrence, G. J.; Law, C. N. (1982a). *Qual. Plant Foods Hum. Nutr.* 31: 229
- Payne, P. I.; Holt, L. M.; Worland, A. J.; Law, C. N. (1982b). *Theor. Appl. Genet.* 63: 129
- Payne, P. I.; Holt, L. M.; Jackson, E. A.; Law, C. N. (1984). *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B304: 273
- Pedersen, K.; Bloom, K. S.; Anderson, J. N.; Grover, D. V.; Larkins, B. A. (1980). *Biochemistry* 19 : 1644
- Pedersen, K.; Devereux, J.; Wilson, D. R.; Sheldon, E.; Larkins, B. A. (1982). *Cell* 29: 1015
- Pedersen, K.; Argos, P.; Naravana, S. V. L.; Larkins, B. A. (1986). *J. Biol. Chem.* 261: 6279
- Pernollet, J. C. (1978). *Phytochemistry* 17: 1473
- Phillips, R. L.; Wang, A. S.; Kowles, R. V. (1983). *Stadler Genet. Symp.* 15 : 105
- Phillips, R. L.; Kowles, R. V.; Mc Mullen, M. D.; Enomoto, S.; Rubenstein, I. (1985). En "Plant Proteins", edit Freeling M., Liss, Nueva York. pp 739-759
- Phillips, S. L.; Casavant, N. C.; Hutchinson, C. A.; Edgell, M. H. (1985). *Nuc. Acids Res.* 13: 2699
- Pintor-Toro, J. A.; Langridge, P.; Feix, G. (1982). *Nuc. Acids Res.* 10: 3845
- Poindexter, C. C. (1903). *Ohio Nat.* 4: 3
- Pouwels, P. H.; EngerValk, B. E.; Brammar, W. J. (1985). "Cloning Vectors", Elsevier, Amsterdam-Nueva York-Oxford.
- Prat, S. (1986). Tesis Doctoral, Fac. Farmacia, Univ. Barcelona.
- Prat, S.; Cortadas, J.; Puigdomenech, P.; Palau, J. (1985). *Nuc. Acids Res.* 13: 1493
- Prem Das, O.; Messing, J. (1987). *Mol. Cell. Biol.* 7 : 4490
- Proudfoot, N. J.; Brownlee, G. G. (1976). *Nature* 263: 211
- Ptashne, M. (1986). "A Genetic "Switch : Genetic Control and Phage Lambda", Cell Press & Blackwell Scient. Pub.,

Cambridge.

- Punnet, H. H. (1953). *J. Hered.* 44: 257
- Rafalski, J. A.; Scheets, K.; Metzler, M.; Peterson, D. M.; Hedgeoth, C. H.; Soll, D. G. (1984). *EMBO J.* 3: 1409
- Rambach, C.; Tiollais, E. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 71
- Ramshaw, J. A. M.; Richardson, D. L.; Meatyard, B. I.; Brown, R. H.; Richardson, M.; Thompson, E. W.; Boulter, D. (1972). *New Phytol.* 71: 773
- Randolph, L. F. (1936). *J. Agric. Res.* 53: 881
- Rasmussen, S. K.; Hopp, H. E.; Brandt, A. (1983). *Carlsberg Res. Commun.* 48: 187
- Reeck, G. R.; Hedcoth, C. H. (1985). *FEBS Lett.* 180: 291
- Rendelhuber, T. (1984). *Nature* 311: 301
- Rhode, C. A.; Pierce, D. A.; Mettler, I. J.; Mascarenhas, D.; Detner, J. J. (1988). *Science* 240: 204
- Richardson, C. C. (1981). En "The enzymes. Vol XIV : Nucleic Acids, part A", edit. Boyer P D, Academic Press, Nueva York. pp. 299-314
- Rickwood, D.; Hames, B. D. (1982). "Gel electrophoresis of Nucleic Acids : a practical approach", IRL Press, Oxford-Washington.
- Rigby, P. W. J.; Dieckmann, M. (1977). *J. Mol. Biol.* 113: 237
- Righetti, P. G.; Gianazza, E.; Viotti, A.; Soave, C. (1977). *Planta* 136 : 3115
- Roberts, R. J. (1982). *Nuc. Acids Res.* 10: r117
- Roberts, R. J. (1986). *Nuc. Acids Res.* :
- Roninson, I. B. (1983). *Nuc. Acids Res.* 11: 5413
- Roussell, D. L.; Boston, R. S.; Goldsbrough, P. B.; Larkins, B. A. (1988). *Mol. Gen. Genet.* 211: 202
- Salamini, F.; Difonzo, N.; Gentinetta, E.; Soave, C. (1979). En "Seed Protein Improvement in Cereals and grain legumes" Vol I, IAEA, Viena. pp. 97-108
- Salamini, F.; Soave, C. (1982). En "Maize for Biological Research", edit. W F Sheridan, Plant Molecular Association, Charlottesville VA 22905. pp. 155-160
- Salamini, F.; DiFonzo, N.; Fornasari, E.; Gentinetta, E.; Regginai, R.; Soave, C. (1983). *Theor. Appl. Genet.* 65: 123
- Sánchez-Martínez, D.; Gómez, J.; Ludevid, M. D.; Torrent, M.; Puigdomènech, P.; Pagés, M. (1987). *Plant Science* 53 : 215
- Sanger, F.; Nicklen, S; Coulson, A. R. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 5463
- Sanger, F.; Coulson, A. R. (1978). *FEBS Lett.* 87: 107
- Sanger, F.; Coulson, A. R.; Barrel, B. G.; Smith, A. J. H.; Roe, B. A. (1980). *J. Mol. Biol.* 143: 161
- Sanger, F.; Coulson, A. R.; Hong, G. F.; Hill, D. F.; Pedersen, G. P. (1982). *J. Mol. Biol.* 162: 729
- Sargent, E. (1900). *Am. Bot.* 14: 689
- Sarkar, K. R.; Coe, E. H. (1971). *Crop. Sci.* 11: 539
- Scalenghe, F.; Turco, E.; Edstrom, J.; Pirotta, V.; Melli, M. (1981). *Chromosome* 82: 205
- Scheets, K.; Rafalski, J. A.; Hedcoth, C. H.; Soll, D. G.

- (1985). *Plant Science* 37: 221
- Schell, J. S. (1987). *Science* 237: 1176
 - Schernthaner, J. P.; Matzke, M. A.; Matzke, A. J. M. (1988). *EMBO J.* 7: 1249
 - Schildkraut, C.; Lifson, S. (1965). *Biopolymers* 3: 195
 - Schmidt, R. J.; Burr, F. A.; Burr, B. (1988). *Science* 238: 960
 - Schmidt, R. J.; Burr, F.; Burr, B. (1989). Comunicacion M019 al "Third Molecular Biology Symposium", Los Angeles, California.
 - Schoffl, F.; Raschke, E.; Nagao, R. T. (1984). *EMBO J* 3: 2491
 - Schultz, D. W.; Swindle, J.; Smith, G. R. (1981). *J. Mol. Biol.* 146 : 275
 - Sellers, P. H. (1974). *SIAM J. Appl. Math.* 26 : 787
 - Setzer, D. R.; McGrogan, M.; Nunberg, J. H.; Schimke, R. T. (1980). *Cell* 23: 361
 - Shapiro, H. S. (1976). *CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology* 2: 259
 - Sharief, F. S.; Li, S. L. (1982). *J. Biol. Chem.* 257: 14753
 - Shepherd, K. W. (1968). En "Proceedings of the 3rd. Internat. Wheat Genetic. Symp.", edit. Finley K W - Shepherd K W, Plenum Press, Nueva York. pp. 86-96
 - Shewry, P. R.; Mifflin, B. J. (1982). *Qual. Plant Foods Hum. Nutr.* 31: 251
 - Shewry, P. R.; Field, J. M.; Lew, E. J. L.; Kasarda, D. (1982). *J. Exp. Bot.* 133: 261
 - Shewry, P. R.; Finch, R.; Parmar, S.; Franklin, J.; Mifflin, B. J. (1983a). *Heredity* 50: 179
 - Shewry, P. R.; Finch, R.; Mifflin, B. J. (1983b). *Cereal Chem.* 60: 1
 - Shewry, P. R.; Bradberry, D.; Franklin, J.; White, R. D. (1984a). *Theor. Appl. Genet.* 69: 63
 - Shewry, P. R.; Mifflin, B. J.; Kasarda, D. (1984b). *Phil. Trans. R. Soc. London B304*: 297
 - Shewry, P. R.; Field, J. M.; Faulks, A. J.; Parmar, S.; Mifflin, B. J.; Dietler, M. D.; Lew, E. J. L.; Kasarda, D. D. (1984c). *Biochim. Biophys. Acta* 788: 23
 - Shewry, P. R.; Mifflin, B. J. (1985). En "Advances in Cereal Science and Technology" Vol. VII, edit. Pomeroy Y, AACC, St. Paul., Minnesota. pp. 1-83
 - Shewry, P. R.; Bruce, N.; Kreis, M.; Forde, J. (1985a) *Biochem. Genet.* 5 : 174
 - Shewry, P. R.; Parmar, S.; Miller, T. E. (1985b). *Heredity* :
 - Smith, G. P. (1973a). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38: 507
 - Smith, G. P. (1973b). *Science* 191: 528
 - Soave, C.; Righetti, P. G.; Lorenzoni, C.; Gentinetta, E.; Salamini, F. (1976). *Maydica* 21 : 61
 - Soave, C.; Suman, N.; Viotti, A.; Salamini, F. (1978). *Theor. Appl. Genet.* 52: 263
 - Soave, C.; Tardani, L.; DiFonzo, N.; Salamini, F. (1981a). *Cell* 27: 403
 - Soave, C.; Righetti, R.; DiFonzo, N.; Salamini, F. (1981b).

Genetics 93 : 363

- Soave, C.; Reggiani, R.; DiFonzo, N.; Salamini, F. (1982).
Biochem. Genet. 11: 1027
- Soave, C.; Salamini, F. (1983). En, "Seed proteins", edit. Mossé
J - Vaughan J - Deussant J, Academic Press, Nueva York. pp.
205-218
- Soave, C.; Salamini, F. (1984a). Developmental Genetics 5: 1
- Soave, C.; Salamini, F. (1984b). Phil. Trans. R. Soc. London
B304: 341
- Sokal, R. R.; Michener, C. D. (1958). Univ. Kansas Sci. Bull.
38 : 1409
- Southern, E. (1975). J. Mol. Biol. 98: 503
- Spena, A.; Viotti, A.; Pirrotta, V. (1982). EMBO J. 1: 1589
- Spena, A.; Viotti, A.; Pirrotta, V. (1983). J. Mol. Biol. 169:
799
- Spena, A.; Krause, E.; Dobberstein, B. (1985). EMBO J. 4: 2153
- Spencer, D. (1984). Phil. Trans. R. Soc. London 304: 275
- Spradling, A. C.; Waring, C. L.; Mahowald, A. P. (1975). Cell
16: 609
- Stark, G. R.; Wahl, G. M. (1984). Annu. Rev. Biochem. 43 : 77
- Stieffel, V. (1988). Tesis Doctoral, Fac. Biología, Univ.
Barcelona.
- Stougaard, J.; Sandal, N. N.; Gron, A.; Kuhle, A.; Marker, K.
A. (1987). EMBO J. 6: 3565
- Stout, J. T.; Kermicle, J. L. (1979). Maydica 24: 59
- Suggs, S. V.; Wallace, R. B.; Hirose, T.; Kiwashima, E. H.;
Itakura, K. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6613
- Sugiyama, T.; Rafalski, A.; Peterson, D.; Soll, D. (1985). Nuc.
Acids Res. 13: 8729
- Su, J. C.; Preiss, J. (1978). Plant Physiol. 61: 389
- Swift, H. (1950). Genetics 36: 643
- Szybalsky, E. H.; Szybalsky, W. (1979). Gene 7: 217
- Tatham, A. S.; Drake, A. F.; Shewry, P. R. (1985). Biochem. J.
226: 557
- Thompson, R. D.; Bartels, D.; Harberd, N. P.; Flavell, R. B.
(1983). Theor. Appl. Genet. 67: 87
- Thompson, G. A.; Larkins, B. A. (1989). BioEssays 10 : 108
- Torrent, M.; Poca, E.; Campos, N.; Ludevid, M. D.; Palau, J.
(1986) Plant Mol. Biol. 7 : 393
- True, R. H. (1893). Bot. Gaz. 18: 212
- Tsai, C. Y.; Huber, D. M.; Warren, H. L. (1980). Plant Physiol.
66: 330
- Tsai, C. Y.; Nelson, O. E. (1968). Plant Physiol. 43: 103
- Tsai, C. Y.; Salamini, F.; Nelson, O. E. (1970). Plant Physiol
46: 299
- Tschermak-Woess, E.; Enzenberg-Kunz, U. (1965). Planta 64: 149
- Ueng, P.; Galili, G.; Sapanara, V.; Goldsbrough, P. B.; Dube,
P.; Beachy, R. N.; Larkins, B. A. (1988). Plant Physiol. 86:
1281
- Valentini, G.; Soave, C.; Ottaviano, E. (1979). Heredity 42: 33
- Viotti, A.; Sala, E.; Alberti, P.; Soave, C. (1975). Maydica
20: 111

- Viotti, A.; Soave, C.; Marotta, R.; Alberi, P.; Balducci, C.; Soave, C. (1979). *Eur. J. Biochem* 102 : 211
- Viotti, A.; Pogna, N. E.; Balducci, C.; Durante, M. (1980). *Mol. Gen. Genet.* 178: 35
- Viotti, A.; Abildstein, D.; Pogna, N.; Sala, E.; Pirrotta, V. (1982). *EMBO J.* 1: 53
- Viotti, A.; Cairo, G.; Vitale, A.; Sala, E. (1985). *EMBO J.* 4: 1103
- Vitale, A.; Smaniotto, E.; Longhi, R.; Galante, E. (1982). *J. Exp. Bot.* 33: 439
- Vitale, A.; Soave, C.; Galante, E. (1980). *Plant Science* 18: 57
- Voelker, T. A.; Sturm, A.; Chrispeels, M. J. (1987). *EMBO J.* 6: 3571
- Wahl, G. M.; Stern, M.; Stark, G. R. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3683
- Walbot, V.; Messing, J. (1987). En "Corn and Corn Improvement", edit. Sprague G F, 3rd edit., Agronomy Society, Univ of Illinois, Urbana - Champaign, Illinois.
- Walker, J. C.; Howard, E. A. S.; Dennis, E. S.; Peacock, W. J. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6624
- Wallace, R. B. (1983). En "DNA Recombinant Technology", edit. Woo S, CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Wallace, R. B.; Shaffer, J.; Murphy, R. F.; Bonner, J.; Hirose, T.; Itakura, K. (1979). *Nuc. Acids Res.* 3543: 3656
- Walling, L.; Drews, G. N.; Goldberg, R. B. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2123
- Wang, S. Z.; Esen, A. (1986). *Plant Physiol.* 81: 70
- Watson, M. E. E. (1984). *Nuc. Acids Res.* 12: 5145
- Weber, E.; Neumann, D. (1980). *Biochem. Physiol. Pflanz.* 175: 279
- Wetmur, J. G. (1975). *Biopolymers* 14: 2517
- Wetmur, J. G.; Davidson, N. (1968). *J. Mol. Biol.* 31: 349
- Weatherwax, P. (1919). *Bull. Torrey Bot. Club* 46: 73
- Weatherwax, P. (1923). Univ of Chicago Press :
- Weatherwax, P. (1930). *Am. J. Bot.* :
- Wienand, U.; Brusckke, C.; Feix, G. (1979). *Nuc. Acids Res.* 6: 2707
- Wienand, U; Feix, G. (1980). *FEBS Lett.* 116 : 14
- Wienand, U.; Langridge, P.; Feix, G. (1981). *Mol. Gen. Genet* 182: 440
- Williams, B. G.; Blattner, F. R. (1980). En "Genetic Engineering", edit. Setlow J K - Hollaender A, Plenum Press, Nueva York. pp. 201
- Williamson, J. D.; Galili, G.; Larkins, B. A.; Gelvin, S. B. (1988). *Plant Physiol* (in press) :
- Wilson, C. (1978). En "Maize Breeding and Genetics", edit. Walden D. B., Wiley, Nueva York. pp. 405-419
- Wilson, C. (1980). *Plant Physiol.* 66: 119
- Wilson, C. (1983). En "Seed Proteins. Biochemistry and Nutritive Value", edit. Gottschalk W - Muller H P, Martinus Nijhoff. : 271
- Wilson, C. M.; Faulks, A. J.; Shewry, P. R.; Mifflin, B. J.

- (1981a). J. Exp. Bot. 32: 1287
- Wilson, C. M.; Shewry, P. R.; Mifflin, B. J. (1981b). Cereal Chem. 58: 275
 - Yanish-Perron, C.; Vieira, J.; Messing, J. (1985). Gene 33: 103
 - Youle, R.; Huang, A. H. C. (1978). Plant Physiol. 61: 13
 - Young, R. A.; Davies, R. W. (1983). Science 222: 778
 - Yousaf, S. I.; Carrol, A. R.; Clarke, B. E. (1984). Gene 27: 309
 - Zimarino, V.; Wu, C. (1987). Nature 327: 727
 - "Membrane Transfer and Detection methods" Amersham.
 - "Nucleic Acid Labelling" Amersham.
 - "Labelling of DNA with P³² by nick translation" Amersham.
 - "Gel Filtration Theory and Practice" Pharmacia Fine Chemicals.