



"CLONACION, SECUENCIACION Y EXPRESION BACTERIANA DEL
ADN_c DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO CANINO"

FOR
JORGE ANGEL ISIDRO ASCACIO MARTINEZ

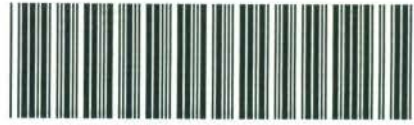
TESIS
PRESENTADA A MAESTROS Y ESTUDIANTES DE LA
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD
AUTONOMA DE NUEVO LEON

COMO PREREQUISTO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA.

MONTERREY, N. L., MEXICO

MAYO DE 1995

a-901



1020090174

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

245 "CLONACION, SECUENCIACION Y EXPRESION BACTERIANA DEL
ADNc DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO CANINO"

Por

a-100-02
JORGE ANGEL ISIDRO ASCACIO MARTINEZ

TESIS

Presentada a Maestros y Estudiantes de la
Facultad de Medicina de la Universidad
Autónoma de Nuevo León.

Como requisito para obtener el grado de

a-502 (Maestro en Ciencias
con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.)

a-260 Monterrey, N.L., México

Mayo de 1995

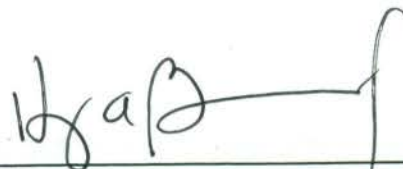
a-300 = 89h.

"CLONACION, SECUENCIACION Y EXPRESION BACTERIANA DEL
ADNc DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO CANINO"

Por

Jorge Angel Isidro Ascacio Martínez

Aprobó:




Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.
Director de tesis.



Dra. Herminia Gpe. Martínez.



Dr. José María Viader Salvadó.



Dr. Julio Sepúlveda Saavedra.



Dra. María del Socorro Flores.

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, en la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

DEDICATORIAS

A mi padre José Isidro, quien siempre me ha apoyado en todo especialmente para lograr mi superación personal y en el estudio.

A mi incansable madre Virginia quien siempre me dió consejos y me alentó a seguir adelante en cada una de mis metas.

A mis dos mujeres, Anaísa J., mi pequeña Gordolobita y mi esposa Ana Isabel, a quienes amo y he sentido su apoyo para la conclusión de este trabajo.

A mis hermanos Weelui (Wella po) quien a pesar de la distancia siempre se preocupó en hablarme para darme un empujoncito emocional y seguir adelante; a Patricia , Zadaki, Naydú, Anaitis, José Rodolfo, Anahtoth, Salvador y Carlitos.

A Eunice por su apoyo en la realización del trabajo de Tesis.

A mi amigo Hugo Alberto Barrera Saldaña, quien supo tenerme paciencia y me dió la mano siempre que lo necesité. Por personas como él es que uno se fija metas superiores en el campo científico, gracias.

Muy especialmente para mi amigo "El compañero" César Molina con el cual incursioné en las primeras odiseas científicas.

Sin olvidar a mi amigo Adolfo Céspedes quien siempre me apoyó a pesar de nuestras diferencias.

A todos aquellos a quienes seria muy largo de enlistar y que se interesaron por saber los avances de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis, Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña, quien con su gran apoyo como maestro y amigo me ayudó en la realización y terminación de este trabajo. A él, mil gracias.

A la Comisión de Tesis, por sus valiosas sugerencias y por el análisis del manuscrito.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme otorgado una beca para la realización de mis estudios de postgrado.

A las secretarías más eficientes de ésta Universidad, Mirthala y Raquel, por su valiosa ayuda y disposición.

Al Dr. Antonio Luna, por su excelente trabajo fotográfico y su gran disposición.

A todos mis compañeros de trabajo, Victor, Rocío, Dr. Juan Pablo Ricardo, Augusto, Feli, Carmen, Claudio, Ataúlfo, Javier, Ana Cecilia, Hugo, Norma, Roberto, Mario, Diana, Luis Enrique, Ana María, Jorge, Dolores, Eddy, Dector, Polo, David a todos ellos gracias por el apoyo que me brindaron durante mi estancia en la ULIEG y sobre todo por su amistad.

Y a mi esposa, Anabelle, quien a pesar de su estado, compartió conmigo momentos de alegría, tristeza y desvelos hasta el final de este trabajo.

INDICE

Lista de abreviaturas	i
Lista de figuras y tablas	ii
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCION	
Biotecnología	2
Hormonas del crecimiento.....	2
Reseña histórica de las GHs	3
Acciones metabólicas de las GH.....	4
Variabilidad de Especie: GH canina (DGH)-vs-humana (HGH)	4
Enanismo pituitario en perros	4
Signos clínicos de la deficiencia de DGH	5
Concentraciones basales de DGH.....	5
Tratamiento de deficiencia de DGH.....	5
Disponibilidad de DGH y objetivos del presente trabajo	6
III. HIPOTESIS	7
IV. OBJETIVOS	7
V. MATERIALES	
Origen de los reactivos.....	8
Material Biológico.....	8
VI. METODOS Y ESTRATEGIAS	
Estrategia general	9
Reacción en cadena de la polimerasa.....	10
Estrategia para la clonación molecular del ADN complementario (ADNc) de DGH.....	11
Diseño de los iniciadores consenso utilizados en la amplificación del ADNc de DGH.....	12
Extracción del ARN total de hipófisis caninas por el método de isotiocianato de guanidina-fenol cloroformo	13
Electroforesis de ARN en geles de agarosa urea-ácido	15
Criterios para establecer la cantidad, pureza e integridad del ARN extraído	15
Síntesis de la primera cadena del ADNc.....	16
Recuperación del ADN sujeto a cualquier tratamiento enzimático.....	16
Precipitación del ADN con etanol	17
Reacción en cadena de la polimerasa (RCP)	18
Clonación del ADNc de DGH en bacteriófagos M13	19
Preparación de plásmidos o bacteriófagos a gran escala.....	21
Digestión con enzimas de restricción	23
<i>Escherichia coli</i> JM101 calcio competentes y transformación con M13	24
Análisis del ADN de clonas fágicas recombinantes	26

Minipreparación de fagos por el método de lisis alcalina.....	27
Obtención del ADN de cadena sencilla del fago quimérico M13	28
Determinación de la secuencia nucleotídica por el método de terminación de cadena por dideoxinucleótidos	29
Preparación y corrida del gel de poliacrilamida-urea	32
Secado y autoradiografía del gel de secuenciación.....	34
Purificación de fragmentos de ADN a partir de agarosa de bajo punto de fusión por el método "Gene Clean"	37
Estrategia para clonar la región 3' no traducible del ADNc de la DGH.....	38
Comparaciones de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas entre DGH y diferentes GHs de mamíferos	39
Subclonación del ADNc de DGH y estrategia de enfasamiento	39
Preparación de bacterias calcio-competentes.....	41
Minipreparación de plásmidos por el método de lisis alcalina	42
Crecimiento de plásmidos a mediana escala	43
Ensayo de expresión de DGH en <i>Escherichia coli</i>	46
Purificación de MBP-DGH a partir de cuerpos de inclusión.....	46
Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS	47
Liberación de DGH del complejo MBP-DGH por corte enzimático	49
Inmunoelectrotransferencia o "Western Blot"	50

VII. RESULTADOS

Extracción del ARN total a partir de hipófisis caninas	53
Amplificación del ADNc de DGH por la RCP.....	54
Clonación del ADNc de DGH	54
Determinación de la secuencia nucleotídica de la región codificante	55
Secuencia nucleotídica de la región 3' no traducible	57
Características del ADNc de DGH y su proteína	67
Comparación aminoacídica de la GH madura del perro-vs-zorro rojo, caballo, elefante africano y humano.....	69
Enfasamiento y subclonación del ADNc de DGH	71
Expresión y detección de DGH en <i>Escherichia coli</i>	73
Separación enzimática de DGH del complejo MBP-DGH	76

VIII. DISCUSION

78

IX. CONCLUSIONES

82

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

83

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia.
ADN	Acido desoxirribonucleico.
ADNc	ADN complementario al ARNm.
ARN	Acido ribonucleico.
ARNm	ARN mensajero.
ARNr	ARN ribosomal.
ARNtot	ARN total.
ATP	Trifosfato de Adenosina.
ATR.	Amortiguador de transcriptasa reversa.
BGH	Hormona del crecimiento bovino.
Ci	Curie.
D.O.	Densidad optica.
DEPC	Dietil pirocarbonato.
DGH	Hormona del crecimiento del perro (secuencia aminoacídica).
dGH	Hormona del crecimiento del perro (secuencia nucleotídica).
DGHR	DGH recombinante.
dNTPs	Desoxinucleótidos.
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético.
g	Gramos.
GHs	Hormonas del crecimiento.
h	Hora (s).
HGH	Hormona del crecimiento humano.
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido piranosa.
Kd	Kilodaltones.
l	Litros.
M	Concentración Molar.
MBP	Proteína de unión a maltosa.
mg	Miliogramos.
ml	Mililitros.
mm	Milímetro.
mM	Concentración milimolar.
ng	Nanogramos.
nuc	Nucleótidos.
LMP	Bajo punto de fusión.
OGH	Hormona del crecimiento ovino.
pb	Pares de bases.
PGH	Hormona del crecimiento porcino.
pH	$-\log [H^+]$.
poli-A	Acido poliadenílico.
RCP	Reacción en cadena de la polimerasa.
RIA	Radioinmunoensayo.
rpm	Revoluciones por minuto.
S	Unidades Svedberg.
s	Segundos.
SDS	Lauril sulfato de sodio.
SEVAG	Cloroformo-alcohol-isoamílico (24:1).
T.A.	Temperatura ambiente.
TAE	Tris-acetato-EDTA.
T.R.	Transcriptasa reversa.

U
UV
μg
μl
μM
°C

Unidades.
Ultravioleta.
Microgramos.
Microlitros.
Micromolar.
Grados Celsius.

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla I.- Algunas secuencias de hormonas del crecimiento	3
Tabla II.- Similitud (%) aminoacídica entre la DGH y las GHs del cerdo, visón, vaca y borrego	70
Tabla III.- Similitud (%) nucleotídica entre el ADNc de DGH y los del visón, cerdo, vaca y borrego	70
Figura 1.- Estrategia general del trabajo experimental.....	9
Figura 2.- Pasos y ciclos de la RCP	11
Figura 3.- Estrategia experimental para clonar el ADNc de DGH	12
Figura 4.- Iniciadores utilizados en la RCP	13
Figura 5.- Secuenciación de M13mp18-DGH y M13mp19-DGH	20
Figura 6.- Reacción de secuenciación	30
Figura 7.- Ejemplo de lectura de un gel de secuenciación	36
Figura 8.- Estrategia para enfasar y subclonar el ADNc de DGH	40
Figura 9.- Estrategia para expresar DGH	45
Figura 10.- Sitio de corte del factor Xa	49
Figura 11.- Secuencia del proceso de inmunoelectrotransferencia	50
Figura 12.- Secuencia de ensamblado del sistema de electrotransferencia	52
Figura 13.- Perfil electroforético del ARN total de hipófisis canina	53
Figura 14.- Amplificación del ADNc de DGH	54
Figura 15.- Inicio y dirección de la secuenciación en las clonas de M13.....	56
Figura 16.- Iniciador genérico utilizado en la RCP para clonar la región 3' no traducible.....	57
Figura 17.- Secuencia nucleotídica del ADNc de DGH a partir del nucleótido 1 al 96 (codones del 1 al 32).....	59
Figura 18.- Secuencia nucleotídica del ADNc de DGH a partir del nucleótido 97 al 237 (codones del 33 al 79)	60
Figura 19.- Secuencia nucleotídica del ADNc de DGH a partir del nucleótido 238 al 345 (codones del 80 al 115)	61
Figura 20.- Secuencia nucleotídica del ADNc de DGH a partir del nucleótido 346 al 429 (codones del 116 al 143)	62
Figura 21.- Secuencia nucleotídica del ADNc de DGH a partir del nucleótido 430 al 540 (codones del 144 al 180)	63
Figura 22.- Secuencia nucleotídica del ADNc de DGH a partir del nucleótido 541 al 651 (codones del 181 al 217)	64
Figura 23.- Secuencia nucleotídica del ADNc de DGH a partir del nucleótido 547 al 651.....	65
Figura 24.- Secuencia nucleotídica del ADNc de DGH a partir del nucleótido 652 al 754.....	66
Figura 25.- Secuencia nucleotídica del ADNc de DGH y su similitud con otras de mamíferos.....	67
Figura 26.- Secuencia aminoacídica de la DGH y su similitud con otros GHs de mamíferos.....	68
Figura 27.- Mapa de restricción del ADNc de DGH	71
Figura 28.- Caracterización enzimática de pMALc-DGH	72
Figura 29.- Mapa de restricción de pMALc-DGH	73
Figura 30.- Expresión de DGH como proteína de fusión	74
Figura 31.- Inmunodetección de DGH	75
Figura 32.- Liberación de DGH a partir de la fusión MBP-DGH	76
Figura 33.- Liberación de DGH por el factor Xa.....	77
Figura 34.- Representación computacional de la estructura tridimensional de la PGH.....	80

I. RESUMEN.

Describimos la clonación, determinación de la secuencia nucleotídica y la expresión en *Escherichia coli*, del ADN complementario (ADNc) al ARN mensajero (ARNm) de la hormona del crecimiento (GH) del perro (DGH). El ARN total fue aislado a partir de hipófisis caninas y lo utilizamos para llevar a cabo la síntesis del ADNc por la reacción de la transcriptasa reversa. Posteriormente amplificamos específicamente el ADNc de DGH por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), utilizando iniciadores basados en secuencias consenso obtenidas después de comparar varios ADNcs de algunas GHs de mamíferos. Estos iniciadores incluyeron sitios artificiales de reconocimiento para ciertas enzimas de restricción en sus extremos 5' para así facilitar subsecuentes manipulaciones.

El producto amplificado fue clonado en vectores M13, donde le determinamos por el método enzimático su secuencia nucleotídica en ambas cadenas, partiendo de dos series de clones independientes; una derivada del experimento de clonación por la RCP utilizando los iniciadores consenso y la otra se derivó a partir de un segundo experimento de la RCP donde reemplazamos el iniciador consenso 3' por un iniciador poli d(T), capaz de aparearse con la cola de poli-A presente en los ARNs de mamíferos y de esta manera permitir amplificar la región 3' no traducible del ARNm de DGH.

El ADNc de DGH fue luego manipulado en su región 5' para enfatizarse a la secuencia del vector de expresión pMALc en el cual fue subclonado para originar la construcción pMALc-DGH, de cuya expresión se derivó una proteína de fusión entre la proteína de unión a la maltosa (codificada por el vector) y la hormona del crecimiento del perro (DGH). Este producto de fusión fue fácilmente detectable entre las proteínas totales de las bacterias resueltas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, tanto cuando fue el gel teñido con azul brillante de Coomassie, como cuando fue tratado para detección por inmunoreacción utilizando el suero anti-hormona del crecimiento bovino (anti-BGH).

La secuencia nucleotídica consta de 648 pb que codifican para una proteína madura de 190 aminoácidos (22 Kd). Además contiene 26 aminoácidos del péptido líder. La secuencia aminoacídica deducida de la porción madura de la hormona del crecimiento del perro presenta una similitud del 100%, 98.4%, 90.5% y 89.5% con las hormonas del crecimiento del cerdo, visón, vaca y borrego, respectivamente. Esta es la primera vez que la secuencia nucleotídica del ADNc de una GH de un miembro de la familia Canidae ha sido determinada y el primer reporte de una similitud total entre dos hormonas del crecimiento de animales de diferentes ordenes.

II INTRODUCCION.

Biotecnología.

Las industrias farmacéutica y agropecuaria han sido las más beneficiadas con el desarrollo vertiginoso de las técnicas del ADN recombinante. Hoy en día se puede transferir el gen para determinado producto a bacterias, las cuales pueden reconocer la información como propia, expresando el gen insertado de tal forma que el producto se sintetiza en cantidades que rebasan por mucho las obtenidas del sistema natural, donde además es generalmente difícil de extraerlo, y por ende incosteable su producción.

Gracias a las técnicas del ADN recombinante, la escasa disponibilidad de muchas proteínas con valor comercial ha dejado de ser un problema. Ahora éstas se elaboran en sistemas microbiológicos reprogramados por Ingeniería Genética (Murray, 1980) donde la síntesis de la proteína recombinante está finamente controlada y regulada. El producto recombinante es tan bueno en función e idéntico o casi igual en composición que el natural.

Dentro de los muchos genes que se han clonado y expresado en sistemas bacterianos, se encuentran hormonas para la medicina humana, tales como la insulina (Sanger y Tuppy, 1951; Sanger y Thompson, 1953; Villa-Komaroff y cols, 1978; Goeddel y cols, 1979a) y la del crecimiento (Goeddel y cols, 1979b), ambas de origen humano. En el caso de hormonas del crecimiento (GHs) de interés agropecuario que están siendo producidas están la del cerdo (Seeburg y cols, 1983), vaca (Miller y cols, 1980; Woychik y cols, 1982) y pollo (Zhvirblis y cols, 1987; Lamb y cols, 1988).

A la fecha, no se ha publicado la clonación molecular ni las secuencias nucleotídica y aminoacídica de la hormona del crecimiento canino (DGH), ni existen éstas en los bancos internacionales de genes y proteínas. Esta información podría ser de gran valor para la síntesis de DGH recombinante y por consecuencia en la valoración de su potencial biotecnológico. No menos importante resultarían los estudios de estructura y función de ésta para la Biología y Fisiología Comparativas, lo que sin duda redundaría en una mejor comprensión de estos reguladores del metabolismo; incluso pudiera extrapolársele en la medicina veterinaria, los beneficios que la hormona del crecimiento humano obtenida por Ingeniería Genética ya ofrece a la medicina humana.

Hormonas del Crecimiento.

Las GHs de mamíferos son polipéptidos de alrededor de 190 aminoácidos con peso molecular aproximadamente de 22000 daltones (22 Kd). Son producidas y secretadas por los somatotrofos de la hipófisis anterior y son responsables de estimular el crecimiento lineal en los animales (Daughaday, 1981).

GHs son miembros de una familia de hormonas que incluyen prolactinas y lactógenos placentarios. Estas hormonas poseen estructuras similares (Catt y cols, 1967; Sherwood, 1967; Niall y cols, 1971) y comparten propiedades funcionales e inmunológicas (Niall y cols, 1973), por lo que se ha considerado que sus genes han evolucionado a partir de un gen ancestral común (Seeburg, 1982; Miller y Eberhardt, 1983).

De entre las secuencia nucleotídicas de los genes y/o los ADNcs de las GHs (vease tabla I) de mamíferos que han sido determinadas están: la del humano (DeNoto y cols, 1981; Seeburg, 1982), rata (Barta y cols, 1981; Page y cols, 1981), ratón (Linzer y Talamantes 1985), cerdo (Seeburg y cols, 1983), vaca (Miller y cols, 1980; Woychik y cols, 1982), oveja (Warwick y cols,

1989), cabra (Yamano y cols, 1988; Yato y cols, 1988) y visón (Shoji y cols, 1990; Harada y cols, 1990); entre las de aves se encuentran: la del pollo (Zhvirblis y cols, 1987; Lamb y cols, 1988), pavo (Foster y cols, 1990) y pato (Chen y cols, 1988); entre los de peces se cuenta con: la del salmón (Sekine y cols, 1985; González-Villaseñor y cols, 1988; Sekine y cols, 1989; Lorens y cols, 1989), atún (Sato y cols, 1988), carpa (Ho y cols, 1989; Chao y cols, 1989), tilapia (Rentier-Delrue y cols, 1989a), trucha (Agellon y Chen, 1986; Agellon y cols, 1988; Agellon y Chen, 1988; Rentier-Delrue y cols, 1989b) y anguila (Saito y cols, 1988); y entre las de anfibios tenemos la rana (Pan y Chang, 1988) y el sapo (Martens y cols, 1989). De las GHs del mono (Li y cols, 1986), elefante africano (Hulmes y cols, 1989), caballo (Zakin y cols, 1976) y zorro rojo (Li y cols, 1989), únicamente se ha determinado por completo la secuencia aminoacídica de la hormona madura.

Tabla 1. Algunas secuencias de hormonas del crecimiento.

MAMIFEROS	AVES	ANFIBIOS	PECES
* Caballo (1976)	+ Pato (1988)	+ Rana (1988)	+ Salmon (1985)
+ Rata (1977)	+ Pollo (1989)	+ Sapo (1989)	+ Trucha (1986)
+ Vaca (1980)	+ Pavo (1990)		+ Atun (1988)
+ Humano			+ Anguila (1988)
+ Raton (1985)			+ Carpa (1989)
* Mono (1986)			+ Tilapia (1989)
+ Puerco (1987)			
+ Borrego (1988)			
+ Cabra (1989)			
* Elefante (1989)			
* Zorro (1989)			
+ Visón (1990)			

+ Secuencia nucleotídica

* Secuencia aminoacídica

Reseña histórica de las GHs.

El efecto de promover el crecimiento de los extractos acuosos de hipófisis, fue demostrado primeramente en bovinos por Evans y Long, desde 1921, pero no fue hasta 1944 que se aisló la hormona del crecimiento bovino (BGH) (Li y Evans, 1944). La falla de los investigadores para inducir el efecto supuesto de la BGH sobre primates dió cabida a dudas respecto al papel fisiológico de ésta. Knobil y cols (1957) demostraron que la ausencia de efecto se debió a la especificidad de especie, es decir, la hormona del crecimiento de una especie superior en la escala evolutiva tiene efecto sobre las especies inferiores, pero no viceversa.

Raben (1957) preparó hormona del crecimiento humano (HGH) biológicamente activa a partir de hipófisis humanas, siendo su estructura primaria elucidada por Li y Dixon en 1971. Después ésta fue corregida por Niall y cols en 1973.

Salmon y Daughaday en 1957 presentaron evidencia de un factor activo en el suero que estaba bajo el control de GH que estimula *in vitro* la incorporación de sulfato en el cartílago. Este mediador de la acción de GH fue denominado factor sulfatante. Estudios clínicos demostraron que los niveles séricos del factor sulfatante estaban correlacionados positivamente con los de GH. En

investigaciones posteriores se descubrió que este factor de sulfatación estimulaba también la síntesis del ADN, ARN, proteínas e hidroxiprolina en condrocitos; promovía la multiplicación de células en cultivo en medios exentos de suero; además presentaba actividad insulínica en todos los tejidos corporales (Spencer, 1983). Por causa de estas propiedades el nombre de factor de sulfatación le fue reemplazado por el de somatomedina, pensando que reflejaba mejor su función primaria: mediador del efecto promotor del crecimiento por la GH.

Acciones metabólicas de las GH.

La hormona del crecimiento tiene efectos anabólicos y catabólicos, los cuales son mediados principalmente a través de la regulación de la concentración en plasma y de la acción fisiológica de la insulina y la somatomedina C. La GH antagoniza la acción de la insulina y estimula la secreción de la somatomedina C. El efecto catabólico de GH es el resultado directo del efecto anti-insulínico de la hormona en los tejidos, mientras que los efectos anabólicos de las GHs son mediados principalmente a través de la secreción de somatomedina C por el hígado (Ganong, 1981; Daughaday, 1985).

Variabilidad de especie: GH canina (DGH)-vs-humana (HGH).

Parece ser que existen diferencias respecto al estímulo en la secreción de GH entre perros y humanos, por ejemplo, el ejercicio moderado estimula la secreción de GH en humanos (Ney y cols, 1974) pero aparentemente no en perros (Tsushima y cols, 1971). La arginina, un estimulante potente de la secreción de GH en humanos, ha dado resultados inconsistentes cuando es administrada a perros (Tsushima y cols, 1971; Hampshire y cols, 1975). La respuesta de la GH a la hipoglicemia inducida por la insulina ha sido también inconsistente en perros; algunos investigadores reportan un incremento claro de la GH en el hombre y en el perro (Burns, 1974; Ney, 1974; Cocola y cols, 1976), mientras que otros documentan una respuesta lenta (Tsushima y cols, 1971). De igual manera, la hiperglicemia resultante de una infusión de glucosa inhibe la secreción de GH en humanos (Ney, 1974) pero tiene un efecto nulo o mínimo en perros (Tsushima y cols, 1971; Cocola y cols, 1976). Por la variabilidad de especie parece ser inapropiado asumir que los factores que afectan la secreción de GH en humanos tendrían automáticamente un efecto similar en perros.

Enanismo pituitario en perros.

El enanismo pituitario se presenta principalmente en los perros pastor alemán, aunque también ha sido descrito en otras razas que incluyen al weimaraner, spitz, toy pinscher y en el perro oso de Carnelian, e incluso este fenómeno también se ha descrito en el gato (Krook, 1969; Andresen y Willeberg, 1976b; Roth y cols, 1980). Herencia autosómica recesiva simple para el enanismo se ha reportado en el pastor alemán y en el perro oso de Carnelian (Andresen y cols, 1974; Willeberg y cols, 1975; Andresen y Willeberg, 1976a; Andresen y Willeberg, 1976b; Nicholas, 1978). Parece ser que no hay predilección sexual para el enanismo pituitario en perros. El animal afectado comienza a mostrar signos clínicos (vg. deja de crecer) alrededor del segundo o tercer mes de vida. De cualquier forma, la edad a la que se sugiere el cuidado veterinario es variable. Generalmente el animal es examinado antes de que cumpla el año de edad a causa de la falla del crecimiento o por anomalías dermatológicas.

Puede haber diferentes etiologías para la baja o nula eficiencia de la GH en perros maduros: a) deficiencia del factor hipotalámico liberador de la hormona del crecimiento; b) producción excesiva del factor inhibidor de la hormona del crecimiento; c) producción deficiente de hormona del crecimiento por los somatotrofos de la hipófisis; d) producción de hormona del crecimiento biológicamente inactiva; e) destrucción de la hormona del crecimiento circulante y f) células blanco insensibles a la hormona del crecimiento.

Signos clínicos de la deficiencia de DGH.

Las manifestaciones clínicas del enanismo pituitario son variadas, aunque la falta de crecimiento (estatura corta) y los problemas dermatológicos, están presentes consistentemente (Feldman y Nelson, 1987). La mayoría de los perros enanos pituitarios permanecen alertas y activos mientras que son jóvenes. A medida que envejecen se vuelven progresivamente torpes, faltos de energía e inactivos. Interesantemente, la mayor parte de los perros enanos pituitarios mantienen un contorno y proporciones normales del cuerpo. El hiposomatotropismo en el perro maduro afecta primeramente el crecimiento del pelo y la pigmentación de la piel.

Durante los primeros 2 o 3 meses de vida, los perros enanos, aparentan normalidad y son indistinguibles de sus compañeros normopituitarios. Después de este tiempo, el pelambre se presenta notablemente más corto, el animal sufre alopecia simétrica bilateral especialmente en las áreas de fricción en el cuello y garganta (región del collar) y en la parte posterolateral de los muslos (región donde se sienta). La piel alopécica al principio está normalmente pigmentada, después viene el proceso de pigmentación hasta la hiperpigmentación (de gris a café hasta negro).

Concentraciones basales de DGH.

Cuando son determinadas por radioinmunoensayo homólogo específico de especie, los niveles de GH basales normales en perros van de 1.5 a 4.3 ng/ml en plasma (Eigenmann, 1983; Tsushima y cols, 1971). Desafortunadamente la concentración basal normal en perros con hiposomatotropismo puede estar incluida en este intervalo (Eigenmann, 1983; Scott y cols, 1978; Parker y Scott, 1980; Eigenmann y Patterson, 1984), haciendo difícil el diagnóstico de hiposecreción cuando se está tomando en cuenta únicamente los niveles basales de la GH.

Tratamiento de deficiencia de DGH.

La terapia para el enanismo pituitario consiste en la administración de GH; sin embargo la purificación de GH a partir de hipófisis es difícil y por ende un proceso costoso. Afortunadamente las GHs de los mamíferos están biológicamente interrelacionadas; la GH humana parece ser activa en animales filogenéticamente inferiores, tal y como es el caso para el perro (Tsushima y cols, 1971; Cocola y cols, 1976; Eigenmann, 1983). De aquí que la GH humana, así como las GHs que se derivan de otras especies de mamíferos, puedan utilizarse para el perro. También la BGH y hormona del crecimiento porcino (PGH) han sido utilizadas experimentalmente para el tratamiento del enanismo pituitario en perros (Siegel, 1977; Eigenmann, 1981). No obstante, se pueden desencadenar reacciones potencialmente adversas a la terapia con GH, que incluyen reacciones de hipersensibilidad y la producción de diabetes mellitus. Efectos positivos plenamente visibles en la terapia con GH sobre perros adultos incluyen regeneración del pelo y engrosamiento de la piel; dichos cambios son visibles generalmente dentro de 4 a 6 semanas después de haber iniciado la terapia.

Disponibilidad de DGH.

Los métodos para el aislamiento y purificación de la DGH fueron descritos primeramente en 1968 (Wilhelmi, 1968) y otra vez en 1969 (Hashimoto, y cols, 1969). Se encontró que la DGH tiene un peso molecular de aproximadamente 22000 daltones (22 Kd) y que el residuo de fenilalanina comprendía la parte carboxi y amino terminal de la proteína, como sucede para la hormona del crecimiento ovino (OGH), PGH, BGH y HGH. La composición aminoacídica y otras propiedades químicas de la DGH se encontraron muy similares a aquellas de PGH.

Reactividad inmunológica cruzada parcial (Tushima y cols, 1971) y del 100% (Cocola y cols, 1976) con PGH ha sido reportada para DGH. Esto ha sugerido que PGH puede sustituir a DGH en un RIA heterólogo para DGH. Reactividad inmunológica cruzada de menor extensión ha sido descrita para BGH y OGH; en cambio con HGH no se obtuvo reacción cruzada (Cocola y cols 1976).

III. HIPOTESIS.

El diseño de iniciadores consenso derivados de regiones nucleotídicas conservadas al inicio y al final de los ADNc de las GHs de distintos mamíferos, nos permitirá, usando ARN de hipófisis caninas y la RCP, amplificar específicamente el ADNc de la DGH.

IV. OBJETIVOS.

Con la realización de este trabajo buscamos contribuir al conocimiento básico en el área de la endocrinología comparada, así como al desarrollo de la biotecnología veterinaria, mediante la obtención de la información genética necesaria para la producción de hormona biosintética del crecimiento canino. Por ello el objetivo general que se persiguió

Objetivo general:

Clonar, secuenciar y expresar en bacterias el ADNc de la hormona del crecimiento canino.

Objetivos particulares:

Para lograr el anterior objetivo general nos propusimos los siguientes objetivos particulares.

- 1.- Obtener los ARNs totales de hipófisis caninas.
- 2.- Sintetizar los ADNs complementarios (ADNcs) de los ARNs totales por la reacción de la transcriptasa reversa (T.R.).
- 3.- Diseñar los iniciadores que nos permitan amplificar únicamente el ADNc de la DGH, por la reacción en cadena de la polimerasa (RCP).
- 4.- Amplificar específicamente por la RCP el ADNc de la DGH y su región 3' no traducible.
- 5.- Clonar el ADNc de DGH en un vector para determinar su secuencia nucleotídica, deducir la aminoacídica y elaborar su mapa de restricción.
- 6.- Subclonar el ADNc de DGH en un vector para expresión en *Escherichia coli* como proteína de fusión con la proteína de unión a maltosa, (MBP).
- 7.- Expresar y caracterizar la DGH recombinante (DGHr).

V. MATERIALES.

Origen de los reactivos:

Enzimas de restricción y de modificación de ácidos nucleicos fueron compradas a Bethesda Research Laboratories, Inc. (BRL, Gaithersburg, MD, EUA) y a New England Biolabs, Inc. (NEB, Beverly, MA, EUA), siguiendo las recomendaciones de cada compañía para su utilización. El nucleótido radiactivo ^{35}S -dATP necesario para llevar a cabo la determinación de la secuencia nucleotídica fue adquirido de Amersham International (Buckinghamshire, UK). Para llevar a cabo la determinación de la secuencia nucleotídica del ADNc de DGH utilizamos el estuche "Sequenase version 2.0" adquirido de United States Biochemical, Inc. (USB, Cleveland, OH, EUA).

Para llevar a cabo la síntesis de la primera cadena de ADNc al ARN total de hipófisis de perro utilizamos el estuche para sintetizar ADNc de la compañía BRL.

Los iniciadores necesarios para llevar a cabo la amplificación del ADNc de DGH, diseñados como consensos para las secuencias de diferentes ADNcs de GHs de mamíferos (vease estrategia), fueron sintetizados por la compañía BioSynthesis, (Lewisville, TX.).

Reactivos para elaborar las soluciones necesarias para realizar este trabajo (amortiguadores, soluciones salinas, medios de cultivo, geles etc.) se obtuvieron de las siguientes casas comerciales: Sigma Chemical Company, Inc (ST. Louis, MO); Merck (Monterrey, México) y Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee, WI).

Material Biológico:

Recuperamos un total de 1.4 g de hipófisis caninas del sacrificio de 17 perros empleados en prácticas del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UANL. Apenas muertos los animales, procedimos a la extracción de las hipófisis en el menor tiempo posible e inmediatamente las lavamos en solución salina fría y las colocamos sobre CO_2 sólido para trasladarlas al tanque de nitrógeno líquido, donde se pueden almacenar indefinidamente.

Los vectores utilizados para la clonación, determinación de la secuencia nucleotídica y expresión del ADNc de DGH (series pMAL y M13) fueron adquiridos de NEB.

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas fueron TB1, RR1 y JM101, la primera adquirida de NEB y las otras de la bacterioteca de la ULIEG.

Plásmidos, bacteriófagos y cepas de *Escherichia coli* empleados en este trabajo provienen de la genoteca y bacterioteca de nuestra Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL.

VI. METODOS Y ESTRATEGIAS.

Estrategia general.

A partir de glándulas pituitarias recuperadas de perros extrajimos los ARN totales, y con éstos sintetizamos los ADNc por medio de la transcriptasa reversa. Amplificamos específicamente el ADNc de DGH por la RCP, el cual clonamos en el bacteriófago M13. En este último determinamos la secuencia nucleotídica del ADNc de DGH por el método enzimático, posteriormente lo subclonamos y lo enfasamos en el vector de expresión pMALc para introducirlo en bacterias y así lograr expresar la DGH como proteína de fusión (véase fig. 1).

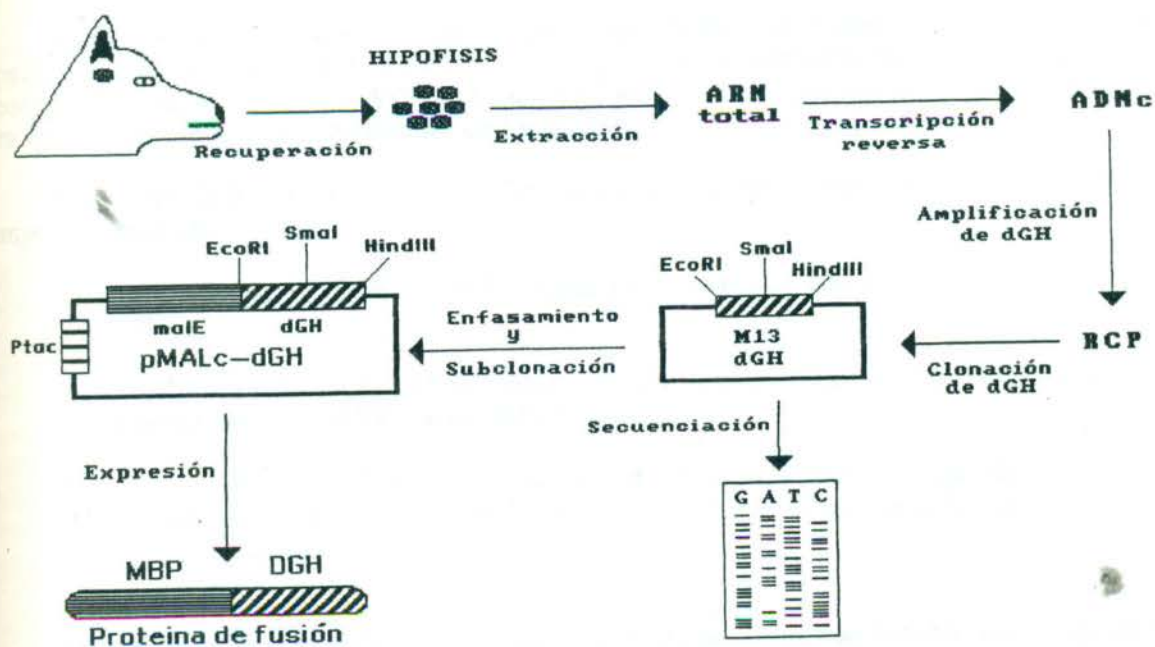


Figura 1. Estrategia general del trabajo experimental.

Una de las metodologías cruciales en el éxito del proyecto fue la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) (Erlich, 1989; Innis y cols, 1990, Barrera-Saldaña y cols, 1993). A continuación describimos brevemente en que consiste:

Reacción en cadena de la polimerasa.

Este proceso fue ideado en 1985 por Karry B. Mullis investigador de la compañía estadounidense "CETUS". Posteriormente fue mejorado por el equipo de investigación de dicha compañía, liderado por Henry Erlich, quienes la utilizaron en la detección clínica de la anemia de células falciformes. A partir de aquí, su aplicación en la biomedicina fue en incremento exponencial.

La RCP es un proceso bioquímico cíclico realizado *in vitro*, mediante el cual cada hebra del duplex del ADN blanco es duplicada por la ADN polimerasa en cada ciclo, el número de éstos fluctúa generalmente entre 25 y 35. En cada uno se va duplicando el ADN blanco, el cual es amplificado de manera geométrica (2, 4, 8, 16, 32, 64, etc. veces) de modo que al final de 30 ciclos tendremos nuestro fragmento de ADN amplificado aproximadamente entre 1×10^6 a 1×10^7 veces comparado con la cantidad inicial.

Los componentes requeridos para la RCP son: ADN blanco, iniciadores (oligonucleótidos) específicos que flanquean el ADN a amplificar, mezcla de desoxinucleótidos (dNTPs), solución amortiguadora de reacción y la ADN polimerasa Taq, esta última es una enzima termoestable ideal para los requerimientos de temperatura de los ciclos.

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

- 1) Desnaturalización (92-98°C, 60-90 segundos) de las cadenas complementarias del duplex de ADN.
- 2) Alineamiento (50-60°C, 40-90 segundos) específico entre los iniciadores y la región correspondiente del ADN blanco desnaturalizado.
- 3) Extensión (70-74°C, 30-90 segundos) a partir de los iniciadores alineados a las hebras de ADN; la ADN polimerasa incorpora los dNTP's para la síntesis de la hebra complementaria a la plantilla blanco.

Cumplido el primer ciclo, se inicia otro en el mismo tubo, con los mismos componentes de la mezcla de reacción, pero ahora contiene el doble de cadenas sencillas de ADN blanco y finaliza volviéndose a duplicar éstas, (vease Fig. 2). La longitud del segmento amplificado por la RCP es el resultado de la suma de los dos iniciadores más la del ADN blanco flanqueado por éstos.

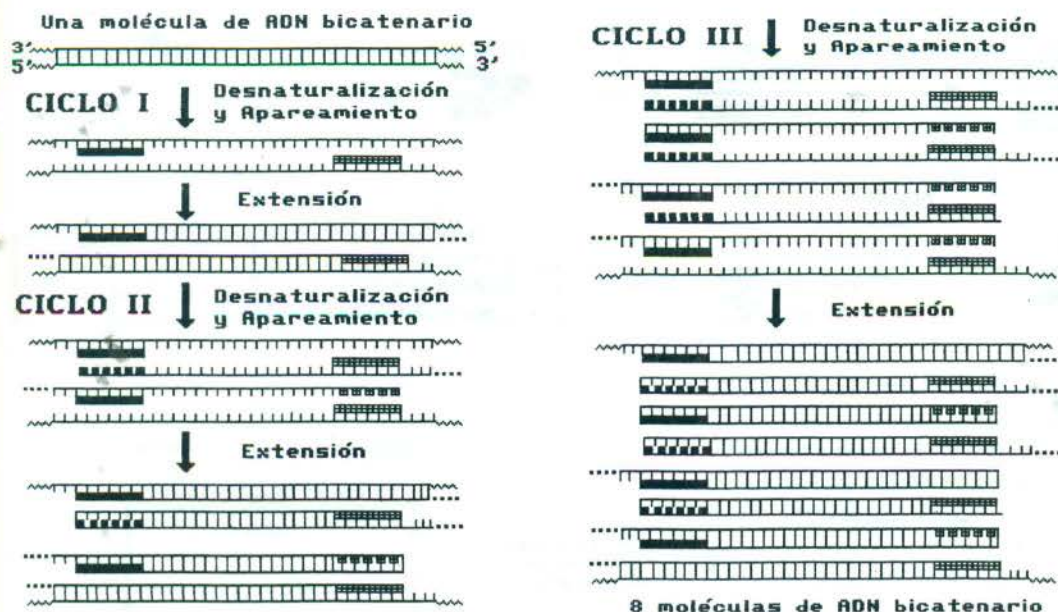


Figura 2.- Pasos y ciclos de la RCP. Esta fue utilizada para llevar a cabo la amplificación específica del ADNc de DGH. Aquí esquematizamos los pasos de los primeros tres ciclos. En el primer paso, el ADN bicatenario es desnaturalizado por calor (92-95°C) de tal forma que pueda darse el apareamiento (segundo paso) de los iniciadores (representados por rectángulos oscuros) a las hebras monocatenarias a una temperatura entre 50-60°C. Por último, la polimerización (tercer paso) por la PolTaq a 70-72°C logra la duplicación del ADN que está flanqueado por los iniciadores (ADN blanco), concluyendo el primer ciclo. De la misma manera inicia el segundo ciclo, de tal forma que en cada ciclo el ADN se duplica. Este es un proceso que genera copias en forma geométrica (2, 4, 8, 16, 32, etc...) y al final de 25-30 ciclos se logra multiplicar aproximadamente de 1×10^6 a 1×10^7 veces la cantidad original del ADN blanco.

Estrategia para la clonación molecular del ADN complementario (ADNc) de DGH.

A partir de hipófisis recuperadas de perros, extrajimos los ácidos ribonucleicos totales y por medio de la transcriptasa reversa utilizando oligonucleótidos al azar sintetizamos cadenas simples de ADNc sobre todos los ARNs presentes. A partir de estos ADNcs amplificamos específicamente al ADNc de DGH por la RCP utilizando iniciadores diseñados para este propósito. En la amplificación del ADNc de DGH le fueron agregados sitios de restricción adicionales (*Eco* RI al inicio y *Hind* III al final) los cuales estaban contenidos en los iniciadores para facilitar la clonación del producto amplificado. Posteriormente cortamos con estas enzimas de restricción tanto el ADNc de DGH como el vector M13 (mp18 y mp19), mismos que ligamos para dar origen a las construcciones M13mp18-DGH y M13mp19-DGH, las cuales fueron caracterizadas por corte con las enzimas de restricción que les dieron origen. Estas construcciones nos sirvieron de plantilla para determinar la secuencia nucleotídica del ADNc de DGH (véase fig. 3).

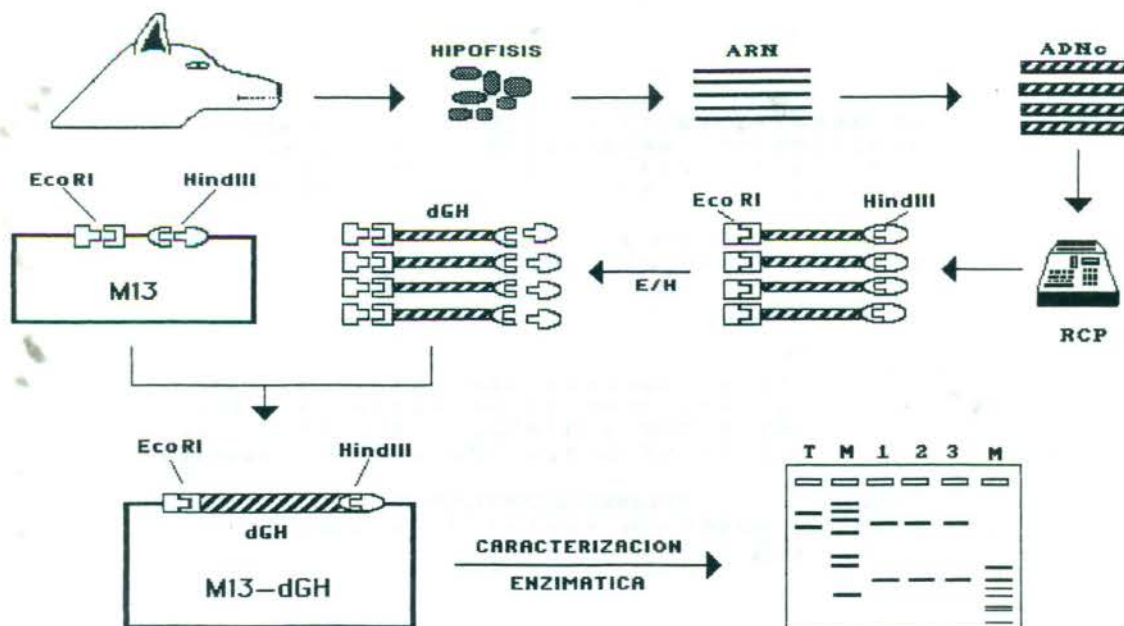


Figura 3.- Estrategia experimental para clonar el ADNc de DGH. La primera parte del proyecto consistió en la obtención, clonación y determinación de la secuencia nucleotídica del DNAc de DGH, para lo que se siguieron los pasos aquí ilustrados.

Diseño de los iniciadores consenso utilizados en la amplificación del ADNc de DGH.

Comparando las secuencias nucleotídicas de las hormonas del crecimiento de diferentes especies de mamíferos cercanas al perro en la escala evolutiva (visón, cerdo, vaca y borrego), obtuvimos las secuencias consensos para el diseño de los oligonucleótidos sintéticos (iniciadores o cebadores para la RCP), tanto de la región 5', como de la región 3', necesarios para poder realizar la amplificación correcta del ADNc de DGH a partir del ARN. Además incluimos sitios artificiales de restricción (*Eco* RI y *Nco* I en el iniciador 5' y *Xba* I y *Hind* III en el iniciador 3') en dichos cebadores para facilitar la clonación en el bacteriófago M13 y las subsecuentes manipulaciones del ADNc amplificado (véase fig. 4).

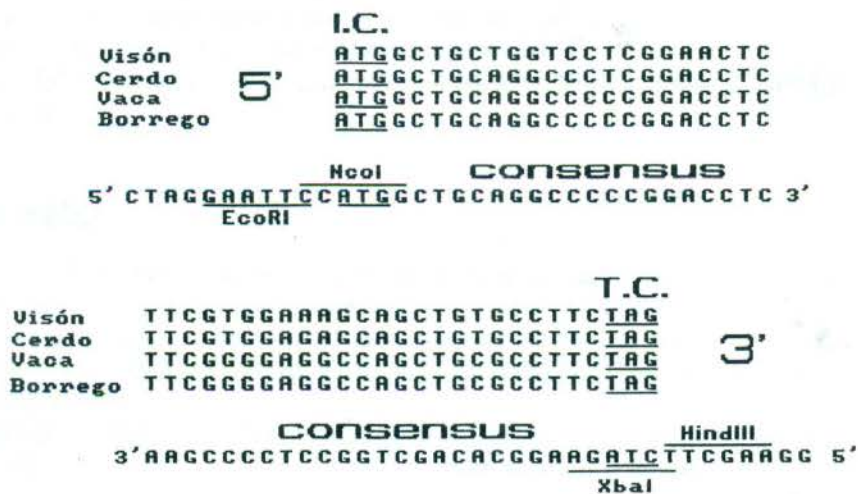


Figura 4.- Iniciadores utilizados en la RCP. Mostramos la comparación de las secuencias nucleotídicas al inicio (5' o río arriba) y final (3' o río abajo) de los ADNcs de varias GHs (visión, cerdo, vaca y borrego) a partir de los codones del inicio y terminación de la traducción ATG y TAG (subrayados), respectivamente. Puesto que éstas resultaron estar bien conservadas durante la evolución, se determinó una secuencia consenso para cada una de estas regiones (20 nucleótidos para el 5' y 27 nucleótidos para el 3'), a partir de las que diseñamos los iniciadores para la RCP incluyendo la incorporación de los sitios únicos de restricción en su extremo 5' con el fin de facilitar la clonación de DGH. Además agregamos algunas bases extras hacia el extremo 5' para permitir que la enzima de restricción pudiera situarse para realizar el corte.

Extracción de ARN total de hipófisis caninas por el método de isotiocianato de guanidina-fenol cloroformo. Este método es una modificación de la técnica descrita por Chomczynsky y Sacchi en 1987.

Para eliminar las ribonucleasas, sometimos todo el material de plástico utilizado a un lavado con NaOH por 10 min, lo enjuagamos exhaustivamente con agua tratada con dietil pirocarbonato (Agua-DEPC). El material de vidrio utilizado (tubos, botellas para centrifuga, probetas, pipetas, vasos, etc.) lo colocamos en el horno a 250 °C por 4 h, con el fin de inactivar las ribonucleasas.

Todas las soluciones (abajo), las tratamos con dietil pirocarbonato al 0.1% por al menos 12 h a una temperatura de 37 °C y posteriormente esterilizamos de la "a" a la "e" en 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 agua-DEPC.
- 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, sarcosil al 0.5% y β -mercaptoetanol 0.1 M).

Procedimiento:

- 1) Extraímos las hipófisis de perros recién sacrificados, las transportamos inmediatamente en hielo al laboratorio y antes de congelarlas en una cama de hielo seco pulverizado y de almacenarlas en el tanque de nitrógeno, las lavamos en una solución 1X SSC (NaCl 3.0 M, Citrato de Sodio 0.3 M) para eliminar la sangre. Así las conservamos hasta su procesamiento.
- 2) Para procesar las hipófisis, las colocamos sobre hielo seco inmediatamente después de sacarlas del nitrógeno líquido. Pesamos una muestra de aproximadamente 0.5 g, y procedimos a procesarlas rápidamente.
- 3) Homogeneizamos el tejido hipofisiario en un macerador de vidrio que contenía 5 ml de solución "D".
- 4) Pasamos el homogeneizado a un tubo corex de vidrio de 30 ml, le agregamos 0.5 ml de acetato de sodio 2 M pH 4, agitamos 1 min, luego añadimos 5 ml de fenol saturado con agua-DEPC, agitamos por 2 min. Por último, agregamos 1 ml de Sevag, mezclamos vigorosamente por 3 min y colocamos al tubo en baño de hielo por 15 min.
- 5) Centrifugamos a 10000 rpm durante 20 min a una temperatura de 4 °C en una centrífuga B-20A de DAMON/IEC DIVISION en la que utilizamos el rotor 872. Al terminar la centrifugación, recuperamos la fase acuosa del tubo utilizando una pipeta de 1 ml y la transferimos a otro tubo Corex. Agregamos 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, agitamos suavemente por inversión y lo colocamos a -20 °C por lo menos 1 h para precipitar los ácidos nucleicos.
- 6) Centrifugamos el tubo bajo las condiciones indicadas en el punto anterior. Decantamos el sobrenadante y lo invertimos dejándolo a 4 °C por 10 min. Disolvimos completamente la pastilla en 1.5 ml de solución "D", adicionamos 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y colocamos el tubo a -20 °C por lo menos 1 h.
- 7) Posteriormente lo centrifugamos por 25 min a 10000 rpm a 4 °C, utilizando el rotor 870. Decantamos el sobrenadante, resuspendimos la pastilla en 0.6 ml de agua-DEPC. Pasamos la solución a un microtubo de 1.5 ml, agregamos un volumen de cloruro de litio 4 M y colocamos el tubo a 4 °C por un mínimo de 4 h con el propósito de eliminar residuos de ADN.
- 8) Centrifugamos el tubo durante 10 min en la microcentrífuga a la velocidad máxima, decantamos cuidadosamente el sobrenadante, la pastilla resultante la lavamos con etanol al 70 % frío, lo centrifugamos a 10000 rpm durante 5 min, decantamos el etanol y secamos en el evaporador centrífugo al vacío por 5 min.
- 9) Finalmente, disolvimos la pastilla de ARN en 0.2 ml de agua- DEPC, realizamos lecturas en el espectrofotómetro a 230, 260 y 280 nm y verificamos la calidad electroforética de nuestro ARN total (ARNtot) en gel de agarosa. Almacenamos la solución del ARNtot como sigue: agregamos acetato de sodio 3.0 M pH 6 hasta que lo dejamos a una concentración final de 0.3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Por último colocamos la solución en un congelador a -20 °C hasta su uso posterior.

Electroforesis de ARN en geles de agarosa urea-ácido.
Método descrito por Rosen y cols en 1975.

Reactivos y soluciones:

- a) Agua.
- b) Urea 10 M.
- c) Amortiguador de citrato de sodio 0.25 M pH 3.5.
- d) Amortiguador de citrato de sodio 25 mM pH 3.5.
- e) Agarosa al 1.5 %.
- f) Amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.6.
- g) Solución de bromuro de etidio a 10 mg/ml.

Nota : Tratamos las soluciones "a", "b", "c" y "d" con DEPC.

Procedimiento:

- 1) **Preparación del gel de agarosa al 1.5%.** A 1.5 g de agarosa añadimos 60 ml de urea 10 M y 30 ml de agua-DEPC. Calentamos esta mezcla a ebullición hasta disolver la agarosa. Dejamos enfriar hasta una temperatura aproximada de 60 °C, luego agregamos 10 ml de amortiguador de citratos 0.25 M pH 3.5. Posteriormente vaciamos la mezcla en el molde para formar el gel (de preferencia placa vertical) y mantuvimos a 4 °C por lo menos 4 h hasta que solidificó completamente.
- 2) **Preparación de la muestra.** En un microtubo añadimos lo siguiente:
 - 10 µl de ARNtot (1 µg/µl).
 - 5 µl de agua-DEPC.
 - 30 µl de urea 10 M.
 - 5 µl de azul de bromofenol al 0.5%.
- 3) **Electroforesis.** Calentamos las muestras a una temperatura de 65 °C por 10 min, las colocamos rápidamente en baño de hielo, las aplicamos en las casillas del gel y realizamos la electroforesis a 80 voltios, hasta que el color indicador avanzara un 80% de la longitud del gel (aproximadamente 4 h). Al término de la corrida, sumergimos el gel en 200 ml de una solución de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.6 que contenía 1 µg/µl de bromuro de etidio durante 20 min. Finalmente desteñimos el gel en agua durante 5 min y lo analizamos bajo luz ultravioleta.

Crterios para establecer la cantidad, pureza e integridad del ARN extraído:

Para determinar la concentración del ARN extraído, tomamos en cuenta que un valor de absorbancia de 1.0 U a 260 nm equivale a 40 µg/ml de ARN, de tal forma que la concentración de ARN la obtuvimos multiplicando el valor de la absorbancia obtenida por 40 y por el factor de dilución que generalmente corresponde a un valor de 1001 (un volumen de 1 µl de ARN se diluyó en 1000 µl de agua para efectuar las lecturas en el espectrofotómetro). Para determinar la pureza del ARN, generalmente se obtiene la razón de la absorbancia a 260 nm sobre la absorbancia a 280 nm; una razón de 1.8 o mayor indica que el ARN es aceptablemente puro.

Para establecer la integridad de las moléculas de ARN visualizamos el gel que contiene las muestras después de haberlo sometido a electroforesis y teñido con bromuro de etidio. Un buen grado de integridad se refleja en una relación en el patrón de fluorescencia de 2:1 entre las bandas 28 y 18 S de los ARN ribosomales. Aunque éstos son sintetizados en igual número de moléculas en las células por ser derivados a partir de un precursor común, el ARNr 28 S es aproximadamente dos veces mayor en longitud que el ARNr 18 S, por lo que atrapa el doble de la cantidad de bromuro de etidio; por lo tanto presenta una fluorescencia doblemente intensa.

Síntesis de la primera cadena del ADNc.

Este procedimiento está basado en la técnica descrita por Gubler y Hoffman en 1983 y D'Alessio y cols en 1987.

Una vez que teníamos el ARNtot en condiciones adecuadas de concentración y calidad, proseguimos a realizar la síntesis de la cadena sencilla de los ADNcs a los diferentes ARNs que se localizan en la hipófisis canina.

- 1) En un tubo estéril de microcentrifuga colocamos 8 μ l de ARNtot (1 μ g/ μ l) de hipófisis caninas y lo calentamos a 65 °C por 10 min.
- 2) Enfriamos el tubo colocándolo en baño de hielo y preparamos la siguiente reacción:

- ATR 5X (250 mM Tris.HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ , 50 mM diotiotreitrol)	10 μ l
- dNTP's 8 mM	3 μ l
- diotiotreitrol 1 M	1 μ l
- iniciadores al azar (0.2 μ g/ μ l)	1 μ l
- ARN total (1 μ g/ μ l)	8 μ l
- Agua-DEPC	22 μ l
- transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Maloney (200 U/ μ l).	5 μ l
	50 μ l

Nota: ATR= Amortiguador de transcriptasa reversa.

- 3) Mezclamos el contenido del tubo, lo incubamos a 37 °C por 1 h, y luego lo colocamos en hielo.
- 4) Al producto de la reacción le hicimos una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) como indicamos a continuación:

Recuperación del ADN sujeto a cualquier tratamiento enzimático.

El método utilizado está tomado de la técnica descrita por Sambrook y cols en 1989.

El objetivo fundamental de una extracción con fenol es la desproteinización de la muestra. En términos simples, el reactivo fenol se mezcla con la muestra bajo condiciones que favorecen la disociación de los complejos proteínas- ácidos nucleicos.

El cloroformo usado en conjunto con el fenol mejora la eficiencia de la extracción de los ácidos nucleicos por su capacidad para desnaturalizar las proteínas y remover los lípidos de la muestra.

Usualmente es suficiente con una sola extracción de fenol saturado con TE-SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico) (25:24:1, v/v) en volumen igual al de la muestra acuosa. De no serlo se puede hacer una segunda extracción pero ahora con Sevag únicamente (24:1 de cloroformo y alcohol isoamílico).

La extracción proteínica de los ácidos nucleicos se realiza mejor tan rápido como sea posible y de preferencia en hielo con amortiguadores refrigerados para minimizar actividad de nucleasa. Cuando la muestra contenga SDS, se requieren temperaturas mayores de 10°C para evitar precipitación de este detergente.

La presencia de SDS en la extracción de ácidos nucleicos es de gran importancia ya que promueve la disociación de las proteínas de los mismos y ejerce una inhibición de las nucleasas endógenas. La presencia del ion Mg^{++} puede mediar la agregación entre ácidos nucleicos y proteínas, es por eso que se usa un quelador de Mg^{++} como el EDTA en el amortiguador de extracción que inhibe la interacción de Mg^{++} .

Reactivos:

Amortiguador TE: 10 mM de Tris-HCl pH 8 y 0.1 mM de EDTA.

Amortiguador TE: 10 mM de Tris-HCl pH 8 y 1 mM de EDTA.

Fenol saturado con 0.1 M Tris-HCl, pH 8.

Fenol/Sevag (1:1).

Sevag: (cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1).

Acetato de sodio 3 M, pH 5.5.

Procedimiento:

- 1) Para un volumen de híbrido ADNc-ARN añadimos medio volumen de fenol, mezclamos al vortex durante 1 min, agregamos medio volumen de SEVAG, mezclamos otra vez al vortex por 1 min y centrifugamos a 13,500 rpm durante 4 min en una microcentrífuga.
- 2) Recuperamos la fase acuosa evitando el material de la interfase y la transferimos a un tubo de microcentrífuga.
- 3) **Le realizamos una extracción, pero ahora únicamente con SEVAG (un volumen), mezclamos por 1 min al vortex y centrifugamos a 13,500 rpm durante 1 min en una microcentrífuga.**
- 4) Transferimos la fase acuosa que contiene los híbridos ADNc-ARN en suspensión a un tubo nuevo.
- 5) Para concentrar nuestros ácidos nucleicos realizamos lo siguiente:

Precipitación del ADN con etanol.

El método utilizado está basado de la técnica descrita por Wallace en 1987.

Se forma un precipitado de ácidos nucleicos al dejar la mezcla de la muestra con sales y etanol a baja temperatura (-20°C o menor). Los ácidos nucleicos precipitados son posteriormente sedimentados por centrifugación, el sobrenadante es removido y la pastilla es lavada con etanol al 70% y es resuspendida en un amortiguador apropiado para su uso posterior. La elección de la sal usada para la precipitación se determina tanto por la naturaleza de la muestra como por el uso que se pretende dar al ácido nucleico.

Las muestras que contienen fosfato o EDTA a concentraciones mayores de 10 mM, no se sujetarán a precipitación con etanol, puesto que estos materiales también precipitarán junto con los ácidos nucleicos; es esencial diluir o dializar tales muestras antes de precipitarlos con etanol.

Reactivos:

- Acetato de amonio 7.5 M o acetato de sodio 3 M, pH 5.2.
- Etanol absoluto (frío).
- Etanol al 70% (frío).

Procedimiento:

- 1) Al tubo que contiene la solución de ADNc-ARN, le agregamos un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.5 más 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Alternativamente puede emplearse medio volumen de acetato de amonio a 7.5 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto.
- 2) Mezclamos por inversión y mantuvimos a -20°C o a temperatura inferior por lo menos 20 min.
- 3) Centrifugamos los ácidos nucleicos precipitados en la microcentrífuga a 13500 rpm durante 8 min y obtuvimos una pastilla blanca correspondiente al híbrido ADNc-ARN en el fondo del tubo (en general las pastillas de $2\ \mu\text{g}$ o más son visibles).
- 4) Removimos el etanol usando una micropipeta, tuvimos cuidado de no arrastrar la pastilla, ni tocar el área del tubo donde podría estar localizada ésta.
- 5) Agregamos $600\ \mu\text{l}$ de etanol al 70% frío a la muestra y mezclamos por inversión. Este paso nos ayudó a remover cualquier soluto atrapado en el precipitado.
- 6) Aseguramos la pastilla al fondo volviendo a centrifugar por 4 min y retiramos el etanol como lo hicimos anteriormente.
- 7) Secamos la pastilla del híbrido en el evaporador centrífugo a vacío durante 5 min.
- 8) Resuspendimos el híbrido en $20\ \mu\text{l}$ de TE o agua.

Reacción en cadena de la polimerasa (RCP).

Una vez que realizamos la extracción fenólica a la solución de los híbridos de ADNc-ARN, procedimos a amplificar específicamente el ADNc de DGH por medio de la reacción de la polimerasa en cadena (Erlich, 1989; Innis, 1990; Barrera-Saldaña y cols, 1992).

- 1) Para lograr esto preparamos en un tubo una mezcla reactiva que contiene:

Agua destilada.	38.7 μl
Amortiguador de amplificación. (100 mM Tris.HCl pH 8.3, 15 mM MgCl_2	
500 mM KCl y 1 mg/ml gelatina).	5.0 μl
Híbrido ADNc-ARN.	2.0 μl
dNTP's 8mM.	1.3 μl
Iniciador 5' 2.5 μM .	1.0 μl
Iniciador 3' 2.5 μM .	1.0 μl
Pol Taq a 5 U/ μl .	<u>1.0 μl</u>
	50.0 μl

- 2) Agregamos a la mezcla anterior 10 μ l de aceite mineral para evitar la evaporación de la fase acuosa en las etapas de calentamiento. El testigo negativo para la amplificación que utilizamos consistió de las mismas condiciones y reactivos para la amplificación exceptuando al híbrido de ARN-ADNc.
- 3) Amplificamos el ADNc de la mezcla de reacción durante 30 ciclos de RCP, cada uno consistió de tres pasos:
 - a) Primer paso, desnaturalización del ADNc a una temperatura de 94 °C por 1.5 min.
 - b) Segundo paso, apareamiento del ADNc con los iniciadores a 55 °C por 1.5 min.
 - c) Tercer paso, polimerización del ADNc por la Pol Taq a 72 °C por 2 min.
- 4) Una vez que terminamos la reacción, checamos el producto de la amplificación, colocando 3 μ l de ésta (mezclados en un μ l de jugo azul 6X) en un gel de agarosa al 1%. Lo sometimos a electroforesis, lo teñimos con bromuro de etidio y lo visualizamos por irradiación con luz ultravioleta.
- 5) Para eliminar el exceso de aceite mineral aprovechamos la diferente propiedad físico química de punto de congelación entre el agua y el aceite mineral. Permitimos que nuestras muestras se congelaran, esto lo logramos manteniendo los tubos por 30 min a una temperatura de -20 °C.
- 6) Eliminamos el aceite mineral con una pipeta ya que éste se encontraba líquido, no así la muestra acuosa la cual se mantuvo en estado sólido.
- 7) Una vez eliminado el exceso de aceite mineral sobre el producto de la reacción, llevamos a cabo una extracción con fenol-SEVAG como indicamos en la técnica "Recuperación del ADN sujeto a cualquier tratamiento enzimático" (Sambrook y cols, 1989).
- 8) Precipitamos nuestro ADNc de DGH amplificado con acetato de sodio y etanol al 100% según se describe en la técnica "Precipitación del ADN con etanol" (Wallace, 1987).
- 9) Finalmente resuspendimos la pastilla de ADNc en un volumen de 30 μ l de agua ultrapura, dejándolo a la concentración aproximada de 20 ng/ μ l.

Clonación del ADNc de DGH en bacteriófagos M13 (Meessing, 1988).

Utilizamos los bacteriófagos M13mp18 y M13mp19 por presentar una serie de ventajas para nuestros propósitos; en la región múltiple de clonación presentan sitios únicos *Eco* RI y *Hind* III, los que nos permitieron clonar el ADNc de DGH, puesto que en el diseño de los extremos 5' de los iniciadores se incluyeron estos sitios adicionales. Además de la clonación, este mismo vector nos permitió determinar la secuencia nucleotídica del ADNc de DGH. Otra de las ventajas de utilizar los vectores M13 está en la orientación de su sitio múltiple de clonación; en el mp18 va de *Eco* RI hacia *Hind* III y viceversa en el mp19. Esto nos facilitó la lectura de la secuencia nucleotídica del ADNc de DGH, leyendo en ambos sentidos sus dos cadenas (véase fig. 5).

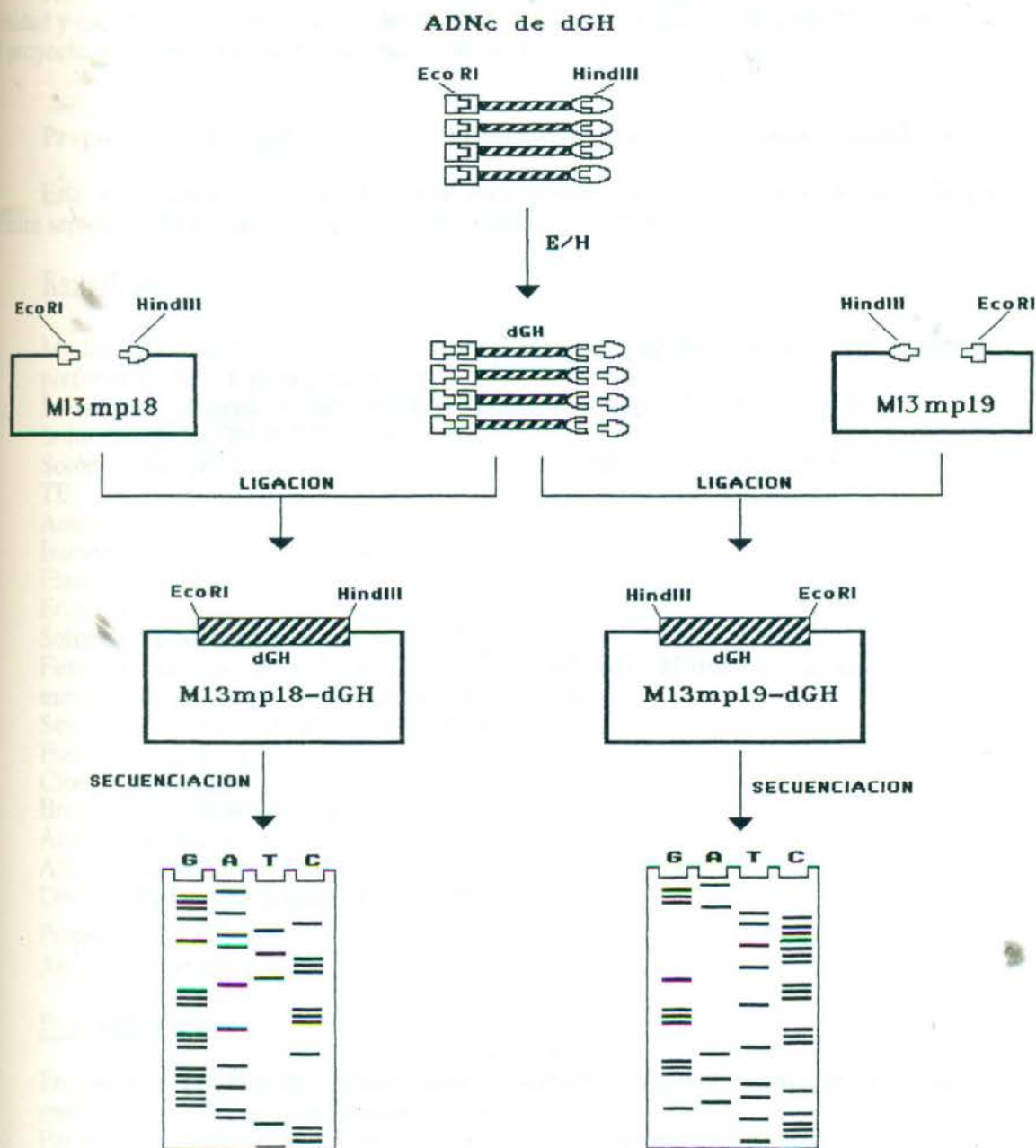


Figura 5- Secuenciación de M13mp18-DGH y M13mp19-DGH. Ligamos el ADNc de DGH cortado con *EcoRI* y *HindIII* con los vectores M13mp18 y M13mp19, abiertos en los mismos sitios, dando origen a las construcciones M13mp18-DGH y M13mp19-DGH. Nótese que M13mp18 y M13mp19 tienen los sitios en direcciones contrarias, de manera que en la primera construcción, la lectura de secuenciación inicia a partir del sitio *Hind III* hacia el sitio *Eco RI* y viceversa en la construcción M13mp19-DGH. De esta manera logramos la lectura de ambas cadenas del ADNc de DGH.

Previo al corte enzimático necesitábamos al bacteriófago M13 tanto mp18 como mp19 en cantidad y calidad suficiente para poder realizar los cortes y manipulaciones necesarias a lo largo del proyecto, para esto realizamos la técnica siguiente.

Preparación de plásmidos o bacteriófagos a gran escala, (Sambrook, 1989).

Este procedimiento involucra una ultracentrifugación a 45,000 rpm durante 24 a 36 h que permite separar el ADN fágico del genómico bacteriano y de los ARNs.

Reactivos:

- a) Medio LB (suplementado con ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$), para crecer plásmidos y de preferencia 2x YT para bacteriófagos.
- b) Solución I: Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris HCl 25 mM, pH 8.0.
- c) Solución II: NaOH 0.2 N, SDS al 1%.
- d) Solución de ARNasa: ARNasa a 10 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, pH 8.0.
- e) TE.
- f) Acetato de amonio 7.5 M.
- g) Isopropanol.
- h) Etanol al 100%.
- i) Etanol al 70%.
- j) Solución de lisozima: 10 mg/ml en TE.
- k) Fenol (saturado con Tris-HCl 0.1 M pH 8.0; Hidroxiquinoleína al 0.1% y β -mercaptoetanol al 0.2%, según Sambrook y cols).
- l) Sevag: Cloroformo alcohol isoamílico 24:1.
- m) Fenol-Sevag (v/v).
- n) Cloruro de Cesio.
- ñ) Bromuro de Etidio (10 mg/ml).
- o) Aceite mineral.
- p) Alcohol isoamílico.
- q) Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 10%.
- r) Proteínasa K (50 $\mu\text{g/ml}$).
- s) Acetato de sodio 3 M pH 5.5.

Procedimiento:

- 1) Propagamos la clona de *Escherichia coli* portadora del bacteriófago creciéndola en 4 ml de medio LB a 37°C por aproximadamente 12 h.
- 2) Pasamos los 4 ml de bacterias del tubo anterior a un matraz que contenía un litro de medio 2x YT y dejamos crecer las bacterias a 37°C por un tiempo de 7-8 h con agitación vigorosa.
- 3) Colectamos las células por centrifugación a 4 000 rpm por 5 min a 4°C, decantamos por inversión del tubo el sobrenadante hasta eliminarlo completamente y resuspendimos las células en 18 ml de solución I fría. Agregamos a este 2 ml de solución de lisozima, resuspendimos la pastilla y dejamos a T.A. durante 10 min.
- 4) Agregamos al tubo 40 ml de solución II recién preparada, mezclamos por inversión hasta que quedara bien homogeneizada la solución y la dejamos a T.A. durante 10 min.
- 5) Adicionamos al tubo 30 ml de solución III fría (4°C), mezclando por inversión y dejándola por 10 min a 4°C.
- 6) Centrifugamos el lisado bacteriano a 7,000 rpm durante 10 min a 4°C. Filtramos el sobrenadante con la ayuda de una tela de nylon con porosidad fina, sobre un embudo en una probeta de 100 ml para medir el volumen (todo estéril). Pasamos el filtrado a un tubo grande de centrifuga.

- 7) Agregamos al filtrado 0.6 volúmenes de isopropanol frío, mezclamos por inversión y dejamos reposar por 1h. a -20°C .
- 8) Centrifugamos la solución a 13500 rpm durante 10 min a 4°C .
- 9) Eliminamos el isopropanol por decantación y escurrimos los tubos sobre servilletas.
- 10) Resuspendimos la pastilla en 3 ml de TE o agua ultrapura (con la resuspensión el volumen aumenta ligeramente). Ajustamos el volumen a 3.35 ml con agua ultrapura (miliQ) en tubos Falcon de 15 ml y corrimos 1 μl en gel de agarosa al 0.8% para checar su cantidad y calidad.
- 11) Agregamos 3.85 g de CsCl (volumen final= 4.25 ml), disolvimos muy bien y transferimos la solución a tubos de 7 ml de ultracentrífuga (rotor VTI65).
- 12) En condiciones de baja luminosidad añadimos 500 μl de bromuro de etidio a 10 mg/ml a cada tubo y agregamos aceite mineral hasta llenar el tubo. Balanceamos los tubos por pares agregándoles agua ultrapura para equilibrarlos cuando fue necesario y los sellamos con calor.
- 13) Colocamos los tubos en el rotor, lo cerramos e invertimos éste varias veces para que se mezclara la solución de los tubos y los sometimos a centrifugación a 45000 rpm durante 36 h a 25°C .
- 14) Sacamos los tubos con mucho cuidado evitando alterar el gradiente, los llevamos al cuarto oscuro para observar la presencia de bandas con ayuda de la lámpara manual de luz u.v. de longitud de onda larga.
- 15) De no observarse separación de bandas centrifugamos otras 24 h y en caso afirmativo procedimos a clavar la aguja de una jeringa en la parte superior del tubo, para evitar la formación de vacío en el siguiente paso.
- 16) Clavamos otra aguja con el bisel hacia arriba en la parte inferior de la segunda banda (de arriba a abajo) que corresponde al bacteriófago y retiramos la banda completa por succión.
- 17) Quitamos la aguja a la jeringa y vaciamos el contenido en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Practicamos 5 extracciones con alcohol isoamílico para eliminar el bromuro de etidio de las muestras.
- 18) Dializamos contra 2 litros de TE durante 2 h, pasamos la solución dializada a un tubo de microcentrífuga, le agregamos ARNasa a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$ (10 μl para un volumen de 1 ml) e incubamos a 65°C durante 30 min.
- 19) Le añadimos SDS a una concentración final de 0.5%, y Proteinasa K a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$ continuamos la incubación a 65°C por 1 h.
- 20) Hicimos extracción a la solución de ADN con un volumen de fenol, otra con fenol-Sevag y finalmente con Sevag como se describe en la técnica "Recuperación del ADN sujeto a cualquier tratamiento enzimático".
- 21) Dividimos la solución de ADN en dos partes iguales en tubos nuevos, les agregamos acetato de sodio 3 M a una concentración final de 0.3 M (un décimo de volumen). Agregamos 2.5 volúmenes de etanol al 100%, mezclamos e incubamos 1 h a -20°C .
- 22) Centrifugamos los tubos a 13500 rpm durante 10 min, retiramos el sobrenadante en un volumen final de 400 μl de acetato de sodio 0.3 M y agregamos 1 ml de etanol.
- 23) Dejamos los tubos 1 h a -20°C , posteriormente los centrifugamos 10 min a 13500 rpm, decantamos y lavamos la pastilla con 1 ml de etanol al 70%, los mezclamos, y centrifugamos 5 min a 13500 rpm.
- 24) Eliminamos el etanol de los tubos y los secamos en el evaporador centrífugo al vacío por 5 min. Disolvimos la pastilla en 200 μl de TE. Posteriormente diluimos 2 μl de esta solución en 1 ml de agua ultrapura (dilución 1:500) para leer la absorbancia a 260, 280 y 230 nm. Por último ajustamos a la concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- 25) Corrimos una alícuota de 200 ng en gel de agarosa 0.8-1% para verificar la integridad y corroborar la concentración del ADN.

Digestión con enzimas de restricción.

Las enzimas conocidas como endonucleasas de restricción juegan un papel clave en el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante. Estas catalizan rompimientos al ADN generalmente de doble cadena para producir fragmentos de restricción o linearizar vectores. El patrón de división de una enzima de restricción es específico para un ADN dado.

Para poder clonar el ADNc amplificado de DGH en M13mp18 y mp19, necesitamos: a) cortar en los sitios de restricción (añadidos al amplificar por medio de los iniciadores) que lo flanquean (*Eco* RI y *Hind* III), b) de igual forma cortar a M13mp18 y mp19 con las enzimas anteriores y por último c) ligar a los vectores M13 contra el producto amplificado cortado con *Eco* RI y *Hind* III.

a) Digestión del producto amplificado.

Eliminamos el exceso de aceite mineral del tubo que contiene el producto amplificado succionándolo con una pipeta de puntilla delgada, le hicimos una extracción con un volumen de fenol-Sevag para eliminar los remanentes del aceite mineral, mezclamos al vortex y centrifugamos 5 min a 10000 rpm. En seguida recuperamos la fase acuosa en otro tubo, le agregamos un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2, mezclamos, le agregamos 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, lo mezclamos e incubamos mínimo 1 h a -20 °C; después de este tiempo centrifugamos, decantamos el sobrenadante y lavamos la pastilla de ADN con etanol al 70%, secamos en el evaporador centrífugo al vacío y por último resuspendimos la pastilla en 30 µl de agua destilada.

Sometimos a una digestión doble al producto amplificado con las enzimas de restricción *Eco* RI y *Hind* III con el amortiguador de corte y cantidad de enzima especificada por la compañía. Después de 2 h de incubación a 37 °C precipitamos con etanol, lavamos y secamos por vacío, resuspendiendo al producto cortado en 20 µl de agua destilada quedando a una concentración aproximada de 20 ng/µl.

b) Preparación de M13 para ser ligado al ADNc de DGH.

Como en el caso anterior, realizamos una digestión doble con las enzimas *Eco* RI y *Hind* III, sobre 3 µg de M13mp18 y M13mp19, respectivamente, utilizando el amortiguador de corte y la cantidad de enzima necesaria, según lo indican las instrucciones de la compañía. Después de 2 h de incubación a una temperatura de 37 °C, precipitamos los ácidos nucleicos agregando medio volumen de acetato de amonio 7.5 M o bien un décimo de acetato de sodio 3M pH 5, mezclamos y añadimos 2.5 volúmenes de alcohol etílico al 100%, volvimos a mezclar por inversión e incubamos 1 h a -20 °C, posteriormente centrifugamos 7 min a 10000 rpm, desechamos el sobrenadante y lavamos la pastilla con 1 ml de etanol al 70%. Luego centrifugamos 4 min a 10000 rpm, decantamos el etanol y secamos la pastilla por vacío; finalmente la resuspendimos en 60 µl de agua destilada, quedando a una concentración aproximada de 40 ng/µl y lo almacenamos a -20 °C hasta su utilización.

c) Ligación del ADNc de DGH al vector M13 (mp18 y mp19).

El método utilizado es una modificación al descrito por Sambrook, y cols en 1989.

La enzima ligasa cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre el extremo 3' oxhidrilo y el extremo 5' fosfato terminal de dos nucleótidos adyacentes, restableciendo así la continuidad covalente de la cadena del ADN.

Reactivos:

- Amortiguador de ligación.
- Ligasa del ADN de T₄.

- 1) Utilizamos la ligasa de ADN de T₄ para formar enlaces covalentes fosfodiéster entre extremos romos ó adhesivos de fragmentos de ADN generados por el corte de enzimas de restricción.
- 2) En nuestro caso *Eco* RI y *Hind* III cortan dejando extremos pegajosos. La relación molar fragmento-vector fue de 1:20 para asegurar la entrada del producto amplificado en el vector M13.
- 3) Realizamos la mezcla de reacción en un tubo en baño de hielo.
- 4) Agregamos los reactivos en el siguiente orden:

H ₂ O ultrapura.	12.5 µl
Amortiguador de ligación.	2.0 µl
M13 (40ng/µl) vector.	1.0 µl
Pdto. amplificado (20ng/µl)	4.0 µl
Ligasa (400 U/µl).	<u>0.5 µl</u>
Vf.	20.0 µl

- 5) Incubamos de 8-16 h a 4°C para extremos romos y a 16°C para extremos cohesivos.
- 6) Una vez realizada las ligaciones, las mantuvimos a una temperatura de -20 °C hasta su utilización para transformar bacterias con cada construcción.

Transformación con fago M13 de *Escherichia coli* JM101 (Mande e Higa, 1970).

La cepa JM101 de *Escherichia coli* es es huésped para la serie de fagos M13, pues debido a su genotipo [(lacproB)F⁺traD36proAB+lacIqZM145] tiene la capacidad de complementar al operón lac del fago M13 y producir la enzima β-galactosidasa activa. Esta enzima es expresada por la inducción del promotor lac con la adición de IPTG, su actividad es monitoriada por el rompimiento enzimático del compuesto incoloro 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (X-Gal), para formar galactosa y un compuesto azul oscuro. La infección del fago se lleva a cabo a través del pili de la bacteria.

Reactivos y soluciones:

- a) Tubos con caldo 2x YT: Triptona, 16 g/l; Extracto de levadura, 10 g/l; NaCl, 5 g/l.
- b) Tubos con medio B: Triptona, 10 g/l; NaCl, 8 g/l; Agar, 6 g/l.
- c) Cajas con medio B: Triptona, 10 g/l; NaCl, 8 g/l; Agar, 15 g/l.
- d) Cloruro de calcio 0.05 M (frío).

- e) X-Gal 20 mg/ml (en dimetilformamida).
- f) IPTG 100 mM en agua.
- g) Medio mínimo (para 100 ml 10x): K_2HPO_4 , 10.5 g; KH_2PO_4 , 4.5 g; $(NH_4)_2SO_4$, 1 g; Citrato de sodio $2H_2O$, 0.5 g. Llevar a 88.5 ml con agua y esterilizar. Agregar por separado: 1 ml $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ al 20 %; 10 ml de Glucosa al 20 % y 0.5 ml de solución Tiamina al 1% y 10 ml de solución de Glucosa al 20% (éstos últimos tres esterilizados por filtración).

Procedimiento:

A) Calcio competentes.

- 1) Sembramos *Escherichia coli* (JM101) por estría en una caja con medio mínimo e incubamos a 37°C por 12-14 h.
- 2) Levantamos una colonia y la inoculamos en un tubo de ensayo que contenía 4 ml de medio 2x YT. Dejamos crecer a 37°C por 12 h con agitación vigorosa.
- 3) Inoculamos un matraz que contenía 50 ml de 2x YT con una dilución 1:100 del cultivo de células del tubo de ensayo y permitimos el crecimiento hasta una densidad óptica (a 600 nm) de 0.30-0.35, tardando aproximadamente de 2 a 2.5 h.
- 4) Pusimos el matraz con células 10 minutos en hielo, y vaciamos la suspensión bacteriana en un tubo Falcon frío de 50 ml. Aparte sembramos una dilución 1:100 en un tubo con 4ml de 2x YT para uso posterior, hasta que obtuviera una absorbancia de 0.35.
- 5) Centrifugamos a 5000 rpm durante 5 min para empastillar las bacterias y decantamos el sobrenadante (todo en hielo y frente al mechero).
- 6) Resuspendimos la pastilla bacteriana en 20 ml de cloruro de calcio 50 mM frío e incubamos 20 min en hielo. Repetimos el paso 5 y resuspendimos en 2 ml de $CaCl_2$ 0.05 M.
- 7) Dejamos en hielo las bacterias de 10 a 20 min y las transformamos, usando 200 μ l de células o bien las guardamos a 4°C por no mas de 2 días, ya que la viabilidad celular disminuye considerablemente, esto se refleja en la baja eficiencia de transformación.

B) Transformación de JM101 con Fago M13 .

- 1) Colocamos a 4 tubos (a-d) fríos y estériles lo siguiente:

a) Ligación mp18-DGH	3 μ l
b) Ligación mp19-DGH	3 μ l
c) M13 superenrollado (1ng/ μ l) (testigo positivo)	1 μ l
d) H_2O (testigo negativo)	3 μ l

Nota: ajustar a un volumen de 10 μ l con agua ultrapura.

- 2) Agregamos 200 μ l de bacterias calcio competentes a cada tubo y mezclamos suavemente. Incubamos 30-40 min en hielo, mezclando a intervalos de 10 minutos.
- 3) Diez o quince min antes de terminar la incubación fundimos el medio B suave de los tubos y los mantuvimos a 47°C en baño María. Previamente habíamos colocado las cajas con medio B a 37°C en la incubadora por lo menos 2 h.
- 4) Una vez terminado el período de incubación de la transformación, (del paso 2), dimos un choque térmico a las bacterias poniendo los tubos en un baño de agua a 42°C por 2 min; después de esto los retiramos colocándolos en una gradilla a T.A.

- 5) Agregamos a cada tubo lo siguiente:
 - a) 100 μ l de bacterias no competentes dejadas creciendo en el paso A-4 anterior.
 - b) 50 μ l de X-Gal a 20 mg/ml.
 - c) 10 μ l de IPTG 100 mM.
 - d) 4 μ l de tiamina al 1%.
- 6) Mezclamos el contenido de cada tubo, lo vaciamos en un tubo que contenía 4 ml de agar suave fundido conservado a 47°C y lo mezclamos 2 o 3 veces por inversión.
- 7) Vaciamos el contenido inmediatamente en una caja con medio B recién sacada de la estufa. Distribuimos homogéneamente el agar con células transformadas con movimientos circulares de la caja sobre la mesa.
- 8) Dejamos solidificar a T.A. (10-15 min) e incubamos las cajas invertidas a 37°C por 6-8 h. Observamos la aparición de placas de crecimiento lento de color azul en el testigo positivo (M13 superenrollado), ausencia de placas en el testigo negativo y placas transparentes y azules en los experimentos (bacterias transformadas con las ligaciones).

NOTA: 1 ng de moléculas de M13 superenrollado produce aproximadamente 1000 transformantes o placas azules de crecimiento lento azules.

Análisis del ADN de clonas fágicas recombinantes:

Después de llevar a cabo la transformación de bacterias e incubado a 37°C, apreciamos la *aparición de placas de crecimiento lento desde las 5 h, tanto en el testigo positivo como en la ligación*. A las 6-8 h las cajas correspondientes al positivo tenían ya placas de crecimiento lento de color azul. En las ligaciones había placas incoloras (posibles recombinantes) y placas azules (vector recircularizado). Las recombinantes portadoras del fragmento de ADN las crecimos y caracterizamos para después proceder a realizar la determinación de la secuencia nucleotídica.

Material y soluciones:

- Tubos con 4 ml de caldo 2x YT.
- Palillos dentales de madera estériles.

Procedimiento:

- 1) Crecimos *Escherichia coli* cepa JM101 toda la noche en tubo con caldo 2x YT a 37°C.
- 2) Al siguiente día, inoculamos nuevos tubos de 2x YT con una dilución 1:100 del inóculo anterior y les permitimos crecer 30 min a 37°C con agitación vigorosa.
- 3) Levantamos con palillo estéril cada placa incolora de crecimiento lento que hayamos localizado en la caja de petri, la colocamos en un tubo con el cultivo fresco de bacterias. Dejamos crecer a 37°C por 7 a 8 h con agitación vigorosa.
- 4) Empastillamos 1.5 ml de cultivo por centrifugación a 10,000 rpm durante 1 min.
- 5) Recuperamos 200-300 μ l del sobrenadante con puntilla estéril y lo colocamos en un microtubo estéril (conservamos el tubo con el sobrenadante a 4°C). Desechamos el resto del sobrenadante y practicamos minipreparación de bacteriófagos al paquete bacteriano como se describe mas adelante.
- 6) Caracterizamos con las enzimas de restricción y seleccionamos las clonas que liberaron el inserto esperado.

Minipreparación de fagos por el método de lisis alcalina.

Esta técnica está basada en el método de Morelle en 1989.

Reactivos y soluciones:

- a) Caldo 2x YT.
- b) Solución de lisis: Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM y Lisozima a 4 mg/ml (Solución I).
- c) Solución alcalina: NaOH 0.2 N y SDS al 1% (Solución II).
- d) Acetato de amonio 7.5 M (Solución III).
- e) Isopropanol
- f) Etanol al 100%
- g) Etanol al 70%
- h) TE: Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM.
- i) Agua ultrapura.
- j) ARNasa a 10 mg/ml.
- k) Fenol saturado con Tris HCl 0.1 M pH 8.0; Hidroxiquinoleína al 0.1% y β -mercaptoetanol al 0.2%, según Sambrook y cols.
- l) Sevag (Cloroformo:alcohol isoamílico, 24:1).
- m) Acetato de sodio 3 M pH=5.5.

Procedimiento:

- 1) Crecimos cada bacteria transformada de 6-8 h a 37°C con agitación vigorosa en 4 ml de medio 2xYT en tubos de 10 ml de capacidad.
- 2) Cosechamos las bacterias centrifugando 1.5 ml de solución durante 1 min a 12000 rpm en tubos de microcentrífuga, decantamos el medio de cultivo y las resuspendimos en 200 μ l de solución I.
- 3) Incubamos los tubos durante 5 min a T.A., les agregamos 400 μ l de solución II alcalina y mezclamos por inversión 6-8 veces e incubamos por otros 10 min en hielo.
- 4) Agregamos 300 μ l de solución III y mezclamos el contenido de los tubos por inversión, continuando con una incubación adicional de 10 min en hielo.
- 5) Centrifugamos por 8 min a 13000 rpm recuperamos el sobrenadante claro y lo transferimos a un segundo tubo.
- 6) Les agregamos 0.6 volúmenes de isopropanol, los mezclamos por inversión e incubamos 20 min a -20°C.
- 7) Los centrifugamos a 13500 rpm por 8 min para empastillar el ADN.
- 8) Removimos el sobrenadante, lavamos el precipitado con 500 μ l de etanol al 70% y centrifugamos 5 min a 12000 rpm.
- 9) Desechamos el alcohol y secamos la pastilla por 5 min en el evaporador centrífugo al vacío.
- 10) Disolvimos la pastilla en 50 μ l de agua destilada, mas 1 μ l de ARNasa (1 μ g/ μ l), mezclamos con la pipeta e incubamos 15 min a 37°C.
- 11) Ajustamos el volumen a 100 μ l con agua destilada.
- 12) Realizamos una extracción fenol-Sevag, agregando a cada tubo medio volumen de fenol saturado, mezclamos al vortex durante 30 seg, en seguida agregamos medio volumen de Sevag y mezclamos al vortex por 30 seg.
- 13) Centrifugamos a 13500 rpm durante 5 min a T.A., tomamos el sobrenadante (fase acuosa) y lo transferimos a otro tubo.
- 14) Agregamos un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y posteriormente le añadimos 2.5 volúmenes de etanol al 100 %, incubamos por 20 min a -20 °C.

- 15) Centrifugamos a 13500 rpm durante 8 min para bajar al ADN, decantamos el etanol y lavamos la pastilla con 500 μ l de etanol al 70%, centrifugamos otros 4 min a la misma velocidad.
- 16) Retiramos el etanol, secamos por 5 min en el evaporador centrífugo al vacío y resuspendimos la pastilla en 30 μ l de agua ultrapura.
- 17) Sometimos a electroforesis en gel de agarosa al 1% una alícuota de 1 μ l de ADN del bacteriófago, además utilizamos ADN testigo de tamaño similar.

Una vez que obtuvimos nuestro ADN de cada clona quimérica, procedimos a caracterizar cada una con las enzimas que dieron origen a su construcción (*Eco* RI y *Hind* III). Realizamos cortes enzimáticos dobles con estas enzimas para que liberaran el inserto correspondiente al ADNc de DGH, de aproximadamente 700 pb. Para visualizarlo corrimos una electroforesis en gel de agarosa al 1 % de cada clona digerida, y como testigo de tamaño corrimos plásmido pBR322 cortado con la enzima *Alu* I, el cual, entre otros nos da un fragmento de tamaño aproximado al de nuestro ADNc de DGH.

Ya localizadas las clonas que liberaron el inserto de 700 pb, este fragmento se espera que corresponda al ADNc de DGH, procesamos a dichas clonas y les determinamos la secuencia nucleotídica del inserto en cuestión. Como primer paso realizamos la siguiente técnica:

Obtención del ADN de cadena sencilla del fago quimérico M13 (Sambrook y cols, 1989).

Es esencial que el ADN de cadena sencilla sea de buena calidad para que los resultados sean excelentes en la determinación de la secuencia nucleotídica. Existen varios métodos reportados para purificar ADN de cadena sencilla a partir de vectores M13 e híbridos plásmido-fago. El siguiente método (comunicación personal del Dr. Daniel Baty del CNRS en Marseille, France) funcionó muy bien en el presente trabajo:

Reactivos y soluciones:

- a) Matraces con caldo 2x YT.
- b) Polietilenglicol al 30 % + NaCl 1.8 M.
- c) Fenol saturado con SEVAG.
- d) TE.
- e) Eter etílico anhidro.
- f) Acetato de sodio 3 M, pH 5.2.
- g) Etanol al 100 %.
- h) Etanol al 70 %.

Procedimiento:

- 1) Inoculamos 11 ml de caldo 2x YT (en matraz Erlenmeyer de 200 ml) con 0.3 ml de la cepa JM101 de *Escherichia coli* en fase estacionaria y la dejamos crecer 30 min a 37°C.
- 2) Agregamos 4-6 placas de fago recombinante deseado (o 10 μ l del sobrenadante apartado al analizar las clonas recombinantes). Las crecimos 7-8 h a 37°C con agitación vigorosa.
- 3) Centrifugamos 1.5 ml del mismo cultivo en 6 microtubos a la velocidad de 13000 rpm durante 10 min, recuperamos el sobrenadante sin tocar las paredes del tubo, procurando dejar de 50 a 100 μ l para evitar material de la pastilla bacteriana.

- 4) Concomitantemente procesamos la pastilla bacteriana para obtención y caracterización del ADN de doble cadena.
- 5) Al sobrenadante de cada tubo le agregamos 200 μ l de PEG al 30% en NaCl 1.8 M, mezclamos en vortex e incubamos 15 min a T.A., centrifugamos las muestras a 13500 rpm durante 8 min y eliminamos el sobrenadante.
- 6) Resuspendimos la pastilla viral en 120 μ l de agua, agregamos 120 μ l de fenol saturado, mezclamos al vortex por 2 min, centrifugamos 5 min y recuperamos la fase superior con extremo cuidado.
- 7) Juntamos el contenido de dos tubos en uno, es decir 3 tubos finales. Les agregamos 1 ml de éter etílico y mezclamos al vortex.
- 8) Centrifugamos a 13500 rpm durante 10 min, retiramos el éter (fase superior) sin romper la interfase y repetimos esta operación una vez mas.
- 9) Mezclamos el contenido de cada juego de tres tubos en 2 tubos. Agregamos una décima de volumen de acetato de sodio 3 M, mezclamos por inversión, añadimos 2.5 volúmenes de etanol al 100% mezclamos y dejamos a -20°C al menos 1 h.
- 10) Centrifugamos a 13500 rpm durante 10 min y tiramos el sobrenadante. Lavamos la pastilla precipitada con 1 ml de etanol al 70%, centrifugamos 5 min y eliminamos el sobrenadante por decantación.
- 11) Secamos en el evaporador centrífugo al vacío por 5 min y resuspendimos la pastilla en 50 μ l de agua ultrapura.
- 12) Determinamos la concentración de ADN y la pureza en el espectrofotómetro a las longitudes de onda de 280, 260 y 230 nm.
- 13) Ajustamos una parte de esta solución de ADN viral a una concentración de 150 ng/ μ l y corrimos 1 μ l ADN en un gel de agarosa al 1% para visualizar que el ADN estuviera a la concentración ajustada.

Una vez que obtuvimos las hebras simples de cada bacteriófago quimérico, procedimos a realizar la siguiente técnica:

Determinación de la secuencia nucleotídica por el método de terminación de cadena por didesoxinucleótidos (Sanger y cols, 1977; Sambrook y cols, 1989; USB, 1990).

Este método, desarrollado por Sanger, es en el que esta basado el estuche elaborado por USB para secuenciación del ADN (véase fig. 6).

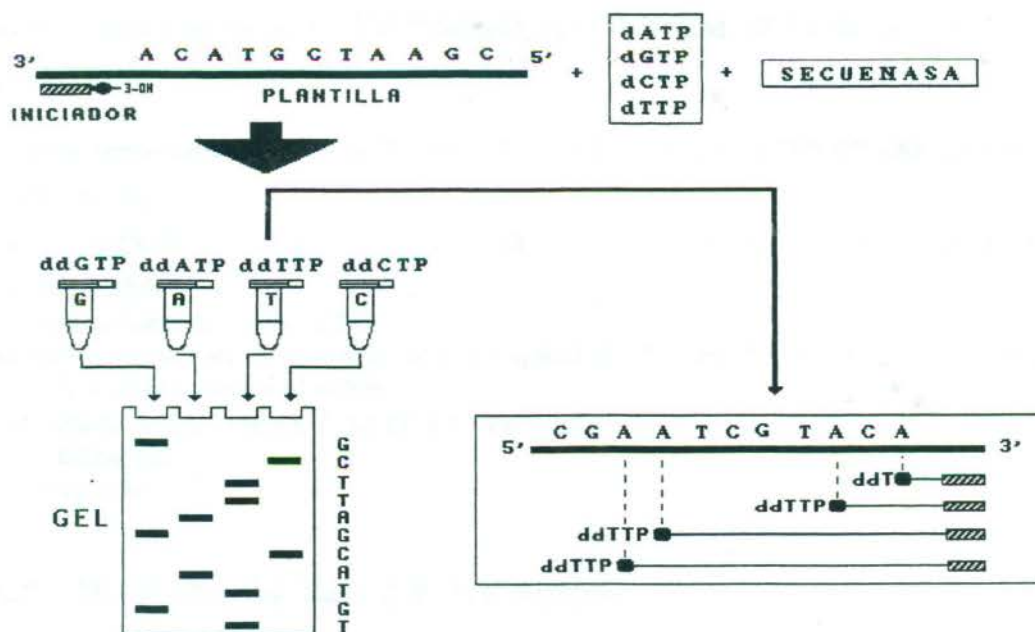


Figura 6.- Reacción de secuenciación. Sobre la plantilla de ADN de M13 de cadena sencilla se aparea el iniciador universal del bacteriófago en la región 3' en su sitio complementario. La reacción de polimerización está dada por la secuenasa (fragmento klenow de la ADN polimerasa modificada por ingeniería genética) al incorporar los desoxinucleótidos respectivos de los cuales la adenina está marcada con S^{35} . Una vez realizada la reacción de marcaje, distribuimos ésta en cuatro tubos etiquetados G, A, T y C en los cuales previamente habíamos colocado el didesoxinucleótido respectivo (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP), con los cuales la reacción de polimerización se ve interrumpida. Se espera por probabilidad que la reacción se detenga en cada uno de todos los nucleótidos a lo largo del fragmento, de tal forma que se origine cierto número de fragmentos que difieran en una base nucleotídica y en el gel los podamos leer como bandas con un nucleótido de diferencia en su longitud. Nótese en la figura el ejemplo para el terminador ddTTP, el cual va a detener la reacción frente a cada adenina (nucleótido complementario) que se encuentre a lo largo de la plantilla (nótese que la secuencia leída es la complementaria).

Reactivos y soluciones:

- Amortiguador de secuenasa: Tris-HCl 200 mM pH 7.5, MgCl 50 mM, NaCl 250 mM.
- Iniciador universal (0.5 pmol/ μ l (5'-GTAAAACGACGGCCAGT).
- Ditiotreitol (DTT 0.1 M).
- Mezcla de dNTP's marcados como dGTP 5x: dGTP 7.5 μ M, dCTP 7.5 μ M, dTTP 7.5 μ M.
- Mezcla terminadora ddG: dGTP 80 μ M, dATP 80 μ M, dCTP 80 μ M, dTTP 80 μ M y ddGTP 8 μ M.

- f) Mezcla terminadora ddA: dGTP 80 μ M, dATP 80 μ M, dCTP 80 μ M, dTTP 80 μ M y ddATP 8 μ M.
- g) Mezcla terminadora ddT: dGTP 80 μ M, dATP 80 μ M, dCTP 80 μ M, dTTP 80 μ M y ddTTP 8 μ M.
- h) Mezcla terminadora ddC: dGTP 80 μ M, dATP 80 μ M, dCTP 80 μ M, dTTP 80 μ M y ddCTP 8 μ M.
- i) Enzima secuenasa versión 2.0.
- j) Mezcla terminadora de la reacción: Formamida al 95%, EDTA 20 mM, Azul de bromofenol al 0.5% y Xilen-cianol al 0.5%.
- k) Nucleótido radiactivo: (S^{35})dATP a 10 mCi/ml.
- l) Agua ultrapura.
- m) Amortiguador TE:

I. Apareamiento del templado e iniciador.

- 1) En un microtubo colocamos lo siguiente:

-Iniciador universal	1 μ l
-Amortiguador de secuenasa	2 μ l
-ADN (150 μ g/ μ l) *	7 μ l (aprox. 1 μ g)

* Si está más concentrado, ajustar volumen a 7 μ l con agua ultrapura.

- 2) Calentamos los tubos a 65°C en baño María durante 2 min y los dejamos enfriar paulatinamente hasta alcanzar 25-30°C en 15- 30 min.

II. Reacción de polimerización.

- 1) Para reacciones normales (secuencia de aproximadamente 400 nucleótidos) la compañía recomienda diluir la mezcla de nucleótidos de polimerización 5 veces con agua ultrapura (4 μ l de nucleótidos y 16 μ l de agua).
- 2) Diluimos la enzima "secuenasa" 1:8 con el amortiguador de dilución específico frío (solo preparamos la enzima necesaria para cada corrida).
- 3) Mezclamos en un tubo lo siguiente:

-Plantilla-iniciador apareados	10.0 μ l
-DTT 0.1 M	1.0 μ l
-Mezcla de nucleótidos diluidos	2.0 μ l
-[S^{35}]dATP (10 μ Ci/ μ l)*	0.5 μ l
-Secuenasa diluida	<u>2.0 μl</u>
Volumen total	15.5 μ l

El volumen utilizado del nucleótido radiactivo dependió de la actividad en el momento de su uso aunque se recomienda usar 5 μ Ci por reacción.

Nota: Estas reacciones se prepararon en baño de hielo.

- 4) Mezclamos suavemente la reacción y la concentramos en el fondo del tubo centrifugándola por unos segundos en la microcentrífuga e incubamos a T.A. por 5 min.

III. Reacción de terminación.

- 1) Preparamos cuatro tubos marcados con las letras G,A,T y C respectivamente para cada muestra; les agregamos 2.5 μ l de la mezcla de terminación ddGTP en el tubo marcado con G; ddATP en A; ddTTP en T y ddCTP en C.
- 2) Precalentamos los tubos anteriores a 37°C por lo menos un min. Una vez terminada la incubación de la reacción de polimerización de la cadena complementaria, de cada tubo transferimos 3.6 μ l de la reacción (marcada radiactivamente) a cada uno de los tubos correspondientes del punto 1 (que contienen los terminadores). Mezclamos suavemente con la micropipeta y centrifugamos para bajar las muestras al fondo del tubo, continuamos la incubación a 37°C por un total de 5 min (se puede continuar hasta 30 min).
- 3) Agregamos 4 μ l de la solución de inhibición de la reacción; mezclamos y mantuvimos en baño de hielo hasta su aplicación al gel o guardamos a -20°C por un tiempo no mayor a una semana.
- 4) Cuando el gel estuvo listo, calentamos las muestras a 80 °C por 2 min.
- 5) Lavamos con una jeringa los carriles del gel para eliminar la urea y colocamos alícuotas (3-4 μ l) de las reacciones en el siguiente orden G,A,T,C.

Preparación y corrida del gel de poliacrilamida-urea.

La duración de la corrida y la concentración del gel de secuenciación son los principales factores que determinan la región de la secuencia nucleotídica que podrá ser leída. Bajo condiciones óptimas se pueden leer 400 bases comenzando desde la parte inferior de la placa radiográfica. Desafortunadamente, son muchos los factores que reducen esta resolución, entre ellos están la calidad de los reactivos usados, el tiempo en el que ocurre la polimerización del gel, la temperatura que adquiere el gel durante la corrida electroforética y por último un secado apropiado del gel después de la corrida.

Recomendaciones:

- El gel se deberá preparar de 1 a 20 h antes de utilizarlo y en caso de que se quiera leer la secuencia cercana al iniciador, hay que precorrerlo durante 30-60 min a 40-50 watts.
- Corridas de geles durante 12 a 15 h permiten leer de 300 a 400 bases.
- Colocar las muestras en el orden G,A,T,C.
- Para geles en los que se usa (35 S), la exposición deberá hacerse en contacto directo entre el gel seco y la película radiográfica de rayos X, es decir, previamente hay que retirar el plástico autoadherible del gel.
- Evitar que al vaciar la poliacrilamida en los vidrios se derrame en la cinta autoadherible que sella los bordes de éstos, porque se despegará y habrá fugas.

Reactivos, soluciones y materiales:

- a) Solución de silicón: Diclorodietil silano al 5 % en cloroformo.
- b) Cinta plástica adhesiva ancha.
- c) Cinta masking-tape.
- d) TBE 5X (para 1 l): Tris-base, 54.0 g; Acido Bórico, 27.5 g y EDTA 0.5 M pH 8.0, 20.0 ml.
- e) Solución de urea (para 500 ml): Urea, 233.5 g; TBE 5X, 100.0 ml; Agua hasta 500 ml.
- f) Solución de poliacrilamida al 20% (para 500 ml): Acrilamida 96.50 g; Metilen-Bis-Acrilamida, 3.35 g; Urea ultrapura, 233.00 g; TBE 5X, 100.0 ml, Agua hasta 500 ml.
- g) TEMED.
- h) PSA (fresco) al 10%.

GEL AL 6 % (120 ml):

Solución de poliacrilamida al 20%	38.60 ml
Solución de Urea (7.77 M)	72.00 ml
Urea en polvo (ajuste de conc.)	6.00 g
Persulfato de amonio al 10 % (PSA)	0.50 ml
TEMED	0.06 ml

GEL AL 8 % (120 ml):

Solución de poliacrilamida al 20%	48.00 ml
Solución de Urea (7.77 M)	72.00 ml
Persulfato de amonio al 10 % (PSA)	0.60 ml
TEMED	0.07 ml

Nota: El gel debe polimerizar en un tiempo de 5 a 15 minutos. Es recomendable tener filtradas a través de una membrana de porosidad de 0.45 μm las soluciones de urea y de poliacrilamida antes de preparar el gel.

Procedimiento:

- 1) Lavamos los vidrios con jabón, enjuagamos con agua de la llave, después con agua desionizada, dejamos secar y por último los limpiamos con alcohol etílico al 100%. El vidrio mas largo lo colocamos en la campana de extracción, agregamos unas gotas de solución de silicón y la distribuimos con una gasa. Dejamos secar 30 min, lavamos con etanol y dejamos secar a T.A.
- 2) Ensamblamos los vidrios colocando los separadores con la parte más gruesa (1.2 mm) en la porción inferior y la más delgada (0.4 mm) en la superior.
- 3) Colocamos la cinta plástica dieléctrica, primeramente en el borde inferior del juego de vidrios ya armado, en seguida colocamos la cinta adhesiva sobre los costados y por último pusimos un refuerzo de cinta en la parte inferior. Para evitar que la poliacrilamida se derrame al estar vaciándola colocamos cinta maskin-tape en el la parte superior del vidrio que sobresale. Preparamos la solución de poliacrilamida al 8% en un matraz Erlenmeyer de 125 ml de capacidad, agregando primeramente 72 ml de la solución de urea 7.7. M, después 48 ml de la solución de poliacrilamida al 20% y mezclamos. En seguida colocamos 60 μl de la solución de persulfato de amonio al 10%, mezclamos suavemente para evitar la formación de burbujas y por último agregamos el TEMED e inmediatamente mezclamos

suavemente por inversión con la ayuda de un pedazo de papel parafilm tapando la boca del matraz para evitar derramar la solución.

- 4) Sin perder tiempo vaciamos la poliacrilamida colocando los vidrios con una inclinación de 20-30° hasta llenar un 70% de la capacidad, como generalmente se forman burbujas al estarlo llenando, colocamos al sistema de manera vertical hasta que las burbujas subieran por flotación y salieran completamente de la solución del gel, volvimos a inclinar los vidrios y ajustamos el volumen con mas poliacrilamida hasta dejarlo al nivel adecuado.
- 5) Una vez lleno, colocamos el peine tipo "dientes de tiburón" invertido (con los dientes hacia afuera). El peine debe introducirse unos 7-8 mm en el gel, si se introduce más no es posible poner las muestras. Nos aseguramos que los peines no quedaran flojos colocando una pinza de cada lado de la parte superior de los vidrios.
- 6) Dejamos polimerizar con la misma inclinación. Una vez que ha polimerizado, en caso de no procesarlo el mismo día lo dejamos máximo hasta el otro día, manteniendo la humedad necesaria colocando toallas absorbentes empapadas con agua y luego con plástico autoadherible para evitar evaporación y crear un ambiente húmedo. Alternativamente lo dejamos montado en la cámara para secuenciación inmerso en el amortiguador para corrida.
- 7) Para instalarlo en el aparato de electroforesis retiramos la cinta inferior del gel para permitir el paso de la corriente eléctrica, retiramos los peines, eliminamos los restos de poliacrilamida y urea con la ayuda de una jeringa con la aguja doblada a 135° y reintroducimos los peines, pero ahora con los dientes hacia abajo hasta pinchar ligeramente el gel (1 o 2 mm).
- 8) Montamos el gel en la cámara de electroforesis y llenamos los depósitos con amortiguador TBE 1X. Llevamos a cabo una pre-corrida a 40-50 watts por 30 a 60 min.
- 9) Antes de colocar las muestras, lavamos los carriles con la misma solución de corrida utilizando una jeringa para eliminar el exceso de urea, de lo contrario las muestras migrarán de manera inadecuada.
- 10) Corrimos el gel a 35-50 watts por 7 a 16 h, dependiendo de la región que deseáramos leer.

Secado y autoradiografía del gel de secuenciación.

Reactivos, soluciones y material:

- a) Charola de plástico o vidrio (40x50x3 cm).
- b) Papel Wattman 3M (46x57 cm).
- c) Plástico autoadherible (Kleen pack).
- d) Chasis para rayos X (30x38 cm).
- e) Equipo de secado con vacío y calor.
- f) Solución de lavado: alcohol metílico al 15% y ácido acético al 5 % disueltos en agua.

Procedimiento:

- 1) Después de correr la electroforesis el tiempo necesario, retiramos la corriente y luego el gel procurando tener cuidado con el líquido de la cámara inferior por su contenido de radiactividad.
- 2) Lavamos los cristales y quitamos primeramente los separadores de plástico, sacándolos hacia los lados. Posteriormente despegamos con sumo cuidado los vidrios haciendo palanca con dos espátulas colocadas entre ellos a nivel de la base.
- 3) Sumergimos el vidrio que retuvo el gel y con éste hacia arriba en una charola que lo pudiera contener en la solución de lavado. Primero introducimos un extremo y después bajamos el otro lentamente (de lo contrario se formarán burbujas que despegaran al gel). Lo dejamos en la solución por un tiempo de 40 a 55 min.
- 4) Sacamos el vidrio con el gel, levantándolo de un extremo lentamente y lo pusimos a escurrir en ángulo de 30-40° sobre servilletas o papel absorbente durante 10 min.

- 5) Colocamos el vidrio horizontalmente (con el gel en la cara superior), acto seguido sobrepusimos una hoja de papel filtro Wattman 3M del tamaño del gel o de la región donde hayamos puesto las muestras, iniciando en el centro del gel y bajando el papel de manera que se fuera adhiriendo hacia los extremos, avanzando gradualmente hasta cubrir la totalidad del gel. Extendimos bien el papel al pasar una pipeta de vidrio rodándola y al mismo tiempo haciendo presión sobre este para que hubiera una mejor adherencia.
- 6) Levantamos el papel filtro iniciando de la orilla mas gruesa del gel de tal manera que quedara adosado y a medida que fuéramos levantando el gel, éste se viniera adherido al papel. Esto lo hicimos a una velocidad constante para evitar que el gel se rompiera o se despegara.
- 7) Recortamos las partes sobresalientes del gel sobre el papel con un bisturí y cubrimos con plástico autoadherible toda la región del papel que contiene al gel.
- 8) Ensamblamos el sistema de secado del gel en el aparato para este propósito (BIO-RAD Dual temperature slab gel dryer, Model 1125B) conectado a una bomba de alto vacío, acomodado de la siguiente manera:
 - Aparato de secado con hoja de acero perforado.
 - Filtro espaciador.
 - Dos hojas de papel filtro whatman 3M.
 - Papel filtro con el gel en la cara superior.
 - Hoja de plástico autoadherible (saran wrap).
 - Cubierta de hule flexible (del aparato).
- 9) Conectamos la bomba de vacío al aparato de secado y la pusimos a funcionar (con la trampa condensadora previamente enfriada).
- 10) Encendimos la bomba (del secador) que hace vacío y la ajustamos de 3 a 4 h. De igual manera seleccionamos el interruptor de temperatura a 80°C y programamos su mecanismo de reloj por el mismo tiempo.
- 11) Una vez concluido el tiempo de secado del gel (vacío y calor), retiramos los dos papel 3MM sobre el cual descansaba el gel, enseguida eliminamos el plástico autoadherible y checamos que el gel estuviera bien seco (esto lo verificamos tocando el gel y checamos que no se sintiera pegajoso al tacto).
- 12) Recortamos la parte superior del gel hasta hacerlo que ajustara su tamaño al del chasis radiográfico, posteriormente lo colocamos dentro de éste y sobre de el pusimos una película de rayos X. Dejamos exponer a T.A. de 1 a 4 días dependiendo de la actividad del radioisótopo.

Cumplido el tiempo de exposición, revelamos nuestra película y leímos la secuencia del ADNc de DGH, iniciando de la parte inferior del film hacia la superior, guiándonos con la secuencia de aparición de las bandas en el orden G,A,T, y C (véase fig. 7).

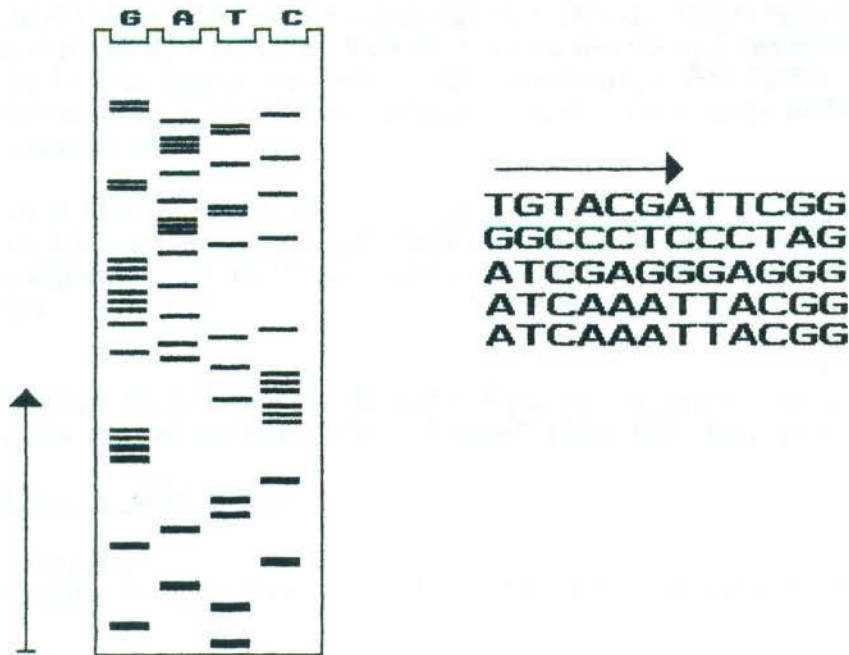


Figura 7.- Ejemplo de lectura de un gel de secuenciación. Se inicia leyendo de la porción inferior del gel banda a banda hacia arriba según vaya apareciendo en el orden de la escalera. El primer carril corresponde a los nucleótidos de Guanina, el segundo a los de Adenina, el tercero a los de Timina y el cuarto a los de Citosina. Las letras se acomodan de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo.

Como la introducción del fragmento del ADNc de DGH fue en ambas orientaciones, (debido al uso de los dos vectores M13 mp18 y mp19) lo leímos en los dos sentidos, comenzando ya sea por la región 5' donde empieza la señal del inicio de la traducción (codón ATG) o del lado contrario 3' donde termina la secuencia para DGH (codón de terminación TAG). Una vez determinadas las secuencias, las traslapamos para alinearlas y así obtuvimos la secuencia completa del ADNc de DGH.

Para las regiones que dieron problema con la lectura, a causa de compresiones (estructuras secundarias formadas en el ADN generalmente entre las bases G-C, y que producen mala resolución de las bandas, pues donde debe haber dos se comportan como una sola), utilizamos del estuche de secuenciación la base desoxiinosina, la cual es un nucleótido que elimina las compresiones, por lo tanto permite leer adecuadamente las bandas.

Hasta aquí teníamos la secuencia total del ADNc de DGH pero leída de una manera traslapada y para corroborar la autenticidad de la secuencia, tuvimos que leer las dos cadenas en ambas orientaciones, lo que implicaba leer aproximadamente 700 nucleótidos, y dado que nuestro sistema solo nos permite leer como máximo 400-500 pb, optamos por cortar en un sitio de restricción a mediación de la secuencia del ADNc de DGH. Así obtuvimos dos fragmentos, uno que va desde el sitio *Eco* RI (localizado en el lado 5') al sitio de restricción intermedio y el segundo

fragmento que va desde éste hasta el sitio *Hind* III (localizado en la región 3'). Estos los subclonamos en el vector M13 adecuado para cada caso. De esta manera logramos leer la secuencia nucleotídica a partir de dicho sitio, es decir de la región interna hacia un extremo en una clona y hacia el otro en la otra, lo que nos permitió leer completamente el ADNc de DGH, en ambas cadenas y orientaciones. Con esto descartamos posibles mutaciones incluidas ya sea por la transcriptasa inversa o por la polimerasa Taq.

Para lograr la clonación de estos dos fragmentos en los fagos M13mp18 y M13mp19, fue necesario purificarlos del vector M13 que contiene el ADNc de DGH, esto con el fin de facilitar y asegurar la incorporación de los fragmentos en su respectivo vector, para lograrlo utilizamos la siguiente técnica.

Purificación de fragmentos de ADN a partir de agarosa de bajo punto de fusión por el método "Gene Clean" (Bio 101, Inc. 1991).

Reactivos y soluciones:

- Ioduro de Sodio saturado.
- Solución de lavado: Etanol al 50%, Tris HCl 20 mM pH 7.2, NaCl 0.2 M y EDTA 2 mM.
- Jugo azul 6X:

Azul de bromofenol al	0.25 %.
Xilen-cianol FF al	0.25 %.
Glicerol en TE al	30.00 %.

Procedimiento:

- 1) Preparamos una solución de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 1 % en TAE 1X y la dejamos enfriar hasta 50-60 °C. Después agregamos bromuro de etidio hasta adquirir una concentración final de 0.5 µg/µl.
- 2) Vaciamos en el molde y dejamos gelificar a T.A., pusimos en las casillas del gel las muestras de ADN del fago quimérico (previamente digerido) mezcladas con jugo azul.
- 3) Corrimos la electroforesis y seguimos la migración de los fragmentos de ADN de nuestro interés con ayuda de una lámpara de luz ultravioleta de longitud de onda larga. Cuando se resolvieron los fragmentos, cortamos la banda de nuestro interés con bisturí y la colocamos en un microtubo de 1.5 ml.
- 4) Centrifugamos 30 s y medimos el volumen aproximado de la agarosa en el tubo.

Nota: La eficiencia del método es mejor en volúmenes de agarosa iguales o menores a 400µl y con cantidades de ADN iguales o menores a 5 µg/banda.

- 5) Agregamos 2.5 volúmenes de ioduro de sodio frío (NaI) y colocamos el tubo en baño María a 70°C hasta que se disolvió totalmente la agarosa.
- 6) Adicionamos por tubo 5 µl de gel de sílica fría y mezclamos el contenido en vortex durante 20 s.
- 7) Incubamos 5 min en hielo y centrifugamos 5 s a la velocidad máxima en la microcentrífuga.
- 8) Retiramos el sobrenadante y resuspendimos la pastilla de sílica que había adsorbido el ADN en 300 µl de solución de lavado fría.
- 9) Centrifugamos 5 s al máximo y repetimos la operación de lavado dos veces más.

- 10) Después del tercer lavado, resuspendimos la pastilla en 10 μ l de agua ultrapura e incubamos 2-3 min en baño María a 50°C.
- 11) Centrifugamos durante 30 segundos y recuperamos el sobrenadante, de manera que no arrastráramos la sílica. Volvimos a resuspender la pastilla en 10 μ l de agua y repetimos la operación desde el paso 10.
- 12) Juntamos ambas alícuotas (20 μ l totales) y corrimos en gel de agarosa al 1% el volumen necesario de muestra para asegurarnos que hayamos recuperado el fragmento y calcular a ojo la concentración aproximada del ADN obtenido. Lo guardamos a -20°C hasta su uso.

La ligación entre los fragmentos purificados y el ADN del M13, se practicó tal y como se describe en la reacción de la ligasa; esta técnica es una modificación al método descrito por Sambrook y cols en 1989.

Transformamos *Escherichia coli* con nuestro producto de ligación, caracterizamos las clonas resultantes, hicimos extracción de su ADN de cadena sencilla y determinamos la secuencia nucleotídica faltante de las dos cadenas correspondiente a cada fragmento de ambas construcciones para completar así la secuencia total en ambas orientaciones del ADNc de DGH, como lo hemos venido mencionando.

Estrategia para clonar la región 3' no traducible del ADNc de la DGH.

Como la estrategia anterior para amplificar específicamente y clonar el ADNc de la DGH resultó exitosa, y habiendo determinado su secuencia nucleotídica, procedimos a llevar a cabo nuestra segunda estrategia para determinar la secuencia natural de los últimos ocho codones del ADNc de DGH anteriores al codón de terminación (TAG), ya que los últimos 27 nucleótidos (ocho codones más el codón de terminación) del producto de amplificación generado usando el oligo 3' consenso corresponderían a la secuencia del mismo. Para esto utilizamos el iniciador 3' genérico poli (dT), al cual le agregamos un sitio extra de restricción para facilitar la clonación. A continuación mostramos su secuencia:

HindIII
3' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCGAAACGTACGT 5'

Este iniciador se apareja en la región de la cola de ácido poliadenílico característica de todos los ARN mensajeros eucarióticos.

Además de permitirnos conocer la secuencia de la región del ADNc correspondiente al **carboxi-terminal de la hormona**, este segundo cebador nos permitiría también conocer la región 3' no traducible, ya que la secuencia donde se une este iniciador está flanqueando a la región 3' no traducible, por lo tanto quedará incluida en la amplificación cuya especificidad estuvo dada por el iniciador 5'.

Una vez que amplificamos con éxito el ADNc de DGH con su región 3' completa, proseguimos como con el ADNc de la primera estrategia de clonación y secuenciación para conocer la secuencia nucleotídica faltante de la región 3' del ADNc de DGH.

Con la secuencia completa procedimos a compararla con otras secuencias ya conocidas de hormonas del crecimiento.

Comparaciones de secuencias nucleotídica y aminoacídica entre DGH y diferentes GHs de mamíferos.

Con el fin de facilitar nuestras comparaciones entre las GHs, utilizamos un programa computacional (Pustell y Kafatos, 1982; Pustell y Kafatos, 1984).

A través de la red computacional INTERNET recuperamos del banco de datos EMBL versión 72, y vía red ICGEB (Trieste, Italia) la secuencia del ADNc de la hormona de las GHs del cerdo, visón, vaca y borrego, utilizamos para ello el programa Intelligenetics "Findseq". Alineamos estas secuencias manualmente de manera que coincidieran los codones de iniciación (ATG) y de terminación (TAG) de cada secuencia. Esto lo hicimos tanto para la secuencia nucleotídica como para la aminoacídica.

De las bases o residuos que mostraron diferencias, calculamos el porcentaje de similitud para cada secuencia respecto a la DGH.

Subclonación del ADNc de DGH y estrategia de enfasamiento.

Conocida la secuencia completa del ADNc de DGH, decidimos llevar a cabo la subclonación de éste sobre el vector de expresión procariótico pMALc, para dar origen a la clona recombinante pMALc-DGH.

Para lograr lo anterior, previamente enfasamos el marco de lectura del ADNc de DGH (obtenido de la clona M13mp18-DGH) con el de pMALc para que la síntesis de DGH pudiera darse, y lo hicimos de la siguiente manera:

En la plasmidoteca de nuestro laboratorio contábamos con el plásmido pSS-hGH el cual contiene la secuencia de los primeros codones de interleucina-2 (IL-2) frente a los de hGH. Flanqueando y dentro de la secuencia nucleotídica de IL-2 están dos sitios de restricción de nuestro interés, *Eco* RI y *Xho* I respectivamente, estos nos sirvieron para enfasar el ADNc de DGH con el vector pMALc. Primeramente cortamos a pSS-hGH en dichos sitios dejando el vector listo para insertar el ADNc de DGH el cual obtuvimos de la clona M13mp18-DGH al cortar en los mismos sitios (*Eco* RI y *Xho* I). Posteriormente ligamos el vector pSS-hGH (*Eco* RI-*Xho* I) con el fragmento del ADNc de DGH abierto en los mismos sitios, de ésta manera construimos la clona intermedia pJA-DGH, la cual contiene de *Eco* RI hasta *Xho* I parte de interleucina-2 y de *Xho* I hasta *Hind* III al ADNc de DGH.

Nota: Este ADNc de DGH lo obtuvimos de otra amplificación por la RCP con un nuevo iniciador 5' que contiene en su secuencia el sitio *Xho* I extra.

Cortamos a pJA-DGH en *Eco* RI y *Hind* III liberando el ADNc de DGH y lo ligamos de acuerdo a la reacción de la ligasa en el vector de expresión pMALc abierto en los mismos sitios de restricción, con esto logramos la construcción quimérica de expresión pMALc-DGH (véase fig. 8).

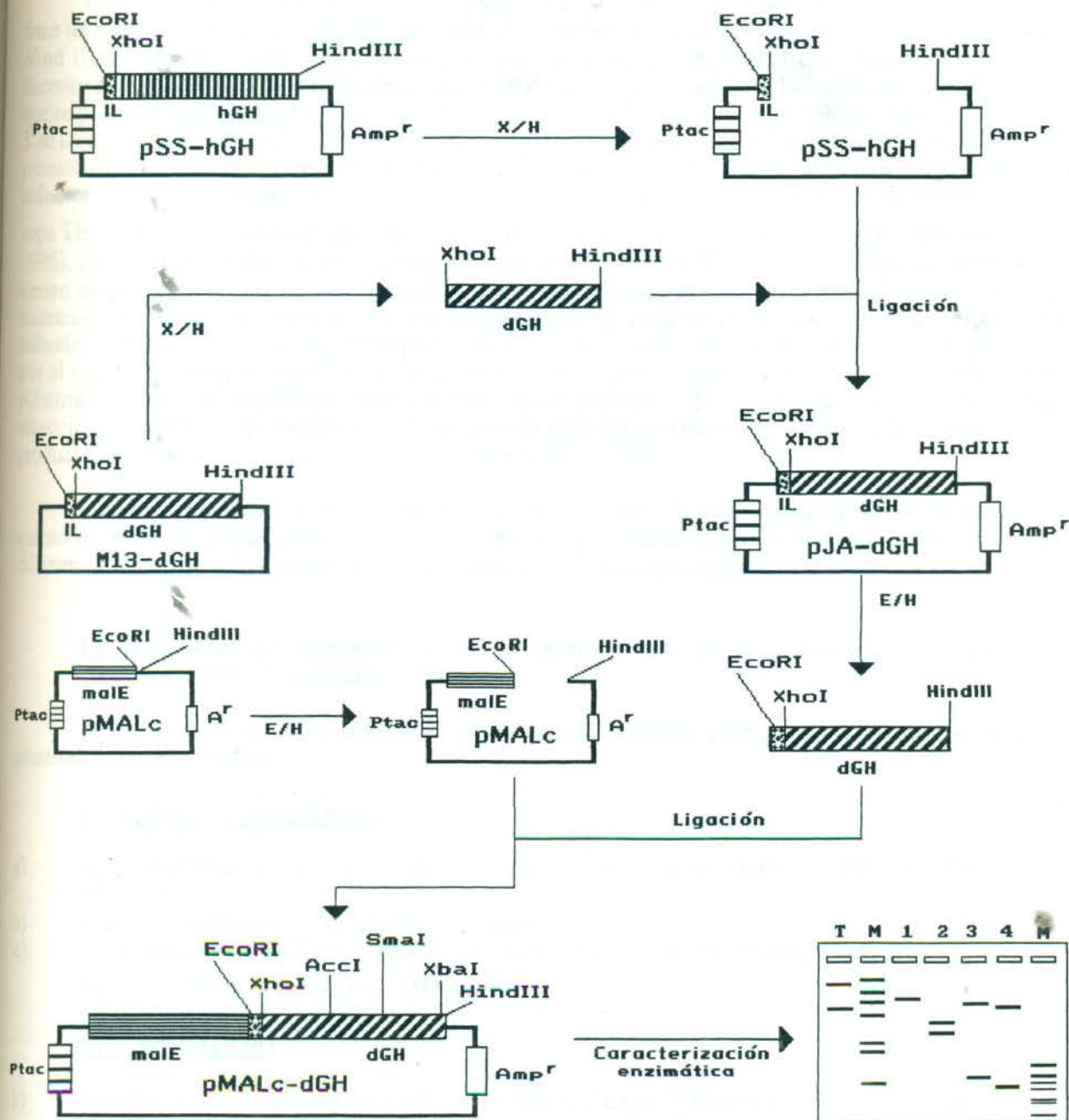


Figura 8.- Estrategia para enfazar y subclonar el ADNc de DGH. Cortamos en los sitios *XhoI*-*HindIII* al plásmido pSS-hGH, dejándolo apto para ser ligado; igualmente lo hicimos con la construcción M13mp18-DGH, de la cual liberamos el ADNc de DGH y lo ligamos con el vector plasmídico mencionado, originando la clona intermedia PJA-DGH, quedándole la región 5' (de *EcoRI* a *XhoI*) del ADNc de DGH con parte de la secuencia de interleucina -2 (*IL*-2), dicha región nos permitirá poner en fase la secuencia nucleotídica de DGH con la secuencia del vector de expresión (*pMALc*) al insertarlo en éste, previamente liberamos el ADNc de DGH de PJA-DGH cortando en *EcoRI*-*HindIII* para ligarlo a *pMALc* abierto en los mismos sitios de restricción. De esta forma originamos el vector expresor (*pMALc*-DGH) con el marco de lectura adecuado para expresar DGH; dicha construcción la caracterizamos con enzimas de restricción diagnósticas.

Cabe mencionar que el plásmido pMALc es un vector de expresión procariótico, el cual tiene un sitio de policlonación múltiple, donde insertamos nuestro ADNc de DGH (sitios *Eco* RI y *Hind* III); este sitio está flanqueado por dos secuencias nucleotídicas: hacia el extremo 5' encontramos la secuencia codificante para MBP (proteína de unión a la maltosa), proteína con la que se produce la fusión de la nuestra (Guan y cols, 1987; Maina y cols, 1988); y hacia el extremo 3' se localiza la secuencia lac Z codificante para la β -Galactosidasa. El sistema está regulado por el promotor tac (Duplay y cols, 1984; Amann y Brosius, 1985.), el cual se activa en presencia del inductor IPTG, desencadenándose la expresión de la MBP fusionada con Lac Z; debido a que la cepa TB1 tiene los elementos necesarios para llevar a cabo la α -complementación (Johnston y cols, 1986), en los ensayos donde utilizamos el compuesto incoloro X-Gal las colonias bacterianas que tienen el plásmido presentaron un color azul. Este resultó ser un sistema útil para seleccionar nuestras clonas recombinantes que han incorporado el fragmento de DGH, ya que el hecho de haberlo incorporado causó un irrupimiento en el marco de lectura para el gen lac Z, producido por el codón de terminación (TAG) de nuestro inserto; por lo tanto, las bacterias que tuvieron este plásmido quimérico originaron colonias blancas en presencia de X-Gal y de esta manera pudimos seleccionar nuestros recombinantes. Además este plásmido presenta el gen de la β -lactamasa cuyo producto confiere resistencia a la bacteria sobre la ampicilina.

Una vez que realizamos la ligación, llevamos a cabo la incorporación del ADN plasmídico quimérico en la bacteria *Escherichia coli* por medio de la transformación bacteriana para plásmidos, utilizando el método de cloruro de calcio como se menciona enseguida .

Preparación de Bacterias Calcio-Competentes de *Escherichia coli* (Dagert y Erlich, 1979; Hanahan, 1983).

Este tratamiento permeabiliza la pared de las bacterias para permitir la entrada del ADN plasmídico transformante.

Reactivos y soluciones:

- a) Medio LB (Luria-Bertani): Triptona al 1%, extracto de levadura al 0.5% y NaCl al 1%, pH 7.5.
- b) Cloruro de calcio 0.1 M, estéril y enfriado a 4°C.
- c) Cajas con agar LB-Ampicilina: Triptona al 1%, extracto de levadura al 0.5%, NaCl al 1%, Agar al 1.5% y Ampicilina a 100 μ g/ml.

Procedimiento:

- 1) A partir de un cultivo puro de *Escherichia coli* cepa TB1 en caja de petri, inoculamos una azada de la colonia bacteriana en un tubo de ensayo que contenía 4 ml de LB. Permitimos el crecimiento durante toda la noche con agitación vigorosa a 37 °C.
- 2) Diluimos el inóculo anterior a una relación de 1:100 en un matraz con 50 ml de medio de cultivo y dejamos crecer con agitación hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 0.35-0.4 a 600 nm.
- 3) Una vez alcanzada ésta, colocamos el matraz en baño de hielo por 10 min y recuperamos las células en un tubo Falcon de 50 ml estéril por centrifugación a 5000 rpm por 5 min.
- 4) Desechamos el sobrenadante y resuspendimos el paquete celular en 20 ml de cloruro de calcio frío (100 mM) e incubamos 20 min en baño de hielo.
- 5) Centrifugamos en las mismas condiciones del paso 3, resuspendimos en 2 ml de CaCl₂ frío, dejamos 10-20 min en baño de hielo y utilizamos 200 μ l de células calcio competentes para cada transformación.

Transformación:

- 1) Transferimos 200 μ l de bacterias calcio competentes recién preparadas a un microtubo frío, que contenía el ADN transformante proveniente de la ligación, incluyendo además, un tubo con 1 ng de ADN superenrollado (pBR322) el cual utilizamos como testigo positivo, y otro que contenía solo 10 μ l de H₂O estéril, correspondiente al testigo negativo; todos los ADNs estaban diluidos en agua a un volumen de 10 μ l, previo a la adición de las bacterias calcio competentes.
- 2) Mezclamos y mantuvimos los tubos con bacterias y ADN en hielo por 40-45 min, mezclando por intervalos de 10 min.
- 3) Sacamos los tubos del hielo y los colocamos en un baño María para dar a las bacterias un choque térmico a 42°C por un tiempo de 2 min. Los colocamos a T.A. y agregamos 100 μ l de medio LB precalentado a 37 °C e incubamos a 37 °C por 20 min con agitación.
- 4) Transferimos el contenido de los tubos utilizando pipeta con puntilla estéril a cajas de petri con agar LB mas el antibiótico ampicilina y plaqueamos con espátula de vidrio, hasta que la muestra estuviera totalmente seca y distribuida homogéneamente.
- 5) Colocamos las cajas petri en la incubadora y a la hora las invertimos para dejarlas creciendo por un tiempo de 12-16 h a una temperatura de 37°C.
- 6) Finalmente, levantamos las colonias producidas con la ayuda del asa bacteriológica y analizamos la presencia del plásmido quimérico por la técnica de minipreparación, la cual describimos a continuación.

Minipreparación de plásmidos por el método de lisis alcalina.

El presente protocolo está basado en el método de Morelle descrito en 1989 y fue utilizado para recuperar los plásmidos de las clonas transformadas para posteriormente caracterizarlos con enzimas de restricción diagnósticas.

Reactivos y soluciones:

- a) Caldo LB suplementado con ampicilina (100 μ g/ml).
- b) Solución de lisis: Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM y Lisozima a 4 mg/ml (solución I).
- c) Solución alcalina: NaOH 0.2 N y SDS al 1% (solución II).
- d) Acetato de amonio 7.5 M (solución III).
- e) Isopropanol
- f) Etanol al 100%
- g) Etanol al 70%
- h) TE: Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM.
- i) ARNasa a 10 mg/ml.
- j) Agua ultrapura.
- k) Fenol saturado con Tris HCl 0.1 M pH 8.0; Hidroxiquinoleína al 0.1% y β -mercaptoetanol al 0.2%, según Sambrook y cols.
- l) Sevag (Cloroformo:alcohol isoamílico, 24:1).
- m) Acetato de sodio 3 M pH=5.5.

Procedimiento:

- 1) Inoculamos 18 clonas bacterianas provenientes de la transformación con el plásmido pMALc, cada una en tubos que contenían 4 ml de caldo LB-ampicilina. Las crecimos durante 16 h a una temperatura de 37°C con agitación vigorosa.
- 2) En tubos de microcentrífuga cosechamos 1.5 ml de cultivo bacteriano centrifugando a 13500 rpm por 30 s, decantamos el sobrenadante y posteriormente resuspendimos al vortex las pastillas bacterianas en 200 µl de solución de lisis (solución I).
- 3) Después de 5 min a T.A. agregamos a cada tubo 400 µl de solución alcalina preparada recientemente, los mezclamos por inversión de 6-8 veces y los colocamos en baño de hielo por 5 min.
- 4) Agregamos 300 µl de acetato de amonio 7.5 M y mezclamos suavemente por inversión 6-8 veces el contenido. Los colocamos nuevamente en hielo por 10 min para permitir la precipitación de proteínas, ARN de alto peso molecular y ADN cromosómico.
- 5) Centrifugamos a 13500 rpm durante 6 min y transferimos los sobrenadantes a otros tubos de microcentrífuga, añadimos medio volumen de fenol saturado, mezclamos al vortex por 30 s, después añadimos medio volumen de Sevag y volvimos a mezclar al vortex. Posteriormente centrifugamos a 13000 rpm durante 4 min y recuperamos la fase acuosa pasándola a nuevos tubos de 1.5 ml, teniendo cuidado de no tocar la interfase.
- 6) Añadimos 0.6 volúmenes de isopropanol, mezclamos y dejamos reposar por 20 min a -20 °C.
- 7) Precipitamos a 13500 rpm durante 10 min. Decantamos el sobrenadante y lavamos la pastilla de ADN con 600 µl de etanol al 70%. Secamos las pastillas en el evaporador centrífugo al vacío por un tiempo de 5 min.
- 8) Resuspendimos nuestra pastilla en un volumen de 30 µl de agua ultrapura mas 1µl de ARNasa. Por último tomamos alícuotas de 1 µl para analizar el perfil electroforético de los plásmidos obtenidos en geles de agarosa al 1%.

Con el ADN obtenido realizamos la caracterización de tamaño del inserto y de los sitios de restricción propios del ADNc de DGH. Ya caracterizado fue necesario tenerlo en existencia en suficiente cantidad para la plasmidoteca de nuestro laboratorio y entre otras cosas para poder manipularlo, por lo que llevamos a cabo la siguiente técnica.

Crecimiento de plásmidos a mediana escala. Método descrito por Shadu y Gedamu en 1988.

Reactivos:

- 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 a 4 mg/ml (solución I).
- c) Solución alcalina: NaOH 0.2 N y SDS al 1% (solución II).
- d) Acetato de amonio 7.5 M (solución III).
- e) Isopropanol
- f) Etanol al 100%
- g) Etanol al 70%
- h) TE: Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM.
- i) ARNasa a 10 mg/ml.
- j) Agua ultrapura.

- k) Fenol saturado con Tris HCl 0.1 M pH 8.0; Hidroxiquinoleína al 0.1% y β -mercaptoetanol al 0.2%, según Sambrook y cols, 1989.
- l) Sevag (Cloroformo:alcohol isoamílico, 24:1).
- m) NaCl 1.6 M, PEG 13%.
- n) Cloruro de litio 8 M.
- ñ) Acetato de sodio 3 M pH=5.5.

Procedimiento:

- 1) Inoculamos 50 ml de medio LB (ampicilina a 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) con 50 μl de cultivo de células o una colonia de la cepa de interés, dejamos crecer por 12-16 h a 37°C con agitación vigorosa.
- 2) Cosechamos las células por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min en tubos Falcon de 50 ml y descartamos completamente el sobrenadante por decantación.
- 3) Resuspendimos las células en 1.8 ml de solución I, y agregamos 200 μl de solución de lisozima a una concentración de 10 mg/ml. Mezclamos por inversión e incubamos 5 min a T.A.
- 4) Agregamos 4 ml de solución II, mezclamos por inversión 8-10 veces y dejamos 10 minutos en baño de hielo.
- 5) Agregamos 3 ml de solución III, mezclamos por inversión e incubamos 10 min en baño de hielo.
- 6) Centrifugamos a 6000 rpm durante 10 min.
- 7) Filtramos el sobrenadante a través de cuatro capas de tela fina en un tubo Falcon de 15 ml. Agregamos 0.6 volúmenes de isopropanol, mezclamos e incubamos a -20 °C por 30 min.
- 8) Recuperamos los ácidos nucleicos centrifugando 15 minutos a 6000 rpm a 4°C en una centrífuga refrigerada de mesa.
- 9) Decantamos el sobrenadante e invertimos el tubo sobre una servilleta para escurrir el líquido. Lavamos el precipitado con 2 ml de etanol al 70% y centrifugamos a 6000 rpm durante 4 min.
- 10) Decantamos el sobrenadante, secamos por 5 min al vacío, disolvimos el precipitado en 400 μl de agua destilada, después lo pasamos a un microtubo de 1.5 ml.
- 11) Agregamos 180 μl de LiCl 8 M frío, mezclamos, e incubamos por 30 min a 4°C y después centrifugamos a 13500 rpm por 6 min.
- 12) Transferimos el sobrenadante a otro tubo y agregamos un volumen de isopropanol, mezclamos por inversión y dejamos incubando a -20 °C por 20 min. Para bajar al ADN centrifugamos a 13500 rpm por 8 min.
- 13) Desechamos al sobrenadante, lavamos la pastilla producida con 800 μl de etanol al 70% y centrifugamos a 13500 rpm durante 5 min, secamos la pastilla en el evaporador centrífugo al vacío por 5 min, la disolvimos en 500 μl de agua destilada mas 5 μl de ARNasa (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y lo incubamos a 37°C por 30 min.
- 14) Le agregamos 500 μl de NaCl 1.6 M, PEG 13%, mezclamos y lo centrifugamos a 13500 rpm durante 6 min.
- 15) Desechamos el sobrenadante, resuspendimos el precipitado en 300 μl de agua destilada.
- 16) Realizamos una extracción proteínica agregando un volumen de fenol-Sevag, agitamos al vortex, centrifugamos a 13500 rpm durante 4 min, recuperamos la fase acuosa sin tocar la interfase orgánica, la pasamos a otro tubo y le agregamos un volumen de Sevag, mezclamos, volvimos a centrifugar y recuperar la fase acuosa.
- 17) Precipitamos al ADN agregando medio volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, incubamos a -20°C por 30 min, centrifugamos a 13500 rpm durante 5 min y eliminamos el sobrenadante.

- 18) Lavamos la pastilla con 500 μ l de etanol al 70% invirtiendo el tubo 3-6 veces, centrifugamos a 13500 rpm durante 4 min.
- 19) Secamos la pastilla en el evaporador centrífugo al vacío y la resuspendimos en 50 μ l de TE o agua ultrapura.
- 20) Sometimos a electroforesis una alícuota diluida de esta solución de ADN en un gel de agarosa al 1% y medimos absorbancia de una alícuota al espectrofotómetro, a las siguientes longitudes de onda 230, 260 y 280 nm.

Una vez caracterizado nuestro plásmido quimérico procedimos a realizar los ensayos de expresión de DGH como proteína fusionada a la MBP (maltose binding protein) (véase fig. 9).

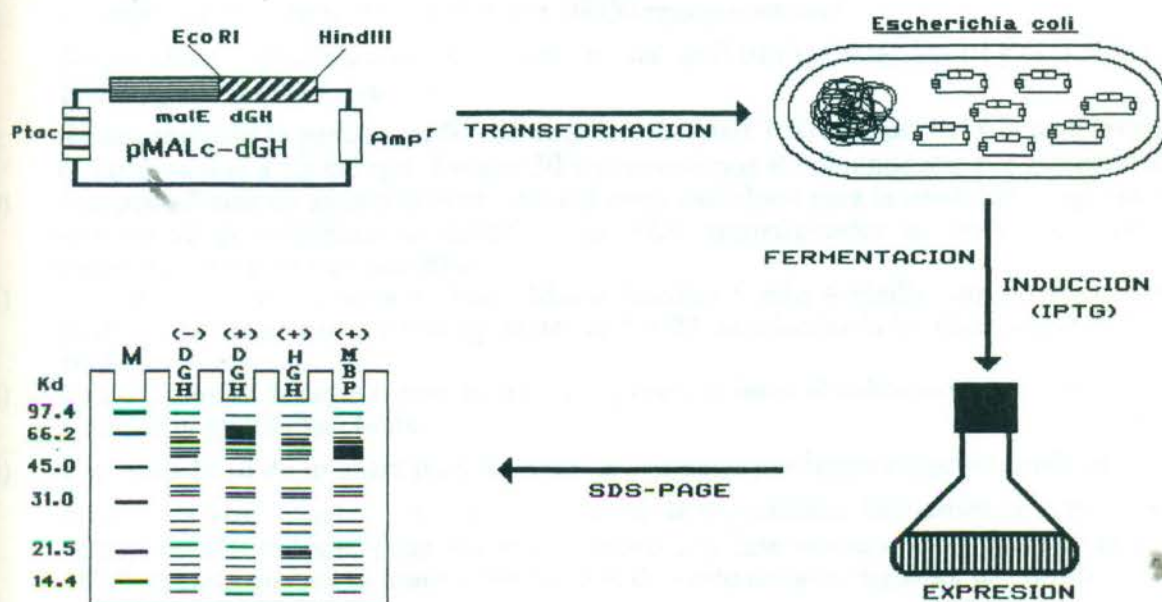


Figura 9.- Estrategia para expresar DGH. Transformamos con la construcción pMALc-DGH a *Escherichia coli* cepa TB1 calcio competentes, una vez obtenidas las clonas las fermentamos en matraz para crecerlas y las indujimos con isopropil- β -tiogalactósido-piranososa para llevar a cabo la expresión de DGH como proteína de fusión a MBP. Dicha proteína fusionada la detectamos en gel desnaturalizante de poliacrilamida teñido con azul brillante de Coomassie, en el mismo gel corrimos testigos de expresión, testigo negativo y marcador de peso molecular.

Ensayo de expresión de DGH en *Escherichia coli* (Sambrook y cols, 1989; Balbas y Bolivar, 1990).

- 1) Sembramos un inóculo de la cepa portadora del plásmido quimérico en 4 ml de medio H o L.B. con el antibiótico ampicilina a 100 µg/ml. Le permitimos crecer con agitación vigorosa toda la noche a 37°C.
- 2) Leimos densidad óptica a la longitud de onda de 600 nm, a una alícuota de 200 µl del cultivo que diluimos a 2 ml con agua destilada.
- 3) Ajustamos las células a una densidad óptica de 0.5 U por ml (a 600 nm) en un tubo con 8 ml de medio H o L.B.
- 4) Incubamos a 37°C por 30 minutos y dividimos el cultivo en dos tubos, indujimos uno de ellos añadiéndole IPTG a una concentración final de 0.1 mM; el otro tubo fue el testigo negativo.
- 5) 3-12 h de incubación después de la inducción, tomamos 200 µl de cultivo de cada tubo y los llevamos a 2 ml con agua para leer densidad óptica.
- 6) Centrifugamos el resto de las células a 10000 rpm por un min.
- 7) Ajustamos las células a una concentración final de 0.01 de unidad por µl y centrifugamos a 12000 rpm durante 2 min.
- 8) Resuspendimos la pastilla en 500 µl de solución Tris-Cl 50 mM pH 7.4 fría para lavarla.
- 9) Centrifugamos a 12000 rpm durante 30 s y removimos el sobrenadante por aspiración.
- 10) Resuspendimos en agua a la mitad del volumen calculado para la densidad, y agregamos la otra mitad de volumen de solución 2X SDS-amortiguador de lisis y continuamos mezclando en el vortex por 20 s.
- 11) Calentamos las muestras en baño María durante 5 min a ebullición; de ser necesario pasamos las muestras por una aguja de calibre 23 para lograr la homogeneización total de ellas.
- 12) Centrifugamos durante 6 min al máximo y transferimos el sobrenadante a otro tubo para eliminar la pastilla insoluble.
- 13) Corrimos 10 µl de muestra para detectar las proteínas por inmunoelectrotransferencia o 30-40 µl para visualizarlas por tinción con azul de Coomassie. Iniciamos la corrida con un voltaje de 100 voltios, hasta que el azul entró a la fase resolutive del gel, aumentamos a 150-200 hasta que el colorante salió hacia el depósito del amortiguador de corrida.

Purificación de MBP-DGH a partir de cuerpos de inclusión.

Método basado en la técnica descrita por Nagai y Thøgersen en 1984.

- 1) Crecimos en tubo toda la noche las bacterias transformadas con el plásmido pMALc-DGH a una temperatura de 37°C en el medio 2x YT suplementado con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml.
- 2) Llevamos a cabo una dilución 1:100 de las bacterias anteriores en un tubo que contenía 4 ml de caldo 2x YT con ampicilina (100 µl/ml) y las dejamos crecer con agitación a 37 °C.
- 3) Cuando el cultivo alcanzó una absorbancia de 0.4 a 600 nm, añadimos IPTG, de tal manera que la concentración final fuera de 0.1 mM. Proseguimos la incubación por un periodo de 4-16 h.
- 4) Recuperamos en tubos Falcon de 50 ml las células por centrifugación durante 5 min a 6000 rpm. Resuspendimos al paquete celular en un volumen de 2 ml de una solución formada por: Tris-HCl 10 mM pH 7.8 y EDTA 0.1 mM.

- 5) Posteriormente llevamos a cabo la lisa bacteriano, congelando la solución celular en nitrógeno líquido y descongelándola, repitiendo este paso 2 veces. Resuspendimos al lisado en 20 ml de una solución formada por: Tris-HCl 50 mM pH 7.8, EDTA 0.1 mM y sacarosa al 25%. Añadimos una solución de lisozima a una concentración final de 1 mg/ml e incubamos en baño de hielo por 1.5 h.
- 6) Agregamos una solución de $MgCl_2$ y posteriormente ADNasa I a una concentración de 20 mM y 50 $\mu g/ml$ respectivamente, mezclamos e incubamos por un periodo de 1.5 h.
- 7) A la solución anterior adicionamos 24 ml de amortiguador de lisis formado por: Tris-HCl 20 mM pH 7.8, NaCl 0.2 M, ácido desoxicólico al 1%, Nonidet P-40 al 1.6%, EDTA 2 mM y ditiotreitól 0.5 mM. Centrifugamos el lisado 10 min a 6000 rpm.
- 8) La pastilla que obtuvimos contiene la proteína de fusión MBP-DGH, la resuspendimos en la solución de lavado formada por: Tritón X-100 al 0.5%, EDTA 1 mM y ditiotreitól 1 mM, por último la sedimentamos por centrifugación durante 4 min a 5000 rpm. Este paso de lavado lo repetimos 4 veces más.
- 9) Finalmente disolvimos la pastilla toda la noche a una temperatura de 4°C en 2 ml de una solución que contiene urea 9 M, Tris-HCl 20 mM pH 7.8 y ditiotreitól 20 μM .
- 10) Ajustamos la solución anterior dializando durante 8 h contra 1 litro de amortiguador de corte para el factor Xa (el cual utilizamos posteriormente) constituido por: Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, $CaCl_2$, y azida de sodio 1 mM; ajustamos a pH 8.0 si fuera necesario, cambiamos el amortiguador de diálisis 1 vez cada 4 h.
- 11) Determinamos la concentración aproximada de nuestra proteína, tanto leyendo al espectrofotómetro a 280 nm, como por SDS-PAGE, corriendo una alícuota de la muestra, junto con un marcador de concentración conocida. Posteriormente teñimos con azul de Coomassie las proteínas y corroboramos la concentración de la MBP-DGH.

Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

Para separar las proteínas bacterianas en los experimentos de expresión y llevar a cabo la detección de la hormona mediante tinción con azul de Coomassie, usamos una combinación de los protocolos reportados por Towin y cols en 1979 y Sambrook y cols en 1989.

Reactivos y soluciones:

- Solución de poliacrilamida al 30%: Acrilamida al 29% y Bisacrilamida al 1% disueltas en agua.
- Dodecil sulfato de sodio (SDS): Solución al 10 % en agua.
- Amortiguadores Tris para preparación de las dos fases del gel (usar solo trizma base):

Tris-HCl 1.0 M pH 6.8 (fase superior o gel concentrador).

Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 (fase inferior o gel de resolución).

- N,N,N',N'-tetrametilendiamino (TEMED).
- Persulfato de Amonio (PSA): al 10 % disuelto en agua y preparado en fresco.
- Amortiguador de electroforesis Tris-glicina: Trizma base 125 mM, Glicina 1.25 M, SDS al 0.5%. Ajustamos la solución a un pH de 8.3.
- Amortiguador para muestra: Tris-HCl 50 mM pH 6.8, β -mercaptoetanol al 5%, SDS al 2%, azul de bromofenol al 0.1%, y glicerol al 10%.
- Solución de tinción de geles: metanol al 45%, ácido acético al 10% y azul de Coomassie R250 al 0.25 %, disueltos en agua.
- Solución de destañido. Misma formulación que la solución de tinción, pero sin el colorante azul brillante de Coomassie.
- Solución fijadora de geles. Misma solución de destañido pero le añadimos glicerol a la concentración final del 1%.

• **Gel de poliacrilamida al 15% (25 ml):**

* Agua	5.700 ml.
* Solución de poliacrilamida al 30%	12.500 ml.
* Tris-HCl 1.5 M pH 8.8,	6.300 ml.
* SDS al 10%	0.250 ml.
* PSA al 10%	0.250 ml.
* TEMED	0.015 ml.

• **Gel de poliacrilamida al 5% (8 ml):**

* Agua	5.500 ml.
* Solución de poliacrilamida al 30%	1.300 ml.
* Tris-HCl 1.0 M pH 6.8	1.000 ml.
* SDS al 10%	0.080 ml.
* PSA al 10%	0.080 ml.
* TEMED	0.010 ml.

Procedimiento:

a) Preparación del gel y electroforesis.

- 1) Ensamblamos el sistema de vidrios (14 cm x 18 cm) y agregamos la cantidad necesaria de solución de poliacrilamida al 15 % recién preparada, hasta llenar el 70% del sistema (fase de resolución). Agregamos isopropanol para formar una capa delgada en la parte superior de la solución de poliacrilamida y evitar la inhibición que ejerce el oxígeno sobre la polimerización.
- 2) Una vez polimerizada (10-15 min), decantamos el isopropanol y secamos el exceso con papel absorbente, posteriormente vaciamos los 8 ml de solución de poliacrilamida al 5% correspondientes a la fase concentradora.
- 3) Colocamos el peine y dejamos polimerizar.
- 4) Una vez polimerizado, retiramos el peine lentamente y montamos el gel en la cámara vertical de electroforesis.
- 5) Llenamos los depósitos superior e inferior de la cámara con amortiguador de corrida a la concentración 1X.
- 6) Calentamos las muestras (0.4 unidades de absorbancia a 600 nm) del lisado bacteriano en baño María a ebullición por un tiempo de 2-3 min y las aplicamos en las casillas del gel con jeringa Hamilton de 10 o 50 μ l de capacidad, según corresponda el volumen de la muestra.
- 7) Corrimos la electroforesis inicialmente a 60-80 voltios hasta que entraron las muestras al gel, después aumentamos a 100 voltios, hasta que el azul entró en la fase resolutive e incrementamos a 150-200 voltios hasta que el azul de bromofenol salió del gel hacia el depósito, y detuvimos la corrida.

b) Tinción con azul de Coomassie.

- 1) **Desmontamos el sistema, retiramos el gel de los vidrios, eliminamos la porción concentradora del gel, cortándola con una espátula o escalpelo y colocamos la parte resolutive en una charola que contenía la solución de tinción por un tiempo de 2 h (se obtiene mejor resultado dejando teñir toda la noche).**
- 2) **Recuperamos la solución de tinción y agregamos la solución para desteñir. Primeramente dimos un lavado rápido de 5 min, retiramos la solución y agregamos solución fresca, reemplazándola cada 2 h, hasta eliminar el fondo azul del gel. Todos los lavados se realizaron con agitación.**

Liberación de DGH del complejo MBP-DGH por corte enzimático.

La enzima utilizada para llevar a cabo el corte corresponde al factor Xa (Nagai y Thøgersen, 1984; Nagai y Thøgersen, 1987). Este interviene naturalmente en la cascada de la coagulación sanguínea. Este factor reconoce una secuencia de 4 aminoácidos (Ile, Glu, Gly, Arg), el corte lo realiza entre la Arg y el aminoácido adyacente a su extremo carboxilo (vease fig. 10). El corte se realizó en una relación del 1% de la enzima con respecto a la cantidad de la proteína de fusión (relaciones del 0.1% al 5% funcionan bien). La mezcla reactiva se puede incubar por un periodo de 3 h a varios días a T.A. o inferior. Dependiendo de la fusión particular puede ser necesario desnaturizar la proteína para hacerla que presente el sitio de corte accesible al factor Xa, después se dializa contra el amortiguador de corte para el factor Xa.

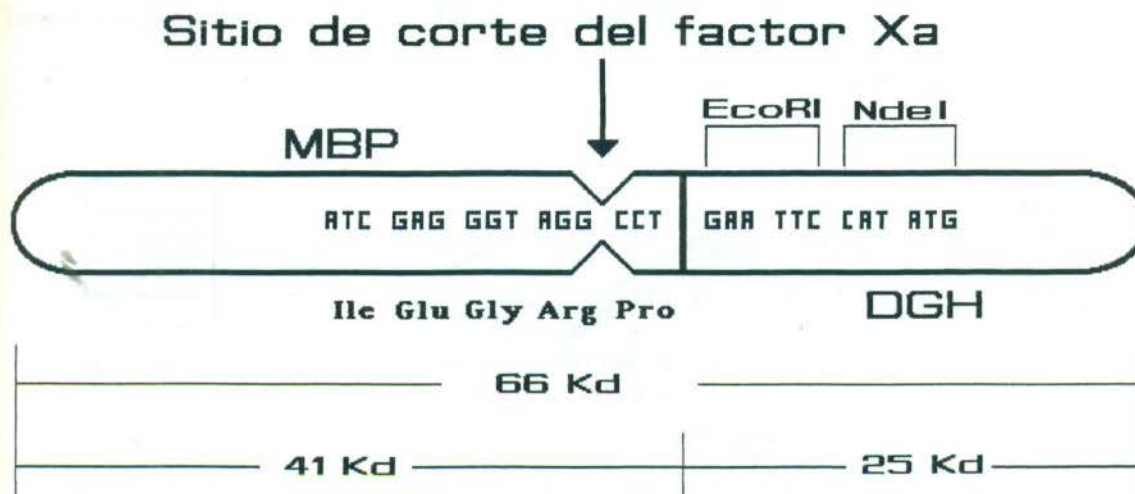


Figura 10.- Sitio de corte del factor Xa. Aquí representamos la proteína de fusión MBP-DGH, la cual tiene un peso molecular de aproximadamente 66 kd. Cuando es separada la DGH de ésta por el factor Xa (su sitio de corte es de cuatro aminoácidos: Ile, Glu, Gly y Arg) da origen a dos proteínas: la MBP de 41kd y la DGH de 25 kd. Nótese que la DGH liberada posee cuatro amonoácidos extras; Pro, el cual es parte de MBP, y tres mas que están entre la región donde se localiza el sitio de restricción *Eco* RI (donde se llevó a cabo la fusión de DGH con MBP a nivel de secuencia nucleotídica) incluyéndolo y el codón de iniciación ATG.

- 1) En nuestro caso fue necesario, además de desnaturizar la proteína de fusión, dializarla contra la solución amortiguadora del factor de corte (véase el paso # 9 del método anterior).
- 2) Ajustamos la solución de la proteína de fusión a una concentración aproximada de 1 mg/ml. A una alícuota de 20 μ l agregamos 0.5 μ l de factor de corte (200 μ g/ml) e incubamos a una temperatura de 6°C por 3 días.
- 3) De igual manera lo hicimos para 5 μ l de solución proteínica pero sin agregar el factor de corte, y le utilizamos como testigo negativo.

- 4) Para verificar el corte agregamos a la mezcla medio volumen de amortiguador de lisis de muestra 2x SDS-PAGE, calentamos en baño María a ebullición cada muestra por 5 min, las colocamos en las casillas del gel PAGE-SDS y llevamos a cabo la electroforesis. Teñimos un gel con azul brillante de Coomassie, y el otro lo procesamos para inmunoelectrotransferencia.

Inmunoelectrotransferencia o "Western blot".

Después de analizar las proteínas de los extractos celulares originados de los experimentos de expresión por el método de tinción con azul de Coomassie, decidimos aumentar la sensibilidad y especificidad de nuestros experimentos al usar para la detección de DGH anticuerpos anti-BGH. Utilizamos una combinación del método de inmunoelectrotransferencia (véase fig.11) reportado por Towin y cols en 1979 y el de Sambrook y cols de 1989.

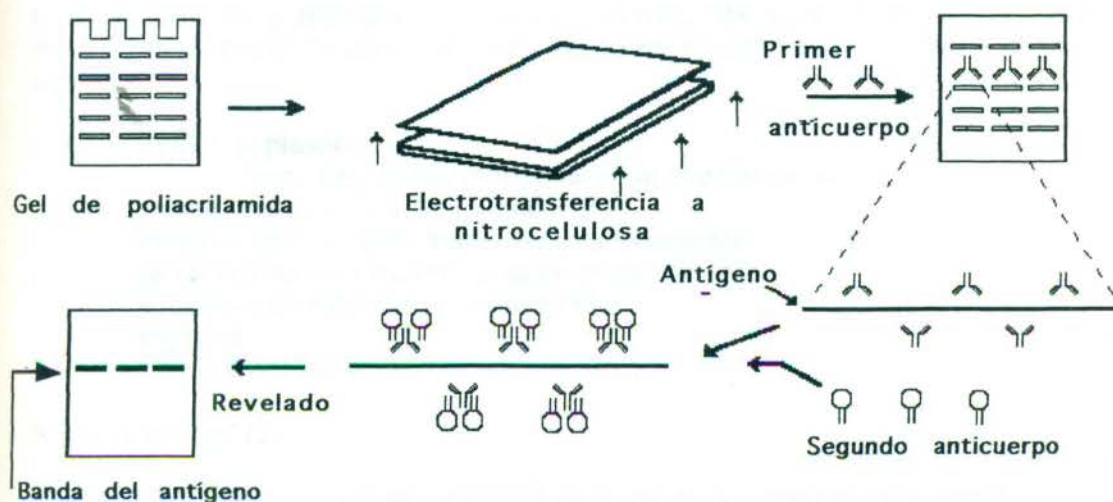


Figura 11.- Secuencia del proceso de inmunoelectrotransferencia. Los componentes proteínicos totales del lisado bacteriano separados electroforéticamente son transferidos de un gel de poliacrilamida a un soporte sólido para seguidamente ser expuesto a reactivos que son específicos para secuencias de aminoácidos o estructuras conformacionales determinadas. Primeramente separamos las proteínas en un gel de poliacrilamida-SDS al 12.5%, las transferimos a un filtro de nitrocelulosa, y detectamos la DGH (antígeno) usando dos anticuerpos; el segundo conjugado a una enzima nos ayudó a revelar el antígeno en cuestión.

Reactivos y soluciones:

Amortiguador de transferencia: glicina 39 mM, trizma base 48 mM, SDS al 0.037% y metanol al 20%; ajustamos a pH de 8.3.

Amortiguador Tris-salino (TBS): Tris 50 mM pH 7.4 y NaCl 150 mM.

TBST: Tween-10 al 0.05% en TBS.

Solución de bloqueo: leche Sveltex al 5% en TBST.

Solución PA 1X: Tris HCl 0.1 M pH 9.5 y NaCl 0.1 M.

Solución reveladora: 10 ml de PA 1X, 5 μ l de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 4.9 M, 40 μ l de NBT (nitro azul de tetrazolio al 50% en dimetilformamida) y 40 μ l de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato al 50% en dimetilformamida).

Primer Anticuerpo: Antisuero de conejo contra BGH (dilución 1:1000 en TBST+ leche al 5%).

Segundo Anticuerpo: Conjugado de anticuerpos de cabra acoplados a la fosfatasa alcalina y dirigida contra las inmunoglobulinas de conejo (dilución 1:1000 en TBST+5% de leche).

Procedimiento:

- 1) Una vez corrido y retirado el gel de poliacrilamida-SDS, montamos el sistema de electrotransferencia de proteínas, colocando en secuencia del cátodo(-) al ánodo(+) lo siguiente:

- (+) -Rejilla de plástico
- Esponja humedecida en amortiguador de transferencia.
- 2 cuadros de papel filtro humedecido.
- Filtro de nitrocelulosa humedecido previamente.
- Gel humedecido en amortiguador de transferencia.
- 2 cuadros de papel filtro humedecidos.
- Esponja.
- (-) -Rejilla de plástico.

Nota: vease fig. 12.

Después de colocar el filtro de nitrocelulosa sobre el gel, pasamos una pipeta rodando para eliminar burbujas. Usamos guantes para evitar el contacto del filtro de nitrocelulosa con los dedos.

- 2) Colocamos el sistema en posición vertical en las ranuras de la cámara de transferencia, el lado correspondiente al gel debe quedar hacia el polo negativo, ya que las proteínas viajan hacia el ánodo.
- 3) Llenamos la cámara con amortiguador de transferencia (de preferencia frío) y aplicamos un voltage constante de 100 por 2-3 h.
- 4) Desmontamos el sistema, retiramos el filtro de nitrocelulosa y lo pusimos en un volumen de 15-20 ml de solución de bloqueo con movimiento rotatorio lento al menos 30 min. Al mismo tiempo, pusimos a teñir el gel en azul de Coomassie para verificar la transferencia adecuada de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa.
- 5) Recuperamos la solución de bloqueo, agregamos el primer anticuerpo de manera que cubra al filtro e incubamos con movimiento rotatorio lento por 6-12 h a T.A.
- 6) Recuperamos la solución de anticuerpos, sometimos al filtro a un lavado rápido con 15-20 ml de TBST y 3 más lentos de 10 min. Incubamos con el segundo anticuerpo (Ig anti-IgG de conejo acoplados a fosfatasa alcalina) 1 h a T.A y recuperamos la solución de anticuerpos.
- 7) Realizamos otro lavado rápido con TBST y tres de 10 min, después dimos dos mas con solución P.A. 1X de 10 min c/u.

90174

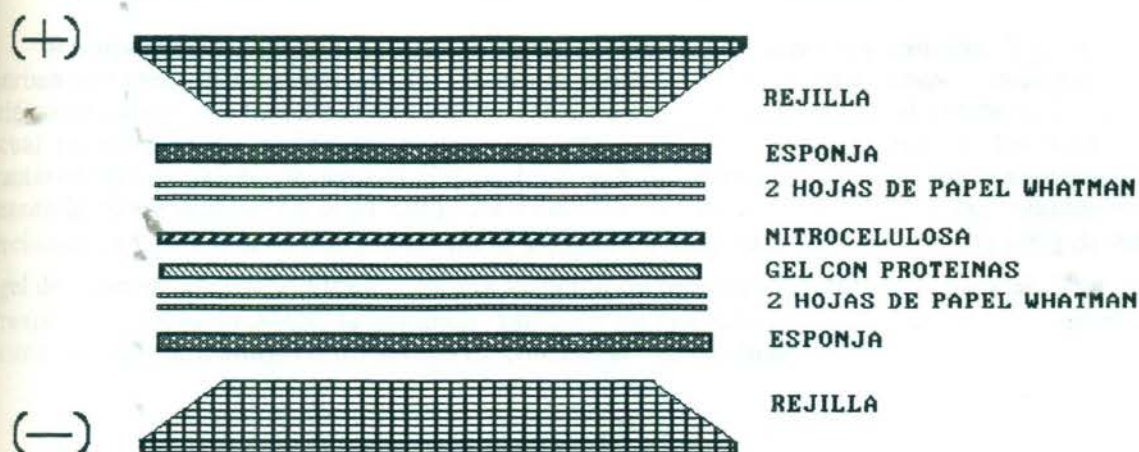


Figura 12.- Secuencia de ensamblado del sistema de electrotransferencia. Cada componente del sistema aquí descrito, previamente se sumergió en el amortiguador de transferencia antes de colocarlo en su lugar respectivo. El gel de poliacrilamida el cual tiene las proteínas a transferirse se colocó sobre una hoja de nitrocelulosa (cortada a la medida al gel), tratando de no formar burbujas, pasamos una pipeta de vidrio rondando sobre el gel para eliminarlas si hubiera, posteriormente se colocan estos sobre dos hojas de papel Watman y posteriormente sobre la esponja y rejilla. Por último, sobre el sistema teniendo el gel arriba colocamos otras dos hojas de papel Watman, la esponja y la rejilla para formar el emparedado. El sistema está listo para ser introducido sobre la ranura de la cámara de transferencia, cuidando siempre que la nitrocelulosa quede enfrente del ánodo y el gel del lado del cátodo. Recuerde que el SDS le confiere carga neta negativa a las proteínas, por lo tanto saldrán del gel para migrar hacia el polo positivo, quedando atrapadas en la nitrocelulosa.

- 8) Cuando el filtro se encontraba en el segundo lavado, preparamos 10-15 ml de solución reveladora y la agregamos después del último lavado.
- 9) Esperamos un tiempo de 1-2 min, comenzamos a observar la aparición de la banda correspondientes a la DGH y detuvimos la reacción cuando la intensidad de las bandas fuera la adecuada (no dejar que se "queme" el filtro), introduciendo la nitrocelulosa en agua destilada.

Nota: corrimos testigos positivos y negativos para la expresión; el testigo positivo corresponde a pBHX, plásmido que expresa HGH madura, los testigos negativos fueron: bacteria con el plásmido pMALc-DGH no inducida y la bacteria sin el plásmido.

VII. RESULTADOS.

Extracción del ARN total a partir de hipófisis caninas.

Recuperamos 1 mg de ARN_{tot} a partir de 450 mg de hipófisis caninas. Una relación de absorbancia espectrofotométrica a 260/280nm superior a 1.8 se considera como buena para el ácido nucleico en cuestión y la del nuestro fue de 1.9. Esta calidad se reflejó en el patrón electroforético, el cual no mostró degradación alguna, pudiéndose observar claramente las tres bandas características de ARN ribosomal (28 S, 18 S y 5 S). Además, y tal y como se esperaba, se presentó la doble intensidad de la banda 28 S comparada con la 18 S. Todas estas características se aprecian en la fig. 13, la cual nos muestra la separación electroforética de dos alícuotas de ARN_{tot} en gel de agarosa-urea-ácido teñido en una solución de bromuro de etidio a 0.5 µg/µl. Una muestra corresponde a nuestro ARN, la segunda también de ARN_{tot} pero extraído a partir de placenta humana, el cual utilizamos como testigo de concentración y calidad.

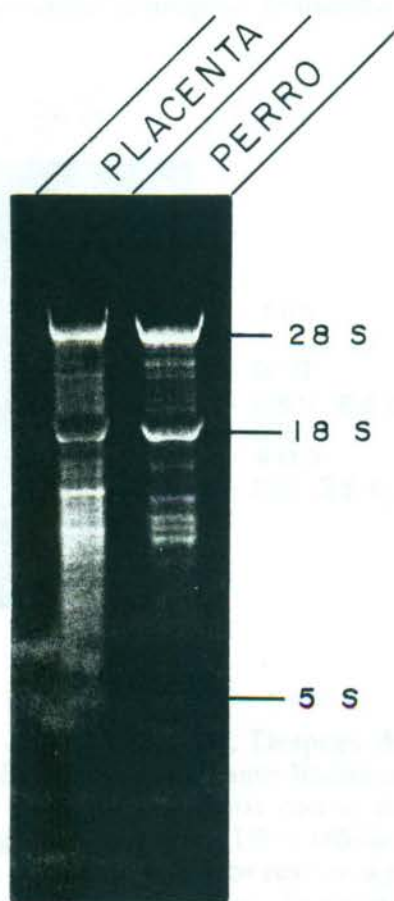


Figura 13.- Perfil electroforético del ARN_{total} de hipófisis canina. Mostramos la corrida de dos muestras de ARN_{tot}, el primer carril es el testigo de placenta humana, el segundo corresponde al ARN_{tot} de hipófisis canina. Obsérvese la presencia de las bandas características, 28S, 18 S y 5 S. En general el patrón de corrida nos indica la buena calidad de nuestra muestra extraída. El gel corresponde a uno de agarosa-urea-citrato al 1.5%, teñido con bromuro de etidio y expuesto a luz ultravioleta.

Amplificación del ADNc de DGH por la RCP.

Partiendo de 8 μ g de ARNtot efectuamos la síntesis enzimática de la primera cadena de ADNc (complementaria a todas las secuencias de los ARN totales), por la reacción de la transcriptasa reversa y usando como cebadores una mezcla de oligonucleótidos (hexámeros) al azar.

Usamos una décima de la reacción de transcripción reversa como sustrato en la amplificación específica del ADNc de DGH por la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), y después de practicar los 30 ciclos de amplificación, retiramos un décimo de volumen de la mezcla amplificada y los corrimos en un gel de agarosa al 1%. Después de haber teñido el gel en bromuro de etidio, pudimos visualizar el producto de la RCP como una sola banda (véase fig. 14). Esta banda correspondió en tamaño al esperado (670 pb) para el ADNc de DGH, según lo pudimos constatar al compararlo con el marcador de pares de bases (pBR322 cortado con *Alu* I), corrido en un carril paralelo del mismo gel y el cual nos da entre otros, un fragmento correspondiente a 660 pb; éste nos sirvió como guía para estimar la longitud de nuestro producto amplificado.

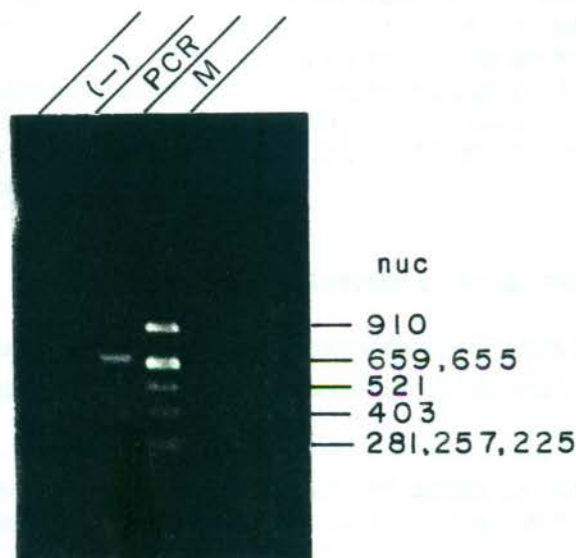


Figura 14- Amplificación del ADNc de DGH. Después de haber amplificado por la RCP con los iniciadores consenso el ADNc de DGH durante 30 ciclos, logramos la visualización de una banda única a nivel de 660 pb según constatamos con el marcador (PBR322- *Alu* I). Estas muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 1% y teñidas con bromuro de etidio. Nuestro testigo negativo de amplificación constó de todos los reactivos para la RCP a excepción del ADN, por lo tanto no se presentó banda; con esto eliminamos la posibilidad de que la banda obtenida sea un artefacto o amplificación inespecífica.

Clonación del ADNc de DGH.

Preparamos una gran escala de los vectores M13mp18 y M13mp19; recuperando 2 mg de cada bacteriófago, los cuales presentaron una relación espectrofotométrica 260/280nm de 1.9 y 2 respectivamente. Esto nos indica la buena pureza con que se obtiene el ADN por este método.

Hicimos una doble digestión con las endonucleasas de restricción *Eco* RI + *Hind* III sobre 3 µg del ADN de M13mp18 y de M13mp19, dejándolos aptos para ser ligados al ADNc de DGH. Precipitamos y lavamos cada digestión y la resuspendimos en 60 µl de agua ultrapura, de manera que adquirieran una concentración aproximada de 40 ng/µl.

Tratamos de igual manera (corte con las mismas enzimas) 10 µl del producto amplificado (aproximadamente 400 ng), dejándolo apto para ser ligado con el ADN de los bacteriófagos. Precipitamos la digestión y la resuspendimos en 20 µl para que adquiriera una concentración final aproximada de 20 ng/µl. Con ambos ADNs (los vectores M13mp18, M13mp19 y el fragmento del ADNc de DGH), realizamos ligación con una relación fragmento a vector de 1:20, por medio de la reacción de la ligasa de ADN de T4. Una vez transcurrido 8 h, tiempo necesario para que se diera la ligación, con 2 µl de cada reacción de ligación transformamos 200 µl de bacterias *Escherichia coli* (cepa JM101) calcio competentes como indicamos en la sección de Metodología.

Después de incubar, en la caja de petri aparecieron placas de crecimiento lento, correspondientes a clonas recombinantes. Levantamos 9 de cada construcción, las cuales procesamos para extracción del ADN de los bacteriófagos recombinantes por minipreparación. Dichas clonas transformantes las analizamos por corte enzimático doble con *Eco* RI + *Hind* III. 8 clonas resultaron positivas para el híbrido M13mp19-DGH, pues liberaron con *Eco* RI + *Hind* III el fragmento de 670 pb correspondiente al ADNc de DGH. Por otro lado solo 7 de 9 fueron positivas para la construcción M13mp18-DGH.

Determinación de la secuencia nucleotídica de la región codificante.

Con el ADN de cadena sencilla de dos construcciones de cada tipo de clona recombinante (a 150 ng/µl), llevamos a cabo la reacción para determinar la secuencia nucleotídica por el método enzimático.

Realizamos varias electroforesis de geles, aplicando diferentes tiempos de corrida y de exposición en películas radiográficas con el fin de poder apreciar el total de la secuencia del ADNc de DGH.

Logramos la obtención de la secuencia completa del ADNc de DGH cuando traslapamos las regiones leídas de las construcciones M13mp18-DGH y M13mp19-DGH; en la primera construcción se lee de *Hind* III hacia *Eco* RI, mientras que en la construcción del bacteriófago mp19 se lee en la dirección contraria, pero en la cadena complementaria. No era suficiente tener la secuencia lograda a partir de dos hebras de diferente orientación, sino que, necesitábamos asegurarnos que la secuencia leída fuera en realidad la correcta, es decir, descartar cualquier lectura errónea a causa de los distintos factores que afectan la corrida de nuestro ADN en el gel y por lo tanto la lectura. Esto solo lo logramos leyendo completamente cada hebra del dúplex del ADNc de DGH y verificando que la secuencia de una correspondiera con su contraparte complementaria (A con T y G con C). Sin embargo, dada la longitud del ADNc leímos con mayor confianza hasta el 75% de la longitud de cada cadena (aproximadamente 500 nuc).

Para reforzar esto fue que también realizamos una segunda generación de construcciones tanto en M13mp18 como en M13mp19. Explotamos un sitio único ubicado hacia el centro del ADNc de DGH para lograr clonar el fragmento correspondiente a la segunda mitad faltante para cada hebra. Además, requeríamos que el sitio en cuestión se pudiera acoplar a nuestro sistema M13 para ser ligado, siendo el sitio seleccionando el *Sma* I localizado a 482 pb del sitio *Eco* RI.

Los vectores M13mp18 y M13mp19 fueron cortados con *Sma* I + *Eco* RI y *Sma* I + *Hind* III, respectivamente. Precipitamos la reacción de cada corte y la resuspendimos en agua ultrapura. Posteriormente llevamos a cabo reacción de ligación de cada uno con el ADNc de DGH cortado en los mismos sitios. Transformamos bacterias (cepa JM101) calcio competente con 2 μ l de cada una, recuperamos las placas de crecimiento lento incoloras y sometimos éstas a crecimiento para minipreparación de la forma replicativa. Caracterizamos varias clonas con las enzimas de restricción *Sma* I + *Eco* RI y *Sma* I + *Hind* III, y a las que les confirmamos el inserto les determinamos su secuencia nucleotídica. Para descartar cualquier mutación posible ocasionada por la polimerasa Taq al estar incorporando los nucleótidos sobre la plantilla del ADNc original, secuenciamos 4 clonas diferentes. Todo esto lo realizamos tal y como indicamos en la sección de Metodología.

Nótese que la lectura de la secuencia de esta segunda serie de construcciones M13mp18-DGH (*Sma* I-*Eco* RI) y M13mp19-DGH (*Sma* I-*Hind* III) inicia a partir del sitio *Sma* I y se dirige hacia ambos extremos del ADNc de DGH. De esta manera leímos fácilmente los nucleótidos faltantes (véase fig. 15).

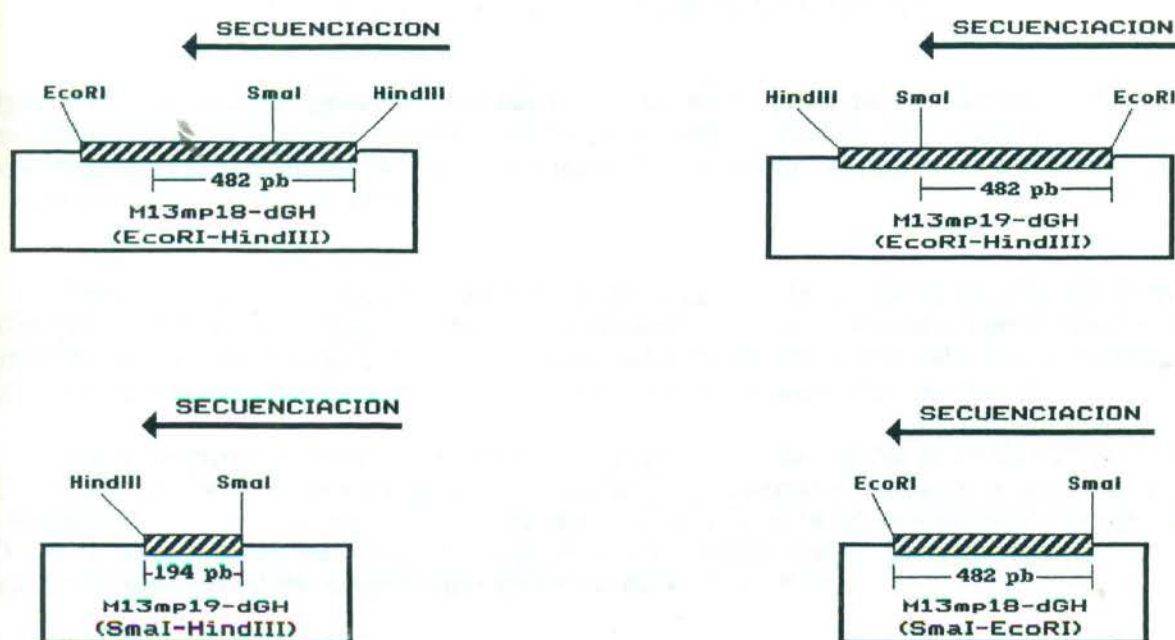


Figura 15.- Inicio y dirección de la secuenciación en las clonas de M13. De primera instancia generamos las primeras dos clonas: M13mp18-DGH y M13mp19-DGH. Estas incluían el ADNc de DGH desde los sitios de restricción *Hind* III hasta *Eco* RI, en mp18 y la dirección opuesta para mp19. En éstos pudimos leer aproximadamente 500pb de secuencia de cada uno (diagramas superiores). Nótese que no fue posible determinar la secuencia completa en cada construcción; para lograrlo iniciamos la segunda serie de construcciones, cortando el fragmento amplificado en los sitios de restricción *Sma* I-*Eco* RI y clonándolo en el bacteriófago mp18 (diagrama inf. der.) de tal forma que leímos iniciando la lectura en *Sma* I hacia *Eco* RI completando de esta manera la lectura total de la secuencia de la clona M13mp18-DGH. Lo mismo hicimos para determinar la secuencia completa de la clona M13mp19-DGH, al clonar el ADNc de DGH de *Sma* I hasta *Hind* III en mp19 y leyendo los 194pb faltantes (diagrama inf. izq).

Secuencia nucleotídica de la región 3' no traducible.

Una vez determinada la secuencia nucleotídica de la región codificante del ADNc de DGH, emprendimos la clonación y secuenciación de la región 3' no traducible del ADNc de DGH, y de los 27 nucleótidos finales de la región codificante del ADNc de DGH. Esto último porque los obtenidos con los experimentos arriba descritos correspondían a la secuencia del iniciador consenso 3' utilizado para llevar a cabo la RCP, y no a la secuencia natural.

Para realizar esto, utilizamos un iniciador 3' diferente al consenso: el iniciador oligo d(T). Este lo diseñamos de acuerdo a la característica que tiene la región terminal de los ARNms eucarióticos de poseer una secuencia en batería de ácido adenílico (cola poli-A). El cebador oligo d(T) es complementario a una región de 17 nucleótidos de la cola poli-A, y además le añadimos un sitio extra *Hind* III para facilitar la clonación posterior del ADNc de DGH (véase fig. 16).

Hind III 3' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCGAAACGTACGT 5'

Figura 16.- Iniciador genérico utilizado en la RCP para la clonar la región 3' no traducible. Este iniciador nos permitió amplificar a partir de la cola poli-A del ADNc de DGH, incluyendo su región 3' no traducible y los últimos 27 nucleótidos codificantes correspondientes a la secuencia del iniciador 3' consenso.

Para llevar a cabo esto, principiemos desde la síntesis de la cadena sencilla del ADNc de DGH, pero variándola un poco; la diferencia consistió en que utilizamos como cebador de la transcriptasa reversa al oligo d(T), por lo tanto del total de los ARNs celulares se sintetizaron exclusivamente los ADNcs a los ARNms por ser éstos los que poseen la cola poli-A.

Posteriormente realizamos la amplificación específica del ADNc de DGH por medio de la RCP (30 ciclos). Nótese que en ésta la especificidad la está dando el iniciador 5' consenso, el cual se alineará únicamente a su región complementaria del ADNc de DGH; en cambio el iniciador oligo d(T) se alineará a todas las secuencias que tengan la región poli-A. Sin embargo, la RCP solo amplificará aquellos ADNc conteniendo ambos, es decir el de DGH.

Corrimos una alícuota de 5 µl (un décimo del total) del producto amplificado en un gel de agarosa al 1% y después de teñir el ADN con bromuro de etidio e iluminar con luz ultravioleta, pudimos observar la aparición de una banda única de longitud aproximada a 800 pb, según calculamos al comparar su movilidad en el gel con la del marcador de longitud (pBR322 cortado con *Alu* I).

Comparado con los 670 pb del producto amplificado anterior, este nuevo ADNc incluye 130 pb, 101 correspondieron a la región 3' no traducible y las restantes a la cola poli-A donde se asentó al iniciador d(T).

Posteriormente cortamos este segundo producto amplificado tanto con las enzimas de restricción *Eco* RI + *Hind* III para clonarlo en M13mp18 y también *Sma* I + *Hind* III para clonarlo en M13mp19. El propósito de estas construcciones fue secuenciar iniciando la lectura en la región poli-A hacia el sitio *Sma* I y por el otro lado leer iniciando de *Sma* I hacia la región poli-A, esto en las construcciones M13mp18-DGH (*Eco* RI-*Hind* III) y M13mp19-DGH (*Sma* I-*Hind* III), respectivamente.

De esta manera logramos establecer la secuencia nucleotídica de la región 3' no traducible del ADNc de DGH leyendo su secuencia en ambas orientaciones para mayor seguridad.

Fue así que leímos completamente ambas cadenas del ADNc de DGH y estuvimos seguros de que no había mutación artificial alguna en su secuencia nucleotídica. En las siguientes figuras (17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24) mostramos la secuencia nucleotídica del ADNc de DGH desde el codón de iniciación ATG, hasta el codón de terminación (TAG), tanto una figura donde se aprecia la secuencia correspondiente al iniciador 3' consenso (véase fig. 22), como otra donde presentamos la secuencia real (natural) de la región que ocupaba este iniciador (véase fig. 23) y por último la figura donde mostramos la región 3' no traducible de DGH y su cola poli-A (véase fig. 24) e incluimos otra donde mostramos la descompresión de una citosina en la región inicial correspondiente a la secuencia del iniciador 5', (nótese la aparición de la quinta citosina la cual no se encuentra en la secuencia correspondiente a esta región cuando no esta descomprimida, véase fig. 17).

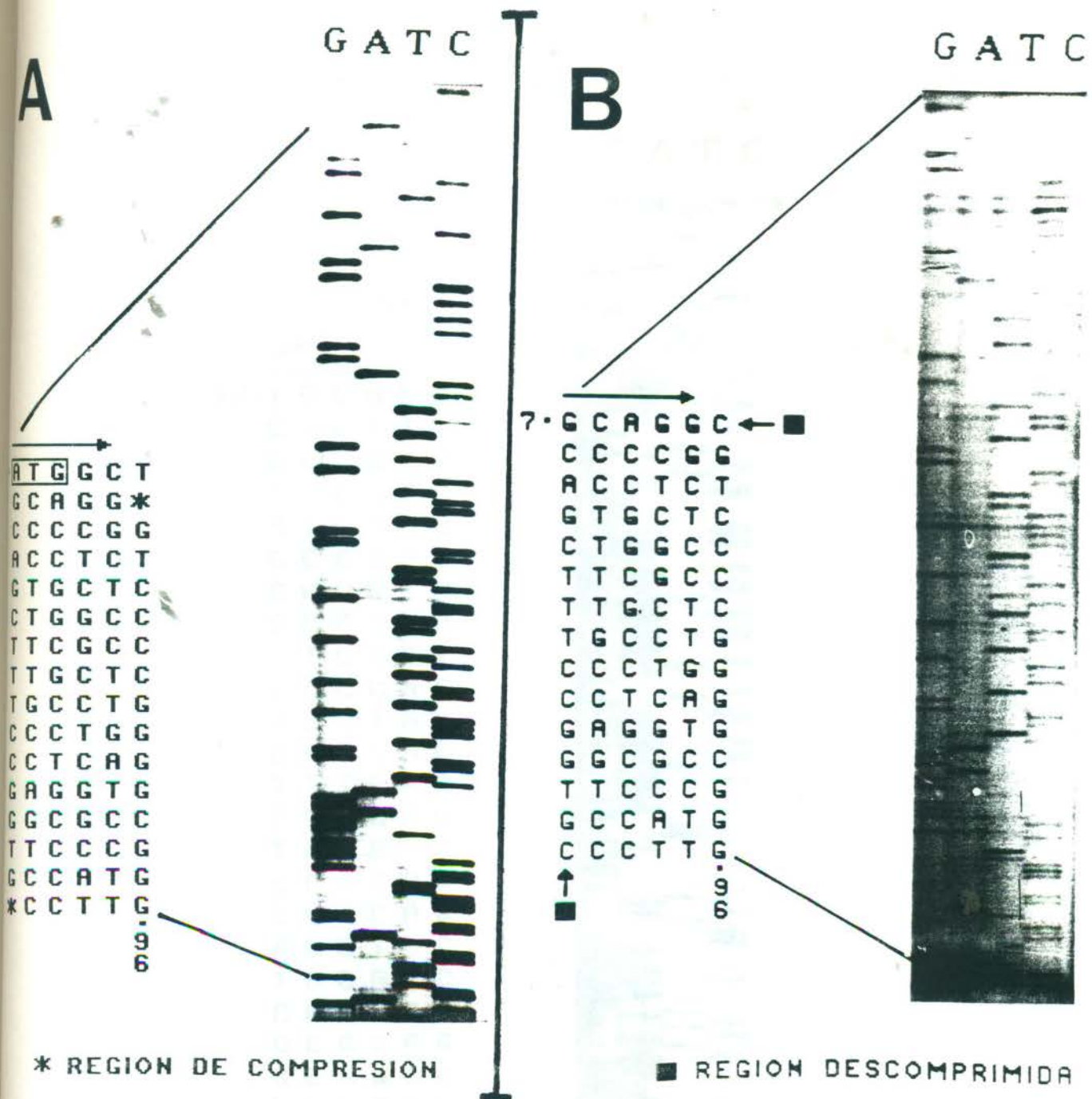


Figura 17.- Secuencia nucleotídica del ADNc de DGH a partir del nucleótido 1 al 96 (codones del 1 al 32). En esta figura mostramos la autorradiografía del gel de secuenciación poliacrilamida-urea de concentración 8%. La reacción se realizó por el método de Sanger. La lectura comienza con el codón de iniciación ATG y se sigue hasta el nucleótido 96. En la fig. A se presentan dos compresiones lo que ocasiona pérdida de dos bandas correspondientes a citosinas, su posición se indica con un asterisco. En la fig. B mostramos la aparición de las citosinas cuando utilizamos el descompresor dITP, las bandas están señaladas por un cuadro oscuro. La secuencia está acomodada para leerse de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha.

Nota: En las siguientes figuras (18-24) las muestras están tratadas bajo las mismas condiciones a las ya mencionadas a excepción de la reacción de descompresión.

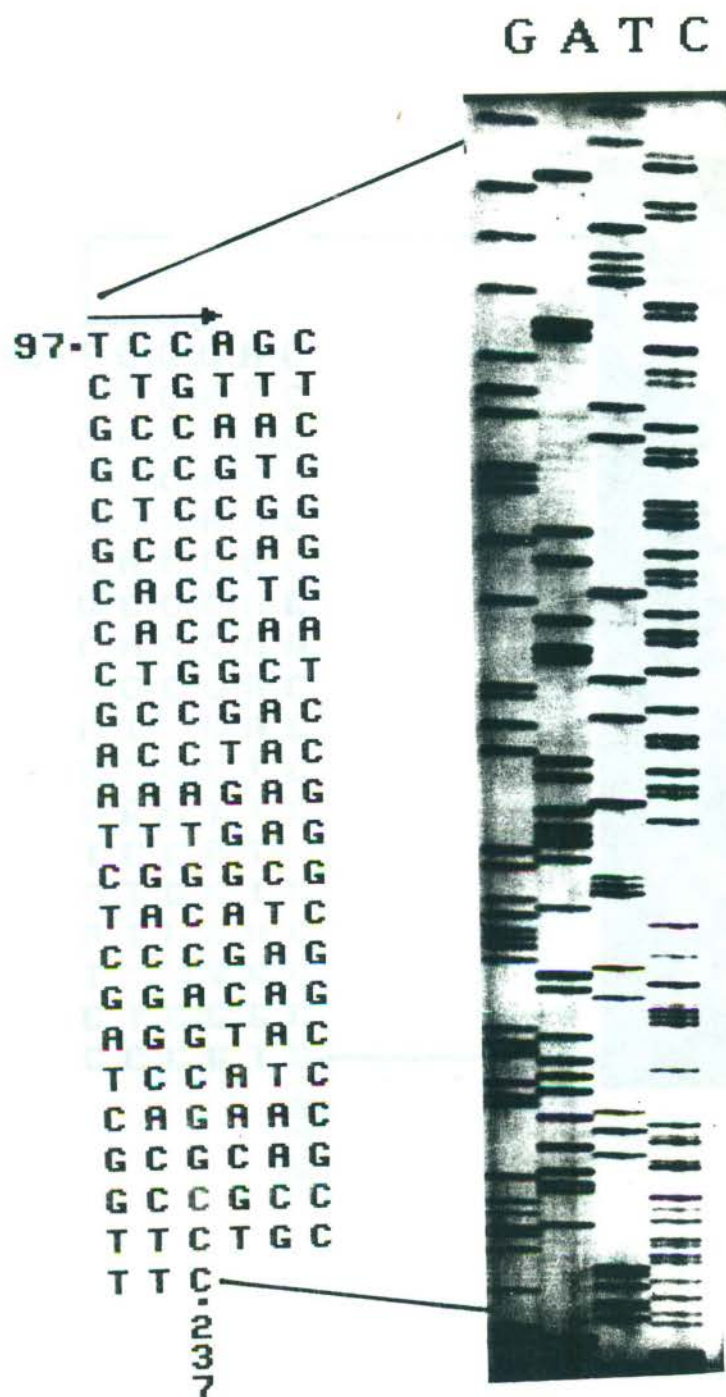


Figura 18.- Secuencia nucleotídica del ADNc de DGH a partir del nucleótido 97 al 237 (codones del 33 al 79).

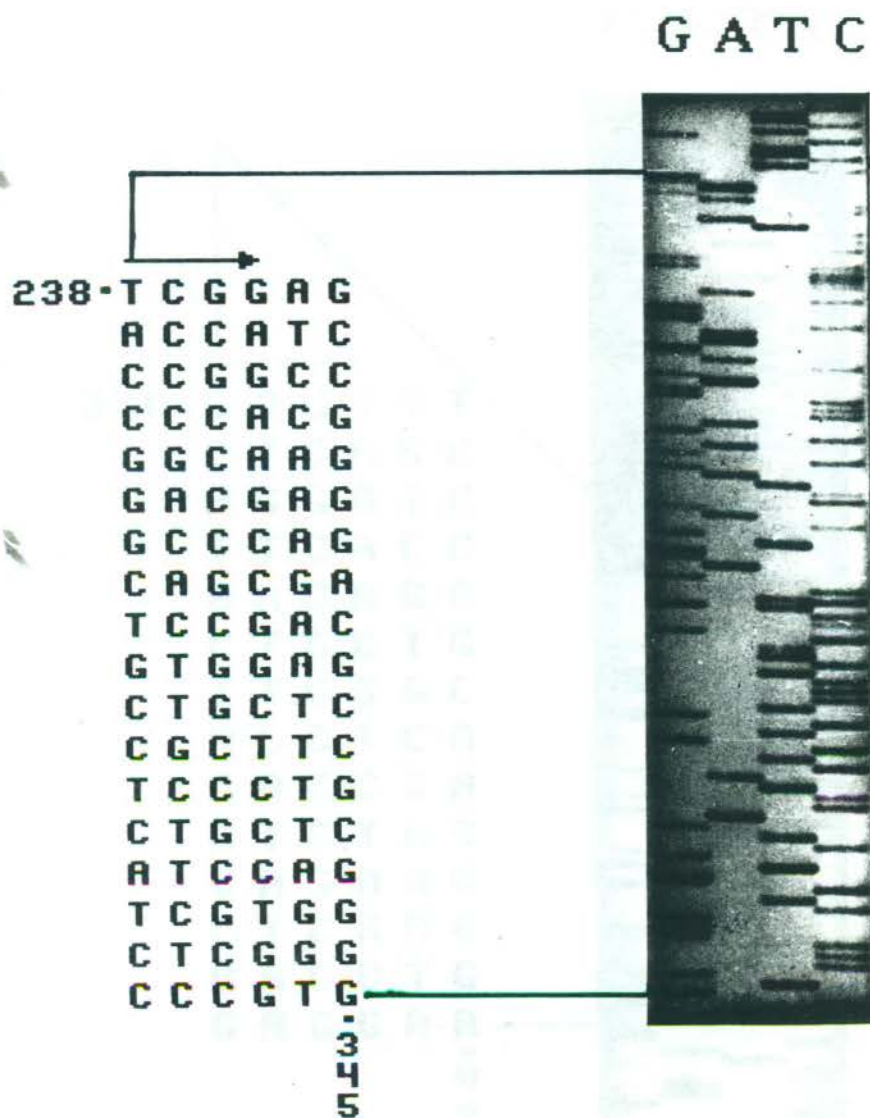


Figura 19.- Secuencia nucleotídica del ADNc de DGH a partir del nucleótido 238 al 345 (codones del 80 al 115).

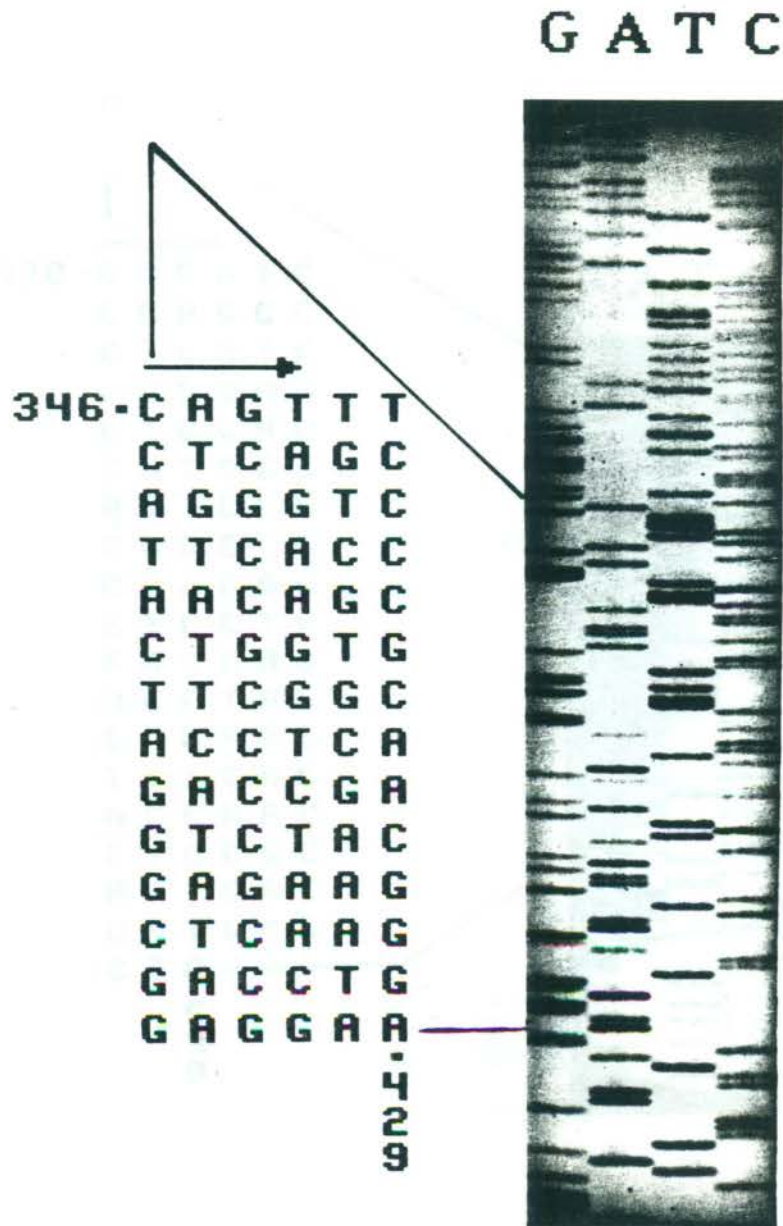


Figura 20.- Secuencia nucleotídica del ADNc de DGH a partir del nucleótido 346 al 429 (codones del 116 al 143).

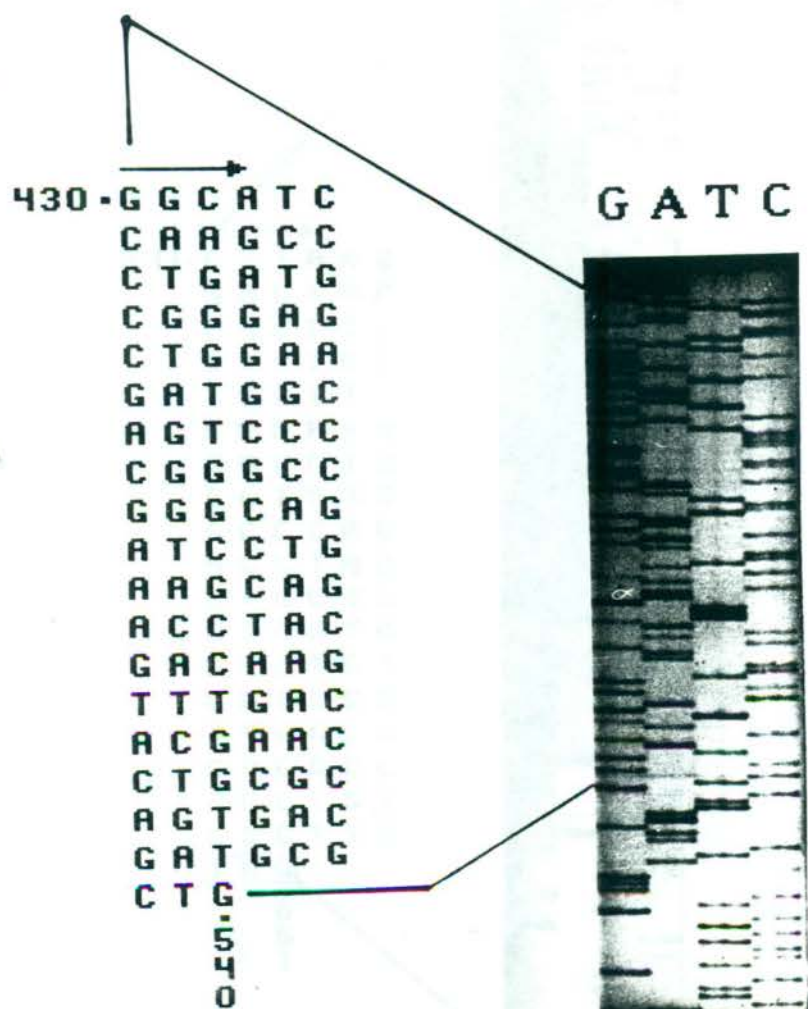


Figura 21.- Secuencia nucleotídica del ADNc de DGH a partir del nucleótido 430 al 540 (codones del 144 al 180).

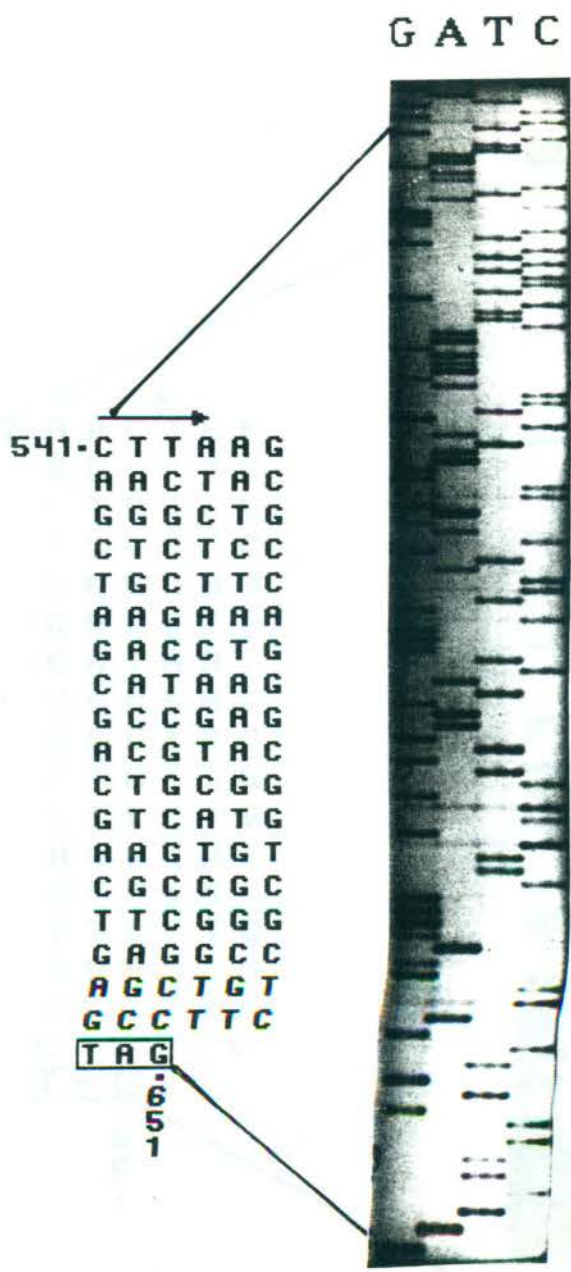


Figura 22.- Secuencia nucleotídica del ADNc de DGH a partir del nucleótido 541 al 651 (codones del 181 al 217). En esta secuencia del nucleótido 628 al 651 (donde se incluye el codón de terminación) están subrayados y corresponden al iniciador consenso 3' incorporado en el ADNc de DGH al amplificar por la RCP.



Figura 23.- Secuencia nucleotídica del ADNc de DGH a partir del nucleótido 547 al 651. En esta secuencia elucidamos la región natural correspondiente al ADNc de DGH del iniciador 3' consenso que va del nucleótido 628 al 651 (véase fig. 22).

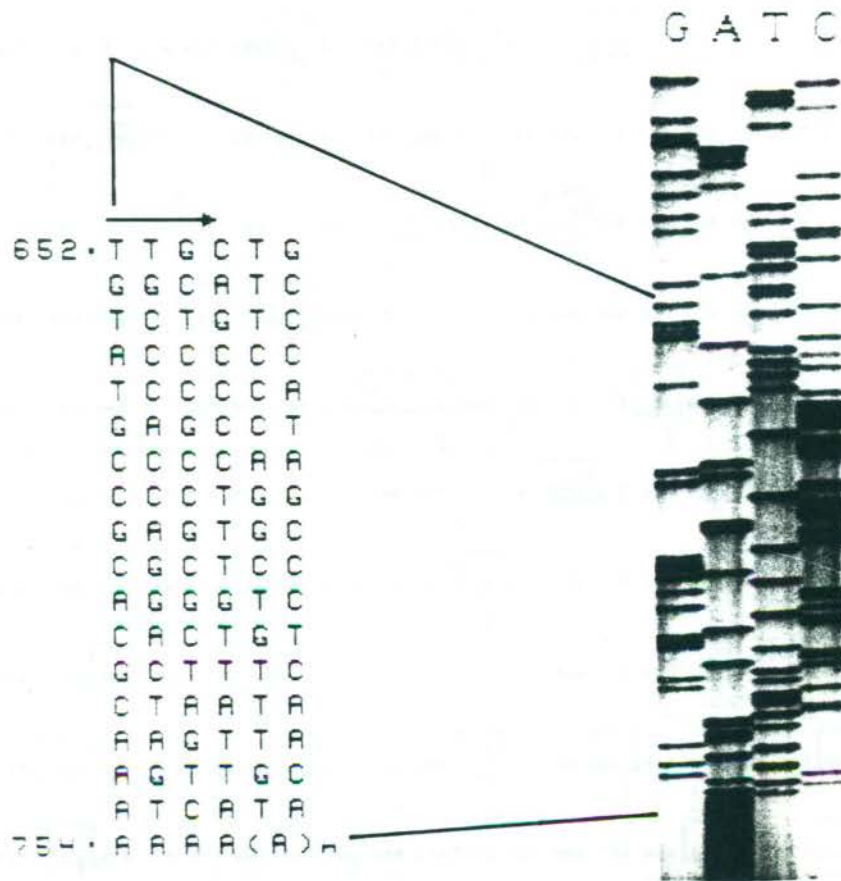


Figura 24.- Secuencia nucleotídica del ADNc de DGH a partir del nucleótido 652-754. Aquí mostramos la secuencia correspondiente a la región 3' no traducible y la cola poli-A del ADNc de DGH.

Características del ADNc de DGH y su proteína.

El ADN de DGH presenta secuencia nucleotídica codificante y 3' no traducible características de las GHs de mamíferos; la primera tiene una longitud de 651 pb y la segunda de 101 pb (véase fig. 25). La región codificante consta de 217 codones, 190 de los cuales corresponden a la hormona madura, 26 de ellos forman el péptido líder y el último corresponde al codón de terminación "TAG" (véase fig. 26).

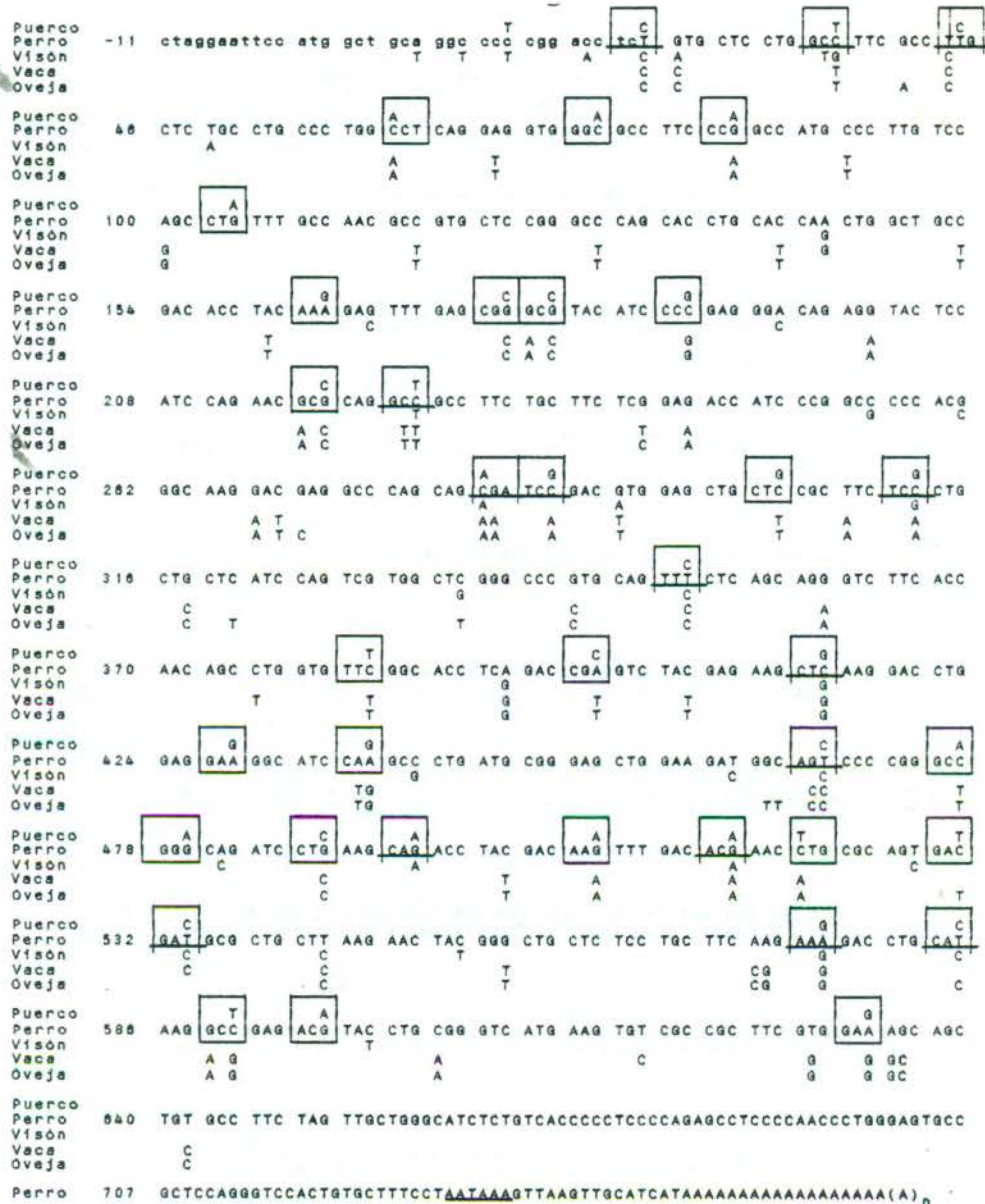


Figura 25.- Secuencia nucleotídica del ADNc de DGH y su similitud con otras de mamíferos. Se muestran las diferencias entre la región codificante del ADNc de DGH y la del cerdo (enmarcada), visón, bovino y ovino. La secuencia del iniciador consenso en la región 5' terminal está en letras minúsculas. La secuencia consta de 651 nucleótidos codificantes mas 101 nucleótidos correspondientes a la región 3' no traducible. La señal de poliadenilación esta subrayada (AATAAA).

		-28	gct gca ggc ccc cgg	-20	acc tct gtg ctc ctg gcc TTC GCC TTG CTC TGC	-10	
		<u>atg</u>	<u>Ala Ala Gln Pro Arg</u>	<u>thr ser Val Leu Leu Ala</u>	<u>Phe Ala Leu Leu Cys</u>		
Perro				Asn	Met	Val	Ser
Puerco					Leu		
Visón					Leu		
Vaca						Thr	
Oveja							
	52	CTG CCC TGG	CCT CAG GAG GTG GGC	-1 +1	TTC CCG GCC ATG CCC TTG TCC AGC		
		<u>Leu Pro Trp</u>	<u>Pro Gln Glu Val Gly Ala</u>	<u>Phe Pro Ala Met Pro Leu Ser Ser</u>			
Perro				Thr			Gly
Puerco				Thr			Gly
Visón				Val		Ser	
Vaca				Val		Ser	
Oveja							
	103	CTG TTT GCC AAC GCC GTG CTC CCG GCC CAG CAC CTG CAC CAA CTG GCT GCC					
		Leu Phe Ala Asn Ala Val Leu Arg Ala Gln His Leu His Gln Leu Ala Ala					
Perro							
Puerco							
Visón							
Vaca							
Oveja							
	154	GAC ACC TAC AAA GAG TTT GAG CCG GCG TAC ATC CCC GAG GGA CAG AGG TAC					
		Asp Thr Tyr Lys Glu Phe Glu Arg Ala Tyr Ile Pro Glu Gly Gln Arg Tyr					
Perro				Asp			
Puerco							
Visón							
Vaca							
Oveja							
	205	TCC ATC CAG AAC GCG CAG GCC GCC TTC TGC TTC TCG GAG ACC ATC CCG GCC					
		Ser Ile Gln Asn Ala Gln Ala Ala Phe Cys Phe Ser Glu Thr Ile Pro Ala					
Perro				Thr	Val		
Puerco				Thr	Val		
Visón							
Vaca							
Oveja							
	258	CCC ACG GGC AAG GAC GAG GCC CAG CAG CGA TCC GAC GTG GAG CTG CTC CCG					
		Pro Thr Gly Lys Asp Glu Ala Gln Gln Arg Ser Asp Val Glu Leu Leu Arg					
Perro							
Puerco							
Visón							
Vaca							
Oveja							
	307	TTC TCC CTG CTG CTC ATC CAG TCG TGG CTC GGG CCC GTG CAG TTT CTC AGC					
		Phe Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Gly Pro Val Gln Phe Leu Ser					
Perro							
Puerco							
Visón							
Vaca							
Oveja							
	358	AGG GTC TTC ACC AAC AGC CTG GTG TTC GGC ACC TCA GAC CGA GTC TAC GAG					
		Arg Val Phe Thr Asn Ser Leu Val Phe Gly Thr Ser Asp Arg Val Tyr Glu					
Perro							
Puerco							
Visón							
Vaca							
Oveja							
	408	AAG CTC AAG GAC CTG GAG GAA GGC ATC CAA GCC CTG ATG CCG GAG CTG GAA					
		Lys Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Ala Leu Met Arg Glu Leu Glu					
Perro							
Puerco							
Visón							
Vaca							
Oveja							
	480	GAT GGC AGT CCC CCG GCC GGG CAG ATC CTG AAG CAG ACC TAC GAC AAG TTT					
		Asp Gly Ser Pro Arg Ala Gly Gln Ile Leu Lys Gln Thr Tyr Asp Lys Phe					
Perro							
Puerco							
Visón							
Vaca							
Oveja							
	511	GAC ACG AAC CTG CCG AGT GAC GAT GCG CTG CTT AAG AAC TAC GGG CTG CTC					
		Asp Thr Asn Leu Arg Ser Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu					
Perro							
Puerco							
Visón							
Vaca							
Oveja							
	582	TCC TGC TTC AAG AAA GAC CTG CAT AAG GCC GAG ACG TAC CTG CAG GTC ATG					
		Ser Cys Phe Lys Lys Asp Leu His Lys Ala Glu Thr Tyr Leu Arg Val Met					
Perro							
Puerco							
Visón							
Vaca							
Oveja							
	613	AAG TGT CGC CGC TTC GTG GAA AGC AGC TGT GCC TTC TAG					
		Lys Cys Arg Arg Phe Val Glu Ser Ser Cys Ala Phe *					
Perro							
Puerco							
Visón							
Vaca							
Oveja							

Figura 26.- Secuencia aminoacídica de la DGH y su similitud con otros GHs de mamíferos. Mostramos las diferencias aminoacídicas entre la DGH contra la GH de cerdo, visón bovino y ovino. La única diferencia de la PGH está enmarcada, el péptido líder está subrayado. La secuencia correspondiente al iniciador consenso en la región 5' terminal se presenta en letra minúscula.

Al traducir sus codones a aminoácidos y tomando en cuenta únicamente los que constituyen la hormona madura (+1 a +190) encontramos que la DGH presentó una similitud aminoacídica en porciento de 99.0 (dos diferencias), 98.5 (tres diferencias), 98.5 (tres diferencias) y 68.6 (sesenta diferencias) comparado con la GH madura del zorro rojo, caballo, elefante africano y humano respectivamente. A continuación mostramos dicha comparación:

Comparación aminoacídica de la GH madura del perro-vs-zorro rojo, caballo, elefante africano y humano

Perro	1	FPAMPLSSLFANAVLRAQHLHQLAADTYKEFERAYIPEGQRYSI*QNAQAA
Zorro		-----*-----
Caballo		-----*-----
Elefante		-----*-----
Humano		--TI--R--D--M--HR----F--Q--E---KE-K--FL--P-TS

Perro	51	FCFSETIPAPTGKDEAQQRSDVELLRFSLLLIQSWLGPVQFLSRVFTNSL
Zorro		-----V-----L-----
Caballo		-----M-----L-----
Elefante		-----
Humano		L---S--T-SNRE-T--K-NL---I-----E-----S--A---

Perro	101	VFGTSDR*VYEKLDLEEGIQALMRELEDGSPRAGQILKQTYDKFDTNLR
Zorro		-----*-----
Caballo		-----*-----R-----
Elefante		-----*-----P--V-----M--
Humano		-Y-A--SN--DL-----T--GR-----T--F---S---SHN

Perro	151	DDALLKNYGLLSFCFKDLHKAETYL RVMKCRRFVSSCAF*
Zorro		-----
Caballo		-----
Elefante		-----
Humano		-----Y--R--MD-V--F--VQ--*S--G--G--

Cuando sometimos a otra comparación a la DGH madura resulto tener un porciento en similitud del 100, 98.4 (tres diferencias), 90.5 (18 diferencias) y 89.5 (20 diferencias) comparada con la GH del cerdo (Seeburg y cols, 1983), visón (Shoji y cols, 1990), bovino (Miller y cols, 1980) y borrego (Warwick y cols, 1989), respectivamente (ver fig. 26 y tabla II). Esta conservación alta entre las especies no se mantiene cuando incluimos en la comparación a la hormona del crecimiento humano (DeNoto y cols, 1981; Seeburg, 1982) la cual comparte únicamente el 68.6% de la secuencia aminoacídica respecto a la del perro como anteriormente lo mencionamos. Respecto a la secuencia nucleotídica, el ADNc de DGH resultó 95.5% (26 diferencias), 94.2% (33 diferencias), 88.8% (64 diferencias) y 88.3% (67 diferencias) similar al ADNc de la GH madura del visón, cerdo, vaca y borrego, respectivamente (véase fig. 25 y tabla III).

Tabla II. Similitud (%) aminoacídica entre la DGH y las GHs del cerdo, visón, vaca y borrego

ESPECIE	Hormona Residuos 1-190	Péptido líder Residuos -18 a -1
Cerdo	100.0	94.4
Visón	98.4	83.3
Vaca	90.5	83.3
Borrego	89.5	77.7

*Residuos antes del -18 corresponden a la secuencia consenso.

Tabla III. Similitud (%) nucleotídica entre el ADNc de DGH y los del visón, cerdo, vaca y borrego.

ESPECIE	Hormona Nuc. 79-648	Péptido líder Nuc. 24-78
Visón	95.5	89.1
Cerdo	94.2	90.0
Vaca	88.8	89.1
Borrego	88.3	87.3

*Nucleótidos antes del 24 corresponden a la secuencia consenso.

Aunque el ADNc de DGH difiere del ADNc de pGH en un total de 38 nucleótidos, de éstos 37 son cambios neutrales (34 se localizan en la tercera posición del codón y 3 en la primera posición) (véase fig. 25), y únicamente uno (también de primera posición) conlleva a un cambio en la secuencia aminoacídica, lo que hace que estas dos hormonas se diferencien en tan solo un codón. De cualquier manera, esta única diferencia aminoacídica entre DGH y PGH está localizada en la posición -6 del péptido líder, por lo tanto, la DGH madura es idéntica a la del cerdo (véase fig. 26).

Con la ayuda del programa computacional de Pustell y Kafatos, determinamos los sitios de restricción del ADNc de DGH y realizamos su mapa de restricción (véase fig. 27)

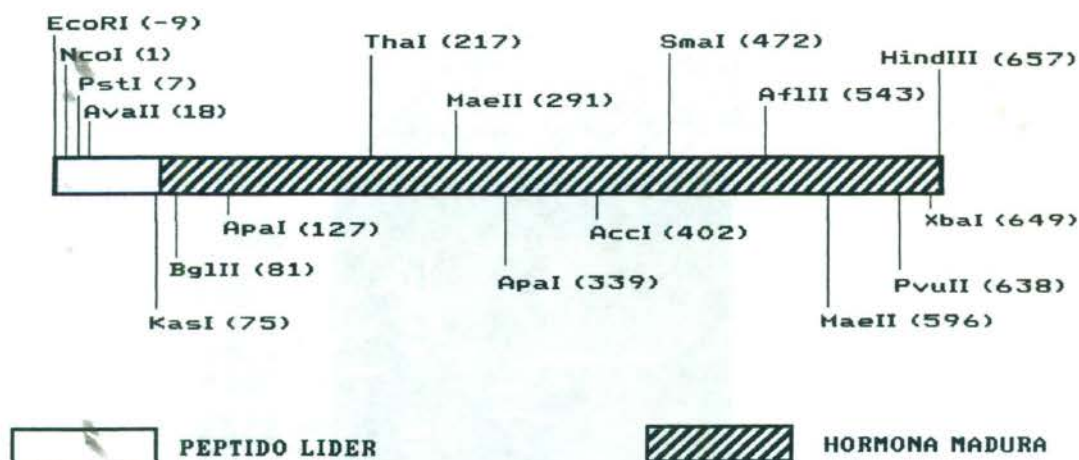


Figura 27.- Mapa de restricción del ADNc de DGH. Mostramos los sitios principales y únicos de restricción a excepción de los dos sitios *ApaI* que presenta. Este mapa se generó con ayuda de un programa computacional (Pustell y Kafatos, 1982; Pustell y Kafatos, 1984).

Enfasamiento y subclonación del ADNc de DGH.

Para lograr expresar nuestro ADNc de DGH, lo subclonamos en el vector plasmídico (pMALc) y crecimos el plásmido recombinante resultante en la bacteria *Escherichia coli* (cepa TB1). El enfasamiento lo logramos, amplificando de nueva cuenta el ADNc de DGH, pero ahora variando el iniciador 5' el cual contiene un sitio de restricción *Xho I* extra que nos sirvió para liberar el ADNc de DGH (de la clona M13mp18-DGH previamente secuenciada) de *Xho I* a *Hind III* y clonarlo en el vector pSS-hGH abierto en los mismos sitios, dando origen a la clona intermedia PJA-DGH la cual presenta de *Eco RI* a *Xho I* parte de los primeros codones de la interleucina-2 (IL-2) con secuencia adecuada para enfasar correctamente al ADNc de DGH con el vector de expresión. Posteriormente cortamos a PJA-DGH desde *Eco RI* hasta *Hind III* liberando el fragmento del ADNc de DGH. Este lo ligamos al vector pMALc abierto en los mismos sitios, dando origen a la clona expresora pMALc-DGH con el marco de lectura adecuado para dar origen a DGH (véase fig. 8).

Una vez efectuada la ligación, transformamos con ésta bacterias *Escherichia coli* cepa TB1 calcio competentes. Sembramos en cajas de agar LB con ampicilina donde crecimos las colonias. Todas las bacterias que habían incorporado al plásmido pudieron desarrollarse en este medio selectivo, por la propiedad que les confiere el gen de la β -lactamasa (resistencia a ampicilina). De éstas, aquellas colonias blancas correspondieron a las portadoras del ADNc de DGH y las azules al vector pMALc recircularizado. Crecimos 12 colonias blancas, en las que la inserción del ADNc de DGH interrumpió la fase de lectura de la β -galactosidasa (enzima causante de producir el color azul cuando actúa sobre el colorante metacrómico X-Gal); les realizamos minipreparación de ADN para posteriormente caracterizarlas con las enzimas diagnósticas del ADNc de DGH.

Cortamos con *Sma* I (sitio interno) la cual lineariza nuestra construcción pMALc-DGH de 6759 pb de longitud. *Eco* RI + *Hind* III liberan el fragmento de 658 pb correspondiente al ADNc de DGH, *Sma* I + *Eco* RI liberan un fragmento de 477 pb, *Xho* I + *Hind* III liberan un fragmento de 653 pb y por último cortamos con la enzima *Acc* I, la cual produce dos bandas una de 2846 pb y la segunda de 3913 pb (véase fig. 28).

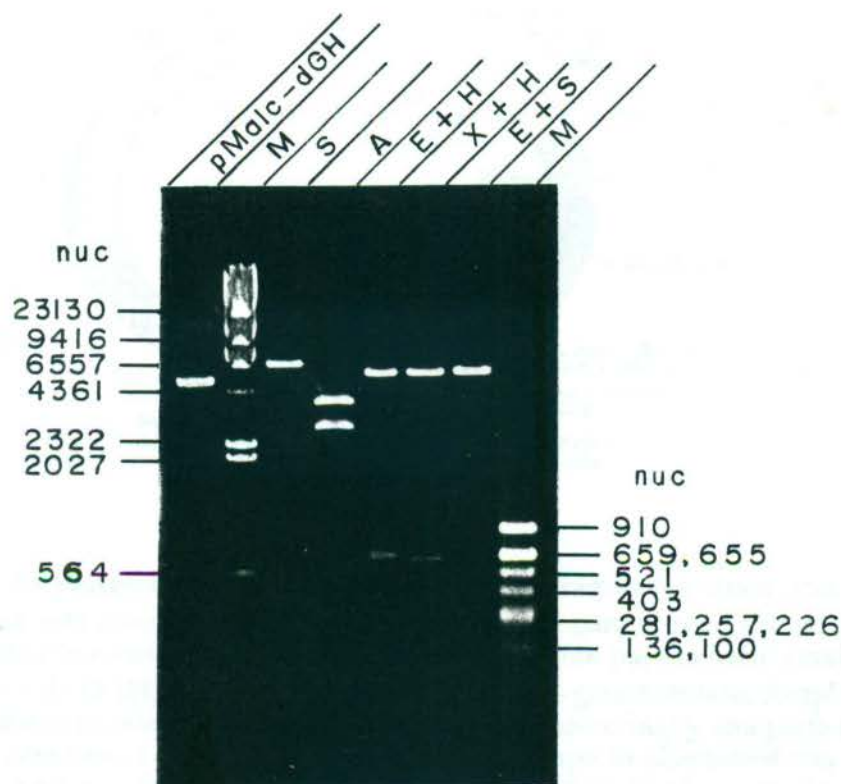


Figura 28.- Caracterización enzimática de pMALc-DGH. Después de haber construido la clona expresora pMALc-DGH la cortamos con diferentes enzimas de restricción, guiándonos en el mapa de esta clona para predecir el o los fragmentos liberados. En el primer carril mostramos a pMALc-DGH sin cortar; en el segundo un marcador de longitud de ADN (λ -*Hind* III) para tamaños grandes; en el tercer carril cortamos con la enzima de restricción *Sma* I la cual es única y por lo tanto lineariza nuestra construcción de longitud 6759 pb; en el cuarto carril mostramos el corte con *Acc* I, dicha enzima corta sobre dos sitios en la construcción, uno interno a nuestro inserto y otro en el vector, por lo tanto produce dos bandas la mayor de 3913 pb y la menor de 2846 pb; en el quinto carril mostramos una doble digestión *Eco* RI + *Hind* III nos libera el fragmento clonado de 658 pb de longitud; en el carril sexto tenemos otra doble digestión *Xho* I + *Hind* III el cual nos libera un fragmento de 653 pb; en el penúltimo carril mostramos el producto de la digestión con *Eco* RI + *Sma* I, libera un fragmento de 477 pb y por último tenemos un marcador de longitud (PBR322-*Alu* I).

La selección de las enzimas para caracterizar nuestra construcción pMALc-DGH y la predicción de la longitud de los fragmentos que se liberaron según mostramos en la figura 28; están basados en el mapa de restricción del híbrido pMALc-DGH (véase fig. 29), el cual como ya se mencionó arriba lo obtuvimos utilizando el programa computacional de Pustell y Kafatos, 1982 y 1984.

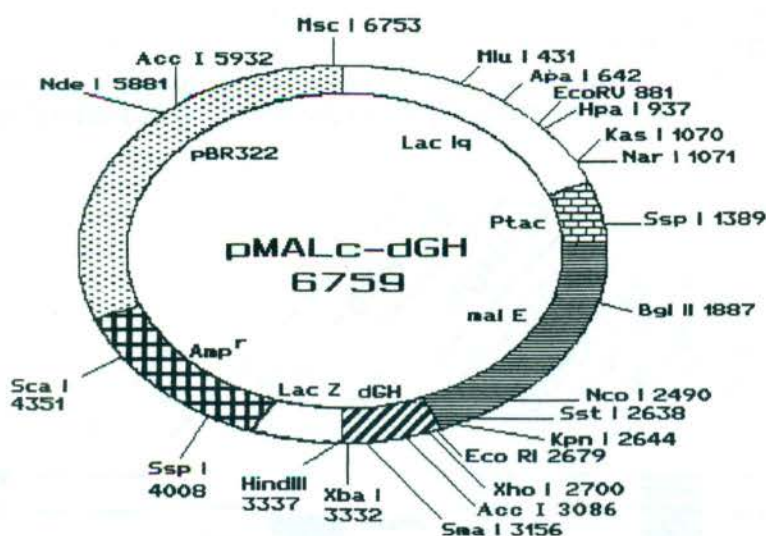


Figura 29.- Mapa de restricción de pMALc-DGH. Mostramos los sitios principales y las regiones de interés de esta construcción, el gen *lac I^q* codifica para el represor del promotor *tac* encargado de promover la transcripción, el gen *mal E* codificante para la MBP (maltose binding protein), DGH (ADNc de DGH), el gen *lac Z* productor de la β -galactosidasa, *Amp^r* (el gen de la β -lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina sobre las bacterias) y una parte del plásmido PBR322 el cual intervino en la formación de pMALc. Este mapa lo diseñamos con la ayuda del programa Pustell el cual nos facilitó la localización de los sitios de corte para las enzimas de restricción.

Una vez caracterizada la construcción pMALc-DGH, la crecimos a mediana escala para tenerla en cantidad suficiente. Logramos recuperar 600 μ g a partir de un volumen de 100 ml de bacterias transformadas con dicha construcción.

Expresión y detección de DGH en *Escherichia coli*.

Sobre un cultivo de 4ml de bacterias ajustado a una densidad celular de 0.5 U (Abs a 595 nm) que contenían la construcción pMALc-DGH, agregamos el inductor IPTG a una concentración final de 0.1 mM y permitimos un tiempo de inducción de entre 5 y 15 h.

Para detectar las proteínas totales expresadas en *Escherichia coli* realizamos una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 15%. Ajustamos las bacterias inducidas y los testigos a una concentración de 0.01 U/ μ l con el fin de procesarlas para SDS-PAGE según describimos en la sección de Metodología.

Habiendo teñido las proteínas del gel con el colorante azul brillante de Coomassie, claramente pudimos apreciar la aparición de una banda intensa esperada al nivel de 66 kd correspondiente a la fusión MBP-DGH (véase fig. 30). Para corroborar que esta banda correspondiera a la fusión MBP-DGH, decidimos inmunodetectarla utilizando suero anti-BGH, esperando que tuviera reacción cruzada como sucede con la HGH, comprobado esto último en nuestro laboratorio. Para esto hicimos otro gel de poliacrilamida del cual electrotransferimos las proteínas a membrana de nitrocelulosa y las hicimos reaccionar con suero de conejo anti- BGH. Posteriormente revelamos con un segundo anticuerpo biotinilado (complejo peroxidasa estreptavidina-biotina). Los tamaños de las proteínas fueron estimados corriendo en paralelo marcadores de peso molecular conocidos. Observamos que el suero anti-BGH detectó exclusivamente una banda a nivel de 66 kd, correspondiente a la fusión MBP-DGH, (véase fig. 31).

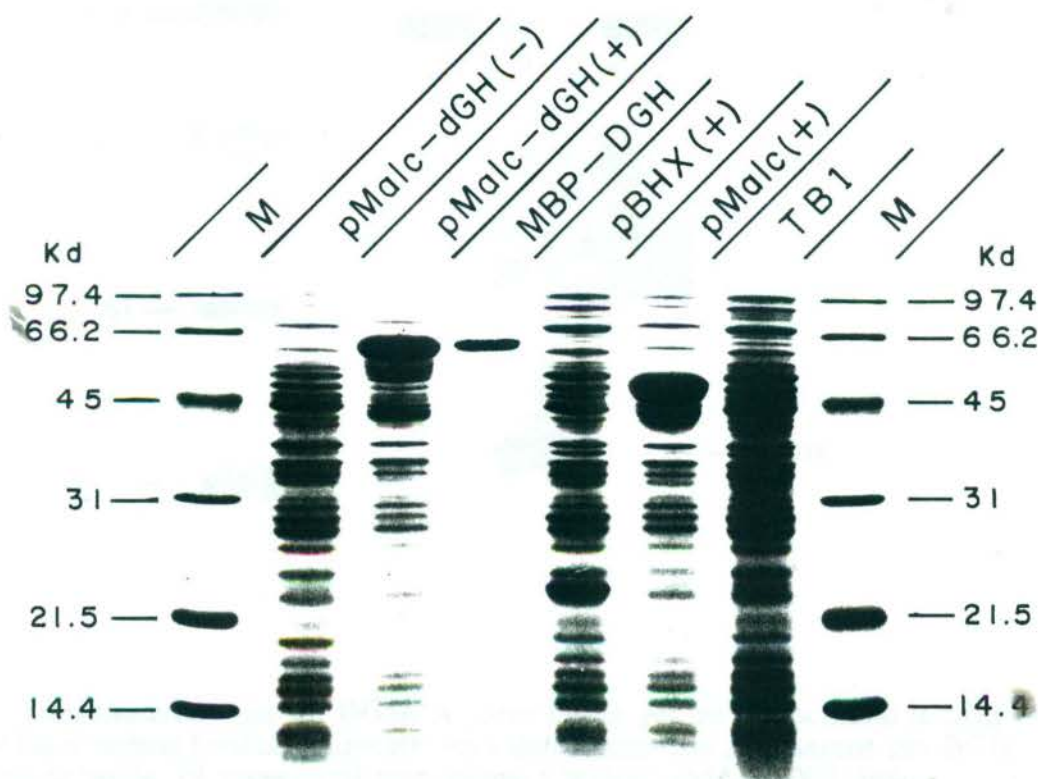


Figura 30.- Expresión de DGH como proteína de fusión. Clonamos el ADNc de DGH en pMALc para originar la construcción expresora pMALc-DGH. Una vez introducida, fermentada e inducida para ser expresada en *Escherichia coli*, este plásmido recombinante expresó la DGH como proteína de fusión (MBP-DGH). Las muestras fueron analizadas en gel de poliacrilamida-SDS al 15% teñidas con azul brillante de Coomassie. Mostramos las proteínas totales de lisado celular de TB1/pMALc-DGH crecidas toda la noche sin inducir en el segundo carril e inducidas con IPTG por 5-15 h en el tercer carril, nótese la aparición de una banda a nivel de 66kd que sobresale entre las otras. El cuarto carril muestra a la MBP-DGH purificada (cuerpos de inclusión). En los carriles quinto y sexto mostramos los controles positivos de expresión TB1/pBHx y pMALc (sin el ADNc de DGH), el primero expresa la HGH madura (22 kd) y el segundo expresa la MBP-LacZ (51 kd) cuando son inducidos con IPTG. El séptimo carril es el control negativo, contiene únicamente el lisado bacteriano de TB1 sin plásmido. Ambos carriles extremos presentan marcadores de peso molecular (M) sus tamaños se indican en kilodaltones.

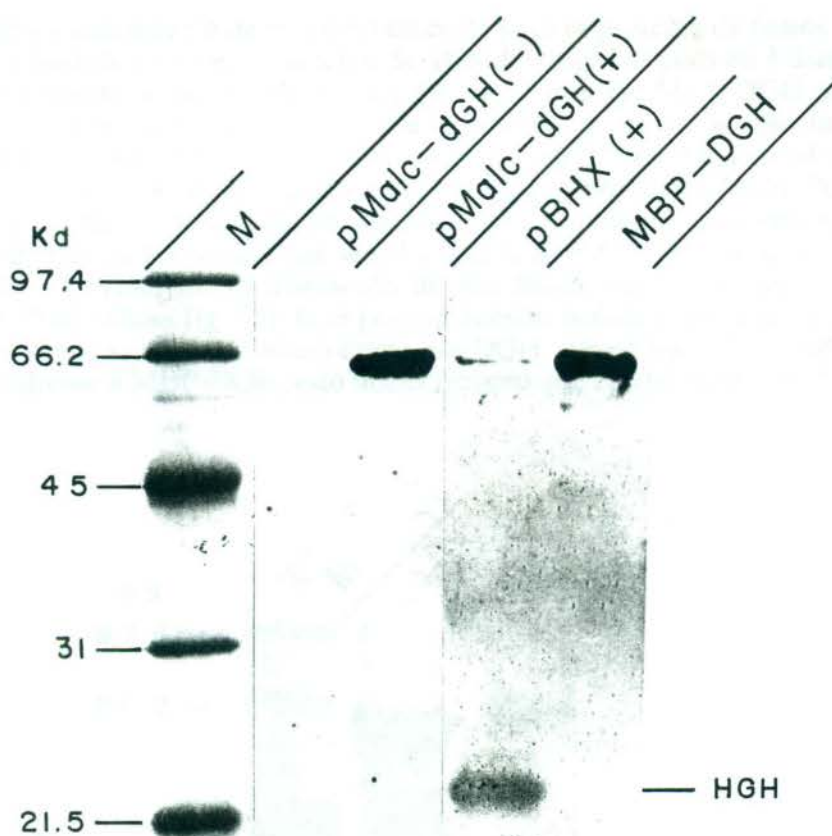


Figura 31.- Inmunodetección de DGH. A partir de un gel de poliacrilamida-SDS al 15% transferimos las proteínas totales a nitrocelulosa y detectamos con anticuerpos anti-BGH a DGH como proteína de fusión. El tercer carril corresponde a la clona pMALc-DGH inducida con IPTG, donde apreciamos una banda de 66 kd correspondiente a la fusión MBP-DGH. El segundo carril es la misma construcción que la del tercero pero sin inducir con IPTG, por lo tanto no se produce la proteína. El cuarto carril representa el testigo positivo de expresión pBHx donde se presenta banda correspondiente a la HGH madura (22 kd). El quinto carril corresponde a la detección del cuerpo de inclusión purificado (MBP-DGH). El primer carril (M) contiene el marcador de peso molecular expresado en kilodaltones.

Aparte de esto, del total de las proteínas bacterianas logramos también la purificación de la proteína de fusión MBP- DGH, por medio de la técnica de purificación de cuerpos de inclusión (toda proteína que se sobre expresa tiende a formar aglomerados hasta acumularse, dando origen a los cuerpos de inclusión) como describimos en la sección de Metodología.

Logramos la recuperación de 400 mg de la proteína en cuestión. Este producto de fusión lo procesamos tanto para detectarlo por SDS-PAGE teñido con azul brillante de Coomassie, donde mostró una banda única a 66 kd, como por inmunoelectrotransferencia, donde detectamos una banda inmunoreactiva al suero anti-BGH también de 66 kd (véase figs. 30 y 31).

Separación enzimática de DGH del complejo MBP-DGH.

Realizamos una mezcla de reacción de corte para la proteína de fusión MBP-DGH con el factor Xa, según lo indicamos en la sección de Metodología. Después de 3 días de incubación a 6 °C, intentamos detectar la separación de la DGH del complejo MBP-DGH por SDS-PAGE, sin embargo, después de teñir con azul brillante de Coomassie no pudimos apreciar proteína liberada. Esto nos hizo suponer que no hubo corte enzimático o bien el corte fue parcial siendo tan escaso el producto liberado, que no alcanzábamos a detectar la DGH por este método. Por lo que decidimos aumentar la sensibilidad de detección, llevándola a cabo a nivel inmunológico realizando "Western blotting". Esta técnica es 100 veces mas sensible que la de PAGE, lo que se reflejó en que por éste método si pudimos visualizar la liberación de una banda correspondiente a DGH a un nivel aproximado de 25 kd (véase fig. 32). Este peso molecular resultó porque la DGH tenía presente su péptido líder, es decir, se había liberado como pre-DGH, (véase fig. 33). También visualizamos la banda correspondiente a MBP-DGH, esto nos corroboró que en efecto el corte había sido parcial.

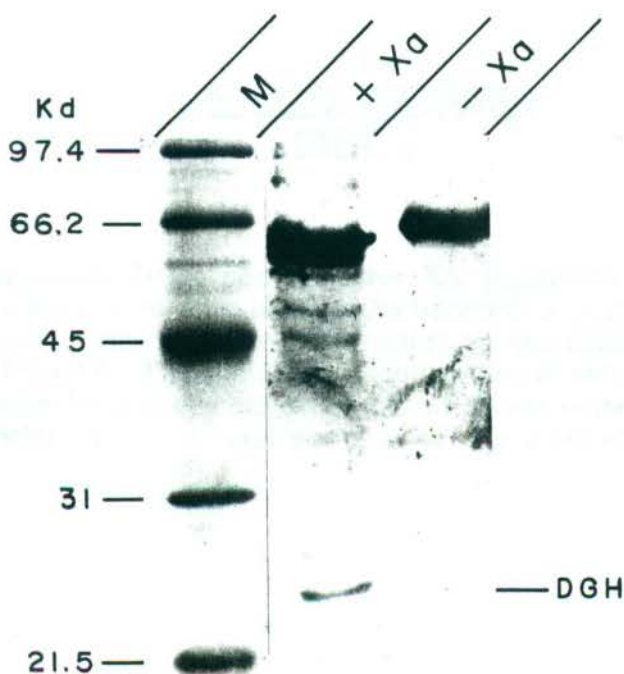


Figura 32.- Liberación de DGH a partir de la fusión MBP-DGH. El corte sobre la proteína de fusión MBP-DGH fue realizado por el factor Xa. Esta figura corresponde a una inmunodetección por suero anti-BGH de DGH atrapada en nitrocelulosa. En el primer carril mostramos el marcador de peso molecular; en el segundo carril mostramos la liberación de DGH la cual presenta un peso molecular de 25 kd por incluir péptido líder (véase fig. 31), además se detecta aun la fusión MBP-DGH, esto nos indica que el corte fue parcial; en el tercer carril mostramos el testigo negativo, la reacción se realizó con los mismos componentes y tratado de la misma manera que nuestro problema con excepción del factor de corte Xa.

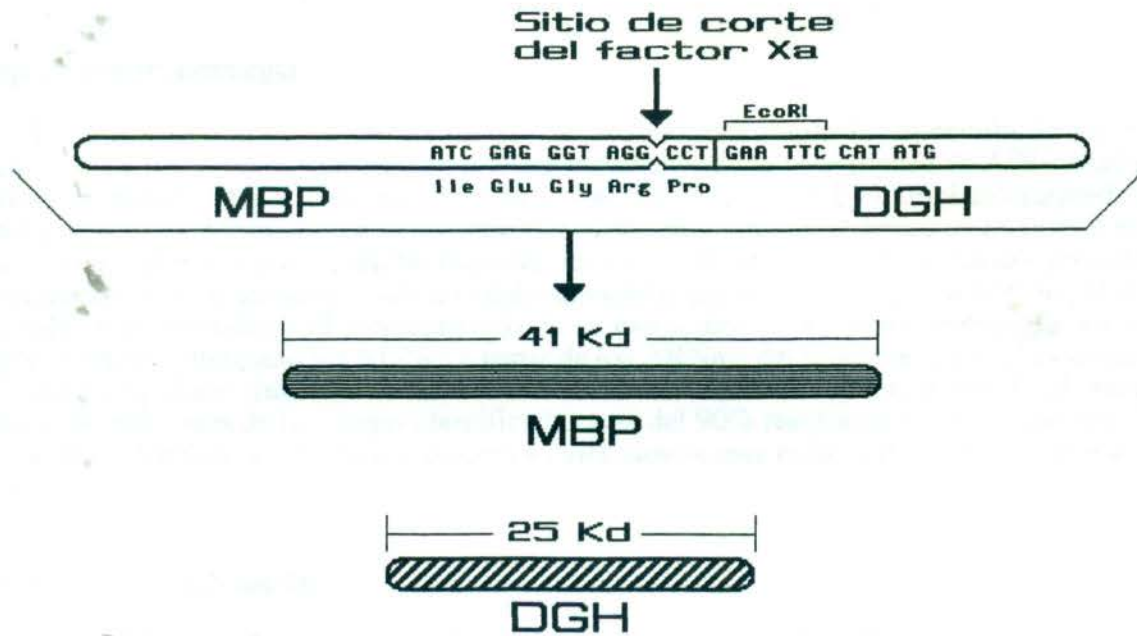


Figura 33.-Liberación de DGH por el factor Xa. Representamos la proteína de fusión MBP-DGH (66 kd) sobre la cual actúa el factor Xa liberando a DGH (25 kd) de MBP (41 kd). La DGH liberada no corresponde a la hormona madura ya que incluye el péptido líder y cuatro aminoácidos extras (Pro, Glu, Phe e His) tres adquiridos en el ensamblaje del ADNc de DGH cuando ligamos a partir del sitio de restricción *Eco* RI el cual se incluye, y el cuarto aminoácido (Pro) propio de la MBP debido al corte por el factor Xa sobre el lado amino de este residuo aminoácido.

VIII. DISCUSION.

Ventaja de nuestra estrategia

Hace algunos años, la estrategia que se seguía para lograr la obtención de un ADNc particular de un tejido dado, consistía en tamizar bibliotecas de la colectividad de ADNcs del tejido en cuestión, introducidos a vectores de propagación o de expresión. Esto implicaba sintetizar los ADNcs respectivos por medio de la retrotranscriptasa. Para tamizar el banco se recurría a sondas radiactivas complementarias al ADNc buscado. Este proceso era elaborado, tedioso y prolongado, y frecuentemente la clona identificada no estaba completa, por lo que se requería de manipulaciones adicionales para completar el conocimiento de su estructura. Con nuestra estrategia, en la que después de haber sintetizado los ADNcs a partir de los ARNms del tejido de interés, los sometimos a RCP para amplificar únicamente el ADNc deseado, facilitamos grandemente la obtención y clonación de éste, pues de las clonas identificadas mas del 90% resultaron positivas, facilitando en gran manera el trabajo, al ahorrarnos tiempo y evitándonos usar radioisótopos para la preparación de la sonda.

Extracción de los ARN totales

Reprodujimos eficientemente el método para extracción de ARNs totales. Este se diseñó originalmente para procesar grandes cantidades del tejido de interés, digamos más de 20 gr, y en nuestro caso logramos practicarla exitosamente hasta con solo 80 mg de tejido, conteniendo así con la escasa disponibilidad de materia prima, pues la hipófisis canina además de pequeña es difícil de recuperar, cuando al principio partimos de 450 mg de tejido hipofisario, logramos recuperar 1 mg de ARNtot, lo que representa el 0.22% de recuperación.

Respecto a la calidad del ARNtot, esta presentó una relación a 260/280 nm de 1.9, considerada como buena, lo que se corroboró al analizar dicho ARNtot en gel de urea-ácido y en el cual se apreciaron las tres bandas sobresalientes del ARN ribosomal (28S, 18S y 5S), siendo la banda del 28S de doble intensidad, comparada con la del 18S, tal cual se esperaba, y por supuesto sin barridos que indicaran degradación alguna.

Amplificación del ADNc de DGH por la RCP

Después de haber efectuado la síntesis del ADNc a partir de los ARNtot por medio de la reacción de la transcriptasa reversa, amplificamos por 30 ciclos de RCP el ADNc de DGH, y los productos los analizamos por electroforesis en gel de agarosa, verificando en éste la presencia de una sola banda de 670pb; dicha banda correspondió en tamaño al ADNc de DGH, pudiendo constatar así la gran sensibilidad y especificidad de la técnica de la RCP.

Clonación

Para fines de lograr la clonación en un vector que a la vez facilitara la secuenciación del ADNc de DGH, preparamos a gran escala los bacteriófagos M13mp18 y mp19, obteniendo un excelente rendimiento (aproximadamente 2 mg/l), siendo de nuevo la relación espectrofotométrica a 260/280 nm de alrededor de 2.

Luego de haber llevado acabo las ligaciones y transformaciones respectivas, al caracterizar los insertos de las clonas candidatas, verificamos la identidad esperada en 8 de 9 clonas para el híbrido M13mp19-DGH y 7 de 9 para el M13mp18-DGH.

Secuenciación

Respecto a la determinación de la secuencia nucleotídica, decidimos clonar el ADNc en ambas orientaciones para poder completar en toda su extensión la secuencia del ADNc de DGH. Esto lo logramos insertándolo en ambos vectores M13, que guardan orientaciones opuestas. Además, requerimos correr las electroforesis en 2 tiempos; el primero de 6 a 8 hrs para leer los primeros 200-250 nuc. y el segundo de 15 a 18 hrs para leer del nuc. 250 al 500, aproximadamente. De lo contrario, hubiera sido difícil confiar en la secuencia completa. Por la misma razón, fue que también hicimos construcciones a partir de sitios internos en el ADNc, como fue el caso de *Sma I*, lo que nos permitió leer completamente cada cadena en su totalidad y en ambas orientaciones. Con esto descartamos lecturas erróneas ó artificios de lectura. Respecto a la región 3' no-traducible, diseñamos un oligonucleótido a base de politimidilato con un sitio de restricción extra *Hind III*. Gracias a éste pudimos incluir en la clonación del ADNc dicha región, y así conocer no solo la secuencia de todos los codones del extremo carboxiterminal, sino también de los nucleótidos correspondientes a la región 3'terminal no-traducible.

Características del ADNc

La secuencia del ADNc de DGH posee las características propias de una prehormona del crecimiento de mamíferos, tanto a nivel nucleotídico como aminoacídico. La pre-DGH difiere tan solo de la PGH en un residuo aminoacídico localizado en el péptido líder en la posición -6 (Pro por Thr), lo que implica una similitud del 100% de las formas maduras de estas dos hormonas.

Este es el primer reporte de una secuencia nucleotídica correspondiente a la hormona del crecimiento de un miembro de la familia canidae y por consecuencia la información aquí generada será de gran utilidad en los estudios comparativos y de evolución. También nos servirá para estimular esfuerzos dirigidos a la aplicación de este regulador metabólico en la medicina veterinaria.

Este resultado obtenido de identidad completa entre DGH y PGH, es comparable con otros. Por ejemplo, sabemos que aunque hay dos secuencias nucleotídicas reportadas para el ADNc de la GH de cabra (gGH) (Yamano y cols, 1988; Yato y cols, 1988) en el banco de genes, ambas codifican para la misma proteína, que resulta ser idéntica a la del ovino (OGH) (Warwick y cols, 1989). De cualquier forma, como especies, éstas últimas pertenecen a la misma familia taxonómica. Pero hasta donde sabemos nuestro hallazgo es el primer reporte de dos GHs idénticas de especies que pertenecen a distintos órdenes y por ende a distintas familias.

Un caso muy parecido, pero en la misma especie, ocurre en los dos genes humanos no-alélicos del lactógeno placentario, mismos que a pesar de varios cambios nucleotídicos, la única diferencia en su secuencia aminoacídica se encuentra en sus péptidos líderes (Barrera-Saldaña y cols, 1983).

El significado del descubrimiento de la identidad completa entre DGH y PGH queda para ser discutido a la luz de las nuevas reconsideraciones sobre las relaciones filogenéticas, motivadas por las nuevas técnicas de Biología Molecular (Li y cols, 1990; Novacek, 1992). La observación de que el perro y el cerdo presentan hormona del crecimiento idénticas, contrastando con la observación de que la GH del visón (Shoji y cols, 1990), especie que pertenece al mismo suborden que el perro, presenta una GH que no comparte identidad total con la DGH, apoya el cuestionamiento de los árboles evolutivos actuales.

Recientemente se dilucidó la estructura tridimensional de la PGH (Abdel-Meguid y cols, 1987) (véase fig. 34), ahora con nuestro hallazgo de la identidad completa entre PGH y DGH, dicha estructura se puede extrapolar a ésta última.

Otra consecuencia valiosa de este resultado es que ahora podemos entender el por qué de la efectividad del tratamiento del enanismo pituitario en perros con la PGH y la reacción cruzada perfecta entre PGH y DGH. Aún más, de nuestro hallazgo se desprende que la DGH es un regulador biológico capaz de ser explotado en por lo menos dos especies animales importantes, una para propósito domésticos (perro) y la otra para propósito de granja (cerdo).

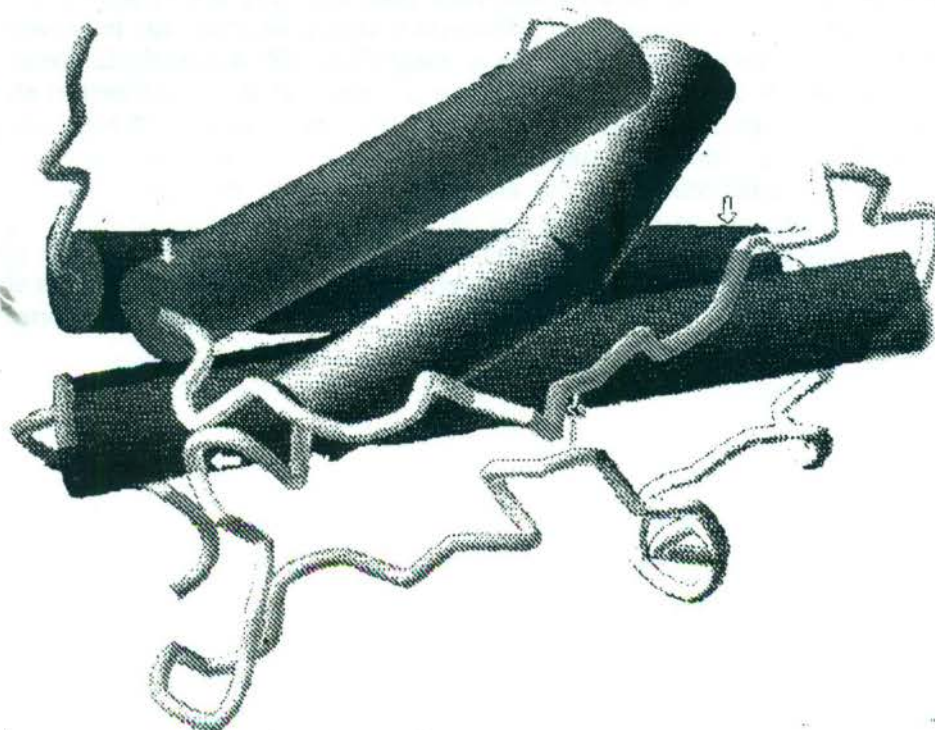


Figura 34.- Representación computacional de la estructura tridimensional de la PGH. Esta consta de 4 hélices alfa (representadas por cilindros), la primera iniciando del amino terminal va del residuo 6 al 33, la segunda del 74 al 86, la tercera del 105 al 126 y la cuarta del 151 al 182. Las regiones sin estructura bien definida se representan en forma de tubo delgado. Su extremo amino se localiza en la parte superior izquierda y el carboxilo terminal en la inferior izquierda. Se indica uno de los dos puentes disulfuro intracadena (cisteína 52 y 163); el segundo (cisteína 180 y 188) está oculto. Todo lo implicado en esta estructura se aplica a la DGH, debida a su identidad total con la PGH.

Síntesis de DGH recombinante

Logramos la producción de la DGH como proteína fusionada a MBP, su purificación en cuerpos de inclusión y hasta la separación y purificación de la DGH a partir del híbrido MBP-DGH (por medio del corte proteolítico infringido por el factor X). Para efectos de investigación aplicada y producción a nivel de laboratorio, este modelo nos es suficiente.

Ahora bien, hablando de un sistema sobreproductor para fines industriales y/o comerciales de la DGH, o de cualquier proteína de interés, requerimos del diseño y puesta en marcha de un sistema procariótico capaz de sobreproducir la proteína como hormona madura y biológicamente activa. Para esto es necesario que el sistema procariótico reconozca a la proteína en cuestión como propia, cosa que es difícil de lograr, por intervenir una serie de factores y variantes, como son el promotor bacteriano, el cual debe ser fuerte y regulable, la secuencia y los nucleótidos flanqueantes a la región de unión al ribosoma (Shine-Delgarno), el orden y tipo de nucleótidos antes del codón de iniciación de la traducción de la proteína, y además, el orden y acomodo de las bases en los codones al inicio del ARNm (para traducción óptima de éste). A la fecha, los resultados obtenidos a nivel de matraz nos indican que vamos por buen camino, pero aún no hemos logrado la construcción adecuada que sobreexpresa la proteína recombinante funcional en la bacteria. No obstante, lo que hemos realizado hasta aquí es un gran avance, ya que si bien logramos la sobreexpresión solo cuando la fusionamos a MBP, ésta es la primera vez que logramos la construcción de una quimera que exprese abundantemente alguna proteína de origen animal en un sistema bacteriano, en nuestro laboratorio.

IX. CONCLUSIONES.

Con los resultados obtenidos en nuestro trabajo podemos concluir que:

- 1.- El uso de iniciadores "consenso" para GHs de mamíferos permitió amplificar el ADNc de DGH.
- 2.- La inclusión de sitios únicos en los extremos del producto amplificado facilitó su clonación.
- 3.- La determinación de secuencia nucleotídica en ambas cadenas y en clonas independientes, descartó mutaciones.
- 4.- Las comparaciones de secuencias, relacionan a DGH de mayor a menor grado con las GHs del cerdo, visón, vaca y borrego.
- 5.- La expresión del ADNc de DGH en bacterias confirma su integridad, pues se produce una proteína de fusión (MBP-DGH) del tamaño esperado (66kd).
- 6.- El reconocimiento de la proteína de fusión por los anticuerpos anti-BGH apoya la identidad de DGH.
- 7.- Con la clonación y determinación de la secuencia nucleotídica del ADNc de DGH, hemos aportado otra secuencia para los estudios evolutivos, siendo de valor particular por contribuir información por vez primera a cerca de la familia canidae.

X. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.

- Abdel-Meguid, S.S.;** Shieh, H.S.; Smith, W.W.; Dayringer, H.E.; Violand, B.N. y Bentle, L.A. Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 6434-6437, (1987).
- Agéllon, L.B.** y Chen, T.T. Rainbow trout growth hormone: Molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli*. *DNA* **5**:463-471, (1986).
- Agellon, L.B.;** Davies, S.L.; Chen, T.T. y Powers, D.A. Structure of a fish (rainbow trout) growth hormone gene and its evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**:5136-5140, (1988).
- Agellon, L.B.** y Chen, T.T. Rainbow trout has two genes for growth hormone. *Mol. Reprod. Dev.* **1**:11-17, (1988).
- Amann, E.** y Brosius, J. ATG vectors for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene*. **40**:183-190, (1985).
- Andresen, E.** y Willeberg, P. Pituitary dwarfism in Carnelian bear dogs: Evidence of simple, autosomal recessive inheritance. *Hereditas* **83**:232-234, (1976b).
- Andresen, E.;** Willeberg, P. y Rasmussen P.G. Pituitary dwarfism in German Shepherd dogs: genetic investigations. *Nord. Vet. Med.* **26**:692-701, (1974).
- Andresen, E.** y Willeberg, P. Pituitary dwarfism in German Shepherd dogs: evidence of simple, autosomal recessive inheritance. *Nord Vet Med* **28**:487-495, (1976a).
- Balbas, P.** y Bolivar, F. Design and construction of expression plasmid vectors in *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology*. **185**:14-37, (1990).
- Barrera-Saldaña, H.A.;** Seeburg, P.H. y Saunders, G.F. Two structurally different genes produce the same secreted human placental lactogen hormone. *J. Biol. Chem.* **258**:3787-3793, (1983).
- Barrera-Saldaña, H.A.;** Ortíz-López, R.; Rojas-Martínez, A. y Reséndez-Pérez, D. Reacción en cadena de la polimerasa. *Ciencia y Desarrollo. Ene./Feb.* pp. 50-60, (1993).
- Barta, A.;** Richards, R.I.; Baxter, J.D. y Shine, J. Primary structure and evolution of rat growth hormone gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**:4867-4871, (1981).
- BIO 101, Inc. Manual del Gene Clean Kit, (1991).**
- Burns, T.W.** Endocrinology, In: *Pathologic physiology*, ed 5, Philadelphia, W.B. Saunders Co. pp. 865-914, (1974).
- Catt, K.J.;** Moffat, B. y Niall, H.D. Human growth hormone and placental lactogen: structural similarity. *Science* **157**:321, (1967).
- Chao, S.C.;** Pan, F.M. y Chang, W.C. Purification of carp growth hormone and cloning of the complementary DNA. *Biochim. Biophys. Acta* **1007**:233-236, (1989).

- Chen, H.-T.;** Pan, F.-M. y Chang, W.-C. Purification of duck growth hormone and cloning of the complementary DNA. *Bioch. Biophysica Acta.* **949:** 247-251, (1988).
- Chomczynski, P.** y Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162:**156-159, (1987).
- Cocola, F.;** Udeschini, G.; Secchi, C.; Panerai, A.E.; Neri, P. y Muller, E.E. A rapid radioimmunoassay method of growth hormone in dog plasma. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **151:**140-145, (1976).
- D'Alessio, J.M.;** Noon, M.C.; Ley, H.L. y Gerard, G.F. One-tube double stranded cDNA synthesis using cloned MMLV reverse transcriptase. *Focus.* **9:**1-4, (1987).
- Dagert, M.** y Ehrlich, S.D. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene.* **6:**23-28, (1979).
- Daughaday, W.H.** Growth hormones and somatomedins, In Daughaday, W.H. (Ed.), *Endocrine Control of Growth.* Elsevier, New York, NY. pp. 1-24. (1981).
- Daughaday, W.H.** The anterior pituitary. In Wilson, J.D.; Foster, D.W. (eds): *Williams Textbook of Endocrinology*, Philadelphia, W.B. Saunders Co. pp. 568-613, (1985).
- DeNoto, F.M.;** Moore, D.D. y Goodman, H.M. Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucl. Acids Res.* **9:**3719-3730, (1981).
- Duplay, P.;** Bedouelle, H.; Fowler, A.; Zabin, I.; Saurin, W. y Hofnung, M. Sequences of the malE gene and its product, the maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* **259:**10606-10613, (1984).
- Eigenmann, J.E.** y Patterson, D.F. Growth hormone deficiency in the mature dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **20:**741-746, (1984).
- Eigenmann, J.E.** Diagnosis and treatment of dwarfism in a German Shepherd dog. *J Am Anim Hosp. Assoc.* **17:**798-804, (1981).
- Eigenmann, J.E.** Diagnosis and treatment of pituitary dwarfism in dogs. *Proc. Sixth Kal Kan Symposium, Columbus, Ohio.* pp. 107-110, (1983).
- Erlich, H.A.** *PCR Technology.* M Stockton Press, (1989).
- Evans, H.M.** y Long, J.A. The effect of the anterior lobe of the hypophysis administered intraperitoneally upon growth and maturity and oestrus cycles of the rat. *Anat. Rec.* **21:**62-63, (1921).
- Feldman, E.C.** y Nelson, R.W. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction.* (W.B. Saunders Company, Philadelphia) pp. 29-54, (1987).
- Foster, D.N.;** Kim, S.U.; Enyeart, J.J. y Foster, L.K. Nucleotide sequence of the complementary DNA for turkey growth hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173:**967-975, (1990).
- Ganong, W.F.** *Review of medical physiology.* Los Altos, C.A., Lange Medical Publications, (1981).

- Goeddel, D.V.;** Kleid, D.G.; Bolivar, F.; Heyneker, H.; Yansura, D.; Crea, R.; Hirose, T.; Kraszewski, A.; Itakura, K. y Riggs, A. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**:106-110, (1979a).
- Goeddel, D.;** Heyneker, H.; Hozumi, T.; Arentzen, R.; Itakura, K.; Yansura, D.; Ross, M.; Miozzari, G.; Crea, R. y Seeburg, P. Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature*. **281**:544-548, (1979b).
- Gonzalez-Villaseñor, L.I.;** Zhang, P.; Chen, T.T. y Powers, D.A. Molecular cloning and sequencing of coho salmon growth hormone cDNA. *Gene* **65**:239-246, (1988).
- Guan, C.;** Li, P.; Riggs, P.D. e Inouye., H. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene*. **67**: 21-30, (1987).
- Gubler, V. y Hoffman, B.J.** A simple a very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*. **25**:263-269, (1983).
- Hampshire, T.;** Altszuler, N.; Steele, R. et al. Radioimmunoassay of canine growth hormone: Enzymatic radioiodination. *Endocrinology*. **96**:822-827, (1975).
- Hanahan, D.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557- 580, (1983).
- Harada, Y.;** Tatsumi, H.; Nakano, E. y Umezu, M. Cloning and sequence analysis of mink growth hormone cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**:1200-1204, (1990).
- Hashimoto, C.;** Irie, M.; Matsuzaki, F.; Tsushima, T. y Shizume, K. Purification and properties of canine growth hormone. *Biochim Biophys Acta* **175**:231-234, (1969).
- Ho, W.K.K.;** Tsang, W.H. y Dias, N.P. Cloning of the grass carp growth hormone cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**:1239-1243, (1989).
- Hulmes, J.D.;** Miedel, M.C.; Li, C.H. y Pan, Y.C.E. Primary structure of elephant growth hormone. *Int. J. Pept. Protein Res.* **33**:368-372, (1989).
- Innis, M.A.;** Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J. y White, T.J. PCR Protocols. Academic Press, Inc, (1990).
- Iritani, A.** Nucleotide sequence of the growth hormone gene cDNA from goat *Capra hircus* L. (Tokara). *Nucleic Acids Res.* **16**:3578-3578, (1988).
- Iritani, A.** Cloning and sequencing of cDNA that encodes goat growth hormone. *FEBS Lett.* **228**: 301-304, (1988).
- Johnston, T.C.;** Thompson, R.V. y Baldwin, T.O. Nucleotide sequence of the luxB gene of *Vibrio harveyi* and the complete amino acid sequence of the β -subunit of bacterial luciferase. *J. Biol. Chem.* **261**:4805-4811, (1986).
- Knobil, E.;** Wolf, R.C.; Greep, R.O. et al. Effect of primate pituitary growth hormone preparation on nitrogen metabolism in the hypophysectomised rhesus monkey. *Endocrinology*. **60** (1):166-168, (1957).

- Krook, L.** Metabolic bone diseases of endocrine origin hypopituitarism. In: Dobberstein, J.; Pallaske, G.; Stunzi, H. (eds). Handbook of the special pathological anatomy of domestic animals. Vol. 1, 3rd ed. Berlin, Verlag, Paul, Parey. pp. 384-390, (1969).
- Lamb, I.C.;** Galehouse, D.M. y Foster, D.N. Chicken growth hormone cDNA sequence. *Nucleic Acids Res.* **16**:9339-9339, (1988).
- Li, W-H.;** Gouy, M.; Sharp, P.M.; O'hUigin, C. y Yang, Y-W. Molecular phylogeny of Rodentia, Lagomorpha, Primates, Artiodactyla, and Carnivora and molecular clocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**:6703-6707, (1990).
- Li, C.H. y** Evans, H.M. The isolation of pituitary growth hormone. *Science.* **99**:183-184, (1944).
- Li, C.H.;** Izdebski, J. y Chung, D. Primary structure of fox pituitary growth hormone. *Int. J. Pept. Protein Res.* **33**:70-72, (1989).
- Li, C.H.;** Chung, D.; Lahm, H-W. y Stein, S. The primary structure of monkey pituitary growth hormone. *Arch. Biochem. Biophys.* **245**:287-291, (1986).
- Li, C.H. y** Dixon, J.S. Human growth hormone. The primary structure of the hormone. *Arch. Biochem. Biophys.* **46**:233-236, (1971).
- Linzer, D.I.H. y** Talamantes, F. Nucleotide sequence of mouse prolactin and growth hormone mRNAs and expression of these mRNAs during pregnancy. *J. Biol. Chem.* **260**:9574-9579, (1985).
- Lorens, J.B.;** Nerland, A.H.; Male, R.; Lossius, I.; Telle, W. y Totland, G.K. The nucleotide sequence of atlantic salmon growth hormone cDNA. *Nucleic Acids Res.* **17**:2352-2352, (1989).
- Maina, C.V.;** Riggs, P.D.; Granda, A.G. III; Slatko, B.E.; Moran, L.S.; Tagliamonte, J.A.; McReynolds, L.A. y Guan, C. A vector to express and purify foreign proteins in *Escherichia coli* by fusion to, and separation from, maltose binding protein. *Gene.* **74**:365-373, (1988).
- Mandel, M. e** Higa, A. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**:159-162, (1970).
- Martens, G.;** Groenen, P. y Braks, A. Expression of two growth hormone genes in the *Xenopus* pituitary gland. *Nucleic Acids Res.* **17**:3974-3974, (1989).
- Meesing, J.** M13, the universal primer and the polylinker. *Focus.* **4**:21-26, (1988).
- Miller, W. L.;** Martial, J. A. y Baxter, J. D. Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. *J. Biol. Chem.* **255**:7521-7524, (1980).
- Miller, W.L. y** Eberhardt, N.L. Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr. Rev.* **4**:97-130, (1983)
- Morelle, G.** A plasmid extraction procedure on a miniprep scale. *Focus* **11**:7-8, (1989).
- Murray, K.** Genetic engineering: Possibilities and prospects for its application in industrial microbiology. *Phil. Trans. R. Soc. London B.* **290**:369-386, (1980).

- Nagai, K.** y Thøgersen, C. Synthesis and sequence-specific proteolysis of hybrid proteins produced in *Escherichia coli*. *Methods in Enzymol.* **153**:461-481, (1987).
- Nagai, K.** y Thøgersen, C. Generation of B-globin by sequence specific proteolysis of a hybrid protein in *Escherichia coli*. *Nature.* **309**:810-812, (1984).
- Ney, R.L.** The anterior pituitary hormones. In: Duncan's diseases of metabolism, ed. 7, Philadelphia, W.B. Saunders Co. pp. 965-1008, (1974).
- Niall, H.D.;** Hogan, M.L.; Sauer, R.; Rosenblum, I.Y. y Greenwood, F.C. Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **68**:866-869, (1971)
- Niall, H.D.;** Hogan, M.L.; Tregear, G.W.; Segre, G.V.; Hwang, P. y Friesen, H. The chemistry of growth hormone and the lactogenic hormones. *Recent. Prog. Horm. Res.* **29**:387-404, (1973).
- Nicholas, F.** Pituitary dwarfism in German Shepherd dogs: a genetic analysis of some Australian data. *J Small Anim Pract* **19**:167-174, (1978).
- Novacek, M.J.** Mammalian phylogeny: shaking the tree. *Nature* **356**:121-125, (1992).
- Page, G.S.;** Smith, S. y Goodman, H.M. DNA sequence of the rat growth hormone gene: location of the 5' terminus of the growth hormone mRNA and identification of an internal transposon-like element. *Nucl. Acids Res.* **9**:2087-2104, (1981).
- Pan, F.M.** y Chang., W. C. Cloning and sequencing of bullfrog growth hormone complementary DNA. *Biochem. Biophysica Acta.* **950**:238-242, (1988).
- Parker, W.M.** y Scott, D.W. Growth hormone responsive alopecia in the mature dog-a discussion of 13 cases. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **16**:824-828, (1980).
- Pustell, J.** y Kafatos, F.C. A convenient and adaptable package of DNA sequence analysis programs *Nucl. Acids Res.* **10**:51-59, (1982).
- Pustell, J.** y Kafatos, F.C. A convenient and adaptable package of computer programs for DNA and protein sequence management, analysis and homology determination. *Nucl. Acids Res.* **12**: 643-655, (1984).
- Raben, M.S.** Preparation of growth hormone from pituitaries of man and monkey. *Science* **125**: 883, (1957).
- Rentier-Delrue, F.;** Swennen, D.; Philippart, J.C.; L'Hoir, C.; Lion, M.; Benrubi, O. y Martial, J.A. Tilapia growth hormone: Molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli*. *DNA* **8**:271-278, (1989a).
- Rentier-Delrue, F.;** Swennen, D.; Mercier, L.; Lion, M.; Benrubi, O. y Martial, J.A. Molecular cloning and characterization of two forms of trout growth hormone cDNA: Expression and secretion of tGH-II by *Escherichia coli*. *DNA* **8**:109-117, (1989b).
- Rosen, J.M.;** Woo, S.L.C.; Holder, J.W.; Means, A.R. y O'Malley, B.W. Preparation and preliminary characterization of purified ovalbumin messenger RNA from the hen oviduc. *Biochemistry* **14**:69-78, (1975).

- Roth, J.A.;** Lomax, L.G.; Altszuler, N. et al. Thymic abnormalities and growth hormone deficiency in dogs. *Am. J. Vet. Res.* **41**:1256-1262, (1980).
- Saito, A.;** Sekine, S.; Komatsu, Y.; Sato, M.; Hirano, T. e Itoh, S. Molecular cloning of eel growth hormone cDNA and its expression in *Escherichia coli*. **73**:545-571, (1988).
- Salmon, W.D. y Daughaday, W.H.** A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J. Lab. Clin. Med.* **49**:825, (1957).
- Sambrook, J.;** Fritsch, E.F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, New York, (1989).
- Sanger, F. y Thompson, E.O.P.** The amino acid sequence in the glycy chain of the insulin. *J. Biochem.* **53**:353-374, (1953).
- Sanger, F. y Tuppy, H.** The amino acid sequence in the phenylalanyl chain of the insulin. *J. Biochem.* **49**:463- 490.(1951).
- Sanger, F.;** Nicklen, S. y Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463-5467, (1977).
- Sato, N.;** Watanabe, K.; Murata, K.; Sakaguchi, M.; Kariya, Y.; Kimura, S.; Nonaka, M. y Kimura, A. Molecular cloning and nucleotide sequence of tuna growth hormone cDNA. *Biochim. Biophys. Acta* **949**:35-42, (1988).
- Scott, D.W.;** Kirk, R.W.; Hampshire, J. y Altszuler, N. Clinicopathological findings in a German Shepherd with pituitary dwarfism. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **14**:183-191, (1978).
- Seeburg, P.H.;** Sias, S.; Adelman, J.; De Boer, H.A.; Hayflick, J.; Jhurani, P.; Goeddel, D.V. y Heyneker, H.L. Efficient bacterial expression of bovine and porcine growth hormones. *DNA* **2**: 37-45, (1983).
- Seeburg, P.H.** The human growth hormone gene family: Nucleotide sequences show recent divergence and predict a new polypeptide hormone. *DNA* **1**: 239-249, (1982).
- Sekine, S.;** Mizukami, T.; Saito, A.; Kawauchi, H. y Itoh, S. Isolation and characterization of a novel growth hormone cDNA from chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Biochim. Biophys. Acta* **1009**:117-120, (1989).
- Sekine, S.;** Mizukami, T.; Nishi, T.; Kuwana, Y.; Saito, A.; Sato, M.; Itoh, S. y Kawauchi, H. Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**:4306-4310, (1985).
- Shadu, C. y Gedamu, L.** A procedure for the preparation of RNA-free plasmid DNA. *Biotechniques.* **6**:20-21, (1988).
- Sherwood, L.M.** Similarities in the chemical structure of human placental lactogen and pituitary growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **58**: 2307-2314, (1967).
- Shoji, K.;** Ohara, E.; Watahiki, M. y Yoneda., Y. Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding the mink growth hormone. *Nucl. Acids Res.* **18**: 6424, (1990).
- Siegel, E.T.** *Endocrine Diseases of the Dog* (eds Lea & Febiger) (Philadelphia, 1977).

- Spencer, E.M.** Anterior pituitary and somatomedins: II. Somatomedins. In Greenspan F.S., Forsham, P.H. (eds): Basic and clinical endocrinology. Los Altos, C.A., Lange Medical Publications. pp. 89-99, (1983).
- Towin, H.;** Staehelin, T. y Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure on some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **76**:4350-4354, (1979).
- Tsushima, T.;** Irie, M. y Sakuma, M. Radioimmunoassay for canine growth hormone. Endocrinology **89**:685-693, (1971).
- United States Biochemical Corporation. Step-by-step protocols for DNA sequencing with sequenase version 2.0 USB Press, Cleaveland, pp 3-12, (1990).
- Villa-Komaroff, L.;** Efstratiadis, A.; Broome, S.; Lomedico, P.; Tizard, R.; Nabet, S.P.; Chick, W.L. y Gilbert, W. A bacterial clone synthesizing proinsulin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **75**:3727-3731, (1978).
- Wallace, D.M.** Methods in Enzimology. (Berger, S.L. y Kimmel, A.R., eds.), Vol. **152**:41-43, Academic Press, New York, (1987).
- Warwick, J.M.;** Wallis, O.C. y Wallis, M. Cloning, sequence and expression in *Escherichia coli* of cDNA for ovine pregrowth hormone. Biochim. Biophys. Acta **1008**: 247-250, (1989)
- Wilhelmi, A.E.** Canine growth hormone. Yale J Biol Med **41**:199- 207, (1968).
- Willeberg, P.;** Kastrup, K.W. y Andresen, E. Pituitary dwarfism in German Shepherd dogs: Studies on somatomedin activity. Nord. Vet. Med. **27**:448-454, (1975).
- Woychik, R.P.;** Camper, S.A.; Lyons, R.H.; Horowitz, S.; Goodwin, E.C. y Rottman, F.M. Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. Nucl. Acids Res. **10**: 7197-7210, (1982).
- Yamano, Y.;** Oyabayashi, K.; Okuno, M.; Yato, M.; Kioka, N.; Manabe, E.; Hashi, H.; Sakai, H.; Komano, T.; Utsumi, K. e Iritani, A. Cloning and sequencing of cDNA that encodes goat growth hormone. FEBS Letters. **228**:301-304, (1988).
- Yato, M.;** Yamano, Y.; Oyabayashi, K.; Okuno, M.; Kioka, N.; Manabe, E.; Hashi, H.; Sakai, H.; Komano, T.; Utsumi, K. e Iritani, A. Nucleotide sequence of the growth hormone gene cDNA from goat *Capra hircus* L. (Tocara). Nucleic Acid Res. **16**:3578, (1988).
- Zakin, M.M.;** Poskus, E.; Langton A.A.; Ferrara, P.; Santome, J.A.; Dellacha, J.M. y Palladini, A.C. Primary structure of equine growth hormone. International Journal of peptide and protein research. **8**:435-444, (1976).
- Zhvirblis, G.S.;** Gorbulev, V.G., Rubtsov, P.M.; Karapetyan, R.V.; Zhuravlev, I.V.; Fisinin, V.I.; Skryabin, K.G. y Baev, A.A. Genetic engineering of peptide hormones: Cloning and primary structure of cDNA of chicken growth hormone. Mol. Biol. **21**:1324-1328, (1987).