



**"CLONACION MOLECULAR DE LOS DNAs  
COMPLEMENTARIOS QUE CODIFICAN PARA  
LAS HORMONAS DE CRECIMIENTO DE ORIGEN  
HIPOFISIARIO HUMANO EN ESCHERICHIA COLI"**

**T E S I S**

**PRESENTADA A MAESTROS Y ESTUDIANTES  
DE LA ESCUELA DE GRADUADOS DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA DE LA  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA MEDICA**

**POR**

**DIEGO ENRIQUE RINCON LIMAS**

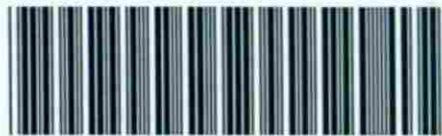
**MONTERREY, N. L., MEXICO ABRIL 1990**

TM

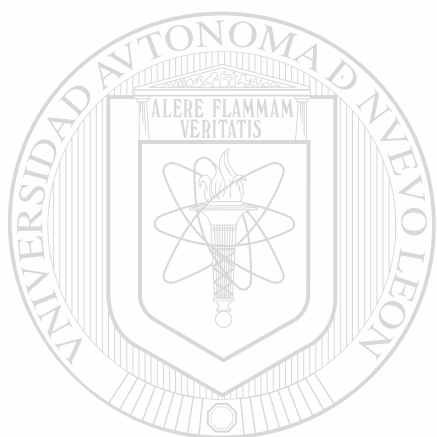
QP624

R5

C.1



1080071405



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**"CLONACION MOLECULAR DE LOS DNAs COMPLEMENTARIOS QUE  
CODIFICAN PARA LAS HORMONAS DE CRECIMIENTO DE ORIGEN  
HIPOFISIARIO HUMANO EN ESCHERICHIA COLI"**

**Por**

**DIEGO ENRIQUE RINCON LIMAS**

**T E S I S**

**Presentada a Maestros y Estudiantes de la Escuela de  
Graduados de la Facultad de Medicina de la Universidad**

**Autónoma de Nuevo León.**

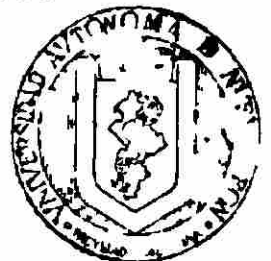
**Como requisito parcial para obtener el grado de :**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**Con especialidad en Microbiología Médica**

**Monterrey, N.L., México**

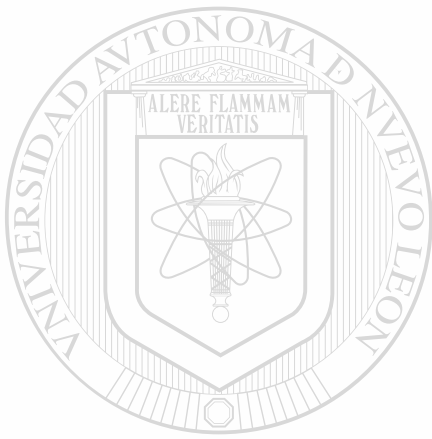
**Abril 1990**



**BIBLIOTECA**



TM  
Q P624  
R5



# UANL

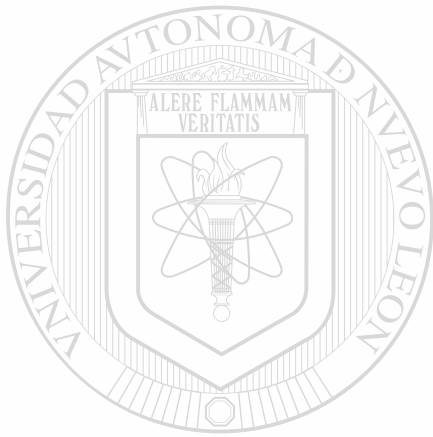
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



5030



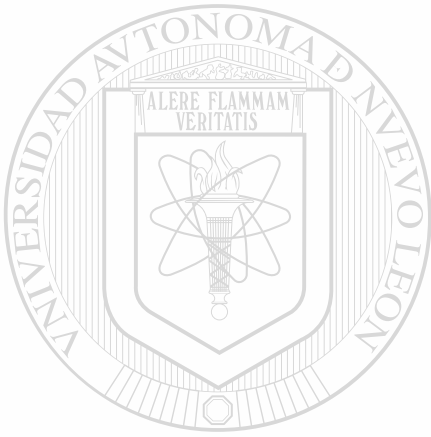
UNANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**BIBLIOTECA**

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



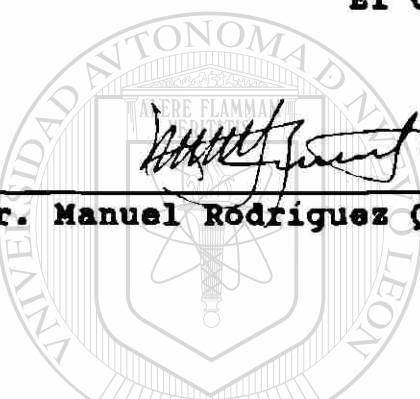
**BIBLIOTECA**

"CLONACION MOLECULAR DE LOS DNAs COMPLEMENTARIOS QUE  
CODIFICAN PARA LAS HORMONAS DE CRECIMIENTO DE ORIGEN  
HIPOFISIARIO HUMANO EN ESCHERICHIA COLI"

Por

DIEGO ENRIQUE RINCON LIMAS

El Comité de Tesis:



*Manuel Rodríguez Quintanilla*

Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla

*Hugo A. Barrera Saldaña*

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

*M.C. Ma. Alicia Suárez Semour*

M.C. Ma. Alicia Suárez Semour

*Herminia G. Martínez Róz.*

Dra. Herminia G. Martínez Róz.

*Irma Salinas González*

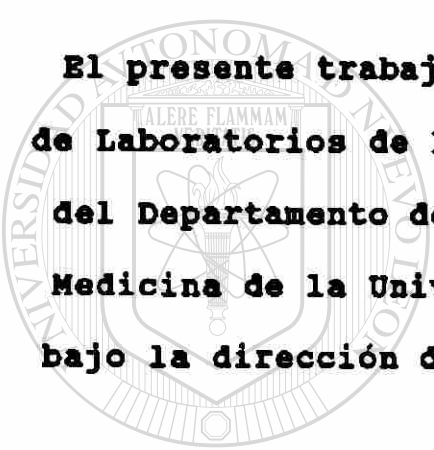
M.C. Irma Salinas González

Aprobó:

*Mario Cesar Salinas Carmona*

Dr. Mario Cesar Salinas Carmona  
Secretario de Ciencias Básicas  
de la Escuela de Graduados de  
la Fac. de Medicina de la U.A.N.L.





**El presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad  
de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas  
del Departamento de Bioquímica de la Facultad de  
Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León  
bajo la dirección del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.**

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**INDICE**

|   |           |
|---|-----------|
| Indice .....  | i         |
| Dedicatorias .....  | iii       |
| Agradecimientos .....   | iv        |
| Lista de abreviaturas .....   | v         |
| Lista de figuras .....  | vi        |
| <b>I. RESUMEN .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>II. INTRODUCCION .....</b>   | <b>2</b>  |
| a) Ingeniería Genética y Clonación molecular .....  | 2         |
| b) Ingeniería Genética y Salud .....  | 4         |
| c) Antecedentes particulares .....  | 5         |
| d) Justificación .....  | 9         |
| <b>III. OBJETIVOS E HIPOTESIS .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>IV. MATERIALES Y METODOS .....</b>   | <b>12</b> |
| a) Origen de los reactivos .....  | 12        |
| b) Material biológico .....   | 12        |
| c) Métodos .....  | 13        |
| Extracción de RNA total por el método de isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo .....                              | 13        |
| Electroforesis de RNA en geles de agarosa-urea-ácido ...  | 15        |
| Hibridación de RNA-DNA en gota seca .....   | 16        |
| Aislamiento de RNAs mensajeros poli A <sup>+</sup> por cromatografía de afinidad en columnas de celulosa oligo-dT ..... | 18        |
| Síntesis de DNA's complementarios .....   | 20        |
| Electroforesis en geles alcalinos de agarosa .....  | 23        |
| La estrategia de clonación. Digestión enzimática de los DNA's complementarios con <u>Aat</u> II y <u>Xma</u> I .....    | 24        |
| Selección y preparación del vehículo de clonación .....   | 25        |
| Purificación del vector de clonación a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión .....                        | 25        |
| Clonación molecular de los DNA's complementarios .....  | 27        |
| Hibridación tipo Southern .....   | 28        |
| Transformación de bacterias con DNA plasmídico .....  | 29        |
| Minipreparaciones de plásmidos por el método de lisis .. alcalina .....   | 31        |
| Hibridación de DNA en gota seca .....   | 32        |
| Crecimiento de plásmidos a mediana escala .....   | 33        |
| Caracterización enzimática de los plásmidos portadores del DNAC de hGH .....  | 34        |
| Electroforesis en geles de poliacrilamida .....   | 35        |
| Electroelución de DNA a partir de geles de poliacrilamida .....   | 36        |
| Caracterización del DNAC de hGH con enzimas de restricción diagnósticas .....   | 37        |
| Subclonación en fagos M13 .....   | 37        |
| Transformación de bacterias con DNA fágico .....  | 39        |

|   |           |
|---|-----------|
| Transformación de bacterias con DNA fágico .....                                | 39        |
| Preparación de templados de DNA de cadena sencilla .....                        | 40        |
| Secuenciamiento de nucleótidos por el método de Sanger .                        | 41        |
| <b>V. RESULTADOS .....</b>  | <b>44</b> |
| Extracción de RNA total de hipófisis humanas .....                              | 44        |
| Detección de secuencias codificantes para hGH .....                             | 46        |
| Aislamiento de RNA's mensajeros poli A <sup>+</sup> .....                       | 46        |
| Síntesis de los DNA's complementarios .....                                     | 49        |
| Una nueva estrategia de clonación .....   | 49        |
| Tamizaje de los plásmidos recombinantes .....                                   | 52        |
| pDRhGH3, pDRhGH7 y pDRhGH10: plásmidos portadores del...<br>DNAc de hGH .....   | 55        |
| Los insertos de DNAc en los plásmidos .....                                     | 58        |
| Se logra también la clonación del DNAc de hGH 20 Kd ....                        | 58        |
| Subclonación en vectores fágicos de la serie M13 .....                          | 61        |
| Determinación de la secuencia nucleotídica y su análisis<br>computacional ..... | 63        |
| <b>VI. DISCUSION .....</b>  | <b>68</b> |
| <b>VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....</b>                                   | <b>70</b> |
| <b>VIII. BIBLIOGRAFIA .....</b>   | <b>72</b> |

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**DEDICATORIAS**

Con todo mi amor a mis padres Dr. Enrique Rincón Zamudio y Sra. Leonor Limas de Rincón, por su inmenso cariño y su incesante apoyo y como un tributo a sus consejos, sus desvelos y sus sacrificios.

A mi tía Laura Limas Rodríguez, a quien debo gran parte de lo que soy, en reconocimiento a todo lo que ha hecho por mi familia.

Con cariño a mis hermanos Gloria, Mily, Jose Luis y Juan, por todas las alegrías y sin sabores que hemos compartido juntos.

Con eterna gratitud a mis tíos Dr. Adán Limas Rodríguez y Sra. Oralia García de Limas y a mis primos Gerardo, Mayela, Mireya, Mauro y Alejandro, por el invaluable apoyo que me otorgaron durante mis estudios.

---

Y en forma muy especial a Jovis, por todo el aliento que me brindó durante la realización del presente trabajo. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis, Dr. Hugo Barrera Saldaña, quien con su carácter recio y firme me enseñó a pensar, analizar, discernir y decidir por mi mismo en este difícil pero siempre fascinante campo de la investigación.

Al Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla y al personal docente del Departamento de Microbiología, por sus enseñanzas y sabios consejos.

A mis sinodales por sus valiosas sugerencias y por su interés en la revisión del presente trabajo.

A la Dirección y al Grupo Satélite de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, por su incondicional apoyo.

MI SINCERO AGRADECIMIENTO A LA SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA POR HABERME HONRADO CON UNA BECA PARA REALIZAR ESTUDIOS DE POSTGRADO.

De igual manera al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme concedido una beca-Tesis.

AL PERSONAL DEL ANFITEATRO DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO "DR. JOSÉ E. GONZÁLEZ", POR SU VALIOSA COOPERACIÓN.

### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A mis compañeros de laboratorio: Diana, Ramiro, Felipe, Herminia, Paty, Eddy, Alfredo, Manuel, Victor, Jaime, Rocío, Ataúlfo, Claudio, Irma y Raúl, por su inquebrantable amistad.

A los doctores Grady F. Saunders y Randy Lejerski por haberme facilitado sus respectivos laboratorios para la realización de algunos experimentos.

Al Instituto de Genética Molecular del Baylor College of Medicine por proporcionarme el material necesario para la impresión de este trabajo.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|        |      |  |
|--------|------|--|
| ATP    | .... | Adenosin trifosfato                                      |
| °C     | .... | Grados centigrados                                       |
| cm     | .... | Centímetro   |
| cols   | ...  | Colaboradores  |
| cpm    | .... | Cuentas por minuto                                       |
| CTP    | .... | Citidin trifosfato                                       |
| DEP    | .... | Dietil pirocarbonato                                     |
| DNAc   | ...  | DNA complementario                                       |
| dNTP   | ...  | Desoxinucleósido trifosfatado                            |
| ddNTP  | ..   | Dideoxinucleósido trifosfatado                           |
| DO     | .... | Densidad óptica  |
| EDTA   | ...  | Acido etilendiamin tetracético                           |
| g      | .... | Gramo  |
| GTP    | .... | Guanosin trifosfato                                      |
| h      | .... | Hora   |
| hGH    | .... | Hormona de crecimiento humana                            |
| hPL    | .... | Hormona lactogénica placentaria                          |
| IPTG   | ...  | Isopropil tio-β-D-galactósido                            |
| Kd     | .... | Kilodaltones   |
| Kg     | .... | Kilogramo  |
| M      | .... | Molar  |
| min    | .... | Minuto   |
| ml     | .... | Mililitro  |
| mm     | .... | Milímetro  |
| mM     | .... | Milimolar  |
| μCi/μl | ..   | Microcuries por microlitro                               |
| μg     | .... | Microgramo   |
| μl     | .... | Microlitro   |
| ng     | .... | Nanogramo  |
| nm     | .... | Nanómetro  |
| nmol   | ...  | Nanomoles  |
| pb     | .... | Pares de bases   |
| pH     | .... | Logaritmo negativo de la concentración de H <sup>+</sup> |
| rpm    | .... | Revoluciones por minuto                                  |
| s      | .... | Segundo  |
| S      | .... | Unidades Svedverg  |
| SSC    | .... | Solución salina citratos                                 |
| SDS    | .... | Lauril sulfato de sodio                                  |
| TTP    | .... | Timidin trifosfato                                       |
| UV     | .... | Ultravioleta   |
| V      | .... | Voltios  |
| X      | .... | Veces la concentración                                   |
| xg     | .... | Veces la gravedad  |
| X-gal  | ..   | 5-Bromo-4-Cloro-3 indolil-β-D galactopiranósido          |

## LISTA DE FIGURAS

| Frontispicio<br># Pag. | Titulo   |
|------------------------|--|
| 1 6                    | Procesamiento del RNAm de hGH.   |
| 2 11                   | Mapa de restricción del DNAc de hGH.   |
| 3 45                   | Caracterización electroforética de RNA's extraídos de tejidos humanos.                                     |
| 4 47                   | Hibridación en gota seca de phPL815( <sup>32</sup> P) contra RNA's de placenta, hígado e hipófisis humana. |
| 5 48                   | Análisis electroforético de RNA's de hipófisis humanas.  |
| 6 50                   | Análisis de los DNA's complementarios de hipófisis humanas.  |
| 7 51                   | Preparación del plásmido pUC19 para la clonación del DNAc de hGH.  |
| 8 53                   | Clonación molecular del DNAc de hGH en el plásmido pUC19.  |
| 9 54                   | Perfil electroforético de los plásmidos recombinantes.   |
| 10 56                  | Detección de los plásmidos portadores del DNAc de hGH.   |
| 11 57                  | Análisis de restricción de los plásmidos portadores del DNAc de hGH.                                       |
| 12 59                  | Digestión de los plásmidos portadores del DNAc de hGH con <u>Xma</u> I y <u>Aat</u> II.                    |
| 13 60                  | Análisis de restricción de los DNAc's de hGH 20 y 22 kd.   |
| 14 62                  | Comparación de mapas de restricción de los DNAc's de hGH.  |
| 15 64                  | Subclonación de un fragmento del DNAc de hGH en el fago M13mp18.   |
| 16 65                  | Determinación de la secuencia nucleotídica del DNAc de hGH.  |
| 17 67                  | Análisis computacional de la secuencia nucleotídica del DNAc de hGH.                                       |

## I) RESUMEN.

La hormona de crecimiento humana (hGH) es una proteína con un amplio espectro fisiológico y terapéutico. En la práctica clínica, la hGH ha sido utilizada para el tratamiento de pacientes que sufren de hipopituitarismo, hipoglicemia, fracturas de huesos, quemaduras de la piel y úlceras. Recientemente se demostró que algunos pacientes que habían recibido hGH de origen hipofisiario fallecieron como consecuencia de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob lo cual motivó a la producción de hGH de origen recombinante. Dado que la hGH disponible en nuestro país es ya insuficiente para satisfacer la demanda de los pacientes que la requieren, y puesto que cada día es mas difícil importarla, emprendimos el presente trabajo.

Utilizando técnicas de Ingeniería Genética y partiendo de los ácidos ribonucleicos mensajeros (RNAm) que extrajimos a partir de tejido hipofisiario humano, construimos moléculas de DNAs complementarios (DNAC). Posteriormente diseñamos una estrategia para enriquecer el DNAC de hGH y favorecer su inserción en el plásmido pUC19. Los plásmidos obtenidos de esta manera fueron propagados en Escherichia coli para generar una bacterioteca recombinante. Por hibridación de DNA en gota seca detectamos tres clonas positivas. Después de un minucioso análisis de restricción descubrimos que dos de las clonas (pDRhGH3 y pDRhGH7) portaban el DNAC de hGH de 22 Kd, mientras que la otra (pDRhGH10) portaba el DNAC de la variante hGH de 20 Kd. Por el método enzimático de Sanger determinamos la secuencia nucleotídica del DNAC de hGH con lo cual inequívocamente demostramos su identidad e integridad plena. Esta es la primera vez que se logra la obtención de los DNAs complementarios de ambas formas de hGH hipofisiaria en un solo paso de clonación preferencial.



## II) INTRODUCCION.

A partir de la última década hemos presenciado una revolución en los campos de la Biología Moderna. Esta revolución no solo ha sido el resultado de un avance instrumental o un progreso en el conocimiento teórico, sino mas bien fue consecuencia de la aplicación de una variedad de técnicas colectivamente denominadas **Ingeniería Genética** o **tecnología del DNA recombinante**. Esta tecnología implica la manipulación y recombinación in vitro del material genético de diferentes organismos para crear nuevas combinaciones genéticas, lo cual puede lograrse actualmente en días o semanas y no a través de millones de años como lo ha venido haciendo la naturaleza.

El impacto que en la ciencia básica ha causado la Ingeniería Genética ha sido dramático, ya que grandes enigmas de la Biología Molecular han sido o están siendo elegantemente dilucidados. Pero junto a estos estudios fundamentales, lo que mas interesa al mundo médico o comercial es que la Ingeniería Genética proporciona los medios para producir en abundancia sustancias escasas o difíciles de extraer del organismo humano y que representan un ilimitado valor terapéutico o diagnóstico. En la actualidad, el aislamiento de un gen que gobierna la síntesis de una proteína de interés para la medicina, no plantea ya muchos problemas al investigador. Gracias a un esfuerzo técnico sin precedentes, cualquier laboratorio puede aplicar la tecnología del DNA recombinante puesto que se dispone comercialmente de todo lo necesario, a veces incluso en forma de paquetes listos para ser usados, lo cual se ha reflejado en un desarrollo vertiginoso de esta nueva y prometedora biotecnología.

### a) Ingeniería Genética y clonación molecular.

El descubrimiento del código genético como base química de la herencia así como las técnicas enzimáticas capaces de modificar al DNA, han ampliado el espectro de investigaciones básicas en áreas como la Genética, la Bioquímica, la Microbiología y la Biología Molecular. Como una consecuencia de ello, en la actualidad es posible reprogramar el legado genético de los microorganismos al gusto del investigador.

El éxito de este suceso depende, en principio, de la disponibilidad de un amplio repertorio de enzimas que actúan sobre los ácidos nucleicos. Se requiere básicamente de enzimas para cortar, unir y modificar el DNA. Los cortes sobre la molécula de DNA fueron posibles gracias al descubrimiento de una serie de proteínas denominadas enzimas de restricción. Estas son endonucleasas capaces de reconocer secuencias

precisas de DNA y de provocar una escisión a nivel de ellas. Un fragmento de DNA originado por la acción de una enzima de restricción puede ser específicamente cortado por la acción sucesiva de una o mas enzimas. Los fragmentos obtenidos de esta manera pueden ser analizados para generar un mapa de restricción, el cual funciona como una cartilla de identidad para la molécula de DNA que se está inspeccionando. La disponibilidad de un gran número de enzimas de restricción y de DNA ligasas (enzimas que unen segmentos de DNA) hace factible tratar a una determinada secuencia génica como un módulo, de tal manera que se pueda mover de una molécula de DNA a otra en forma premeditada.

Puesto que pueden hacerse las mismas operaciones de corte y ligación en dos DNA's de orígenes distintos pero que han sido producidos por la acción de una misma enzima de restricción, resulta posible insertar un fragmento cualquiera de DNA extraño en un vector de clonación (plásmidos o bacteriófagos) proceso conocido como **clonación molecular**. Una vez hecha la recombinación del material genético, basta luego con introducir las moléculas recombinantes a células apropiadas, de tal manera que puedan amplificarse al utilizar la maquinaria sintetizadora de DNA de la célula huésped. A este respecto los plásmidos son los vectores mas utilizados para la clonación en Escherichia coli. Estos son pequeñas moléculas de DNA circular con replicación independiente que existen naturalmente en algunas bacterias y que les confieren, por lo regular, resistencia a un antibiótico. Durante el mencionado proceso de clonación, y cuando se trata de clonar todo el DNA del genoma celular, se originan miles de clonas bacterianas cada una de las cuales acarrea un recombinante con un inserto de DNA diferente. A esta colección de clonas se le conoce como banco de DNA genómico o genoteca. El siguiente paso es identificar la clona que contiene el plásmido deseado para lo cual se requiere el empleo de un fragmento de DNA cuya secuencia de nucleótidos sea complementaria al gen de interés, de tal manera que pueda ser utilizado como sonda radiactiva para detectar, mediante hibridación de ácidos nucleicos y autorradiografía, a la bacteria que porta el plásmido recombinante que interesa al investigador.

Una estrategia alternativa para simplificar el proceso de clonación de secuencias génicas es seleccionar aquellas secuencias de DNA transcritas a RNA mensajero (RNAm). Esto es, en un grupo celular dado, de los cientos de miles de genes existentes en el genoma sólo unos cuantos miles son copiados a RNAm. La obtención de un banco que sea representativo de los RNAm de estas células contiene pues menos miembros distintos y estarían más representados aquellos RNAm característicos del tejido en cuestión. Lo anterior se lleva a cabo purificando los RNAm y a partir de cada una de esas moléculas se fabrica una copia de DNA conocida como **DNA complementario (DNAc)**. La

clave para formar el DNA complementario es la enzima transcriptasa inversa. Dicha enzima cataliza la síntesis de una cadena de DNA complementario a una plantilla de RNAm. El DNAc monocatenario proveniente de la acción de la transcriptasa inversa, puede convertirse ahora a DNAc de doble cadena mediante un tratamiento con las enzimas RNasa H y DNA polimerasa. Los DNAs complementarios así obtenidos son más estables y más manipulables que los RNAm y pueden insertarse en algún vector de clonación dependiendo de la estrategia y los propósitos del investigador, para generar así finalmente lo que se conoce como un "banco de DNAs complementarios".

## **b) Ingeniería Genética y Salud.**

Existe un buen número de productos biológicos de uso en la medicina cuya utilidad en el tratamiento y prevención de muchas enfermedades se ha visto severamente limitada por dos razones principales: 1) las concentraciones tan bajas en que estos productos se hallan presentes en sus fuentes naturales y 2) la insuficiente disponibilidad de las fuentes naturales de estos productos.

En este momento, los ingenieros genéticos enfrentan la difícil misión de incrementar el actual y ya insuficiente ritmo de producción de algunas proteínas de importancia médica que, dadas las limitaciones de sus fuentes naturales, su producción por técnicas bioquímicas convencionales solo permite el tratamiento de muy pocos de los enfermos que las requieren. Actualmente, en los países industrializados, la Ingeniería Genética ha desarrollado una biotecnología cuyos principales esfuerzos se han dirigido, con un éxito sin precedentes, a la utilización y manipulación de microorganismos a fin de obtener hormonas, factores de coagulación, factores de crecimiento, vacunas, drogas antineoplásicas, drogas antivirales así como otros factores biológicos y farmacéuticos para los cuales la Ingeniería Genética representa la mejor y en ocasiones la única alternativa para su producción.

En México, la explotación de la Ingeniería Genética en beneficio del sector salud se encuentra sumamente retrasada con respecto a los países desarrollados. Por ello es imperativo establecer sistemas para la producción de proteínas de importancia biomédica mediante la tecnología del DNA recombinante. Probablemente uno de los mejores ejemplos de todas las posibles contribuciones que la Ingeniería Genética tendrá en el área de la salud para nuestro país, sea la producción de hormona de crecimiento humana recombinante.



### c) Antecedentes particulares :

La hormona de crecimiento humana (hGH) o somatotropina, es una proteína con un peso molecular de 22,000 daltones constituida por una sola cadena polipeptídica de 191 aminoácidos unida por dos puentes disulfuro (1). Esta hormona se sintetiza en la hipófisis o pituitaria, que en los seres humanos es una glándula de 1 cm de diámetro situada en la base del cráneo como una prolongación del hipotálamo; dicha estructura pesa alrededor de 0.5 g y desde el punto de vista histológico, se reconocen tres zonas en ella: el lóbulo anterior o adenohipófisis, el lóbulo posterior o neurohipófisis y la parte intermedia (2,3). Es precisamente en el lóbulo anterior o adenohipófisis donde se sintetiza la hormona de crecimiento así como también las hormonas folículo estimulante, luteinizante, prolactina y diversas hormonas tróficas (2).

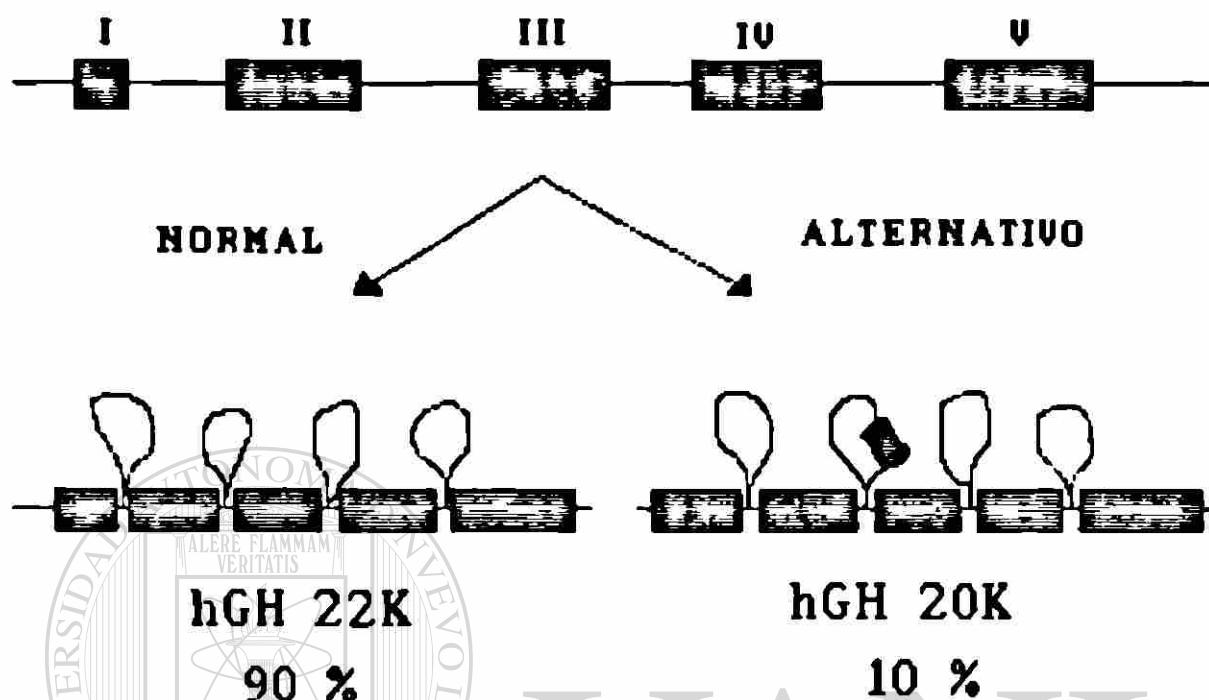
La hGH es codificada por un gen que forma parte de un complejo génico integrado también por los genes de la hormona lactogénica placentaria (hPL) (4). Los genes que codifican para hGH y hPL se encuentran agrupados en las bandas q22-24 del cromosoma 17, son cinco y se disponen en el siguiente orden: 5' \* hGH-N \* hPL-1 \* hPL-4 \* hGH-V \* hPL-3 \* 3' (5). El gen hGH-N (normal) tiene una longitud de 1,653 pb y está compuesto de 5 exones y 4 intrones. Este gen es expresado exclusivamente en la hipófisis y codifica para una proteína de 22 Kd. Además de esta forma predominante, el 10% de la hGH hipofisiaria está presente como una proteína de 20 Kd, la cual carece de los residuos aminoácidos 32 al 46 como consecuencia de un "splicing" diferencial (6) (Figura 1). Por otra parte, el gen hGH-V (variable) difiere del gen hGH-N en la información para 13 residuos aminoácidos; recientemente su transcrito fue detectado en tejido placentario (7) pero el producto proteico de ese gen no ha sido aun identificado por lo tanto su fisiología permanece desconocida.

La hGH de 22 Kd presenta una gran cantidad de funciones entre las que destacan la actividad impulsora del crecimiento, actividad promotora de la síntesis de proteínas, DNA y RNA, efectos diabéticos y acciones lactogénicas y mamotróficas (1,4). Así mismo está involucrada en la regulación de una variedad de procesos metabólicos que incluyen el metabolismo del Nitrógeno, Lípidos, Minerales, Carbohidratos y además actúa como elemento sinérgico para reforzar el efecto de otras hormonas (8).

En la práctica clínica la hGH de 22 Kd tiene un amplio potencial farmacológico, el cual ha sido aprovechado principalmente para el tratamiento de niños con problemas de crecimiento debido a una deficiencia de dicha hormona y también para el tratamiento de pacientes que sufren de



## PROCESAMIENTO DEL RNAm DE hGH



**Figura 1.- Mecanismos de "splicing" alternativo en los RNAm de hGH.** La expresión del gen hGH ha sido detectada únicamente en hipófisis. El transcrito primario sufre dos clases de "splicing" cada uno de los cuales produce un RNA mensajero que da origen a diferentes proteínas. La hormona 22 Kd constituye el 90% y la variante 20 Kd, el restante 10% de la producción total de hGH. Esta última se origina como una consecuencia de una delección de 45 nucleótidos localizados en el extremo 5' del tercer exón.

hipoglicemia, fracturas de huesos, quemaduras de la piel y úlceras (9). A pesar de los enormes avances científicos y tecnológicos, el papel terapéutico de la hGH 20 Kd no ha sido aun esclarecido.

Desde hace mas de 25 años la hormona utilizada para propósitos clínicos en E.U.A. fue obtenida a partir de hipófisis extraídas de cadáveres humanos (10). Hasta antes de 1977 esta hormona había sido purificada y proporcionada por tres Universidades diferentes. Posteriormente fue distribuida por el National Hormone and Pituitary Program y desde entonces estuvo disponible comercialmente como Asellacrin (Serono Labs) y Crescormon (Kabi Vitrum) (9). Sin embargo, ya que la hormona de crecimiento es especie-específica en su acción y puesto que los cadáveres humanos eran la única fuente de obtención de dicha hormona, esto representó obviamente una limitante muy marcada para el suministro y el abasto de los miles de niños que la requieren, ya que para tratar a un niño hasta la pubertad pueden ser necesarios varios centenares de hipófisis (11). Aunado a ello se demostró recientemente que cuatro adultos jóvenes que habían recibido ese tipo de preparados fallecieron como consecuencia de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, una infección letal causada por un virus lento que se caracteriza por demencia, síntomas cerebelares, ataxia, mioclonía y muerte inexorable (10,11,12,13,14). Esto condujo a que el 19 de Abril de 1985 un grupo de expertos del National Institute of Health prohibiera la utilización de estos productos debido a que muy probablemente las preparaciones de la hormona estaban contaminadas con ese virus (10).

La necesidad de utilizar el potencial terapéutico de la hormona de crecimiento humana motivó a los biólogos moleculares para que solucionaran este problema haciendo uso de las poderosas herramientas que nos proporciona la tecnología del DNA recombinante. En este caso, dicha tecnología ha jugado un papel importante ya que fue aplicada exitosamente para producir hormona de crecimiento humana en Escherichia coli sin riesgo de contaminación viral y en cantidades ilimitadas (15,16,17) dando solución definitiva al grave problema de disponibilidad e inseguridad terapéutica. Además de ello, se ha logrado también la clonación del gen de la hormona de crecimiento de especies diferentes incluyendo a la rata (18), bovino y porcino (19). Las secuencias del RNAm de la hormona de crecimiento de estas especies han sido analizadas a través de sus DNAs complementarios y han mostrado ser moléculas de aproximadamente 800 nucleótidos que codifican para un precursor de esta hormona (18,20, 21,22). El precursor contiene un péptido señalador hidrofóbico de 26 residuos aminoácidos covalentemente unido al extremo amino terminal de la hormona madura. Este péptido señalador está involucrado en el mecanismo de secreción de la hormona de crecimiento por las células somatotrópicas de la hipófisis (1).

Puesto que la administración de la préhormona es afuncional en el organismo debido a la conservación del péptido señalador, nuevamente los biólogos moleculares buscaron la manera de producir la hormona madura en microorganismos programados por Ingeniería Genética. En 1979, Goeddel y colaboradores lograron la expresión directa en *E. coli* de la hormona de crecimiento humana sin su péptido señalador, al construir un gen híbrido mediante la combinación de un segmento de DNA sintético y otro segmento de DNAC derivado del RNAm de hGH (15). El uso del DNA sintético facilitó el diseño conveniente de una nueva secuencia codificadora para la región amino terminal de hGH. En este diseño el codón de iniciación de la traducción (ATG) precede directamente al codón del primer aminoácido de hGH (15). Por lo tanto la forma biosintética de la hormona de crecimiento, la cual fue manufacturada por la compañía Genentech, difiere de la hormona natural en que posee un residuo de metionina extra en su extremo amino terminal (12). El producto de Genentech denominado " Protropin " fue sometido a pruebas de experimentación desde 1981 (23). Olson y colaboradores demostraron que produce los mismos efectos que la proteína nativa ya que mantiene las actividades biológicas promotoras del crecimiento (24). En 1983, Jonsdottir realizó un estudio con anticuerpos monoclonales para saber si existía variación entre los determinantes antigénicos de la hormona biosintética y la hormona nativa y no encontró diferencia significativa con lo cual se descartó la posibilidad de una reacción inmunológica secundaria a su administración (25).

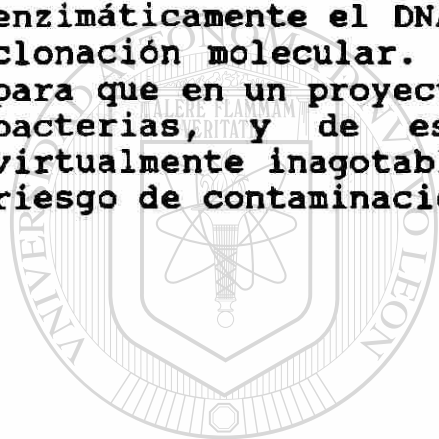
En una prueba clínica contundente en la que se utilizó hormona de crecimiento producida por Ingeniería Genética, se demostró que de 84 pacientes voluntarios con hipopituitarismo solamente uno no respondió al tratamiento y no se observaron efectos secundarios a la administración (23). Fue así como en Octubre de 1985, finalmente la Food and Drugs Administration en E.U.A. aprobó la venta de la metionil-hormona de crecimiento para el tratamiento terapéutico de las personas con deficiencia de dicha hormona (23,26). Protropin representa el segundo producto de la tecnología del DNA recombinante disponible comercialmente en el mercado. El primero fue una versión biosintética de la insulina humana que también fue manufacturada por Genentech.

En Europa, la versión biosintética de hGH es suministrada por Kabi Vitrum con el nombre de Somatonorm y en E.U.A. por la compañía Genentech bajo el nombre de Protropin. A medida que se acumulan datos clínicos sobre eficacia y seguridad, las autoridades recomiendan el empleo del producto recombinante. Por lo anterior es claro que la hormona de crecimiento humana biosintética cubre todas las posibilidades terapéuticas de su homóloga de procedencia extractiva. Su producción por fermentación bacteriana constituye un rotundo ejemplo del

enorme potencial que tienen las técnicas de la Ingeniería Genética para la solución de problemas clínicos, abriéndose consecuentemente un futuro esperanzador para la explotación de secuencias proteicas de importancia biomédica.

**d) Justificación :**

Actualmente no es posible suministrar ninguna garantía de seguridad en la administración de la hGH de origen hipofisiario, sean cuales sean las precauciones tomadas en su fabricación. Además dado que la hormona del crecimiento humana disponible en nuestro país es insuficiente para satisfacer la demanda de los pacientes que la requieren y puesto que cada día es mas difícil importarla por su alto costo, emprendimos el presente trabajo. Su propósito fue el de sintetizar enzimáticamente el DNAC de hGH e introducirlo a un vector de clonación molecular. El logro de esta meta es el requisito para que en un proyecto subsecuente se pueda producir hGH en bacterias, y de esta manera se produzca una fuente virtualmente inagotable de hormona de crecimiento humana sin riesgo de contaminación.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### III) OBJETIVOS E HIPOTESIS.

#### Objetivo General:

Con el presente trabajo pretendemos contribuir al surgimiento y desarrollo de la biotecnología para la salud humana, mediante la obtención de la información genética requerida para la producción de hGH de origen biosintético.

#### Objetivos Particulares:

La estrategia general que utilizamos para la realización del presente trabajo estuvo integrada por seis objetivos experimentales los cuales se describen a continuación :

- a.- Obtención de las moléculas de RNA's mensajeros a partir de hipófisis extraídas de cadáveres humanos.
- b.- Síntesis de los DNA's complementarios a estos RNA's mensajeros.
- c.- Inserción selectiva del DNac de hGH en un vector de clonación molecular y su propagación en E. coli.
- d.- Identificación de la clona bacteriana portadora del plásmido recombinante que contiene la información para hGH.
- e.- Caracterización del DNac de hGH con enzimas de restricción específicas.
- f.- Determinación parcial de la secuencia nucleotídica del DNac de hGH para demostrar su identidad e integridad plena.

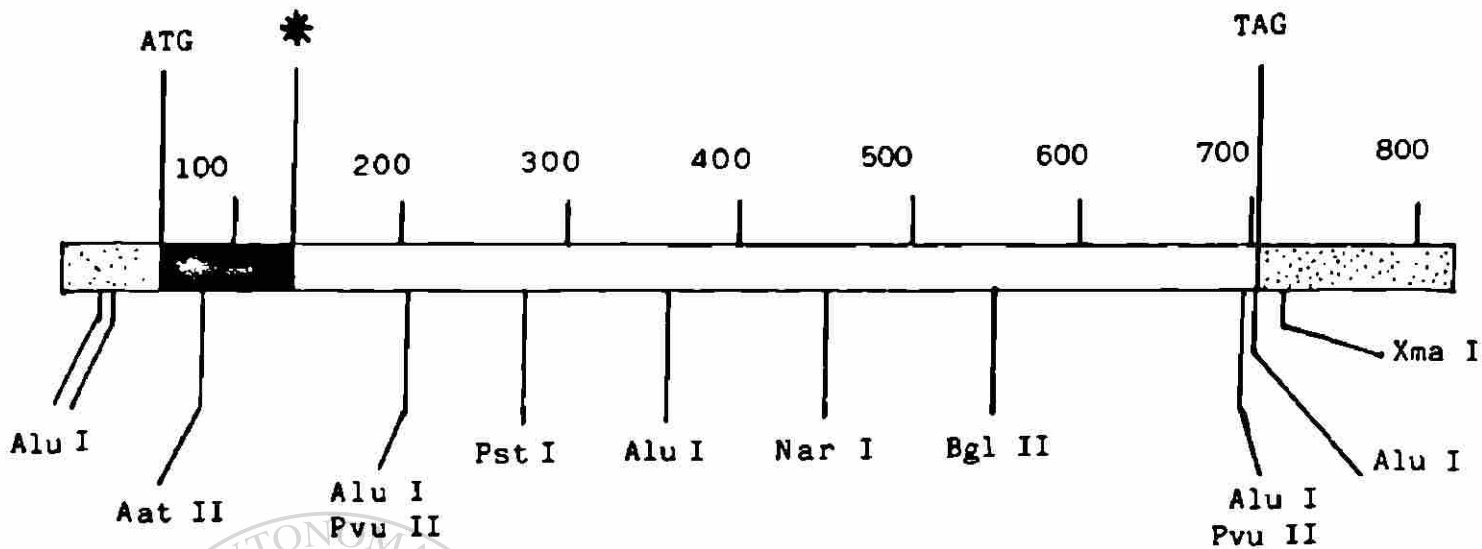
#### Hipótesis :

Después de analizar la secuencia nucleotídica previamente reportada del DNac de hGH (22) y construir su mapa de restricción (Figura 2), nos percatamos de que la información que codifica para la hGH madura estaba flanqueada por sitios únicos para las enzimas de restricción Aat II y Xma I. Puesto que dichas enzimas reconocen secuencias nucleotídicas raramente encontradas a lo largo del genoma humano (27), propusimos lo siguiente :

"La digestión enzimática de los DNA's complementarios derivados de hipófisis humanas con las enzimas de restricción Aat II y Xma I y su posterior inserción en un vector de clonación, similarmente digerido, nos permitirá obtener rápida y eficientemente a las clonas recombinantes portadoras del DNac de hGH".



## MAPA DE RESTRICCIÓN DEL DNAC DE hGH



ATG Codón de iniciación

TAG Codón de terminación

 Región codificante para la hormona madura

 Región codificante para el péptido señalador

 Región no traducible

\* Primer aminoácido de la hormona madura

**Figura 2.- Organización del DNAC de la hormona de crecimiento humana.** Se muestra la estructura anatómica del DNAC de hGH y se indican los sitios de restricción diagnósticos para su identificación. Se observa que la información que codifica para la proteína madura es flanqueada por los sitios Aat II y Xma I hacia los extremos 5' y 3' respectivamente.

#### IV) MATERIALES Y METODOS.

##### A) ORIGEN DE LOS REACTIVOS :

Las enzimas de restricción y modificación de ácidos nucleicos fueron obtenidas de varias casas comerciales: Bethesda Research Laboratories, New England Biolabs, Pharmacia y Boehringer Mannheim y se utilizaron de acuerdo a las condiciones especificadas por el proveedor.

La celulosa oligo-dT utilizada para la purificación de los RNA mensajeros fue adquirida de Collaborative Research Inc.

El conjunto enzimático para la síntesis de DNA's complementarios fue obtenido de Bethesda Research Laboratories y el nucleótido radiactivo ( $^{35}\text{S}$ - $\alpha$ -dATP) utilizado para este propósito fue obtenido de Amersham.

De igual manera el nucleótido radiactivo  $^{32}\text{P}$ - $\alpha$ -dCTP utilizado para marcar el DNAC de hPL fue adquirido de Amersham International.

Para la determinación de la secuencia nucleotídica del DNAC de hGH se utilizó el conjunto de reactivos "Sequenase kit" de la compañía United States Biochemical.

Los reactivos empleados en la elaboración de amortiguadores, soluciones diversas y medios de cultivo fueron obtenidos de distintas casas comerciales: Sigma, Merck, Aldrich, IBI y Casa Rocas, procurando cuando fue posible emplear los de mayor calidad disponibles.

##### B) MATERIAL BIOLÓGICO :

5 g de tejido hipofisiario humano fueron recuperados de autopsias por el personal del Anfiteatro del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González". Estas hipófisis fueron extraídas en el menor tiempo posible para evitar la degradación del RNA y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido donde fueron almacenadas hasta su uso.

Se utilizó el plásmido pUC19 para la clonación de los DNA's complementarios y la bacteria Escherichia coli cepa RR1 para la propagación de los plásmidos recombinantes.

El marcador de peso molecular 1Kb Ladder fue donado por el Dr. Randy Lejersky (Departamento de Genética, M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute, University of Texas).

El DNAC de hPL, fragmento de 785 pb utilizado como rastreador molecular, fue derivado del plásmido pPL815 (28) mediante una digestión con la enzima de restricción Pst I y



posterior purificación. Para la hibridización de RNA-DNA en gota seca se utilizó phPL815 linearizado con Eco RI. El marcaje radiactivo de ambas secuencias génicas fue realizado generosamente por el M.C. Ramiro Ramirez Solís (Institute for Molecular Genetics, Baylor College of Medicine).

Para la preparación de los fagos recombinantes durante el protocolo del secuenciamiento nucleotídico utilizamos la bacteria Escherichia coli cepa JM103.

Tanto los plásmidos y los fagos así como las bacterias utilizadas provienen de la genoteca y la bacteriotea de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas.

### C) METODOS :

#### Extracción de RNA total de hipófisis humanas por el método de Isotiocianato de guanidina-Fenol-Cloroformo:

El método que utilizamos es una modificación de la técnica descrita por Chomczynsky y Sacchi en 1987 (29).

**Materiales, Reactivos y Soluciones :** Para eliminar las RNAsas, todo el material de plástico utilizado se sometió a un lavado con NaOH 1N por 10 min y se enjuagó exhaustivamente con agua tratada con dietil pirocarbonato (H<sub>2</sub>O-DEP). Todo el material de vidrio empleado (tubos y botellas de centrifuga, probetas, pipetas, vasos, etc.) fue horneado a 250°C por 4 h.

Las soluciones de los incisos a hasta e fueron tratadas con dietil pirocarbonato (DEP) al 0.1% por al menos 12 h a 37°C y posteriormente esterilizadas en el autoclave.

- a) Acetato de sodio 2 M pH 4.
- b) Citrato de sodio 0.75 M pH 7.
- c) Acetato de sodio 4 M pH 6.
- d) Cloruro de litio 4 M.
- e) Agua ultrapura (Milli Q).
- f) Sarcosil al 10%.
- g) Fenol saturado con H<sub>2</sub>O-DEP.
- h) Solución Sevag (cloroformo-alcohol isoamílico, 24:1).
- i) Etanol absoluto y etanol al 70% almacenados a -20°C.
- j) Solución D (isotiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM pH 7, sarcosyl 0.5% y β-mercaptoetanol 0.1 M).

#### **Procedimiento:**

- 1) Las hipófisis fueron colocadas sobre hielo seco inmediatamente después de sacarse del Nitrógeno líquido. Se pesó una alícuota de 5 g y se procesó rápidamente para evitar cualquier descongelamiento.

- 2) Se homogenizaron 5 g de tejido hipofisiario en una licuadora de vidrio que contenía 50 ml de solución D. Se mezcló a alta velocidad durante 3 min encendiendo y apagando cada 20 s para permitir que los trozos que quedaban en la superficie bajaran y fueran alcanzados por las aspás.
- 3) Se pasó el homogenizado a un frasco de vidrio de 500 ml con tapón esmerilado y se agregaron 5 ml de acetato de sodio 2 M pH 4, se agitó 1 min. Luego se añadieron 50 ml de fenol saturado con H<sub>2</sub>O-DEP y se agitó por 2 min. Por último, 10 ml de Sevag y se mezcló vigorosamente por 3 min. Se repartió la mezcla en dos botellas Corex de 150 ml y se colocaron en hielo durante 15 min.
- 4) Se centrifugó a 8,000 rpm durante 20 min a 4°C en una centrifuga B-20A de DAMON/IEC DIVISION utilizándose el rotor 872. Al terminar la centrifugación se recuperaron las fases acuosas de ambas botellas utilizando una jeringa de vidrio de 20 ml y se transfirieron a otras dos botellas Corex. Se les agregaron dos volúmenes de etanol absoluto frío, se agitaron suavemente por inversión y se colocaron a -20°C por al menos 1 h para precipitar los ácidos nucleicos.
- 5) Se centrifugó bajo las condiciones especificadas en el punto anterior. Se decantaron los sobrenadantes y se invirtieron las botellas a 4°C por 10 min para que escurrieran las pastillas. Se disolvió completamente cada una de las pastillas en 3 ml de solución D y se transfirieron a un solo tubo Corex de 30 ml horneado. Se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto frío y se colocó el tubo a -20°C por 1 h.
- 6) Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm en la centrifuga B-20A utilizándose el rotor 870 durante 25 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 5 ml de H<sub>2</sub>O-DEP. Se agregó un volumen de cloruro de litio 4 M y se colocó el tubo a 4°C por un mínimo de 4 h con el propósito de eliminar residuos de DNA.
- 7) Se centrifugó al igual que en el punto 6 y se decantó cuidadosamente el sobrenadante. La pastilla se lavó con etanol al 70% frío y se secó a 4°C con el tubo en posición invertida durante 10 min.
- 8) Finalmente, la pastilla de RNA se disolvió en 5 ml de H<sub>2</sub>O-DEP y se tomó una alícuota (50 µl) para efectuar lecturas en el espectrofotómetro a 230, 260 y 280 nm, así como para verificar su calidad electroforética. Se agregó acetato de sodio 4.5 M pH 6 para dar una concentración final de 0.3 M y dos volúmenes de etanol absoluto frío. La solución se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml y se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

### Electroforesis de RNA en geles de agarosa-urea-ácido:

Se utilizó el método descrito en su forma original por Rosen y cols. en 1975 (30).

#### Reactivos y soluciones :

- a) Agua tratada con DEP.
- b) Urea 10 M.
- c) Amortiguador de citrato de sodio 0.25 M pH 3.5.
- d) Amortiguador de citrato de sodio 0.025 M pH 3.5.
- e) Agarosa al 1.5 % (ver inciso 1 del procedimiento).
- f) Amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.6.
- g) Solución de bromuro de etidio a 10 mg/ml.

Nota: Las soluciones c y d fueron tratadas con DEP.

#### Procedimiento:

- 1) Preparación del gel de agarosa al 1.5 %.- 1.5 g de agarosa se añadieron a 60 ml de urea 10 M y 30 ml de H<sub>2</sub>O-DEP. La mezcla se calentó a ebullición hasta disolver la agarosa. Se dejó enfriar hasta aproximadamente 60°C y luego se añadieron 10 ml de amortiguador de citratos 0.25 M pH 3.5. Posteriormente se vació en el molde para el gel (de preferencia en placa vertical) y se mantuvo a 4°C por lo menos 4 h para que solidificara.

- 2) Preparación de la muestra:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

10 µl de RNA (1 µg/µl)  
5 µl de H<sub>2</sub>O-DEP  
30 µl de Urea 10 M  
5 µl de Azul de bromofenol al 0.5%

- 3) Electroforesis.- Las muestras se calentaron a 65°C por 10 min y se colocaron rápidamente en hielo. Se aplicaron en las casillas del gel y se realizó la electroforesis a 80 volts por 3 a 4 h a temperatura ambiente. Al término de la misma, el gel fue sumergido en 200 ml de una solución de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.6 conteniendo 1 µg/ml de bromuro de etidio durante 20 min. Finalmente se destiñó el gel durante 5 min en agua y se analizó bajo luz ultravioleta.

#### Criterios para establecer cantidad, pureza e integridad del RNA extraído:

Para determinar la concentración del RNA se tomó en cuenta que un valor de absorbancia de 1.0 a 260 nm equivale a 40 µg/ml de RNA; de manera que la concentración de RNA se obtiene al multiplicar el valor de la absorbancia obtenida por 40 y por el factor de dilución que generalmente corresponde a

un valor de 101 ( una alícuota de 10  $\mu$ l de RNA se diluye en 1000  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-DEP para hacer las lecturas al espectrofotómetro, por lo tanto al dividir el volumen final entre el volumen inicial obtenemos un factor de dilución de 101).

Para determinar la pureza del RNA, generalmente se obtiene la razón de la absorbancia a 260 nm UV entre la absorbancia a 280 nm UV. Una razón de 1.8 o mayor indica que la preparación es aceptablemente pura.

Para establecer la integridad de las moléculas de RNA obtenidas se visualiza el gel que contiene las preparaciones de RNA después de someterlo a electroforesis y posterior tinción con bromuro de etidio. Debe observarse una relación en el patrón de fluorescencia de 2:1 entre las bandas 28 y 18 S (respectivamente) de los RNA ribosomales. Aunque éstos son sintetizados en cantidades equimoleculares en la célula ya que son derivados a partir de un precursor común, el RNAr 28 S es aproximadamente dos veces mayor en longitud que el RNAr 18 S por lo que atrapa dos veces mas la cantidad de bromuro de etidio y por ello presentará una fluorescencia de mayor intensidad.

#### Hibridación de RNA-DNA en gota seca:

El presente método, basado en la descripción de Davis y cols. (31), fue utilizado para analizar los RNA's totales y detectar la presencia de secuencias génicas que codifican para hGH.

#### Reactivos y Soluciones:

- a) Formamida desionizada.
- b) SSC 20 X (Cloruro de sodio 17.53% y citrato de sodio 8.82% pH 7).
- c) Solución Denhardt 100 X (Albúmina sérica bovina 2%, Ficoll tipo 400 2% y polivinil pirrolidona 10%).
- d) Fosfato de sodio 1 M pH 8.
- e) SDS al 10%.
- f) Dextrán sulfato al 50%.
- g) Agua tratada con DEP.
- h) Solución de prehibridación (Formamida desionizada 50%, SSC 5 X, Solución Denhardt 5 X, Fosfato de sodio 50 mM pH 8, SDS 0.1% y DNA de esperma de salmón 250  $\mu$ g/ml).
- i) Solución de hibridación (Formamida desionizada 50%, SSC 5 X, Solución Denhardt 5 X, Fosfato de sodio 50 mM pH 8, SDS 0.1%, Dextrán sulfato 10% y 3 x10<sup>6</sup> cpm del plásmido phPL815 marcado con <sup>32</sup>P).
- j) Soluciones de RNA's totales de placenta, hígado e hipófisis humanas a una concentración de 2  $\mu$ g/ $\mu$ l.



**Procedimiento:**

- 1) En tubos de microcentrifuga debidamente rotulados se hicieron las siguientes mezclas:

|                      | <u>PLACENTA</u>            | <u>HIGADO</u>              | <u>HIPOFISIS</u>           |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| RNA                  | 10 $\mu$ l                 | 10 $\mu$ l                 | 10 $\mu$ l                 |
| SSC 20 X             | 4 $\mu$ l                  | 4 $\mu$ l                  | 4 $\mu$ l                  |
| H <sub>2</sub> O-DEP | <u>6 <math>\mu</math>l</u> | <u>6 <math>\mu</math>l</u> | <u>6 <math>\mu</math>l</u> |
|                      | 20 $\mu$ l                 | 20 $\mu$ l                 | 20 $\mu$ l                 |

Posteriormente se calentaron a 65°C para desnaturalizar los RNA's y se colocaron rápidamente en hielo.

- 2) A un papel filtro de nitrocelulosa previamente recortado a una dimensión de 6 x 2 cm se le hicieron 6 divisiones de 2 cm<sup>2</sup> con la ayuda de un bolígrafo. De esta manera se obtuvieron 3 columnas de 2 compartimientos cada una con el objeto de colocar cada muestra por duplicado. Este papel fue humedecido en agua destilada estéril por 5 min y posteriormente en SSC 20 X por otros 5 min. Se dejó secar a temperatura ambiente.
- 3) Se depositaron por duplicado cada una de las muestras desnaturalizadas en su respectiva columna y se aplicó aire caliente con una pistola secadora. Se colocó el papel de nitrocelulosa entre papel Whatman 3 MM y se horneó al vacío por 2 h a 80°C.
- 4) Se colocó el papel filtro en una bolsa de plástico y se agregaron 5 ml de la solución de prehibridación. Se eliminaron las burbujas de aire, se selló la bolsa por calentamiento y se prehibridizó a 42°C por 12 h.
- 5) Se calentó la solución de hibridación a 100°C por 10 min para desnaturalizar la sonda y se colocó súbitamente en hielo.
- 6) Se hizo un orificio en una esquina de la bolsa que contiene el papel de nitrocelulosa y se desechó la solución de prehibridación. En su lugar se agregaron 1.5 ml de la solución de hibridación (con la sonda previamente desnaturalizada), se selló nuevamente la bolsa y se colocó en un baño de agua a 42°C por 16 h con agitación suave.
- 7) Se recuperó el papel filtro de la bolsa y se sometió a 3 lavados de 15 min cada uno en 400 ml de SSC 2 X y SDS 0.1%. Los dos primeros a temperatura ambiente y el último a 50°C.
- 8) Posteriormente se hicieron 2 lavados en 400 ml de SSC 0.1 X y SDS 0.1% a 50°C por 45 min con agitación suave. En seguida se enjuagó el filtro en 200 ml de SSC 0.1 X por 10 min y se dejó secar a temperatura ambiente sobre una hoja de papel Whatman 3 MM.

- 9) Finalmente se cubrió el papel filtro con plástico adherible y se colocó en un cartucho para exposición radiactiva conteniendo una película ultrasensible. Se permitió la exposición por 12 h a  $-70^{\circ}\text{C}$ , se reveló la autorradiografía y se interpretaron los resultados.

**Aislamiento de RNA's mensajeros poli A\* por cromatografía de afinidad en columnas de celulosa oligo-dT:**

Se utilizó el método originalmente descrito por Aviv y Leder (32) y fue tomado de Maniatis y cols. (33).

**Materiales, reactivos y soluciones:**

Para eliminar la presencia de RNAsas, todo el material de plástico utilizado se sometió a un lavado con NaOH 1 N por 10 min y se enjuagó exhaustivamente con agua tratada con DEP. Todo el material de vidrio empleado (probetas, pipetas, vasos, etc.) fue horneado a  $250^{\circ}\text{C}$  por al menos 4 h. Se utilizaron guantes de latex durante todo el procedimiento.

Las soluciones de los incisos a hasta d fueron tratadas con dietilpircarbonato (al 0.1%) por al menos 12 h a  $37^{\circ}\text{C}$  y posteriormente esterilizadas en el autoclave.

- a) Cloruro de sodio 5 M.
- b) Sarcosil al 10%.
- c) EDTA 0.2 M.
- d) Acetato de sodio 4.5 M pH 6.
- e)  $\text{H}_2\text{O-DEP}$ .
- f) Tris-HCl 1 M pH 7.5 (Se preparó en  $\text{H}_2\text{O-DEP}$  y posteriormente se esterilizó en el autoclave).
- g) Hidróxido de sodio 0.1 N.
- h) Amortiguador de unión 4 X (NaCl 2 M, Tris-HCl 40 mM pH 7, Sarcosil 2% y EDTA 4mM en  $\text{H}_2\text{O-DEP}$ ).
- i) Amortiguador de elución 4 X (Tris-HCl 40 mM pH 7, Sarcosil 2% y EDTA 4 mM en  $\text{H}_2\text{O-DEP}$ ).
- y j) Etanol absoluto y etanol al 70% almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Procedimiento:**

**Preparación del RNA total.**

- 1) El RNA total almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  en una solución de etanol y sales fue centrifugado en una microcentrífuga (Eppendorf) por 10 min a 15,000 rpm. Se lavó con etanol al 70% y se secó en un evaporador centrífugo al vacío (Savant) por 5 min.
- 2) La pastilla se resuspendió en 1 ml de  $\text{H}_2\text{O-DEP}$  y la solución fue transferida a un tubo Falcon de 50 ml. Dicha solución se ajustó de tal manera que la concentración de RNA fuese de 1 mg/ml.

- 3) La solución de RNA se calentó a 65°C por 5 min y se colocó rápidamente en hielo. Después de 5 min se agregó amortiguador de unión a una concentración final de 1 X.

#### **Preparación de la celulosa oligo-dT.**

- 4) 0.5 g de celulosa oligo-dT tipo III (Collaborative Research Incorporation) fueron suspendidos en 10 ml de amortiguador de unión 1 X mezclando suavemente la solución con una pipeta pasteur.
- 5) Después de 5 min de sedimentación se descartó el sobrenadante por aspiración y la celulosa se resuspendió nuevamente en 10 ml de amortiguador de unión 1 X.

#### **Preparación de la columna.**

- 6) Una columna de 5 ml (Dispocolumn de BIORAD) fue sujeta a un soporte universal mediante unas pinzas para bureta. Así mismo un tubo Falcon de 50 ml, el cual fue utilizado como depósito para las soluciones que se pasarían a través de la columna, fue sujeta también al soporte con otras pinzas para bureta. En la tapa de dicho tubo se hizo un pequeño orificio y a través de él se introdujo un extremo de una manguera de plástico de 5 mm de diámetro por 30 cm de largo. El otro extremo de la manguera fue conectado a la tapa de la columna.
- 7) Se colocaron unas pinzas de presión regulable sobre la manguera para controlar la velocidad de flujo hacia la columna. Se aplicó la solución de celulosa oligo-dT directamente en el dispositivo de BIORAD y se dejó reposar para que se empacalara fuertemente hasta formar una columna de aproximadamente 2 ml.
- 8) Se agregaron al depósito 5 volúmenes de columna de una solución de NaOH 0.1 N y EDTA 5 mM permitiéndose un flujo de 250 µl/min. Posteriormente se aplicaron 5 volúmenes de H<sub>2</sub>O-DEP y luego 3 volúmenes de amortiguador de unión verificándose que el pH del líquido eluido fuese neutro.

#### **Cromatografía de afinidad.**

- 9) El RNA total previamente desnaturalizado fue aplicado a la columna y el RNA no unido se colectó en un tubo Falcon de 15 ml sumergido en hielo. Se dejó de colectar hasta que la absorbancia de la solución eluida era igual a cero a 260 nm.
- 10) Se lavó la columna con 3 volúmenes de amortiguador de unión 1 X y posteriormente se aplicaron 5 volúmenes de amortiguador de elución 1 X para eluir los RNA mensajeros. Se dejó de colectar hasta que la absorbancia del líquido eluido era igual a cero.



- 11) Los RNA mensajeros colectados se desnaturalizaron a 65°C por 5 min y se colocaron rápidamente en hielo. Se les agregó amortiguador de unión a una concentración final de 1 X. Se equilibró la columna con 3 volúmenes de amortiguador de unión 1 X y se aplicaron nuevamente estos RNA's para realizar una segunda cromatografía.
- 12) Se lavó la columna con 3 volúmenes de amortiguador de unión 1 X y posteriormente se aplicaron 3 volúmenes de amortiguador de elución 1 X. En esta etapa se colectaron 10 fracciones de 1.5 ml cada una, se midió la absorbancia de cada una de ellas y se mezclaron aquellas con mayor densidad óptica. Se agregó acetato de sodio a una concentración final de 0.2 M y se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Esta solución se colocó a -20°C durante toda la noche.
- 13) Los RNA's mensajeros fueron colectados por centrifugaciones sucesivas en un solo tubo de microcentrífuga a 15,000 rpm por 10 min. La pastilla de RNA se lavó con etanol al 70% y se secó en un evaporador centrífugo al vacío. Finalmente los RNA's fueron disueltos en 100 µl de H<sub>2</sub>O-DEP, se determinó su concentración por espectrofotometría a 260 nm y se verificó su calidad por electroforesis en un gel de agarosa-urea-ácido.

#### Síntesis de DNA's Complementarios:

Para la síntesis de los DNA's complementarios utilizamos un conjunto enzimático de la compañía BRL (cDNA Synthesis System, catálogo 8267SA) cuya aplicación está basada en la técnica descrita por Gubler y Hoffman en 1983 (34).

Reactivos y soluciones:

- a) TE pH 7.6 (Tris-HCl 10 mM pH 7.6 y EDTA 1 mM).
- b) EDTA 250 mM pH 7.5.
- c) Acido tricloroacético (TCA) al 5 y al 10% almacenados a 4°C.
- d) Etanol absoluto y etanol al 70% almacenados a -20°C.
- e) Acetatato de amonio 7.5 M
- f) Fenol-sevag (1:1).
- g) <sup>35</sup>S-α-dATP a 10 µCi/µl.
- h) RNAm's de hipófisis humanas a 1 µg/µl.

Componentes del conjunto enzimático:

- i) Transcriptasa inversa MMLV (virus de la leucemia murina de Moloney) a 200 U/µl.
- j) Amortiguador para síntesis de la primera cadena 5 X.
- k) Oligo-dT<sub>12-18</sub> 0.5 mg/ml.
- l) DNA polimerasa I de E. coli a 10 U/µl
- m) Amortiguador para síntesis de la segunda cadena 10 X.
- n) RNAsa H de E. coli a 2 U/µl.

- ñ) Mezcla de dNTP's a 10 mM cada uno.
- o) Agua tratada con DEP.

### Procedimiento:

- 1) En un tubo de microcentrífuga sumergido en hielo se hizo la siguiente mezcla de reacción:

|  |      |    |
|--|------|----|
| Amortiguador para síntesis de la primera cadena 5 X. | 10   | μl |
| Mezcla de dNTP's a 10 mM cada uno .....              | 2.5  | μl |
| Oligo-dT <sub>12-18</sub> 0.5 μg/μl .....            | 5    | μl |
| RNAM's de hipófisis humanas a 1 μg/μl .....          | 5    | μl |
| Transcriptasa inversa MMLV a 200 U/μl .....          | 5    | μl |
| Agua tratada con DEP .....                           | 22.5 | μl |

Después de realizar la mezcla se tomó una quinta parte (10 μl) y se pasó a un segundo tubo de microcentrífuga que contenía 0.2 μl de una solución del radioisótopo <sup>35</sup>S-α-dATP (10 μCi/μl), el cual fue utilizado como trazador radiactivo. De esta fracción radiactiva se tomó 1 μl y se colocó sobre un filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/C) rotulado como "TCA antes".

- 2) Ambos tubos se colocaron a 37°C por 1 h. Después de este tiempo se detuvo la reacción radiactiva mediante la adición de 0.2 μl de EDTA 0.25 M pH 7.5.
- 3) La reacción no radiactiva fue sometida a una extracción orgánica con un volumen (40μl) de una solución de fenol-sevag (1:1), se centrifugó a 10,000 rpm por 3 min y se recuperó la fase acuosa. La fase orgánica fue sometida a una segunda extracción con 40 μl de TE y al final se mezclaron ambas fases acuosas. Se les agregó medio volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2.2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se colocó la mezcla a -20°C por al menos 1 h. Se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 30 μl de H<sub>2</sub>O-DEP. Esta solución (híbrido RNAM-DNAC) fue utilizada para la síntesis de la segunda cadena como se mencionará mas adelante.
- 4) De la mezcla radiactiva se tomaron 2 alícuotas de 1 μl y se colocaron respectivamente sobre 2 piezas de papel filtro (Whatman GF/C) rotulados como "TCA total" y "TCA después". Se dejaron secar al aire.
- 5) Al resto de la solución radiactiva (7 μl) se le agregaron 43 μl de TE, 25 μl de acetato de amonio 7.5 M y 165 μl de etanol absoluto frío. Se colocó a -20°C por 1 h. Se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 10 μl de TE. De esta solución se tomaron 3 μl para analizar la síntesis de DNAC monocatenario por electroforesis en un gel alcalino de agarosa como se mencionará en la sección posterior.

- 6) Los filtros rotulados como "TCA antes" y "TCA después" fueron sometidos a un lavado con TCA al 10% por 10 min, dos lavados con TCA al 5% por 5 min y un lavado con etanol al 95% por 5 min. Se dejaron secar a temperatura ambiente por 10 min.

Posteriormente estos dos filtros al igual que el rotulado como "TCA total" fueron colocados respectivamente dentro de 3 viales que contenían 5 ml de líquido de centelleo y se cuantificó la radiactividad emitida en un contador de centelleo utilizando el canal para  $^{35}\text{S}$ . Se cuantificó la síntesis de DNAC monocatenario de acuerdo a la siguiente fórmula (35, 36):

$$\mu\text{g de DNAC monocatenario} = \frac{\text{cpm TCA antes} - \text{cpm TCA después}}{\text{cpm TCA total}} \times \text{nmoles de dATP} \times 4 \times .33$$

- 7) Para la síntesis de la segunda cadena de los DNAC se hizo la siguiente mezcla en un tubo de microcentrífuga colocado sobre hielo:

|   |                    |
|---|--------------------|
| Solución de RNAm-DNAC monocatenario (inciso 3) ....                     | 30 $\mu\text{l}$   |
| Agua tratada con DEP .....  | 35.6 $\mu\text{l}$ |
| Solución de dNTP's (10 mM) .....  | 3 $\mu\text{l}$    |
| Amortiguador para síntesis de la segunda cadena 10 X. 8 $\mu\text{l}$   |                    |
| $^{35}\text{S}$ - $\alpha$ -dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ) ..... | 0.5 $\mu\text{l}$  |
| DNA polimerasa I de <i>E. coli</i> (10 U/ $\mu\text{l}$ ) .....         | 2.5 $\mu\text{l}$  |
| RNasa H de <i>E. coli</i> (2U/ $\mu\text{l}$ ) .....                    | 0.4 $\mu\text{l}$  |

Después de realizar la mezcla se tomó una alícuota de 1  $\mu\text{l}$  y se depositó sobre un filtro Whatman GF/C rotulado como "TCA antes". Se colocó la mezcla de reacción en un baño de agua a 16°C por 2 h.

- 8) Al término de la incubación se tomaron 2 alícuotas de 1  $\mu\text{l}$  y se colocaron respectivamente en 2 filtros rotulados como "TCA total" y "TCA después". Posteriormente se detuvo la reacción mediante la adición de 3  $\mu\text{l}$  de EDTA 0.25 M.
- 9) De esta reacción radiactiva se tomó una décima parte (8  $\mu\text{l}$ ) y se precipitaron los ácidos nucleicos con acetato de amonio y etanol. Se colocó la solución a -20°C por 1 h y posteriormente se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min. Se lavó la pastilla con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 3  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O-DEP. Esta fracción fue utilizada para analizar la síntesis de la segunda cadena por electroforesis en un gel alcalino de agarosa.
- 10) La solución restante fue sometida a una extracción orgánica con un volumen de fenol-sevag en forma similar a como se mencionó en el inciso 3. Se recuperó la fase acuosa y se le agregó medio volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2.2 volúmenes de etanol absoluto frío. Después de 1 h a -20°C se

obtuvieron los DNAs complementarios mediante el mismo procedimiento del inciso anterior excepto que en este caso la pastilla fue resuspendida en 20  $\mu$ l. Esta solución (que contiene los DNAC de doble cadena) fue colocada a 4°C donde fue almacenada hasta su uso posterior.

- 11) En seguida los 3 filtros que contienen alícuotas radiactivas fueron tratados de igual manera que en el inciso 6 y finalmente se cuantificó la síntesis de DNAC's bicatenarios mediante la siguiente fórmula (35, 36):

$$\mu\text{g de DNAC bicatenarios} = \frac{\text{cpm TCA antes} - \text{cpm TCA después}}{\text{cpm TCA total}} \times \text{nmoles de dATP} \times 4 \times .33$$

### Electroforesis en geles alcalinos de agarosa:

El presente método fue utilizado para analizar los productos obtenidos durante la síntesis de los DNA's complementarios y fue tomado de Maniatis y cols. (33).

#### Reactivos y soluciones:

- 1) Amortiguador de gel 10 X (NaCl 0.3 M y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  20 mM pH 7.5).
- 2) Amortiguador alcalino de electroforesis 10 X (NaOH 0.3 M y EDTA 20 mM).
- 3) Amortiguador de muestra 2 X (NaOH 20 mM, glicerol 20% y azul de bromofenol 0.02%).
- 4) Acido tricloroacético al 7%.

#### Procedimiento:

- 1) Se preparó un gel de agarosa al 1.5% con amortiguador de gel 1 X y se vació en un molde horizontal para electroforesis. Se montó el gel sobre una cámara y posteriormente se cubrió con amortiguador alcalino de electroforesis 1 X a una altura no mayor de 3 mm. Se permitió un lapso de 30 min con el propósito de que difundiera el álcali hacia el interior del gel.
- 2) Alícuotas de las reacciones de síntesis de la primera y segunda cadena fueron mezcladas con un volumen de amortiguador de muestra 2 X.
- 3) Se aplicaron las muestras y se llevó a cabo la electroforesis a un voltaje de 7.5 V/cm hasta que el colorante migró a una distancia de 8 cm. Al término de la electroforesis el gel fue sumergido por 30 min en ácido tricloroacético al 7%.
- 4) Finalmente el gel fue depositado sobre varias piezas de papel Whatman 3 MM, se cubrió la parte superior con plástico adherible y se secó en un secador de geles a 80°C por 1 h. Posteriormente se retiró la pieza de plástico y el gel fue



colocado dentro de un cartucho para exposición radiactiva conteniendo una película ultrasensible. Se permitió la exposición por 48 h a temperatura ambiente, se reveló el autorradiograma y se interpretaron los resultados.

### La estrategia de clonación. Digestión enzimática de los DNA's complementarios con Aat II y Xma I:

Frecuentemente la selección de una clona bacteriana que porta una determinada secuencia de DNA recombinante es el paso más difícil durante un proceso de clonación. En nuestro caso hemos diseñado una estrategia para favorecer, en forma casi exclusiva, la inserción del DNAC de hGH en un vector de clonación. Dicha exclusividad fue vislumbrada cuando analizamos, ayudados por programas computacionales, la secuencia nucleotídica del DNAC de hGH. Nos percatamos de que la información que codifica para la hormona madura era flanqueada por sitios únicos para dos enzimas de restricción: Aat II y Xma I, las cuales reconocen secuencias nucleotídicas que no son muy repetitivas en el genoma humano (27).

Basándonos en estos hallazgos, decidimos someter la población de los DNA's complementarios a la acción de dichas enzimas de restricción, suponiendo que solo una pequeña fracción de ellos serían cortados con esas enzimas. Los fragmentos generados durante la digestión enzimática, mas no aquellos DNA's que quedarán intactos o que contuvieran uno o varios sitios para una misma enzima, serían capaces de integrarse fácilmente en un vector de clonación que hubiese sido digerido con las mismas enzimas de restricción. De ocurrir esto, esperábamos que por complementariedad de pares de bases se formarían las moléculas recombinantes, de las cuales una gran proporción debería contener secuencias codificantes para hGH. Fue así como procedimos a digerir los DNA's complementarios con dichas enzimas de restricción de la siguiente manera:

- 1) En un tubo de microcentrífuga se colocaron 200 ng de DNA's complementarios, los cuales fueron digeridos con Xma I de acuerdo a las condiciones especificadas por el proveedor (New England Biolabs). Después de 5 h de incubación a 37°C, los DNA's fueron precipitados de manera habitual con etanol y acetato de amonio. Se colocó la mezcla a -20°C.
- 2) Los DNA's fueron colectados por centrifugación a 15,000 rpm por 10 min. Se lavó la pastilla con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 10 µl de agua ultrapura estéril.
- 3) Los DNA's complementarios fueron digeridos nuevamente pero ahora con la enzima Aat II. Después de 5 h a 37°C se repitieron los mismos procedimientos de los incisos 2 y 3.

Finalmente los DNA's fueron colocados a 4°C donde fueron almacenados hasta su uso posterior.

NOTA: Puesto que la solución de DNA's complementarios es una mezcla muy heterogénea de diversas secuencias génicas, se utilizó un exceso de 10 veces la concentración de enzima de restricción requerida para digestiones convencionales (comunicación personal, Hugo Barrera Saldaña).

### Selección y preparación del vehículo de clonación:

Como se mencionó en la sección anterior una vez que los DNA's complementarios hubiesen sido digeridos con Aat II y Xma I, estos deberían de ser integrados en un vector de clonación que hubiese sido digerido también con las mismas enzimas.

Para este propósito seleccionamos el plásmido pUC19 (37), el cual tiene un sitio único para la enzima de restricción Aat II localizado en la posición 2,617 y otro sitio único para la enzima Xma I localizado en la región de sitios múltiples de clonación exactamente sobre la posición 412. Para la preparación de dicho vector realizamos lo siguiente:

- 1) 5  $\mu$ g del plásmido pUC19 fueron digeridos con Aat II en un volumen de 50  $\mu$ l de acuerdo a las instrucciones especificadas por el proveedor. Después de 2 h a 37°C se precipitó el DNA mediante la adición de etanol y acetato de amonio. Se colocó la mezcla a -20°C por 30 min.
- 2) Se colectó el DNA digerido mediante centrifugación a 15,000 rpm por 15 min, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 10  $\mu$ l de agua ultrapura estéril.
- 3) Se realizó la segunda digestión enzimática con Xma I a 37°C por 2 h. Después de este lapso se tomó una alícuota de 200 ng y se hizo una electroforesis analítica en un gel de agarosa al 1% (28) para verificar la doble digestión. Posteriormente al resto de la mezcla de reacción se le agregó una quinta parte de jugo azul 6 X (glicerol al 30%, xilencianol al 25% y azul de bromofenol al 0.25%) y se sometió a una electroforesis preparativa tal y como se menciona en la siguiente sección.

### Purificación del vector de clonación a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión:

El presente método, tomado de Maniatis y cols. (33), fue utilizado para recuperar el vector de clonación después de haber sometido los productos de la digestión anterior a una electroforesis preparativa en un gel de agarosa de bajo punto de fusión.

**Reactivos y soluciones:**

- a) Agarosa de bajo punto de fusión (Sea Plaque, FMC).
- b) TAE 1 X (Tris-acetato 0.04 M y EDTA 0.002 M).
- c) Bromuro de etidio a 10mg/ml.
- d) Cloruro de sodio 1 M.
- e) Fenol saturado con Tris 0.1 M pH 8.
- f) Etanol absoluto y etanol al 70% fríos.

**Procedimiento:****Electroforesis preparativa.**

- 1) Se prepararon 50 ml de una solución de agarosa al 1% en TAE 1 X y se calentó a ebullición. Se dejó enfriar hasta 50°C, se agregaron 2.5 µl de bromuro de etidio (10mg/ml), se mezcló y se vertió la solución en un molde horizontal para electroforesis. Se dejó solidificar por 2 h.
- 2) Se montó el gel en la cámara de electroforesis y se cubrió con TAE 1 X. Se aplicaron los productos de la digestión del plásmido pUC19 con Aat II y Xma I (aproximadamente 5 µg) después de haber tomado una alícuota de 200 ng para analizar posteriormente la recuperación del fragmento de nuestro interés. Se aplicaron también 200 ng del plásmido pBR322 digerido con Rsa I, el cual fue utilizado como marcador de peso molecular.
- 3) Se realizó la electroforesis a 50 volts hasta que el azul de bromofenol migró a 3/4 partes de la longitud del gel (10 cm). En un cuarto oscuro y con la ayuda de una lámpara de luz UV de onda larga, se localizó la banda de 2,205 pb correspondiente al vector de clonación. Dicha banda fue cortada con una hoja de bisturí y se colocó en un tubo de microcentrífuga.

**Recuperación del DNA.**

- 4) El tubo que contiene el fragmento de agarosa de bajo punto de fusión, fue colocado a 70°C por 5 min. Se agregó una décima parte de NaCl 1 M para evitar la separación de las cadenas de DNA y se colocó nuevamente a 70°C hasta que la agarosa se fundió completamente.
- 5) Se agregaron 3/4 partes de fenol y se mezcló fuertemente en un vortex por 2 min. Se centrifugó a 15,000 rpm por 5 min. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo de microcentrífuga. Nuevamente se agregaron 3/4 partes de fenol y se mezcló de igual manera en el vortex.
- 6) Se centrifugó a 15,000 rpm por 5 min. se recuperó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo de microcentrífuga. Se



agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se colbó a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 1 h.

- 7) Se centrifugó a la misma velocidad por 15 min. Se lavó la pastilla con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en  $20\ \mu\text{l}$  de agua ultrapura. Finalmente se verificó la recuperación por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

### Clonación molecular de los DNA's complementarios:

Una vez que se obtuvo el vector de clonación, éste fue utilizado para la inserción de los DNA's complementarios que hubiesen sido digeridos con Aat II y Xma I. Lo anterior se llevó a cabo mediante el empleo de DNA ligasa de T4 (38) de la siguiente manera:

- 1) En tubos de microcentrífuga se hicieron las siguientes mezclas de reacción:

|  | <u>PROBLEMA</u>                    | <u>CONTROL</u>                     |
|--|------------------------------------|------------------------------------|
| DNA del vector (pUC19) .....               | 6 $\mu\text{l}$ (100 ng)           | 6 $\mu\text{l}$ (100 ng)           |
| DNA's complementarios .....                | 2 $\mu\text{l}$ (9 ng)             | -----                              |
| DNA ligasa de T4 (1U/ $\mu\text{l}$ )..... | 1 $\mu\text{l}$                    | 1 $\mu\text{l}$                    |
| Amortiguador de ligasa 10 X...             | 2 $\mu\text{l}$                    | 2 $\mu\text{l}$                    |
| Agua ultrapura .....                       | 9 $\mu\text{l}$                    | 11 $\mu\text{l}$                   |
|  | <u>20 <math>\mu\text{l}</math></u> | <u>20 <math>\mu\text{l}</math></u> |

NOTA: El vector tiene un tamaño de 2,205 pb y el DNAC de hGH un tamaño de 640 pb lo cual quiere decir que el vector es 3.4 veces mas grande que el inserto. Lo anterior indica que si se desea una relación molar de 1:1, debemos mezclar, por decir algo, 10 ng del vector y 3 ng del inserto. En nuestro caso se eligió una relación de vector a inserto de 10:1 para asegurar la inserción del DNAC de hGH (Comunicación personal, Hugo Barrera Saldaña). Ahora bien, puesto que esta secuencia representa probablemente el 30% de todos los DNA's complementarios, la cantidad del inserto se multiplicó por un factor de 3, por lo que finalmente mezclamos 9 ng de los DNAC's y 100 ng del vector en nuestra reacción de ligación.

- 2) Se incubaron ambas mezclas a  $15^{\circ}\text{C}$  por 12 h. Se tomó una quinta parte de cada una de ellas y se analizaron los productos de ligación por electroforesis en un gel de agarosa. Al resto de la solución se le agregó medio volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2.2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se colocó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.
- 3) Se precipitaron los DNA's por centrifugación a 15,000 rpm por 15 min, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en  $20\ \mu\text{l}$  de agua ultrapura. Esta solución se colocó a  $4^{\circ}\text{C}$  donde fue almacenada hasta su uso posterior.

### **Hibridación tipo "Southern":**

El presente método (39) fue utilizado para analizar la integración del DNAC de hGH en el vector de clonación.

#### **Reactivos y soluciones:**

- a) TAE 1 X (Tris-acetatos 0.04 M y EDTA 0.002 M).
- b) Bromuro de etidio (0.5 µg/µl).
- c) Solución desnaturalizante (NaOH 1 M y NaCl 3 M).
- d) Solución neutralizante (NaCl 3 M y Tris-HCl 1 M pH 7.5).
- e) SSC 20 X (NaCl 17.53% y Citrato de sodio 8.82% pH 7).
- f) SDS al 10%.
- g) Solución de prehibridación (Formamida desionizada 50%, SSC 5 X, Solución Denhardt 5 X, Fosfato de sodio 50 mM pH 8, SDS 0.1% y DNA sonificado de esperma de salmón 250 µg/ml).
- h) Solución de hibridación (Formamida desionizada 50%, SSC 5X, Solución Denhardt 5 X, Fosfato de sodio 50 mM pH 8, SDS 0.1%, Dextrán sulfato 10% y  $1 \times 10^6$  cpm del DNAC de hPL marcado con  $^{32}$ P).

#### **Procedimiento:**

##### **Preparación del gel.**

- 1) Se preparó un gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X y de izquierda a derecha se aplicaron las siguientes muestras: DNA 1 Kb Ladder como marcador de peso molecular, DNA's complementarios sin digerir, DNA's complementarios digeridos con Aat II y Xma I, el fragmento de pUC19 Aat II-Xma I utilizado como vector y el DNAC de hPL como control positivo de la hibridización.
- 2) Después de realizar la electroforesis se tiñó el gel en 200 ml de bromuro de etidio por 15 min y se destiñó en agua destilada por otros 15 min. Se tomó una fotografía.
- 3) El gel fue sumergido en solución desnaturalizante por 30 min. Se enjuagó en agua destilada y se introdujo en solución neutralizante por otros 30 min. Posteriormente fue colocado en SSC 20 X por 10 min.

##### **Transferencia a papel filtro de nitrocelulosa.**

- 4) En una cuba hidroneumática se vertió SSC 20 X y se introdujo un bloque de material inerte que sobresalía de la superficie del líquido. Sobre este material se diseñó un puente de humedad con una tira de papel Whatman 3 MM previamente humedecida en SSC 20 X y se eliminaron las burbujas de aire que se formaron entre el papel y el bloque utilizando una pipeta como rodillo.
- 5) Se colocó el gel sobre el papel filtro evitando la formación de burbujas. Sobre el gel se colocó una membrana de

nitrocelulosa previamente humedecida en agua por 10 min y en SSC 20 X por 15 min. La membrana era unos pocos milímetros mas grande que el gel. Se eliminaron las burbujas con una pipeta y sobre dicha membrana se depositaron 3 capas de papel Whatman 3 MM del mismo tamaño y después una cantidad abundante de toallas absorbentes. Se colocó un objeto pesado (0.5 Kg) sobre las toallas y se permitió la transferencia por 16 h.

- 6) Se desmontó el aparato, se recuperó la membrana y se dejó secar al aire entre dos hojas de papel Whatman. Se horneó la membrana durante 2 h a 80°C en una estufa con vacío mientras que el gel fue teñido con bromuro de etidio y analizado con luz UV para verificar la transferencia.

#### **Hibridación y autorradiografía.**

- 7) Se colocó la membrana en una bolsa de plástico, se agregaron 5 ml de solución de prehibridación y se selló la bolsa con un sellador térmico. Se prehibridó por 5 h a 42°C en un baño de agua con agitación lenta.
- 8) Se descartó la solución de prehibridación y en su lugar se agregaron 2 ml de la solución de hibridación con la sonda radiactiva previamente calentada a ebullición por 5 min y enfriada en hielo por otros 5 min. Se eliminaron las burbujas y se selló nuevamente la bolsa. Se hibridó toda la noche a 42°C con agitación lenta.
- 9) Se desechó cuidadosamente la solución de hibridación. Se recuperó la membrana y se sometió a 3 lavados de 15 min en 400 ml de SSC 2 X y SDS 0.1%. Los dos primeros a temperatura ambiente y el último a 50°C.
- 10) Posteriormente se hicieron 2 lavados en 400 ml de SSC 0.1 X y SDS 0.1% a 50°C por 45 min agitación suave.
- 11) Finalmente se enjuagó la membrana en 200 ml de SSC 0.1 X por 10 min y se dejó secar al aire entre dos hojas de papel Whatman 3 MM. Se envolvió la membrana con plástico adherible y se expuso a una película ultrasensible de rayos X durante toda la noche a -70°C. Se reveló la película al día siguiente y se interpretaron los resultados.

#### **Transformación de bacterias con DNA plasmídico:**

El presente método (40) fue utilizado para propagar en Escherichia coli los productos generados durante la ligación de los DNA's complementarios con el vector de clonación pUC19.

#### **Reactivos y soluciones:**

- a) Medio LB (Tryptona 1%, Extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%, pH

7.5).

- b) Cloruro de calcio 0.1 M estéril y enfriado a 4°C.
- c) Placas de agar LB-Ampicilina (Tryptona 1%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, Agar 1.5% y Ampicilina 100 µg/ml).

#### **Procedimiento:**

#### **Preparación de bacterias Ca<sup>++</sup> competentes (41).**

- 1) A partir de un cultivo puro de Escherichia coli cepa RR1 se inocularon 20 ml de caldo LB. Se permitió el crecimiento durante toda la noche a 37°C con agitación vigorosa.
- 2) Se tomó 1 ml de este cultivo y se inoculó un matraz con 50 ml de caldo LB. Se incubó a 37°C con agitación constante hasta que alcanzó una D.O. de 0.350 a 550 nm.
- 3) Se colocó el matraz en hielo por 10 min. Se cosecharon las células en un tubo Falcon de 50 ml mediante centrifugación a 3,000 xg por 5 min a 4°C.
- 4) Se desechó el sobrenadante, se eliminó el exceso de líquido y se resuspendió la pastilla en 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M frío con la ayuda de un vortex. Se colocó el tubo en hielo por 20 min y se repitió la centrifugación. Finalmente se resuspendió la pastilla bacteriana en 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M frío y se mantuvo en hielo hasta su uso posterior.

#### **Introducción de los plásmidos.**

- 5) Se transfirieron 100 µl de bacterias Ca<sup>++</sup> competentes a cada uno de 4 tubos de microcentrifuga debidamente rotulados y respectivamente se agregaron los siguientes DNA's:
  - 5 µl (20 ng) de la ligación del vector + DNAC's.
  - 5 µl (20 ng) del vector sin insertos.
  - 10 µl (1 ng) de pUC19 superenrollado (control positivo).
  - 10 µl de agua destilada estéril (control negativo).
- 6) Se colocaron los tubos en hielo por 1 h y posteriormente se dió un choque térmico a 42°C por 45 s. Se regresaron los tubos al hielo por otros 10 min. Se agregó a cada tubo, cerca del mechero, 200 µl de caldo LB estéril (sin ampicilina) y se incubaron a 37°C por 20 min.
- 7) Finalmente se transfirió el contenido de cada tubo a su respectiva placa de agar LB-ampicilina y se extendieron con una asa de vidrio. Se colocaron las placas a 37°C durante toda la noche.



### Minipreparaciones de plásmidos por el método de lisis alcalina:

El presente protocolo está basado en el método de Morelle descrito en 1989 (42) y fue utilizado para recuperar los plásmidos de las clonas recombinantes.

#### Reactivos y soluciones:

- a) Caldo LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml).
- b) Solución de lisis (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM y lisozima 4 mg/ml).
- c) Solución alcalina (NaOH 0.2 N y SDS 1%).
- d) Acetato de amonio 7.5 M.
- e) Isopropanol y etanol al 70%.
- f) TE (Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM).
- g) RNasa (1 mg/ml).

#### Procedimiento:

- 1) Cada una de las clonas bacterianas provenientes de la transformación fue cultivada en 4 ml de caldo LB-Ampicilina. Se permitió el crecimiento por 12 h a 37°C con agitación vigorosa.
- 2) En tubos de microcentrifuga se cosecharon 3 ml de cultivo bacteriano mediante dos centrifugaciones sucesivas a 5,000 rpm por 2 min y posteriormente las pastillas bacterianas se resuspendieron en 200 µl de solución de lisis.
- 3) Después de 5 min a temperatura ambiente se agregaron 400 µl de solución alcalina recientemente preparada y se mezcló fuertemente al invertir los tubos 3 a 6 veces.
- 4) Después de 5 min en hielo se agregaron 300 µl de acetato de amonio 7.5 M y se mezcló suavemente el contenido por 10 s. Se colocó nuevamente en hielo por 10 min para permitir la precipitación de proteínas, RNA de alto peso molecular y DNA cromosómico.
- 5) Se centrifugó a 10,000 rpm por 3 min y se transfirieron los sobrenadantes a otros tubos de microcentrifuga. Se agregaron 500 µl de isopropanol, se mezcló y se dejaron reposar los tubos por 10 min a temperatura ambiente.
- 6) Se centrifugó a 15,000 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se lavaron las pastillas con etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente por 3 min, se desechó el sobrenadante y se secaron las pastillas en el evaporador centrífugo al vacío (SAVANT).

- 7) Se disolvieron las pastillas en 100  $\mu$ l de TE y se les agregó 1  $\mu$ l de la solución de RNAsa (1 mg/ml). Se colocaron los tubos a 37°C por 15 min y por último se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ l para analizar el perfil electroforético de los plásmidos obtenidos.

#### Hibridación de DNA en gota seca (31):

El siguiente protocolo fue realizado para verificar la presencia de plásmidos portadores del DNAC de hGH en nuestras clonas recombinantes. Para este propósito se utilizó el dispositivo VACUSYSTEM (BIORAD) y se manejó de acuerdo a las instrucciones especificadas por el proveedor.

#### Reactivos y soluciones:

- a) NaOH 0.4N.
- b) SSC 2 X.
- c) Solución de prehibridación (ver hibridación tipo Southern)
- d) Solución de hibridación (ver hibridación tipo Southern).

#### Procedimiento:

- 1) Se recortó una pieza de membrana de nylon (Zetabind) a un tamaño de 7 x 10 cm y se introdujo en agua estéril por 15 min. Se colocó la membrana sobre la placa inferior del dispositivo de BIORAD y sobre ella se colocó la parte superior. Se ensamblaron fuertemente ambas partes con la ayuda de unas pinzas especiales para este propósito.

NOTA: El dispositivo consta de dos placas de acrílico; una inferior que contiene un artefacto para hacer succión mediante vacío y una superior que presenta 96 agujeros similares a los de una placa de microtitulación.

- 2) Se seleccionaron diversos agujeros de acuerdo a la cantidad de muestras disponibles y con cinta adhesiva se cubrieron aquellos agujeros que no se utilizarían. Se aplicaron 100  $\mu$ l de agua ultrapura en cada orificio seleccionado y se abrió el vacío para succionar el líquido.
- 3) En un orden adecuado se aplicaron 200  $\mu$ l (100 ng de DNA en agua) de cada una de las muestras previamente calentadas a ebullición por 3 min y enfriadas en hielo por 5 min. En el mismo volumen se aplicaron 10 ng de pHL815 y 10 ng de pUC19 como testigos positivo y negativo respectivamente. Se abrió nuevamente el vacío.
- 4) Se agregaron 500  $\mu$ l de NaOH 0.4 N para desnaturalizar el DNA y adherirlo a la matriz de nylon. Se aplicó vacío por última vez. Se desmontó el dispositivo, se recuperó la membrana y se



colocó en 500 ml de SSC 2 X por 15 min. Se dejó secar al aire entre dos hojas de papel Whatman 3 MM.

- 5) Finalmente se realizó la hibridación y autorradiografía tal y como se mencionó en el protocolo de hibridación tipo Southern (incisos 7 a 11).

### Crecimiento de plásmidos a mediana escala:

El presente método fue utilizado para obtener cantidades relativamente abundantes de los plásmidos de nuestro interés con el propósito de poder analizarlos minuciosamente mediante disecciones enzimáticas. Dicho método fue descrito por Sadhu y Gedamu en 1988 (43).

Reactivos y soluciones:

- a) Caldo LB-Ampicilina (100 µg/ml).
- b) Cloranfenicol.
- c) Solución STET (Sacarosa 8%, Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 50 mM y Tritón X-100 5%).
- d) Lisozima a 10 mg/ml.
- e) RNAsa A a 10 mg/ml.
- f) Fenol saturado con Tris 0.1 M pH 8.
- g) Solución Sevag.
- h) Acetato de amonio 6 M.
- i) Etanol absoluto y etanol al 70% fríos.
- j) PEG-6,000 (30% de polietilenglicol en NaCl 1.8 M).
- k) Acetato de sodio 3 M pH 5.2.

### Procedimiento:

- 1) Cada una de las bacterias portadoras de plásmidos de nuestro interés, fue cultivada en 2 ml de caldo LB-Ampicilina por 12 h a 37°C. Posteriormente se tomaron 200 µl de este cultivo y se inocularon 25 ml de caldo LB-Ampicilina. Se permitió el crecimiento por 3 h. Posteriormente 1 ml de este cultivo fue transferido a 100 ml de LB-Ampicilina y cuando la D.O. a 600 nm alcanzó un valor de 0.5, se agregó cloranfenicol a una concentración final de 250 µg/ml. Se prolongó la incubación por 16 h con agitación vigorosa.
- 2) Las células fueron colectadas por centrifugación a 5,000 xg por 10 min y se resuspendieron en 7 ml de solución STET. En seguida la suspensión celular fue transferida a un tubo de ensaye (vidrio) de 15 ml y se agregaron 800 µl de una solución de lisozima a 10 mg/ml. Las soluciones fueron mezcladas por agitación, se colocó el tubo a 0°C por 10 min y posteriormente en un baño de agua hirviendo por 1 min.
- 3) El lisado celular fue transferido a un tubo de policarbonato de pared gruesa y el DNA cromosómico fue eliminado por

ultracentrifugación a 45,000 rpm por 30 min a 4°C.

- 4) Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo de polipropileno de 15 ml (Falcon). Se agregó RNasa A a una concentración final de 20 µg/ml y se incubó a 37°C por 30 min. Se realizaron varias extracciones orgánicas con fenol y sevag hasta la desaparición de los productos orgánicos en la interfase. A la fase acuosa recuperada se le agregó 0.1 volumen de acetato de amonio 6 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se colocó el tubo a -20°C por 30 min.
- 5) Los ácidos nucleicos fueron colectados por centrifugación a 7,000 rpm (Beckman TJ-6) por 10 min, se lavó la pastilla con etanol al 70% y se resuspendió en 2 ml de agua ultrapura. Se agregaron 800 µl de PEG-6,000, se mezcló vigorosamente y se repartió la solución en dos tubos de microcentrífuga los cuales fueron colocados a 4°C por 12 h.
- 6) El DNA fue colectado por centrifugación a 15,000rpm por 10 min, se resuspendió cada pastilla en 200 µl de agua y posteriormente se juntaron ambas soluciones en un solo tubo. Se agregó acetato de sodio a una concentración final de 100 mM y en seguida 2 volúmenes de etanol absoluto frío.
- 7) Después de 5 min a temperatura ambiente el DNA fue centrifugado a 15,000 rpm por 10 min, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 100 µl de agua ultrapura. Finalmente se cuantificó la obtención del DNA plasmídico mediante espectrofotometría a 260 nm y se verificó su calidad por electroforesis en geles de agarosa.

#### Caracterización enzimática de los plásmidos portadores del DNAc de hGH:

Una vez que los plásmidos que portaban secuencias codificantes para hGH fueron crecidos a mediana escala, se sometieron a tres digestiones enzimáticas con enzimas de restricción que cortaban tanto en el vector como en el inserto. Se seleccionaron las enzimas Pvu II, Ava II y Rsa I y se realizaron las digestiones de acuerdo a las condiciones especificadas por el proveedor. El patrón de restricción esperado para cada una de las digestiones, de acuerdo a la secuencia ya publicada (22), era el siguiente:

- 3 fragmentos Pvu II de 2,113, 497 y 227 pb
- 3 fragmentos Ava II de 1,638, 963 y 222 pb
- 2 fragmentos Rsa I de 2,018 y 812 pb

Al finalizar las digestiones se verificaron los productos por electroforesis en un gel de agarosa al 2% de acuerdo a Maniatis y cols. (33).

Por otra parte, cada uno de los plásmidos fue sometido a una doble digestión con las enzimas de restricción Aat II y Xma I con el propósito de analizar el tamaño de los insertos liberados. Si dichos plásmidos portaban el DNAC de hGH desde el sitio Aat II hasta el sitio Xma I, era de esperarse la liberación de un fragmento de 640 pb. Los productos de esta digestión fueron analizados, con mayor resolución, por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 4%.

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida:**

Este método es ampliamente utilizado para resolver pequeños fragmentos de DNA que varían en un rango de 50 a 2,000 pb. En nuestro caso, fue utilizado para determinar con exactitud el tamaño de los insertos liberados al digerir los plásmidos recombinantes con Aat II y Xma I. Se preparó un gel de poliacrilamida al 4% de acuerdo a Maniatis y cols. (33).

#### **Reactivos y soluciones:**

- a) TAE 50 X (Tris-acetato 2 M pH 8 y EDTA 100 mM).
- b) Solución de acrilamida-bisacrilamida (30%-0.8%).
- c) Persulfato de amonio al 50%.
- d) TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina).
- e) Agua ultrapura (Milli Q).
- f) Bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

#### **Procedimiento:**

- 1) Entre dos placas de vidrio de 15x17 cm se colocaron 3 separadores (BIORAD) de 1.5 mm de espesor en las posiciones laterales y en la parte inferior de ambas placas respectivamente. Para facilitar el desprendimiento del gel al final de la electroforesis, se aplicó una ligera capa de vaselina en cada separador. Se ensamblaron fuertemente las placas con pinzas especiales para este propósito y se colocaron en posición vertical sobre la mesa de trabajo.
- 2) En un vaso de precipitados se preparó la siguiente mezcla:

|   |         |
|---|---------|
| -- TAE 50 X .....                             | 700 µl  |
| -- Agua ultrapura .....                       | 29.5 ml |
| -- Acrilamida -bisacrilamida (30%-0.8%) ..... | 4.66 ml |
| -- Persulfato de amonio al 50% .....          | 87.5 µl |
| -- TEMED .....                                | 28.0 ml |

Se mezcló el contenido por rotación manual y se virió rápidamente en el interior de las placas de vidrio. Se colocó inmediatamente un peine (BIORAD) de tamaño apropiado y se dejó solidificar el gel por 30 min.

- 3) Se retiró el peine y se montaron las placas en una cámara vertical para electroforesis. Se utilizó TAE 1X como amortiguador de corrida. Se aplicaron las muestras con una microjeringa de 50  $\mu$ l (Hamilton 701 N) y se realizó la electroforesis a 80 volts por 4 h.
- 4) Se desmontaron las placas y cuidadosamente se virvió el gel en 200 ml de bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml). Se permitió la tinción por 10 min y posteriormente se enjuagó en agua destilada por 5 min. Finalmente se colocó el gel sobre un transiluminador (UVP, Inc.) y se interpretaron los resultados.

#### **Electroelución de DNA a partir de geles de poliacrilamida:**

La presente sección describe un eficiente método de electroseparación de DNA a partir de un gel de poliacrilamida. Fue publicado por Bogel y cols. en 1987 (44) y su aplicación requiere un dispositivo, ya comercializado, conocido como Elutrap (Schleicher & Schuell). Básicamente el Elutrap es un cilindro hueco de acrílico en el cual se coloca una serie de membranas selectivas a los ácidos nucleicos. Dicho dispositivo se introduce en una cámara de electroforesis y a través de él se genera un campo eléctrico que permite la elución del DNA y su posterior recuperación en una trampa formada por dos membranas especiales.

Este método fue utilizado para recuperar el DNAC de hGH después de digerir los plásmidos que lo portan con las enzimas de restricción Aat II y Xma I.

#### **Reactivos y soluciones:**

- a) TAE 1 X (Tris-acetato 0.04 M pH 8.2 y EDTA 0.002M).
- b) Fenol saturado con Tris 0.1 M pH 8.
- c) Sevag.
- d) Acetato de amonio 7.5 M.
- e) Etanol absoluto y etanol al 70% fríos.

#### **Procedimiento:**

- 1) En las ranuras de ambos extremos del Elutrap se colocó una membrana BT1. En el extremo positivo (+) del aparato se colocó además una membrana BT2 a una distancia de 1 cm hacia el interior de la respectiva membrana BT1. Las membranas se acoplaron en posición vertical y se sujetaron fuertemente con una cuña especialmente diseñada para este propósito.
- 2) Se introdujo el dispositivo, con la polaridad adecuada, en una cámara horizontal para electroforesis que contenía TAE 1 X como amortiguador de corrida. Se agregaron 5 ml de TAE 1 X al cilindro del Elutrap y 300  $\mu$ l a la trampa formada por las membranas BT2 y BT1 en el extremo positivo. En la parte



central del cilindro se depositó el fragmento de acrilamida que contenía la banda de interés y se permitió la electroelución por 2 h a 150 volts.

- 3) Al final de la corrida se invirtió la polaridad de los cables en la cámara de electroforesis y se aplicó el mismo voltaje por 45 s. La solución que contiene el DNA fue recuperada de la trampa y se transfirió a un tubo de microcentrífuga. Se hicieron dos extracciones orgánicas con fenol y una con sevag. Se agregó medio volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se colocó a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 1 h.
- 4) El DNA fue colectado por centrifugación a 15,000 rpm por 15 min. Se lavó la pastilla con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 20  $\mu\text{l}$  de agua ultrapura. Se tomó una alícuota de 1  $\mu\text{l}$  y se analizó el perfil electroforético del DNA recuperado.

#### Caracterización del DNAC de hGH con enzimas de restricción diagnósticas (45):

Se recuperó el DNAC de hGH por electroelución y posteriormente fue sometido a diversas digestiones con enzimas de restricción diagnósticas para realizar una caracterización enzimática más fina. Para ello se seleccionaron las enzimas Rsa I, Ava II, Hinf I y Pst I y se utilizaron de acuerdo a las condiciones especificadas por el proveedor.

El patrón de restricción esperado para cada una de esas enzimas era el siguiente :

- 2 fragmentos Rsa I de 366 y 274 pb
- 2 fragmentos Ava II de 405 y 235 pb
- 2 fragmentos Hinf I de 414 y 226 pb
- 2 fragmentos Pst I de 447 y 193 pb

Después de 2 h de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  se analizaron los productos de las digestiones por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 4% y se interpretaron los resultados.

#### Subclonación en fagos M13 (46):

El presente método fue utilizado para transferir una porción del DNAC de hGH al vector fágico M13mpl8 como previo requisito a la determinación de la secuencia nucleotídica. Para este propósito es importante destacar que, debido a la capacidad de resolución de los geles de secuenciamiento, el fragmento a subclonar debe tener un tamaño entre 250 y 600 pb y que las enzimas de restricción utilizadas para generar ese fragmento deben ser compatibles con la región de sitios múltiples de clonación (47).



El DNAC de nuestro interés tiene una longitud de 640 pb partiendo desde el sitio Aat II hasta el sitio Xma I. Dichos sitios corresponden respectivamente a las posiciones 79 y 719 del DNAC de hGH (22). De acuerdo a las limitantes mencionadas anteriormente, seleccionamos un sitio de restricción en el interior de nuestra secuencia que fuera compatible con el vector fágico y que a la vez produjera un fragmento génico aceptable. Se eligió un sitio de restricción Pst I localizado sobre la posición 193 del DNAC de hGH, de manera que si se hacía una doble digestión con las enzimas Pst I y Sma I (reconoce el mismo sitio que Xma I en la posición 719 y es compatible con el vector) se produciría un fragmento de 447 pb llenándose así los requisitos estipulados.

### Procedimiento:

- 1) 2  $\mu\text{g}$  del DNAC de hGH fueron digeridos con las enzimas de restricción Pst I y Sma I de acuerdo a las condiciones especificadas por el proveedor.
- 2) Al término de la doble digestión se realizó una electroforesis preparativa en un gel de poliacrilamida al 4% y se recuperó el fragmento de 447 pb por el método de electroelución. Se ajustó la concentración del DNA a 100 ng/ $\mu\text{l}$ .
- 3) 1  $\mu\text{g}$  del fago M13mp18 (7,250 pb) fue digerido también con las mismas enzimas de restricción. El DNA fue precipitado de manera convencional con etanol y acetato de amonio y se resuspendió en agua ultrapura de tal manera que la concentración final fuese de 100 ng/ $\mu\text{l}$ .
- 4) En tubos de microcentrifuga se realizaron las siguientes mezclas de reacción: a) vector e inserto sin ligasa, b) vector e inserto con ligasa y c) vector solo con ligasa.

|  | a( $\mu\text{l}$ ) | b( $\mu\text{l}$ ) | c( $\mu\text{l}$ ) |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|
| Vector (M13mp18, 100 ng/ $\mu\text{l}$ ) | 2                  | 2                  | 2                  |
| Inserto (447 pb, 100 ng/ $\mu\text{l}$ ) | 3.7                | 3.7                | -----              |
| Amotiguador de ligación 10 X             | 2                  | 2                  | 2                  |
| DNA ligasa de T4                         | -----              | 1                  | 1                  |
| Agua ultrapura                           | <u>12.3</u>        | <u>12.3</u>        | <u>15</u>          |
|  | 20.0               | 20.0               | 20.0               |

NOTA: en a y b se tomó una relación de 3:1 (inserto a vector).

- 5) Se colocaron los tubos a 15°C por 12 h. Posteriormente se tomó una tercera parte de cada reacción y se analizaron los productos de ligación por electroforesis en geles de agarosa al 1%. La solución remanente se trató con etanol y acetato de amonio, se recuperó el DNA por centrifugación y finalmente se resuspendió en 20  $\mu\text{l}$  de agua ultrapura. Se almacenó a 4°C hasta su uso posterior.

### Transformación de bacterias con DNA fágico (48):

El presente método fue utilizado para propagar en bacterias aquellos fagos recombinantes que hubiesen adquirido el inserto proveniente del DNAC de hGH.

#### Reactivos y soluciones:

- a) Caldo 2YT (NaCl al 0.5%, bactotripton a al 1.6% y extracto de levadura al 1%).
- b) Cloruro de calcio 50 mM almacenado en frío.
- c) IPTG 100 mM.
- d) X-Gal al 2% en dimetil formamida.
- e) Agar blando 2YT (agar al 0.6% en caldo 2YT).
- f) Placas de agar LB.

#### Procedimiento:

- 1) A partir de un cultivo puro de Escherichia coli cepa JM103 se inocularon 60 ml de caldo 2YT y se permitió el crecimiento hasta que el cultivo alcanzó una D.O. de 0.5 a 600 nm. Se tomaron 60 ml de ese cultivo y se cosecharon las células por centrifugación a 5,000 xg por 5 min. Los restantes 20 ml se colocaron en hielo y se conservaron como bacterias no competentes.
- 2) Se resuspendió la pastilla en 30 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM y se colocó en hielo por 40 min. Se centrifugó nuevamente a 5,000 xg por 5 min y la pastilla se resuspendió finalmente en 6 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Se tomaron alícuotas de 300  $\mu$ l y se transfirieron a tubos de microcentrífuga estériles y colocados en hielo.
- 3) Se tomaron 5 ml de cada mezcla del experimento de subclonación (vector e inserto sin ligasa, vector e inserto con ligasa y vector sin inserto con ligasa) y se agregaron respectivamente a 3 tubos de microcentrífuga que contenían las células competentes. Se dejaron reposar en hielo por 40 min.
- 4) Se dió un choque térmico a 42°C por 2 min y en seguida se regresaron los tubos al hielo por otros 2 min. Se transfirieron a temperatura ambiente y se agregaron 10  $\mu$ l de IPTG 100 mM, 50  $\mu$ l de X-Gal al 2% y 300  $\mu$ l de células no competentes (inciso 1).
- 5) Se agregó la mezcla anterior a 3 ml de agar blando 2YT fundido en baño María y equilibrado a 45°C, se mezcló suavemente en un vortex y se virvió sobre placas de LB extendiéndose mediante rotación manual. Finalmente cuando el agar blando se solidificó, se invirtieron las cajas y se colocaron a 37°C durante toda la noche.

### Preparación de templados de DNA de cadena sencilla (49):

La transformación de una cepa apropiada de *E. coli* con vectores M13 que contienen un determinado inserto, produce placas blancas después de permitir el crecimiento sobre un medio suplementado con X-Gal. Este reactivo es un sustrato incoloro para la enzima  $\beta$ -galactosidasa, la cual lo convierte a un color azul permitiendo la detección visual de la actividad enzimática. Dichos vectores están diseñados de tal manera que al interrumpir la región de sitios múltiples de clonación se pierde su actividad enzimática, con lo cual se facilita la identificación de los recombinantes por medio de un ensayo de placas blancas y azules.

Una vez que se detectan las placas blancas se requiere preparar a partir de ellas el DNAC monocatenario que será utilizado como molde para el secuenciamiento nucleotídico. Con este propósito se preparó el templado de cadena sencilla de aquellos recombinantes que contenían un inserto de 447 pb proveniente del DNAC de hGH.

#### Reactivos y soluciones:

- a) Caldo 2YT (NaCl al 0.5%, bactotripton a al 1.6% y extracto de levadura al 1%).
- b) Solución de precipitación (PEG-8,000 al 40% y Acetato de sodio 5 M pH 7).
- c) TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.6 y EDTA 1 mM).
- d) Fenol saturado con Tris-HCl 0.05 M pH 7.5.
- e) Cloroformo.
- f) Acetato de sodio 3M pH 5.2.
- g) Etanol absoluto y etanol al 90%.

#### Procedimiento:

- 1) A partir de un cultivo exponencial de *Escherichia coli* JM103, se hizo una dilución 1:100 en 1.5 ml de caldo 2YT y se infectó con una placa blanca obtenida durante la transformación. Se incubó a 37°C con agitación vigorosa durante 8 h. Se transfirió el cultivo a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min.
- 2) Cuidadosamente se transfirió el sobrenadante (contiene los fagos) a otro tubo y se agregó una novena parte de solución de precipitación. Se colocó a 4°C por 15 min y se colectaron los fagos por centrifugación a 15,000 rpm por 10 min. Se eliminó minuciosamente el sobrenadante y se secó el interior del tubo con tiras de papel filtro.
- 3) Se resuspendió la pastilla en 200  $\mu$ l de TE y se agregaron 200  $\mu$ l de fenol-cloroformo (3:1). Se mezcló en el vortex y se centrifugó a 10,000 rpm por 2 min para separar las fases. Se

recuperó la fase acuosa y se repitió la extracción con la mezcla de fenol-cloroformo. Se hizo una última extracción con 200  $\mu$ l de cloroformo.

- 4) A la fase acuosa final se le agregó una décima parte de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se colocó a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 30 min y posteriormente se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min. Se lavó la pastilla con etanol al 90% y se secó en el evaporador centrífugo al vacío.
- 5) Finalmente la pastilla de DNA fue resuspendida en 20  $\mu$ l de TE y se tomó una alícuota de 1  $\mu$ l para verificar su perfil electroforético (la presencia de una sola banda debe ser evidente después de tinción con bromuro de etidio). El resto de la solución se colocó a  $4^{\circ}\text{C}$  donde fue almacenada hasta su uso posterior. Generalmente esta solución contiene 0.1-1  $\mu\text{g}$  de DNA/ $\mu$ l.

#### Secuenciamiento de nucleótidos por el método de Sanger:

El método de Sanger (50), también conocido como método de terminación de la cadena, implica la síntesis *in vitro* de una cadena de DNA por una DNA polimerasa a partir de un templado de DNA de cadena sencilla.

La síntesis es iniciada a partir de un oligonucleótido iniciador que se aparea al templado y dicha reacción es interrumpida por la incorporación de un análogo de nucleótidos que impide la elongación de la cadena. Los análogos de nucleótidos son los 2',3'-dideoxinucleósidos 5' trifosfatos (ddNTP's). Al realizar mezclas de dNTP's y uno de los cuatro ddNTP's, la polimerización del DNA será interrumpida en una fracción de la población de las cadenas en cada sitio donde el ddNTP llegue a ser incorporado. Cuatro reacciones separadas, cada una con un diferente ddNTP, proporcionan la información necesaria acerca de la secuencia nucleotídica. Durante la reacción de síntesis se incluye también un nucleótido radiactivo de tal manera que las cadenas marcadas, de diferentes longitudes, pueden ser visualizadas por autorradiografía después de separarlas por electroforesis en un gel de alta resolución.

Para la determinación de la secuencia nucleotídica del inserto proveniente del DNAC de hGH se utilizó el conjunto de reactivos "SEQUENASE KIT" disponible comercialmente por la compañía United States Biochemicals (catálogo 70700).

#### Reactivos y soluciones:

- a)  $^{35}\text{S}$ - $\alpha$ -dATP (10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ).
- b) TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y EDTA 1 mM).
- c) TBE 10 X (Tris base 0.89 M, ácido bórico 0.89 M y EDTA 20 mM).



- d) Acrilamida, bisacrilamida y TEMED (grado electroforético).
- e) Urea.
- f) Persulfato de amonio al 10% (recientemente preparado).
- g) Solución de lavado de geles (Acido acético al 10% y metanol al 12%).

#### Componentes de conjunto "SEQUENASE":

- h) Secuenasa (DNA polimerasa del bacteriófago T7).
- i) Amortiguador de secuenciamiento 5 X.
- j) Oligonucleótido iniciador 0.5 pmol/ $\mu$ l.
- k) Ditiotreititol 0.1 M.
- l) Mezcla de marcaje 5 X (dGTP, dCTP y dTTP a 7.5  $\mu$ M cada uno).
- m) Mezclas de terminación para ddG, ddA, ddT y ddC respectivamente.
- n) Solución inactivadora (Formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0.05% y Xilencianol 0.05%).

#### Procedimiento:

##### Apareamiento del templado y el iniciador.

- 1) En un tubo de microcentrífuga se hizo la siguiente mezcla:
 

|  |            |
|--|------------|
| -- Oligonucleótido iniciador .....           | 1 $\mu$ l  |
| -- Amortiguador de secuenciamiento 5 X ..... | 2 $\mu$ l  |
| -- DNA (aproximadamente 1-2 $\mu$ g) .....   | 7 $\mu$ l  |
|  | 10 $\mu$ l |

Se calentó la solución a 65°C por 2 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente por un periodo de 30 min.

##### Reacción de marcaje.

- 2) A partir de la mezcla de marcaje 5 X se hizo una dilución 1:5 con agua ultrapura estéril mientras que la enzima secuenasa fue diluida 1:8 con TE frío (2 $\mu$ l por reacción). La enzima diluida debe ser almacenada en hielo por no mas de 60 min.

- 3) A la mezcla de templado e iniciador se le agregó lo siguiente:
 

|   |              |
|---|--------------|
| -- Templado-iniciador (inciso 1) .....                          | 10 $\mu$ l   |
| -- Ditiotreititol 0.1 M .....                                   | 1 $\mu$ l    |
| -- Mezcla de marcaje diluida .....                              | 2 $\mu$ l    |
| -- <sup>35</sup> S- $\alpha$ -dATP (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l) ..... | 0.5 $\mu$ l  |
| -- Secuenasa diluida .....                                      | 2 $\mu$ l    |
|   | 15.5 $\mu$ l |

Se mezcló ligeramente evitando las burbujas y se incubó a temperatura ambiente por 10 min.

##### Reacciones de terminación.

- 4) Se rotularon 4 tubos de microcentrífuga con las letras G, A, T y C respectivamente. Se colocaron 2.5  $\mu$ l de la mezcla de terminación de ddGTP en el tubo rotulado como G. De igual



manera en los tubos rotulados como A, T y C se colocaron 2.5  $\mu$ l de la respectiva mezcla de terminación. Se precalentaron los tubos a 37°C por al menos 1 min.

- 5) A partir de la reacción de marcaje se tomaron alícuotas de 3.5  $\mu$ l y se transfirieron a cada uno de los tubos G, A, T y C. Se continuó la incubación a 37°C por otros 5 min.
- 6) Se agregaron 4  $\mu$ l de solución inactivadora a cada reacción de terminación, se mezcló vigorosamente y se colocaron en hielo hasta realizar la electroforesis. Esta solución es estable a -20°C por una semana.

#### **Preparación del gel de secuenciamiento.**

Se utilizaron 2 placas de vidrio de 1/4" de espesor (una de 33x38 cm y otra de 33x40 cm) y separadores laterales de 0.4 mm de espesor. Este material fue adquirido de BRL.

- 7) Se lavaron escrupulosamente las placas con detergente y se enjuagaron con agua desionizada. Se colocaron sobre la mesa de trabajo y posteriormente se limpiaron con etanol. Se agregaron 3 ml de una solución de silicón sobre una de las placas.
- 8) Se colocaron los separadores laterales sobre la placa grande y sobre ellos se colocó la placa pequeña. Se colocó una tira continua de cinta adhesiva alrededor de los lados y el fondo del molde. Se ensamblaron fuertemente ambas placas con pinzas especiales para este propósito.
- 9) Para preparar un gel al 8% se hizo la siguiente mezcla: 76 g de acrilamida, 0.4 g de bisacrilamida, 48 g de urea, 40 ml de agua ultrapura y 10 ml de TBE 10 X. Se calentó ligeramente hasta completa disolución. Se agregaron 500  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10% y se filtró la solución a través de una membrana con poros de 0.45  $\mu$ m.
- 10) Se añadieron 50  $\mu$ l de TEMED, se mezcló suavemente la solución y se tomó con una jeringa de 60 ml sin aguja. Se colocó el molde a una posición de 45' apoyándolo sobre una de sus esquinas inferiores y se vació el gel usando el émbolo para controlar el flujo. Se insertó el peine (BRL) utilizando el lado plano del mismo para formar un carril único y ancho. Se dejó polimerizar por 45 min.

#### **Electroforesis y autorradiografía.**

- 11) Se eliminó la cinta que estaba alrededor del molde y éste se ensambló en una cámara vertical para electroforesis. Se retiró cuidadosamente el peine y se lavó el carril utilizando una pizeta con agua para eliminar los residuos de urea. Se reinsertó el peine en posición correcta presionando

ligeramente los dientes sobre la superficie del gel para formar los carriles. Se agregó TBE 1 X y se realizó una precorrida a 1200 V por 2 h.

- 12) Cuando el gel estuvo listo, se calentaron las muestras a 75°C por 2 min y se cargaron inmediatamente. Se usaron 2.5 µl por cada línea y se aplicaron en el orden G, A, T y C de izquierda a derecha.
- 13) Se realizó la electroforesis a 1,500 volts por 4 h al término de las cuales se repitió el inciso anterior y se aplicaron nuevamente las muestras en las líneas adyacentes.
- 14) Después de otras 4 h de electroforesis al mismo voltaje, se desmontó el molde y se colocó horizontalmente sobre la mesa de trabajo. Se insertó una espátula entre las placas de vidrio y se retiró la placa siliconizada. La placa que contiene el gel fue sumergida en la solución de lavado de geles por 30 min y posteriormente se depositó sobre la mesa.
- 15) Se colocó una pieza de papel Whatman 3 MM (30x40 cm) sobre la superficie del gel y se presionó firmemente utilizando una pipeta como rodillo. Se aplicó presión en una de las esquinas del filtro y se fue levantando lentamente con el gel unido. Se secó el gel adherido al papel filtro en un secador de geles con vacío a 80°C por 2 h. Finalmente se colocó en un cartucho para exposición radiactiva conteniendo una película ultrasensible y se permitió la exposición a temperatura ambiente durante toda la noche. Se reveló la autorradiografía y se interpretaron los resultados.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

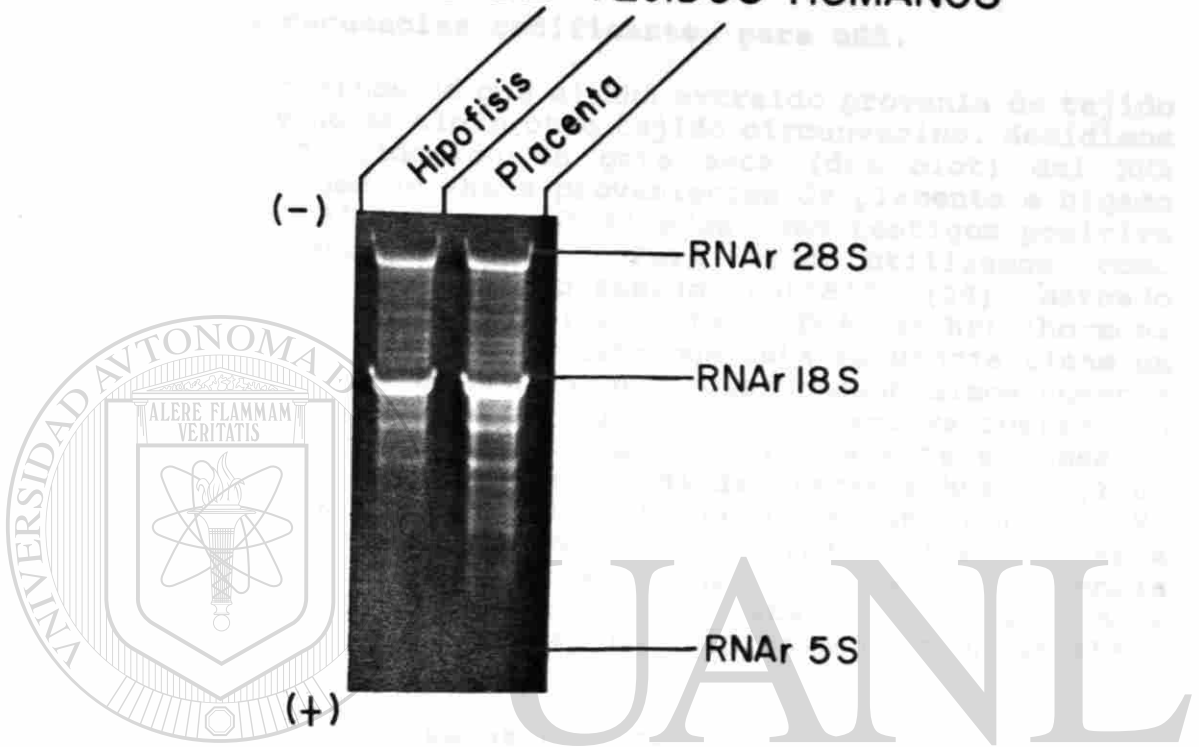
## V) RESULTADOS

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### **Extracción de RNA total de hipófisis humanas.**

5 g de tejido hipofisiario humano recuperado a partir de autopsias realizadas en el anfiteatro del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" fueron procesados por el método de isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo, tal y como se describe en la sección de materiales y métodos, lográndose obtener 8 mg de RNA total. Estos RNA's se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa-urea-ácido comparando su perfil electroforético con el de un RNA de buena calidad extraído de placenta humana y disponible en nuestro laboratorio (Figura 3). Los resultados de este análisis demostraron la buena calidad e integridad del RNA de nuestro interés.

## CARACTERIZACION ELECTROFORETICA DE RNA's EXTRAIDOS DE TEJIDOS HUMANOS



**Figura 3.-** Electroforesis de RNA's en gel de agarosa - urea-ácido. Se aplicaron a un gel de agarosa al 1.5%, 10  $\mu$ g de RNA's totales extraídos de hipófisis y placenta humana. El gel fue teñido con bromuro de etidio y visualizado por iluminación con luz ultravioleta. Se indican las especies de RNA mas abundantes, señaladas de acuerdo a su coeficiente de sedimentación.

El RNA obtenido no mostró signos de degradación ni contaminación con DNA y presentó un índice de pureza de 1.83 (un buen índice de pureza se considera a un valor entre 1.8 y 2).

#### **Detección de secuencias codificantes para hGH.**

Para cerciorarnos de que el RNA extraído provenía de tejido hipofisiario y no de algún otro tejido circunvecino, decidimos realizar una hibridación en gota seca (dot blot) del RNA obtenido, así como de RNA's provenientes de placenta e hígado humanos, los cuales fueron utilizados como testigos positivo y negativo respectivamente. Para ello utilizamos como rastreador molecular al plásmido phPL815 (28) marcado radiactivamente. Dicho plásmido porta el DNAC de hPL (hormona lactogénica placentaria) y puesto que esta secuencia tiene un 95% de similitud con el DNAC de hGH, cuando concluimos nuestro experimento pudimos detectar una señal radiactiva fuerte con el RNA extraído de hipófisis humanas. Obviamente se observó una señal aun mas fuerte con el RNA de placenta humana (100% de similitud) pero no se detectó señal alguna con el RNA proveniente de hígado humano. Los resultados de este experimento nos confirmaron, sin lugar a dudas, la presencia de secuencias nucleotídicas que codificaban para la hormona de crecimiento humana (Figura 4) en nuestra población de RNA's totales.

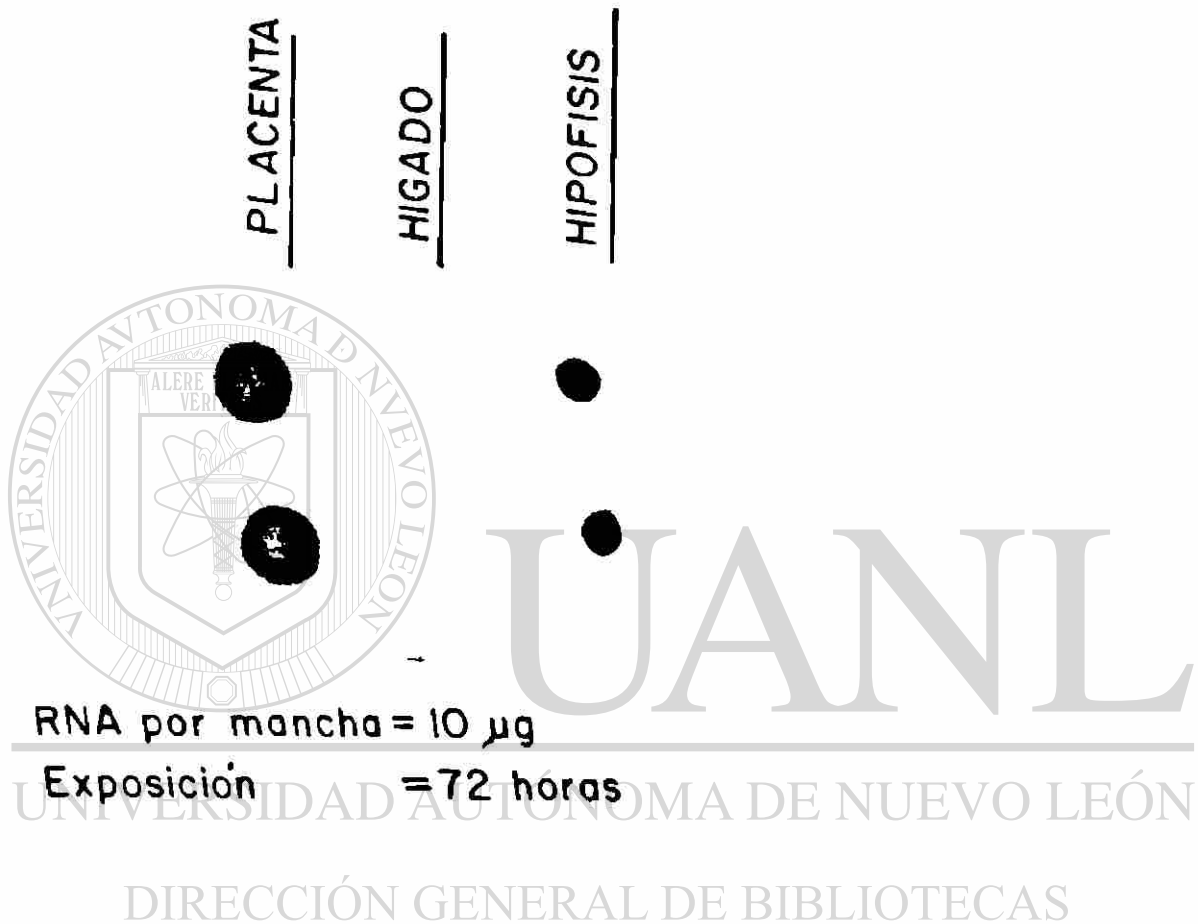
#### **Aislamiento de RNA's mensajeros poli A<sup>+</sup>.**

Una vez que se confirmó la presencia de RNAm's específicos para hGH, continuamos con la purificación de los RNAm poli A<sup>+</sup>.

Sobre una columna de celulosa oligo-dT se aplicaron 8 mg de RNA total de hipófisis humanas tal y como se describe en la sección de materiales y métodos. Cuando obtuvimos el RNA poli A<sup>+</sup> decidimos someterlo a un segundo pasaje a través de dicha columna para lograr una mayor purificación. De esta doble cromatografía logramos recuperar 90 µg de RNAm poli A<sup>+</sup>, lo que corresponde al 1.1% de la cantidad original del RNA total.

El RNAm obtenido fue visualizado por electroforesis en un gel de agarosa-urea-ácido y su perfil electroforético fue analizado al correr en el mismo gel, una alícuota del RNA total tomada previamente al proceso cromatográfico (Figura 5). De esta comparación dedujimos que nuestra fracción poli A<sup>+</sup> era excelente ya que se pudo apreciar una notable disminución de los RNA ribosomales 28 S y 18 S y una notable desaparición del RNA 5 S. No se observaron signos de degradación y se obtuvo un índice de pureza de 1.81 .

HIBRIDIZACION EN GOTA SECA DE phPL815(<sup>32</sup>P)  
 CONTRA RNA's DE PLACENTA, HIGADO E  
 HIPOFISIS HUMANA



**Figura 4.- Autorradiograma de una hibridización tipo Northern para detectar secuencias de RNAm de hGH o RNA's homólogos a éste. Se aplicaron por duplicado (columnas) 10 µg de RNA total de cada una de las muestras indicadas sobre un papel filtro de nitrocelulosa. Se utilizó RNA de placenta como testigo positivo y RNA de hígado como testigo negativo.**



# ANALISIS ELECTROFORETICO DE RNA'S DE HIPOFISIS HUMANAS



**Figura 5.- Perfil electroforético del RNA total aislado de hipófisis humanas y de su fracción RNA poli A<sup>+</sup>. El RNA total se obtuvo por el método de isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo mientras que la fracción poli A<sup>+</sup> se derivó de éste por cromatografía de afinidad en columna de celulosa oligo-dT. El gel utilizado fue de agarosa-urea-ácido al 1.5%. Después de la electroforesis los RNA's se visualizaron por tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz ultravioleta.**

## **Síntesis de los DNA's complementarios.**

La conversión enzimática del RNAm poli A<sup>+</sup> a DNAc de doble cadena y la posterior inserción de este DNA en un plásmido bacteriano, ha llegado a ser una herramienta fundamental en diversas áreas de la Biología Molecular. En nuestro caso, logramos construir moléculas de ácidos desoxirribonucleicos complementarios a los RNAm portadores de la información para la síntesis de todas las proteínas producidas en la hipófisis humana incluyendo por supuesto a aquella que codifica para la síntesis de hGH.

Para este propósito utilizamos un conjunto enzimático disponible comercialmente por la compañía BRL. A partir de únicamente 5 µg de RNAm poli A<sup>+</sup> logramos sintetizar 3.2 µg de DNA's complementarios. De acuerdo a la fórmula enunciada en la sección de materiales y métodos, obtuvimos 2.1 µg de DNAc monocatenario mientras que la producción total de DNA's complementarios de doble cadena fue de 3.2 µg, lo que corresponde a una eficiencia del 64% tomando en cuenta la cantidad inicialmente utilizada de RNAm poli A<sup>+</sup>.

Posteriormente continuamos con la caracterización electroforética de los DNA's complementarios obtenidos. Alícuotas de las reacciones de síntesis de la primera y segunda cadena fueron analizadas por electroforesis en un gel alcalino de agarosa al 1.4% y posteriormente por autorradiografía (Figura 6).

Los resultados de este análisis indicaron que los RNAm mas abundantes en la hipófisis humana presentan un rango de tamaño entre 500 y 1700 pb, con una mayor acentuación en la región de 700 a 1200 pb. Lo anterior se dedujo de la fuerte señal radiactiva emitida en la región del gel correspondiente a DNA's complementarios con tales longitudes según los marcadores de peso molecular usados como referencia.

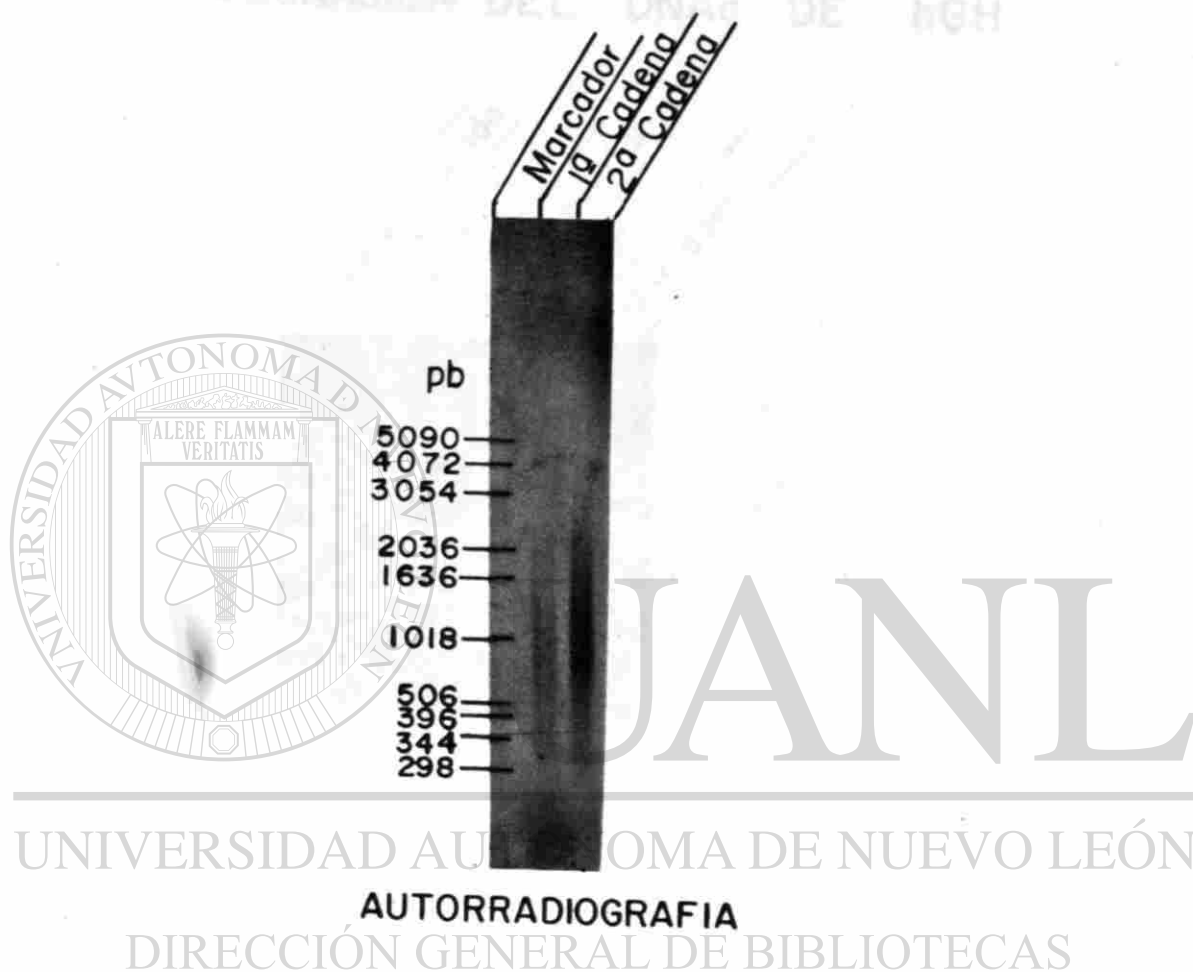
## **Una nueva estrategia de clonación.**

Como se explicó en la sección de materiales y métodos, diseñamos una innovadora estrategia para favorecer, en forma casi exclusiva, la inserción del DNAc de hGH en un vector de clonación.

Una vez que obtuvimos los DNA's complementarios, éstos fueron sometidos a la acción de las enzimas de restricción Aat II y Xma I y los fragmentos derivados de esta doble digestión fueron clonados en el plásmido pUC 19, el cual había sido digerido previamente también con las mismas enzimas de restricción y purificado por electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Figura 7). Durante este procedimiento verificamos que la digestión del DNAc de hGH

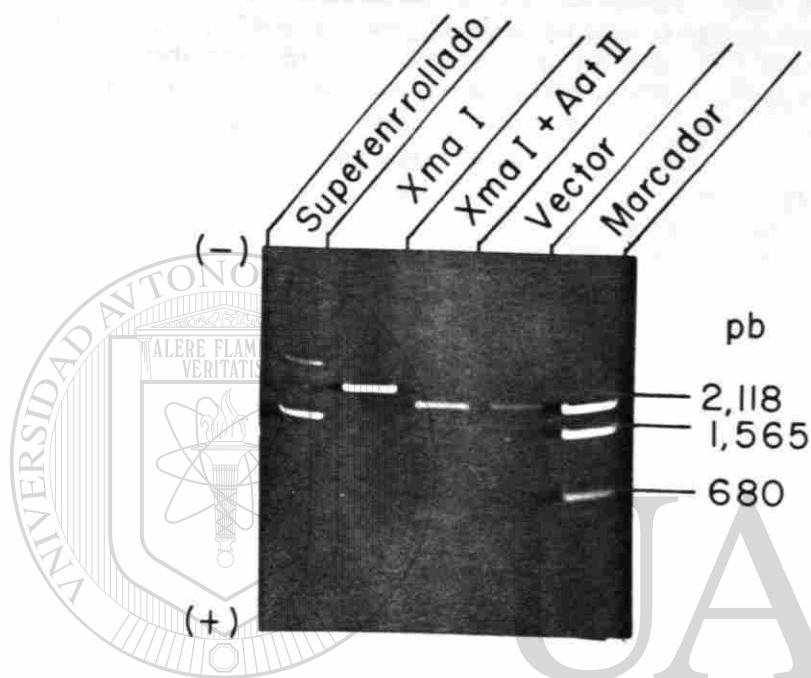
# ANALISIS DE LOS DNAs COMPLEMENTARIOS DE HIPOFISIS HUMANAS

PREPARACION DE PLASMIDOS pUC 19 PARA  
LA CLONACION DEL DNAs DE hGH



**Figura 6.-** Caracterización electroforética de los DNAs complementarios de hipófisis humanas. Alícuotas de las reacciones de síntesis de la primera y segunda cadena de los DNAs complementarios fueron analizadas en un gel alcalino de agarosa al 1.4% y posterior autorradiografía. El radioisótopo utilizado corresponde a  $^{35}\text{S}$ -dATP y tanto el gel como su autorradiografía se efectuaron de acuerdo a Maniatis y cols. Se utilizó 1 Kb Ladder como marcador de peso molecular.

## PREPARACION DEL PLASMIDO pUC 19 PARA LA CLONACION DEL DNAC DE hGH



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Figura 7.- Obtención del vector para la clonación del DNAC de hGH.** El plásmido pUC19 fue linearizado con la enzima Xma I y posteriormente fue sometido a digestión con la enzima Aat II obteniéndose dos fragmentos (2205 y 481 pb). El fragmento mayor, el cual se utilizó como vector para la clonación del DNAC de hGH, fue purificado a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Se utilizó DNA de pBR322 cortado con Rsa I como marcador de peso molecular. El gel fue de agarosa al 1% y las bandas de DNA se visualizaron por tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz ultravioleta.

(820 pb) con las enzimas Aat II y Xma I produjera un fragmento de 640 pb, el cual codifica para la hGH madura, así como también corroboramos la integración de este fragmento en el vector de clonación.

Lo anterior se llevó a cabo al transferir a un papel filtro de nitrocelulosa, el DNA de un gel que contenía resueltos de acuerdo a su tamaño, los DNA's complementarios intactos, DNA's complementarios digeridos con Aat II y Xma I, el producto de ligación de estos últimos con el vehículo de clonación pUC19, el plásmido pUC19 digerido con Aat II y Xma I como testigo negativo y el DNAC de hPL como testigo positivo. Posteriormente hicimos una hibridización tipo "Southern" en la que utilizamos como rastreador molecular al DNAC de hPL marcado radiactivamente. Por análisis autorradiográfico logramos detectar la presencia del DNAC de hGH como una banda de 820 pb en la mezcla de DNA's complementarios intactos, así como la digestión de este DNAC con las enzimas Aat II y Xma I para generar un fragmento de 640 pb y la inserción de esta última secuencia génica en el vehículo de clonación (Figura 8). Lo anterior se dedujo al observar la posición de la señal radiactiva emitida en cada uno de los tres casos. Con estos resultados pudimos demostrar la factibilidad y versatilidad de nuestra estrategia.

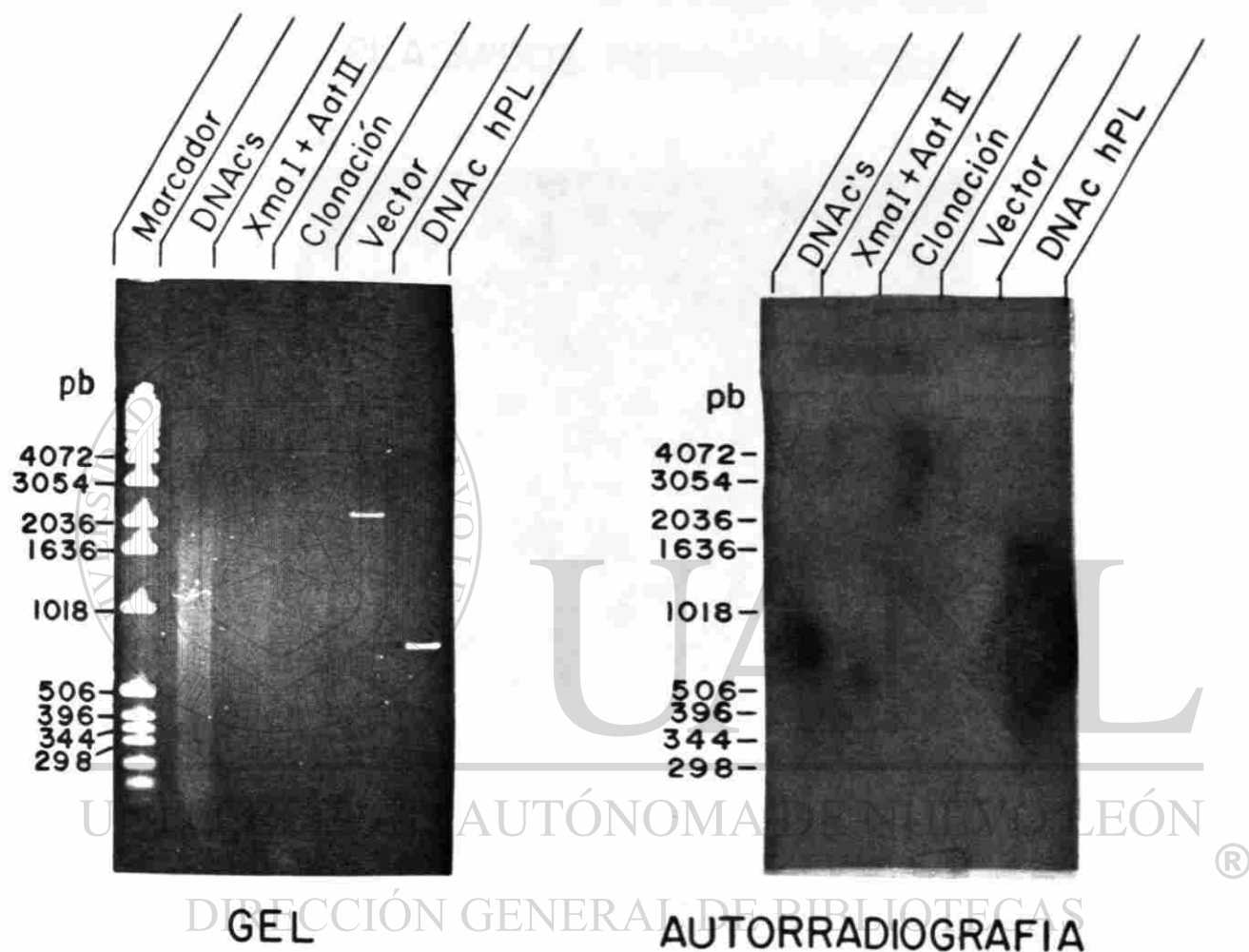
#### **Tamizaje de los plásmidos recombinantes.**

Una vez que los DNA's complementarios fueron integrados en el vehículo de clonación, las moléculas recombinantes así obtenidas fueron introducidas en bacterias Escherichia coli cepa RR1, a las cuales se les había inducido previamente la capacidad de incorporar DNA foráneo por tratamiento con cloruro de calcio en frío. Las bacterias transformadas fueron propagadas en medio de cultivo suplementado con ampicilina, con lo cual se permitiría únicamente el crecimiento de aquellas bacterias que hubiesen adquirido plásmidos recombinantes.

Al final de dicho procedimiento obtuvimos 18 clones bacterianas provenientes de la ligación de los DNA's complementarios con el plásmido pUC19 y no se detectó colonia alguna en la ligación del vector solo sin insertos. Lo anterior nos indicó que aquellas clones deberían de poseer plásmidos recombinantes. Posteriormente se colectó cada una de esas clones y se sometieron a un protocolo de extracción de plásmidos por el método de lisis alcalina. Cada uno de los plásmidos recombinantes fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 2% para inferir, en base al perfil electroforético, el tamaño del inserto que contenían. De las 18 clones, 4 de ellas (clonas 3,7,9 y 10) portaban plásmidos que coincidían con el perfil electroforético esperado (Figura 9). Lo anterior se dedujo por el hecho de que en el análisis

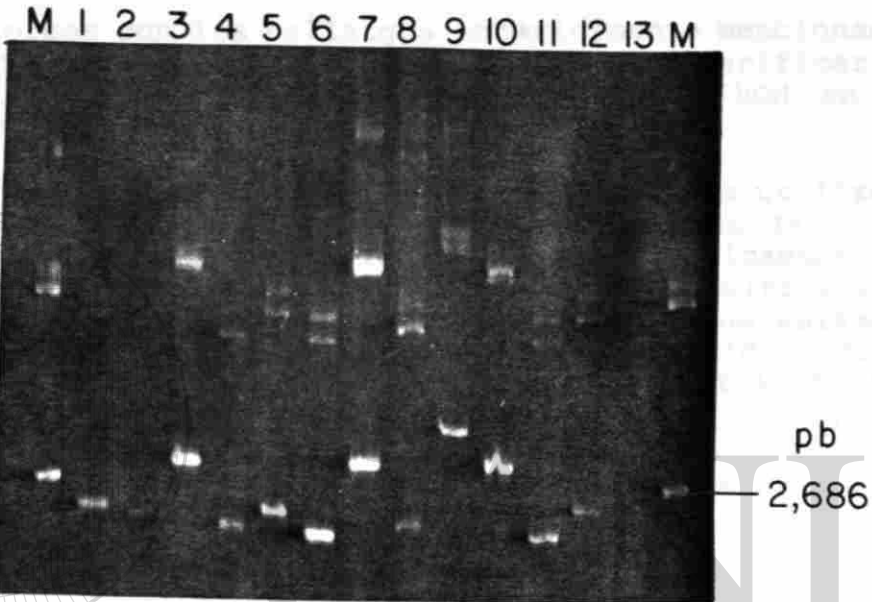


# CLONACION MOLECULAR DEL DNAC DE hGH EN PLASMIDO pUC 19



**Figura 8.-** Análisis tipo Southern para detectar la clonación molecular del DNAC de hGH en el plásmido pUC19. A la izquierda se observa un gel de agarosa al 1.4% que contiene en el orden acostumbrado: 1 Kb Ladder como marcador de peso molecular; DNAs complementarios intactos; DNAs complementarios digeridos con *Aat* II y *Xma* I; ligación de estos últimos con el plásmido pUC19; pUC19 linealizado y DNAC de hPL. A la derecha se aprecia la autorradiografía después de hibridar estos DNAs contra el DNAC de hPL.

## PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LOS PLASMIDOS RECOMBINANTES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**Figura 9.- Análisis electroforético de plásmidos recombinantes.** La fotografía muestra el perfil electroforético de trece de los plásmidos recombinantes obtenidos al transformar bacterias *E. coli* RR1. Su movilidad se compara contra aquella del vector plasmídico pUC19 (carriles M). Los carriles 3, 7, 9 y 10 corresponden a los recombinantes con insertos de mayor longitud, lo cual los hizo sospechosos de portar el DNAC de hGH. El gel fue de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio (2  $\mu\text{g/ml}$ ) y fotografiado bajo luz ultravioleta.

electroforético se corrió también el plásmido pUC19 superenrollado, de tal manera que todos aquellos plásmidos que migraran por arriba de este DNA, deberían de tener insertos grandes y serían sospechosos de portar el DNAC de hGH.

**pDRhGH3, pDRhGH7 y pDRhGH10: plásmidos portadores del DNAC de hGH.**

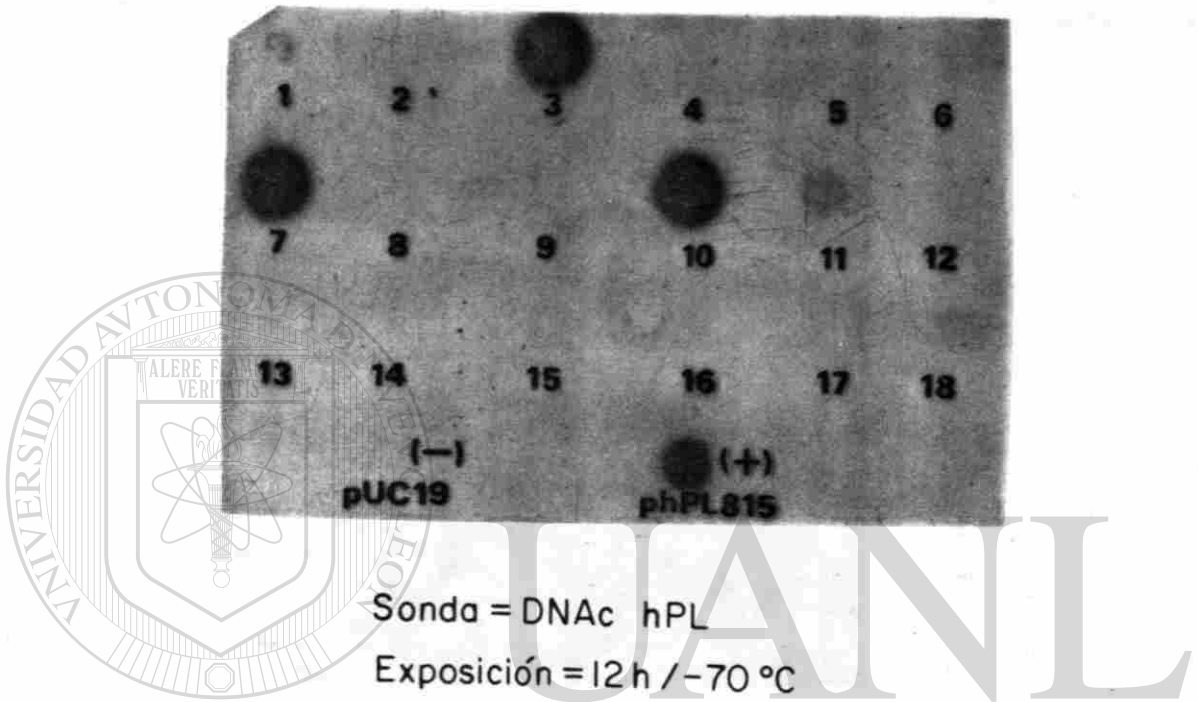
No conformes con los hallazgos anteriormente mencionados, decidimos realizar un segundo experimento para verificar con mayor sensibilidad, la presencia del DNAC de hGH en los plásmidos sospechosos.

Para ello hicimos una hibridación en gota seca utilizando nuevamente el DNA plasmídico de cada una de las 18 clonas contra el DNAC de hPL marcado radiactivamente. Unicamente los plásmidos de las clonas 3, 7 y 10 dieron señal positiva en la autorradiografía (Figura 10) lo que nos indicó que solamente ellos portaban el DNAC de hGH. Estos plásmidos fueron denominados pDRhGH3, pDRhGH7 y pDRhGH10; el prefijo DR hace referencia al nombre y apellido del autor, el sufijo hGH indica que portan secuencias codificantes para hGH y el número al final hace referencia al número de la clona bacteriana según el orden en el cual fue cosechada.

Dichos plásmidos fueron crecidos a mediana escala, tal y como se mencionó en el respectivo protocolo, obteniéndose 259  $\mu\text{g}$  de pDRhGH3, 192  $\mu\text{g}$  de pDRhGH7 y 226  $\mu\text{g}$  de pDRhGH10 con índice de pureza superior a 1.8 y una buena apariencia de su perfil electroforético (datos no mostrados).

Una vez que se obtuvo suficiente cantidad de cada uno de los plásmidos mencionados, posteriormente fueron caracterizados con enzimas de restricción diagnósticas para verificar la certeza de su identidad. Después de haber digerido con las enzimas Pvu II, Ava II y Rsa I y posterior electroforesis en un gel de agarosa al 2%, encontramos que los productos de esas digestiones coincidían con el patrón de restricción esperado, previamente mencionado en la sección de materiales y métodos. En dichas digestiones, Pvu II generó 3 fragmentos de 2113, 497 y 227 pb; Ava II, 3 fragmentos de 1638, 963 y 222 pb y de la digestión con Rsa I se liberaron 2 fragmentos de 2018 y 812 pb. Estos resultados nos indicaron sin lugar a dudas, que efectivamente habíamos logrado la clonación molecular del DNAC de hGH (Figura 11).

# DETECCION DE LOS PLASMIDOS PORTADORES DEL DNAC DE hGH

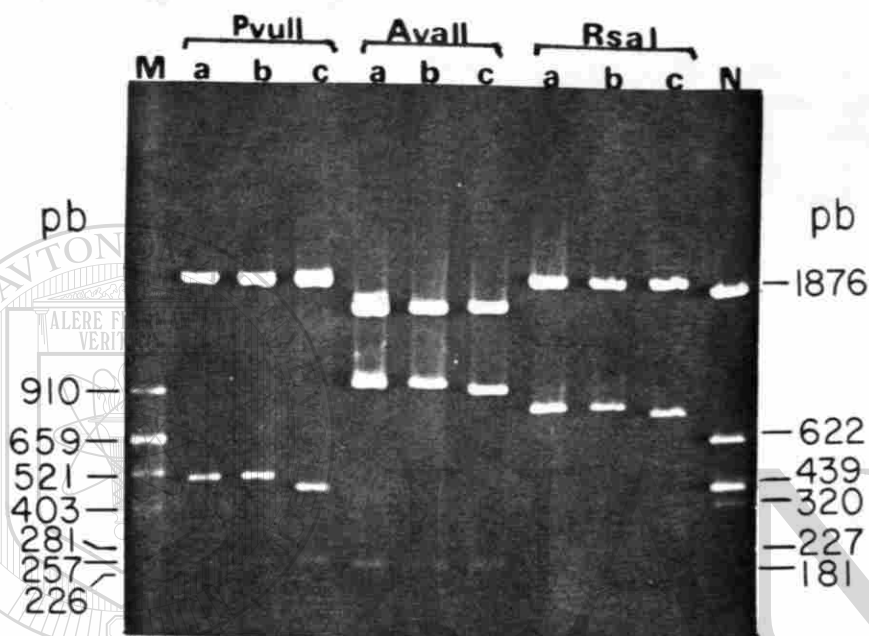


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

**Figura 10.- Autorradiograma del tamizaje de DNA plasmidico en gota seca.** Se muestra la señal obtenida al hibridar el DNA (100 ng) de los 18 plásmidos recombinantes contra el DNAC de hPL marcado radiactivamente. Las posiciones 3, 7 y 10 corresponden a plásmidos portadores del DNAC de hGH. Se utilizaron 10 ng de phPL815 y pUC19 como testigos positivo y negativo respectivamente.

## ANALISIS DE RESTRICCION DE LOS PLASMIDOS PORTADORES DEL DNAC DE hGH



a = pDRhGH3

b = pDRhGH7

c = pDRhGH10

**Figura 11.- Digestiones analíticas de los plásmidos portadores del DNAC de hGH.** Se muestra el análisis electroforético de los fragmentos obtenidos al digerir los plásmidos pDRhGH3 (a), pDRhGH7 (b) y pDRhGH10 (c) con las enzimas de restricción Pvu II, Ava II y Rsa I. Los patrones de restricción obtenidos demostraron que los tres plásmidos portan el DNAC de hGH. Los marcadores corresponden a pBR322 digerido con Alu I (M) y pBR322 digerido con Hae II (N). El gel fue de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio y visualizado por iluminación con luz ultravioleta.



## Los insertos de DNAC en los plásmidos.

A pesar de que todo indicaba que poseíamos ya el DNAC de nuestro interés, decidimos recuperar dicha secuencia génica de cada uno de los plásmidos recombinantes mediante una digestión con Aat II y Xma I. Esto nos permitiría realizar una disección enzimática mas fina exclusivamente sobre el DNAC de hGH evitando así la presencia de fragmentos provenientes del vehículo de clonación.

Cuando liberamos los insertos de los plásmidos recombinantes con las enzimas de restricción Aat II y Xma I encontramos un resultado muy interesante. Observamos que pDRhGH3 y pDRhGH7 liberaron un fragmento de 640 pb mientras que pDRhGH10 liberó un fragmento de aproximadamente 595 pb cuando fueron analizados por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 4%.

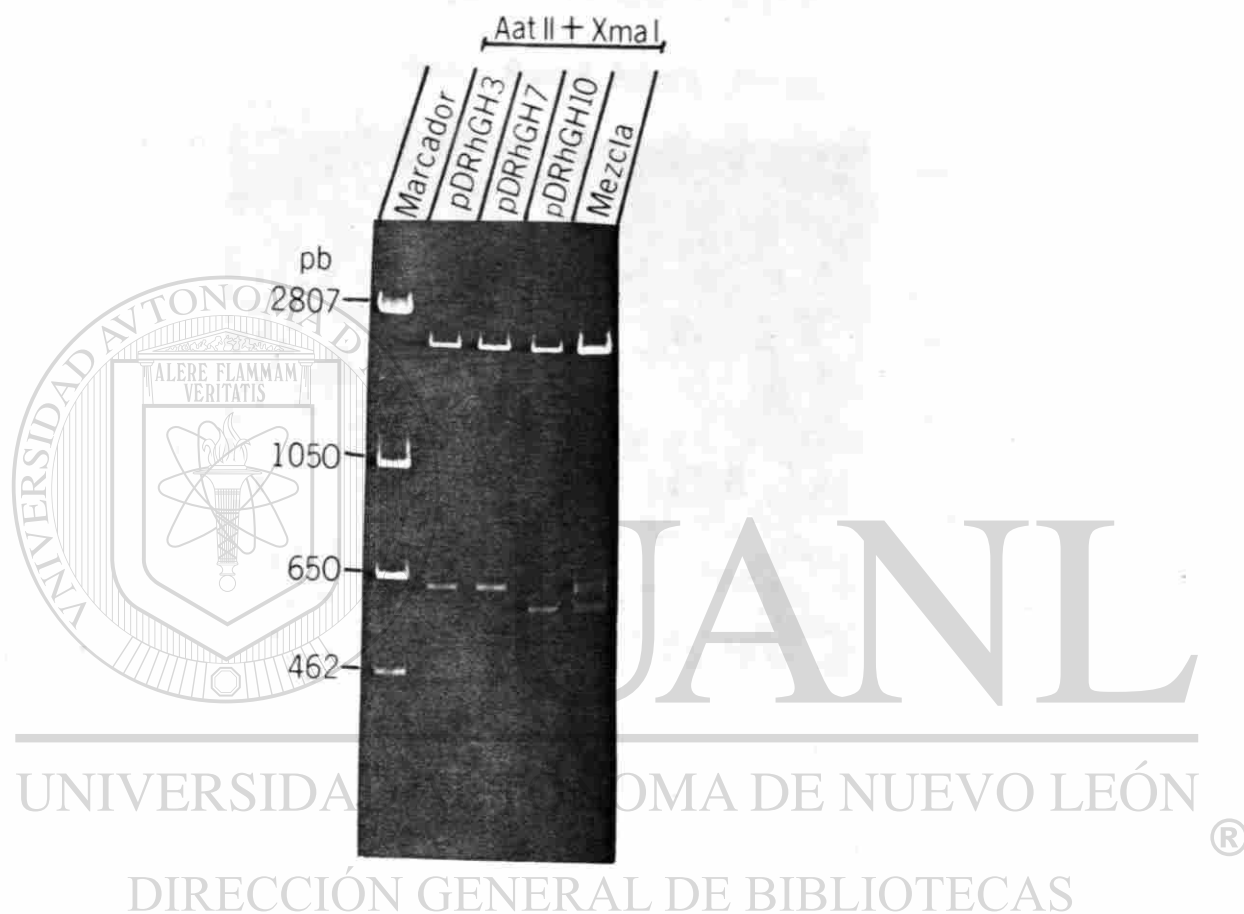
Para evitar la posibilidad de que este comportamiento electroforético hubiese sido debido a algún artefacto del gel, hicimos una mezcla de los tres plásmidos y la sometimos a la acción de dichas enzimas de restricción, ante lo cual observamos nuevamente la liberación de dos insertos diferentes (Figura 12). Lo anterior nos hizo suponer que los dos primeros codificaban para la hGH de 22 Kd mientras que el último codificaba para la variante hGH de 20 Kd.

**Se logra también la clonación del DNAC de hGH 20 Kd.**

A partir del gen de la hormona de crecimiento humana se producen dos diferentes RNA mensajeros como consecuencia de un "splicing" diferencial (51). El primero de ellos se traduce en la bien estudiada hGH de 22 Kd, mientras que el otro acarrea una delección interna de 45 pb generando así su traducción una proteína de 20 Kd. Dicha proteína corresponde al 10% de la hGH hipofisiaria y presenta la misma secuencia aminoacídica que la hGH de 22 Kd excepto por una delección de 15 aminoácidos localizados entre los residuos 32 al 46 (52).

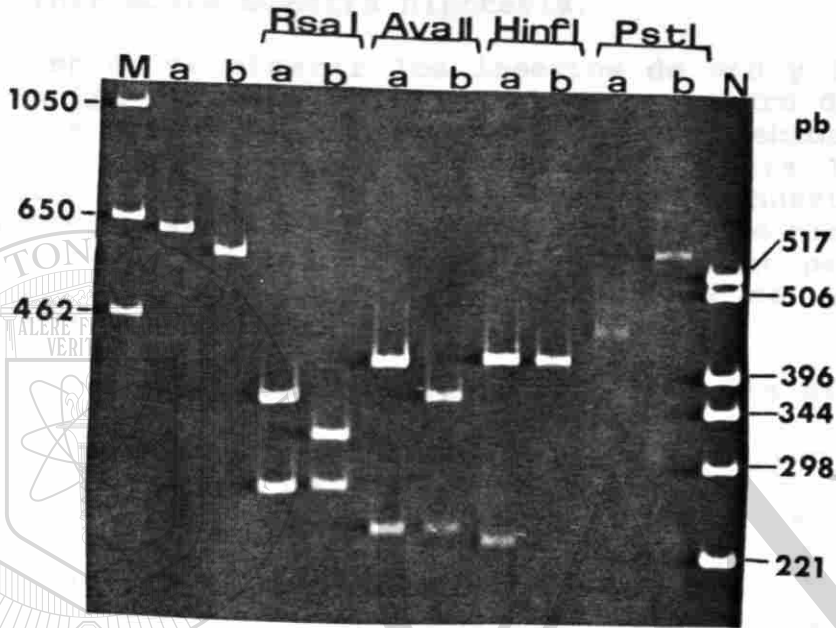
Para verificar nuestra suposición decidimos primeramente recuperar los insertos de 640 y 595 pb por electroelución en geles de poliacrilamida. Posteriormente ambos insertos fueron digeridos con una batería de enzimas de restricción integrada por Rsa I, Ava II, Hinf I y Pst I. En la digestión con las primeras tres enzimas observamos la liberación de dos fragmentos génicos, uno de los cuales siempre permanecía constante al digerir ambos insertos con la misma enzima, mientras que el otro presentaba un menor tamaño en el inserto de 595 pb (Figura 13).

## PERFIL ELECTROFORETICO DE LOS DNAC DE hGH



**Figura 12.- Comportamiento electroforético del DNAC de hGH inserto en los plásmidos recombinantes.** Los plásmidos pDRhGH3, pDRhGH7, pDRhGH10 y una mezcla de todos ellos fueron digeridos con las enzimas de restricción Aat II y Xma I para analizar la migración de los fragmentos liberados. pDRhGH3 y pDRhGH7 liberaron un inserto de 640 pb mientras que pDRhGH10 liberó un inserto de aproximadamente 595 pb. El gel fue de poliacrilamida al 4%, teñido con bromuro de etidio (2  $\mu$ g/ml) y fotografiado bajo luz ultravioleta.

## ANALISIS DE RESTRICCION DE LOS DNAC DE hGH 20 Y 22 K



a: DNAC hGH 22K

b: DNAC hGH 20K

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Figura 13.- Digestiones analíticas de los DNAs complementarios que codifican para las hormonas de crecimiento humana de 20 y 22 Kd. Los DNAs complementarios para la hGH 22 Kd (a) y hGH 20 Kd (b) fueron digeridos con Rsa I, Ava II, Hinf I y Pst I. Esta última enzima cortó el inserto de 640 pb (DNAC hGH 22 Kd) en dos fragmentos mientras que aquel de 595 pb (DNAC hGH 20 Kd) permaneció intacto. El gel fue de poliacrilamida al 6%, teñido con bromuro de etidio (2 µg/ml) y visualizado al ser iluminado con luz ultravioleta.**

Cuando revisamos la secuencia del DNAC de hGH 20 Kd con la ayuda de una computadora y programas computacionales especiales para Biología Molecular, encontramos que ésta carecía del sitio Pst I presente en el DNAC de hGH 22 Kd (Figura 14). Tal sitio está ausente como consecuencia de una deleción en el RNAM de la hGH 20 Kd que comprende los primeros 45 nucleótidos del tercer exón del gen hGH. Por lo anterior es claro que dicha enzima de restricción sería la clave para discernir sobre nuestra hipótesis.

Después de digerir los insertos de 640 y 595 pb con la enzima Pst I, el primero de ellos nos liberó dos fragmentos mientras que el último permaneció intacto debido a que carece del mencionado sitio de restricción (Figura 13). Con este resultado pudimos respaldar la veracidad de nuestra hipótesis. Lo anterior nos demostró con toda certeza que habíamos logrado la obtención, no solo del DNA complementario para la hormona de crecimiento de 22 Kd, sino también de aquel para la variante de hGH de 20 Kd.

#### **Subclonación en vectores fágicos de la serie M13.**

Finalmente no conformes con las caracterizaciones por cortes con enzimas de restricción y electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida, decidimos realizar experimentos tendientes a determinar la secuencia, nucleótido por nucleótido, del DNAC de hGH. Para ello subclonamos un fragmento del DNAC de hGH 22 Kd en vectores fágico especiales para la determinación de secuencias nucleotídicas por el método enzimático de Sanger.

A partir del plásmido pDRhGH3 se escindió el DNAC de hGH de 22 Kd mediante una doble digestión con Aat II y Sma I (isosquízómero de Xma I). El fragmento liberado (640 pb) fue recuperado por electroelución de acuerdo al protocolo descrito en la sección de materiales y métodos. Posteriormente fue sometido a una segunda digestión con Pst I para generar un fragmento de 447 pb, el cual fue recuperado también por electroelución.

Este último fragmento, que comprende el 70% de nuestra secuencia génica, fue integrado en el vector M13mp18 como requisito indispensable para el secuenciamiento nucleotídico. En esta etapa digerimos también el vector con las enzimas Pst I y Sma I, las cuales reconocen secuencias localizadas en la región de sitios múltiples de clonación ("polylinker"); sin embargo dicho vector no fué purificado, es decir, permaneció premeditadamente en la mezcla de digestión junto con un pequeño fragmento de 25 pb localizado sobre el "polylinker" y liberado también durante la doble acción enzimática. Esta mezcla de ambos fragmentos del fago M13mp18 fue utilizada en la reacción de ligación con el inserto del DNAC de hGH.

## COMPARACION DE MAPAS DE RESTRICCIÓN DE LOS DNAC DE hGH

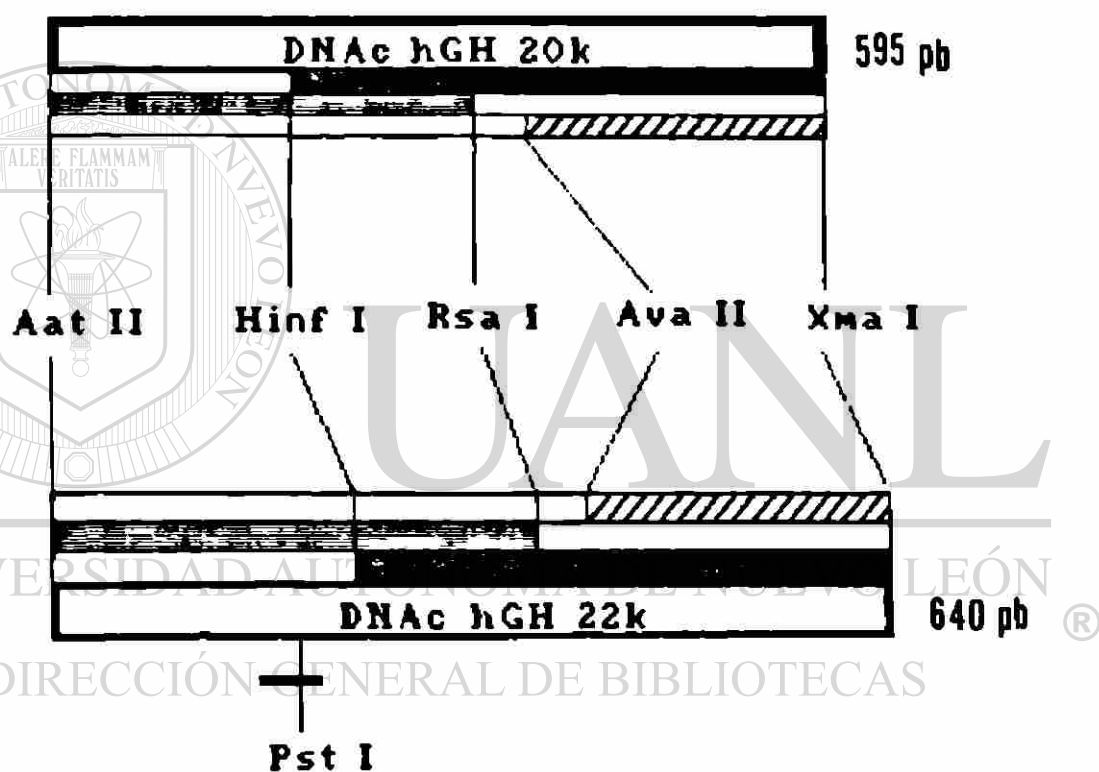


Figura 14.- Análisis de restricción computacional de los DNAC's de hGH 20 y 22 Kd. Se ilustran las regiones génicas desde Aat II hasta Xma I que corresponden a 595 pb para el DNAC de hGH 20 Kd y 640 pb para el DNAC de hGH 22 Kd. Las enzimas Hinf I, Rsa I y Ava II cortan esas regiones en dos fragmentos, uno de los cuales siempre permanece constante en ambos DNAC's mientras que el otro difiere en longitud como consecuencia de una deleción de 45 pb en el DNAC de hGH 20 Kd. La región deletada se muestra como una barra gruesa por debajo del DNAC de hGH 22 Kd e incluye un sitio único para la enzima de restricción Pst I.



Para ello se hicieron las siguientes mezclas de reacción: vector e inserto sin ligasa, vector e inserto con ligasa y vector sin inserto con ligasa. Al término de la incubación, tomamos una alícuota de cada mezcla y verificamos los productos de ligación por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Figura 15). En nuestro testigo sin ligasa no encontramos ligación detectable, en cambio en las reacciones de vector e inserto con ligasa y vector solo con ligasa si pudimos detectar productos de ligación. La reacción de vector solo con ligasa fue utilizada para demostrar la calidad del vector al determinar que fuera capaz de reensamblarse con el pequeño fragmento de 25 pb presente en dicha reacción.

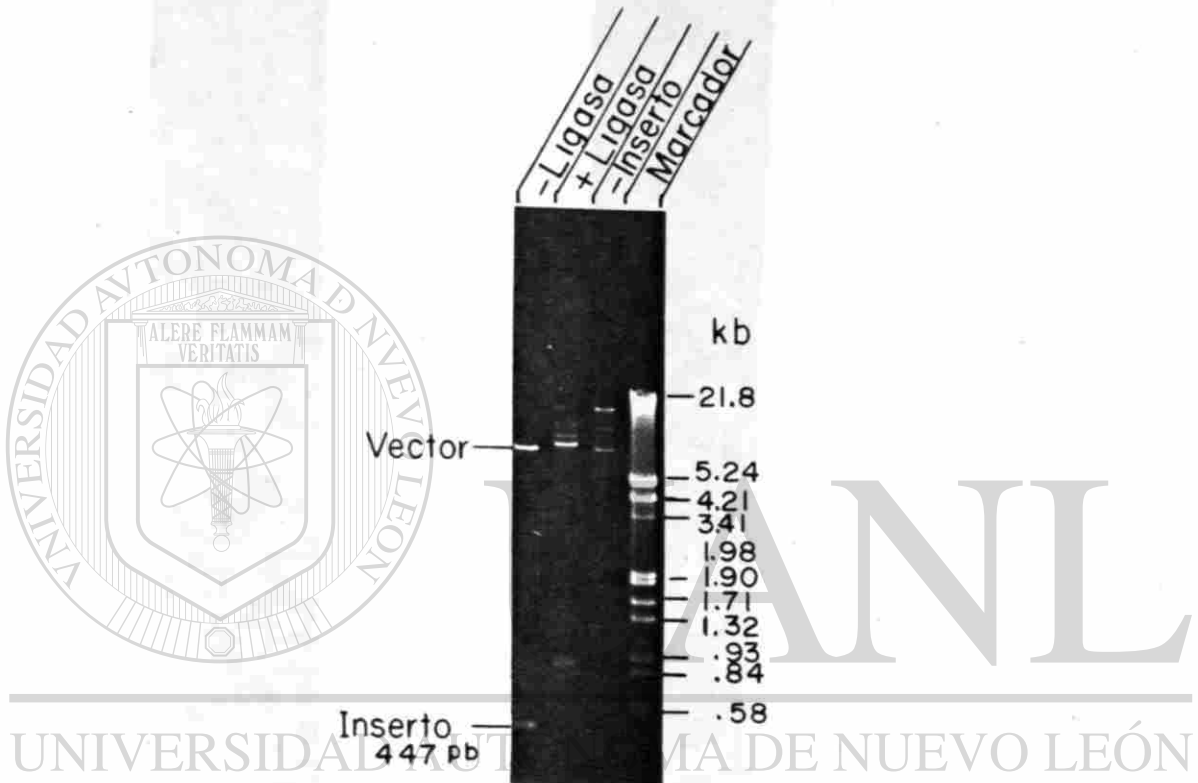
Posteriormente tomamos alícuotas de ambos productos de ligación y las introdujimos en bacterias competentes Escherichia coli cepa JM103 en presencia de IPTG y X-Gal. Al terminar la transformación con los productos del vector solo en presencia de ligasa, logramos detectar únicamente placas azules sobre el césped de bacterias no competentes, mientras que con la mezcla de vector e inserto con ligasa logramos detectar una combinación de placas blancas y azules (datos no mostrados) lo que nos indicó la presencia de fagos recombinantes portadores de un inserto proveniente del DNAC de hGH.

#### **Determinación de la secuencia nucleotídica y su análisis computacional.**

Para establecer inequívocamente la identidad de nuestro DNAC de hGH, decidimos someterlo al secuenciamiento nucleotídico por el método de Sanger.

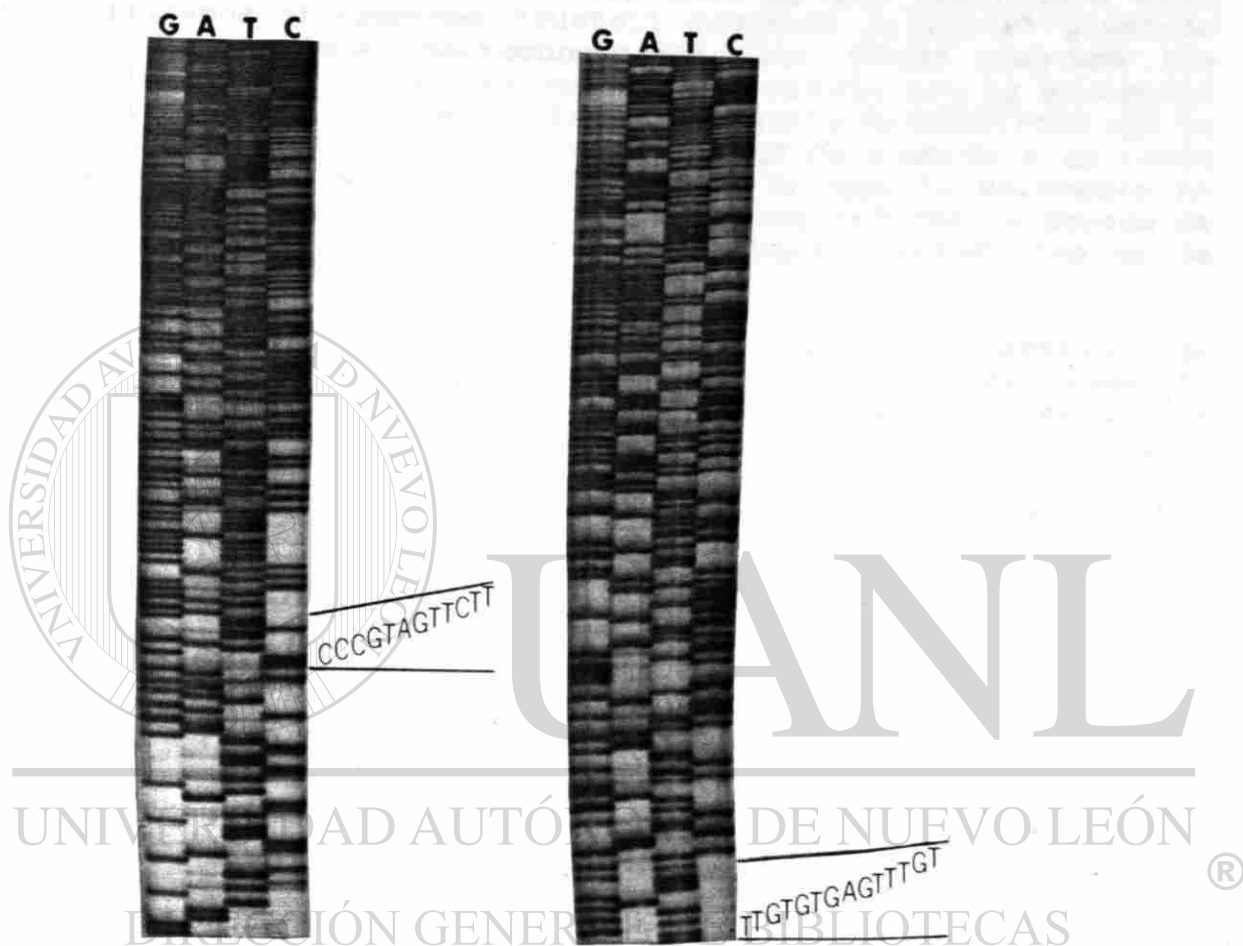
Para ello subclonamos un fragmento de 447 pb, que incluye el 70% del DNAC de hGH, en el vector M13mp18. A partir de las placas blancas de crecimiento lento obtenidas después de la transformación, preparamos el templado de DNA de cadena sencilla tal y como se mencionó en la sección metodológica correspondiente. Por análisis electroforético verificamos la buena calidad de nuestra preparación (datos no mostrados). Posteriormente dicho templado fue utilizado para realizar una serie de reacciones que incluían básicamente a la enzima secuenasa, a los cuatro ddNTP's y a sus correspondientes análogos dideoxirribonucleotídicos. Al término de las reacciones se tomaron alícuotas de cada una de ellas y se sometieron a electroforesis desnaturalizante en un gel de urea y poliacrilamida al 8%. Al obtener la autorradiografía del gel utilizado pudimos apreciar la excelente nitidez de nuestra separación electroforética (Figura 16).

## SUBCLONACION DE UN FRAGMENTO DEL DNAC DE hGH EN EL FAGO M13 mp 18



**Figura 15.-** Subclonación del DNac en vectores fágicos de la serie M13. El fragmento de 447 pb recuperado del DNac de hGH fue subclonado en el vector M13mp18. Se utilizó una reacción de vector sin ligasa como testigo negativo y una reacción de vector sin inserto en presencia de ligasa como testigo positivo. El marcador fue fago lambda digerido con Eco RI y Hind III.

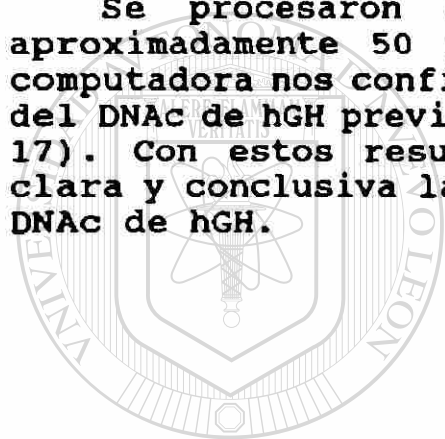
AUTORRADIOGRAFIAS DEL GEL UTILIZADO PARA DETERMINAR LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL DNAC DE hGH



**Figura 16.-** Determinación de la secuencia nucleotídica del DNAC de hGH. Se muestran porciones autorradiográficas del gel de secuenciamiento en el que se aplicaron reacciones dideoxinucleotídicas del DNA de cadena sencilla proveniente del inserto de pDRhGH3. Se utilizó un gel de urea-poliacrilamida al 8%, secuenasa como enzima polimerizante y  $^{35}\text{S}$ -dATP como trazador radiactivo.

Finalmente lo que hicimos fue leer la autorradiografía registrando, de abajo hacia arriba, cada señal radiactiva según el carril al que pertenecía (G, A, T o C). Con la información así recabada alimentamos una computadora para determinar la integridad de nuestros resultados de acuerdo a la secuencia ya publicada del DNAC de hGH (18). Para ello utilizamos el programa "Pustell Sequence Analysis" diseñado por International Biotechnologies, Inc..Dicho programa fue manipulado de tal manera que al alimentarlo con la secuencia aquí obtenida, nos indicaría el porcentaje de similitud con la secuencia ya publicada del DNAC de hGH de acuerdo a un rango de 80 a 100% de identidad. En caso de que la secuencia no correspondiera al 100% de similitud, nos informaría acerca de la localización de las regiones mutadas o artefactos en la secuencia problema.

Se procesaron 8 regiones de nuestra secuencia, de aproximadamente 50 pb cada una, y en todos los casos la computadora nos confirmó un 100% de similitud con la secuencia del DNAC de hGH previamente reportada en la literatura (Figura 17). Con estos resultados pudimos demostrar de una manera clara y conclusiva la identidad e integridad plena de nuestro DNAC de hGH.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

P U S T E L L S E Q U E N C E A N A L Y S I S P R O G R A M S  
International Biotechnologies, Inc.

-----  
SUBSEQUENCE HOMOMOLOGY SEARCH PROGRAM      Version 4.0

HOMOLOGIES OF CDNAHGHN

with the subsequence: PDRHG3

CTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAGACATTCT

A,G,C,T=known bases; ( ) enclose alternate bases  
P=purine; Q=pyrimidine; N=any base  
X under a base that is required to be a match

All matches have 80% homology or greater.

MATCH      BASE      SEQUENCE

100%      623      CTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAGACATTCT

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Figura 17.- Análisis computacional de la secuencia nucleotídica del DNAc de hGH. Se muestra un ejemplo representativo de los datos obtenidos durante la determinación de la estructura primaria del DNAc de hGH. Se alimentó el programa Pustell con una secuencia de 47 pb (línea continua) proveniente del inserto de pDRhGH3 y se investigó la homología con el DNAc de hGH previamente publicado (caja rectangular). Los resultados indicaron un 100% de homología a partir de la posición número 623.**



## VI) DISCUSION.

En el presente trabajo se ha descrito una serie de experimentos diseñados para obtener la información genética que en humanos es responsable de dirigir la síntesis de hGH.

Para lograr nuestra meta comenzamos primeramente con la recuperación del RNA total a partir de tejido hipofisiario humano. La calidad del RNA extraído fue aceptable ya que se obtuvo un índice de pureza de 1.83. Además cuando analizamos su perfil electroforético observamos que la fluorescencia de las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 28 y 18 S, correspondía a una intensidad de 2:1, respectivamente. Esta observación está basada en los comentarios que acerca de la integridad de las moléculas de RNA se dieron en la sección de materiales y métodos.

En la purificación de la fracción poli A<sup>\*</sup> a partir de los RNA's totales, pudimos percibir una notable disminución de los RNA ribosomales además de que obtuvimos valores óptimos de rendimiento si los comparamos con aquellos reportados en la literatura (53).

Aunque se ha descrito un gran número de diferentes metodologías para la síntesis de DNA's complementarios (33,53,54), nosotros hemos utilizado aquella que involucra la síntesis de la primera cadena con transcriptasa inversa, seguido de la eliminación del templado de RNAm con RNasa H y la síntesis de la segunda cadena con DNA polimerasa I de Escherichia coli. Con este equipo enzimático pudimos obtener una eficiencia de síntesis del 64%, valor superior a los que generalmente se obtienen con otras metodologías (55).

La inspección computarizada de la secuencia previamente publicada del DNAc de hGH, nos permitió identificar dos sitios únicos de restricción que flanquean la región génica que codifica para la hGH madura. Hacia el extremo 5' del DNAc de hGH identificamos un sitio Aat II localizado en el codón -20 del péptido señalador (extensión aminoterminal de 26 aminoácidos), mientras que en el extremo opuesto detectamos un sitio Xma I localizado 4 nucleótidos después del codón de terminación. De acuerdo con estos hallazgos postulamos como hipótesis que la ligación de los DNA's complementarios de origen hipofisiario digeridos con Aat II y Xma I, con el fragmento mayor del plásmido pUC19, similarmente cortado, nos permitiría obtener fácilmente los plásmidos recombinantes portadores del DNAc de hGH. Lo anterior fue apoyado por el hecho de que Aat II y Xma I reconocen secuencias nucleotídicas que no son muy repetitivas en el genoma humano, de manera que solo una mínima fracción de los DNA's complementarios serían afectados por dichas enzimas de restricción, incluyendo por supuesto al DNAc de hGH.

Cuando analizamos el perfil electroforético de los DNA's complementarios intactos y aquellos que fueron digeridos con Aat II y Xma I, no pudimos detectar el DNAC de hGH como bandas de 820 y 640 pb, respectivamente. Lo anterior era de cualquier manera poco probable debido a la heterogeneidad de las moléculas de DNA's complementarios, por lo que únicamente pudimos apreciar un barrido de material génico en los carriles donde fueron aplicadas dichas muestras. Para solventar esta limitación, diseñamos un experimento de hibridación tipo Southern por medio del cual pudimos comprobar que la digestión del DNAC de hGH (820 pb) con Aat II y Xma I liberó un fragmento de 640 pb, el cual codifica para la hGH madura, así como también corroboramos la integración de dicho fragmento en el plásmido pUC19. Con los resultados de este experimento pudimos demostrar el éxito de nuestra estrategia de clonación preferencial.

Un resultado todavía más impactante y de "bona fide" fue que nuestra estrategia de clonación preferencial nos permitió obtener no solamente el DNA complementario para la hormona de crecimiento de 22 Kd, sino también el de aquel que codifica para la variante de 20 Kd.

Recientemente en nuestro laboratorio, Amaya Manzanares obtuvo el DNAC de la hormona de crecimiento bovina (bGH) mediante la elaboración de un banco de DNA's complementarios (56). En este trabajo solamente se pudo detectar un plásmido portador del DNAC de bGH de entre 2,000 clonas recombinantes. Por otra parte, en 1988 un extenso grupo de investigadores japoneses lograron la obtención del DNAC de la forma variante de hGH de 20 kd (57). Para ello cosecharon 2,400 clonas transformantes y después de realizar un tedioso análisis de hibridación de colonias *in situ*, detectaron 5 clonas positivas de las cuales únicamente 2 de ellas portaban la secuencia génica de longitud completa. En nuestro caso, el tamizaje de únicamente 18 clonas bacterianas nos permitió identificar 3 clonas portadoras del DNAC de hGH (dos que codifican para la hGH 22 kd y una para hGH 20 kd), lo cual pone de manifiesto la eficiencia y potencialidad de nuestra estrategia.

Dado que solamente se conocen las propiedades terapéuticas de la hGH de 22 Kd y puesto que ese es nuestro principal interés, únicamente determinamos la secuencia nucleotídica del DNAC de hGH de 22 Kd. Por análisis computacional encontramos que dicha secuencia presentó un 100% de homología con aquella reportada previamente en la literatura, con lo cual pudimos demostrar inequívocamente la integridad de nuestros resultados.

Debido al reciente descubrimiento y la baja abundancia de la hGH de 20 Kd en el tejido hipofisiario, el papel fisiológico de dicha variante permanece desconocido. Nuestro entendimiento acerca de la biología molecular, fisiología y evolución de ambas formas alternativas de hGH, dependerá de una futura fuente de versiones recombinantes de esas proteínas para realizar estudios comparativos.

## VII) CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

Utilizando técnicas modernas de Ingeniería Genética logramos obtener la secuencias nucleotídicas que en humanos son responsables de dirigir la síntesis de hGHs hipofisiarias.

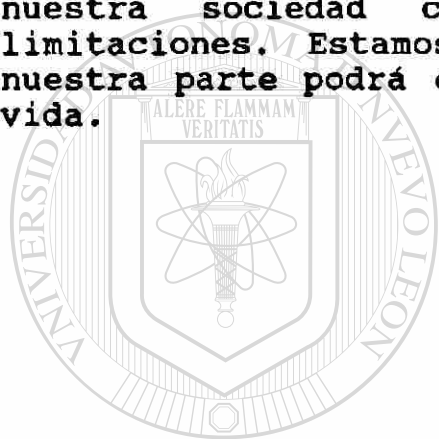
Nuestra modesta pero significativa aportación a los campos de la biotecnología para la salud y la endocrinología molecular, ha sido gracias a la realización de una serie de experimentos apoyados por estudios computacionales.

La estrategia experimental que diseñamos y utilizamos con éxito para el aislamiento del DNAC de hGH, fue una contribución original de nuestro grupo. Algunos grupos de investigadores han optado por simplificar los procesos de clonación molecular al enriquecer los RNA mensajeros o los DNA's complementarios de interés, ya sea en un gradiente de densidad, en electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida, o mediante una cromatografía de filtración en sefarosa, con el propósito de favorecer la clonación de aquellas moléculas con un tamaño similar al de la secuencia nucleotídica deseada. En nuestro caso, la digestión de los DNA's complementarios de hipófisis humanas con un par de enzimas de restricción y su directa ligación en el plásmido pUC19 nos permitió clonar rápida y eficientemente el DNAC de hGH. Esta innovadora estrategia nos condujo a obtener, por primera vez en toda América Latina, los DNA's complementarios tanto para la hormona de crecimiento humana de 22 Kd como para la forma variante de 20 Kd.

Si bien es cierto que únicamente obtuvimos la secuencia nucleotídica del DNAC de hGH de 22 Kd, recientemente realizamos una serie de experimentos encaminados a determinar si los dos DNA's complementarios eran capaces de producir proteína recombinante en células en cultivo (58). De una manera clara y conclusiva, los resultados de este trabajo demostraron que ambos DNAC's fueron capaces de expresar en células de mamífero, un polipéptido que es reconocido por anticuerpos anti-hGH.

Especial interés se le debe dar al origen, regulación e interacción de ambas formas de hGH y principalmente al papel fisiológico de la variante de 20 Kd. En nuestro laboratorio ya hemos iniciado los primeros estudios tendientes a elucidar el papel fisiológico de dicha variante (59). Estamos seguros que el contar ahora con el DNAC de hGH de 20 y 22 Kd, nos ayudará a entender las relaciones entre estructura y función de estos importantes reguladores metabólicos.

Finalmente, a partir de los resultados de las investigaciones aquí presentadas, se dará inicio a un proyecto en caminado a obtener a mediano plazo, hormona de crecimiento humana recombinante por fermentación bacteriana. El presente trabajo obedece a nuestro deseo y responsabilidad de demostrar a nuestro país el potencial que ofrece la Ingeniería Genética para mejorar las condiciones de vida de algunos miembros de nuestra sociedad condenados a una vida con serias limitaciones. Estamos concientes que un esfuerzo mas de nuestra parte podrá ofrecerles la posibilidad de una mejor vida.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## VIII) BIBLIOGRAFIA

- 1- Paladini, A.C., Peña, C. y Poskus, E. (1982). Molecular biology of growth hormone. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 19:25-36.
- 2- Martin, D.W., Rodwell, V.W., Mayer, P.A. y Granner, D.K. (1986). *Bioquímica de Harper. El Manual Moderno, S.A.* 10a. Edición, México, pp 525-529.
- 3- Wyngaarden, J.B. y Smith, L.H. (1988). *Cecil Textbook of Medicine.* W.B. Saunders Company. 18th Edition, Philadelphia, pp 1290-1297.
- 4- Kidd, V.J. (1983). The human growth hormone and placental lactogen gene complex. En "Perspectives on genes and the molecular biology of cancer". Ed. D.L. Robberson y G.F. Saunders. Raven Press, pp 143-167.
- 5- Harper, M.E., Barrera-Saldaña, H.A. y Saunders, G.F. (1982). Chromosomal localization of the human placental lactogen gene-growth hormone gene cluster to 17q22-24. *Am. J. Hum. Genet.* 34:227-234.
- 6- De Noto, F.M., Moore, D.D. y Goodman, H.M. (1981). Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acid. Res.* 9:3719-3730.
- 7- Chen, E.Y., Liao, Y., Smith, D.H., Barrera-Saldaña, H.A., Gelinas, R.E. y Seeburg, P.H. (1989). The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. *Genomics* 4:479-497.
- 8- Raity, S. y Tolman, R.A. (1986). *Human Growth Hormone.* Plenum Medical. 1st. Edition, New York, pp 1-66.
- 9- Frazer, T., Gavin, J.R., Daughaday, W.H., Hillman, R.E. y Weldon, V.V. (1982). Growth hormone dependent growth failure. *J. Pediatr.* 101:12-15.
- 10- Underwood, L.E., Fisher, D.A., Frasier, D.A., Gertner, J.M., Kaplan, S.L., Kirkland, R.T., Lipne, B.M. y Raiti, S. (1985). Degenerative neurologic disease in patients formerly treated with human growth hormone. *J. Pediatr.* 107:10-12.
- 11- The Medical Letter on Drugs and Therapeutics. (1985). Problems with growth hormone. *The Medical Letter, Inc., New Rochelle, N.Y.,* 27 (Issue 691):57-58.
- 12- The Medical Letter on Drugs and Therapeutics. (1985). Biosynthetic growth hormone. *The Medical Letter, Inc., New Rochelle, N.Y.,* 27 (Issue 702):101-102.



- 13- Norman, C. (1985). Virus scare halts hormone research. *Science* 228:1176-1177.
- 14- Joklik, W.K., Willet, H.P. y Amos, D.B. (1983). *Microbiología de Zinsser*. Editorial Médica Panamericana. 17a. Edición, Buenos Aires, 1217-1219.
- 15- Goeddel, D.V., Heyneker, H.L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura, D.G., Ross, M.J., Miozzari, G., Crea, R. y Seeburg, P.H. (1979). Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature* 281:544-548.
- 16- Becker, G.W. y Hsiung, H.M. (1986). Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 204:145-150.
- 17- Gray, G.L., Balridge, J.S., Mckeown, K.S., Heyneker, H.L. y Chang, C.N. (1985). Periplasmic production of correctly processed human growth hormone in *Escherichia coli* : natural and bacterial signal sequences are interchangeable. *Gene* 39:247-254.
- 18- Seeburg, P.H., Shine, J., Martial, J.A., Baxter, J.D. y Goodman. (1977). Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone. *Nature* 270:486-494.
- 19- Seeburg, P.H., Sias, S., Adelman, J., de Baer, H.A., Hayflick, J., Jhurani, P., Goeddel, D.V. y Heyneker, H.L. (1983). Efficient bacterial expression of bovine and porcine growth hormones. *DNA* 2:37-45.
- 20- Roskam, W.G. y Rougeon, F. (1979). Molecular cloning and nucleotide sequence of the human growth hormone structural gene. *Nucleic Acids Res.* 7:305-320.
- 21- Miller, W.L., Martial, J.A. y Baxter, J.D. (1980). Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. *J. Biol. Chem.* 255:7521-7524.
- 22- Martial, J.A., Hallewell, R.A., Baxter, J.D. y Goodman, H.M. (1979). Human growth hormone : complementary DNA cloning and expression in bacteria. *Science* 205:602-607.
- 23- Sun, M. (1985). Gene-spliced hormone for growth approved. *Science* 248:523.
- 24- Olson, K.C., Fenno, J., Lin, N., Harkins, R.N., Snider, C., Kohr, W.H., Ross, M.J., Douglas, F., Prender, G. y Stebbing, N. (1981). Purified human growth hormone from *Escherichia coli* is biologically active. *Nature* 293:408-411.

- 25- Jonsdottir, I., Ekre, H.P. y Perlman, P. (1983). Comparative study of pituitary and bacteria-derived human growth hormone by monoclonal antibodies. *Molec. Immun.* 20:871-876.
- 26- Beardsley, T. (1985). Human growth hormone : approval for synthetic products in U.S., Britain. *Nature* 317:659.
- 27- Brown, W.R.A. y Bird, A.P. (1986). Long-range restriction site mapping of mammalian genomic DNA. *Nature* 322:477-479.
- 28- Barrera-Saldaña, H.A. (1982). Expression of the human placental lactogen genes. Ph.D. Thesis. The University of Texas Health Science Center of Houston.
- 29- Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- 30- Rosen, J.M., Woo, S.L.C., Holder, J.W., Means, A.R. y O'Malley, B.W. (1975). Preparation and preliminary characterization of purified ovoalbumin messenger RNA from the hen oviduct. *Biochemistry* 14:69-78.
- 31- Davis, L.G., Dibner, M.D. y Battey, J.F. (1986). *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier Science Publishing Co. New York, pp 147-149.
- 32- Aviv, H. y Leder, P. (1972). Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligo thymidilic acid cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69:1408-1415.
- 33- Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pp 188-209.
- 34- Gubler, V. y Hoffman, B.J. (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25:263-269.
- 35- D'Alessio, J.M., Noon, M.C., Ley, H.L. y Gerard, G.F. (1987). One-tube double stranded cDNA synthesis using cloned MMLV reverse transcriptase. *Focus* 9:1-4.
- 36- Bethesda Research Laboratories. (1988). *cDNA Synthesis System. Instruction Manual*. Life Technologies Inc., Gaithersburg, M.D., pp 19-20.
- 37- Meesing, J. (1985). pUC18 and pUC19 restriction maps. *Focus* 7:11-13.
- 38- King, P.V. y Blakesly, R.W. (1986). Optimizing DNA ligations for transformation. *Focus* 8:1-3.

- 39- Southern, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-511.
- 40- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
- 41- Dagert, M. y Ehrlich, S.D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6:23-28.
- 42- Morelle, G. (1989). A plasmid extraction procedure on a miniprep scale. *Focus* 11:7-8.
- 43- Sadhu, C. y Gedamu, L. (1988). A procedure for the preparation of RNA-free plasmid DNA. *Biotechniques* 6:20-21.
- 44- Gobel, U., Maas, R., Bantel-Schal, U. y Clad, A. (1987). Rapid and quantitative electroelution and electro dialysis of DNA from gels. *J. Biochem. Biophys. Methods* 14:245-260.
- 45- Appleby, D.W. (1984). Diagnostic restriction enzyme digestion. *Focus* 6:5-6.
- 46- Meesing, J. (1988). M13, the universal primer and the polylinker. *Focus* 4:21-26.
- 47- Bethesda Research Laboratories. (1988). M13 Cloning/Dideoxy Sequencing. Instruction Manual. Life Technologies Inc., Gaithersburg, M.D., pp 8-27.
- 48- Mande, M. y Higa, A. (1970). Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53:159-162.
- 49- United States Biochemical Corporation. (1988). Step-by-step protocols for DNA sequencing with sequenase. USB Press, Cleaveland, pp 3-12.
- 50- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5463-5467.
- 51- Seeburg, P.H. (1982). The human growth hormone gene family : nucleotide sequences show recent divergence and predict a new polypeptide hormone. *DNA* 1:239-249.
- 52- Cooke, N.E., Ray, J., Watson, M.A., Kuo, B.A. y Liebhaber, S.A. (1988). Human growth hormone gene and the highly homologous growth hormone variant gene display different splicing patterns. *J. Clin. Invest.* 82:270-275.

- 53- Walker, J.M. (1984). *Methods in Molecular Biology*. Vol. 2. Humana Press. Clifton, N.J., pp 101-120.
- 54- Berger, S.L. y Kimmel, A.R. (1987). *Guide to Molecular Cloning Techniques*. *Methods in Enzimology* 152:307-371.
- 55- Polites, H.G. y Marotti, K.R. (1986). A step-wise protocol for cDNA synthesis. *Biotechniques* 4:514-520.
- 56- Amaya Manzanares, F. (1988). Obtención del DNA complementario de la hormona de crecimiento bovina. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, México.
- 57- Masuda, M., Watahiki, M., Tanaka, N., Yamakawa, M., Shimizu, K., Nagai, J. y Nakashima, K. (1988). Molecular cloning of cDNA encoding 20 KDa variant human growth hormone and the alternative splicing mechanism. *Bioch. Biophys. Acta* 949: 125-131.
- 58- Ramírez-Solís, R., Reséndez-Pérez, D., Alvidrez-Quihui, L.E., Rincón-Limas, D.E., Varela-Martínez, R., Martínez-Rodríguez, H.G. y Barrera-Saldaña, H.A. (1990). New vectors for the efficient expression of mammalian genes in cultured cells. *Gene* (en prensa).
- 59- Rincón-Limas, D.E., Reséndez-Pérez, D., Alvidrez-Quihui, L.E., Castro-Muñoz Ledo, F., Kuri-Karcuch, W. y Barrera-Saldaña, H.A. (1990). Cloning, expression and demonstration of in vitro adipogenic activity of human pituitary growth hormones. *Gene* (sometido para publicación).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



