

1988-1

79498017

Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE CIENCIAS



ADAPTACION DE LA METODOLOGIA PARA EL USO DEL
ADN RECOMBINANTE.

TESIS PROFESIONAL

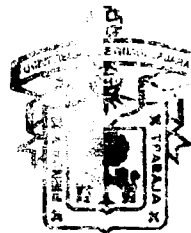
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

CARIDAD AUREA LEAL CORTES

GUADALAJARA, JAL. JULIO DE 1989

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Bioquímica IV de la División de Genética en la Unidad de Investigaciones Biomédicas de Occidente (U.I.B.O.), bajo la asesoría de la QFB. Ma. Enriqueta Franco Gamboa y dirección de la Profesora Dra. María de Lourdes Ramírez Dueñas.

I N D I C E

C O N T E N I D O

P A G I N A

I.	INTRODUCCION	1
II.	OBJETIVOS	18
III.	MATERIAL	19
IV.	METODOS	23
V.	RESULTADOS	33
VI.	DISCUSION	42
VII.	BIBLIOGRAFIA	45

I N T R O D U C C I O N

Hasta mediados de los años 70, el ácido desoxirribonucleico (ADN) fué la macromolécula celular más difícil de analizar; sin embargo, el surgimiento de una serie de avances técnicos denominados en conjunto TECNOLOGIA DEL ADN RECOMBINANTE (TADNR) cambió grandemente esta situación (1). Esta nueva tecnología, ha permitido determinar la estructura fina de los genes y conocer más profundamente su función, conduciendo a su aplicación en diversas áreas de las ciencias biológicas convirtiéndose en una útil y poderosa herramienta principalmente en la Genética humana, donde se han logrado precisar diversas enfermedades en términos de su patología molecular (2) .

Varias décadas de investigación básica sobre los ácidos nucleicos y su - enzimología, fueron necesarios para el establecimiento de la TADNR (3) . Algunas técnicas ya usadas y otras de nueva creación, constituyen ésta nueva - tecnología, las más importantes son :

- a) la ruptura del ADN con enzimas de restricción para producir fragmentos de diferente tamaño molecular (4) ,
- b) la separación y transferencia a un soporte fijo de los fragmentos del --- ADN (5), y
- c) localizar un fragmento de ADN en particular, por hibridización con una secuencia específica llamada sonda, obtenida por clonación (6).

LA MOLECULA DE ADN

Se atribuye a los ácidos nucleicos (ADN y ARN), ser el depósito de información genética en todos los organismos. El ADN se localiza fundamentalmente en el núcleo de células eucarióticas (cromosomas), aunque también se le encuentra en pequeñas cantidades en mitocondrias y cloroplastos (7). Su estructura fué establecida por J. Watson y F.Crick en 1953, basados en estudios de difracción de rayos X realizados por M. Wilkins y R. Franklin (8).

El modelo está formado por dos cadenas antiparalelas compuestas por unidades nucleotídicas que se enrollan en forma helicoidal alrededor de un eje central, distinguiéndose un esqueleto constante formado por el azúcar (desoxirribosa) y el fosfato de los nucleótidos en la parte exterior de la molécula, y una parte variable en el interior formada por las bases nitrogenadas. Ambas cadenas se hallan unidas entre sí, por medio de puentes de hidrógeno - (H) establecidos entre las bases de una y otra cadena: Adenina con Timina mediante dos puentes H y Citosina con Guanina por tres puentes H, así que, la secuencia de las bases a lo largo de una cadena, es complementaria de la otra y el orden de dichas bases le dan a la molécula una enorme variabilidad. En este modelo, la distancia entre una base y la siguiente es de 3.4 \AA y el giro de la doble hélice se completa en 34 \AA formando un diámetro promedio de 20 \AA . Además presenta dos surcos, uno mayor ó profundo y otro menor ó superficial (8).

La ruptura de los puentes H que unen las cadenas dejando hebras simples, suele suceder al exponer el ADN a temperaturas altas ó a cualquier cambio extremo de pH (Desnaturalización). Al restablecerse las condiciones óptimas, las cadenas vuelven a unirse por complementaridad de sus bases (Renaturalización), estableciendo de nuevo puentes H. Estas propiedades son aprovechadas por la TADNR en la manipulación del ADN (9).

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

En los primeros intentos por analizar el ADN, sólo se contaba con unas cuantas enzimas para su ruptura las cuales hidrolizaban el enlace fosfodiéster entre los nucleótidos al azar independientemente de la naturaleza de sus bases (10). Poco después Werber Arber encontró que las bacterias contenían nucleasas capaces de reconocer secuencias cortas de nucleótidos dentro del ADN y separar el enlace fosfodiéster en sitios muy específicos en ambas cadenas (4). Estas desoxirribonucleasas recibieron el nombre de ENZIMAS ó ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN, y junto con Hamilton Smith y Daniel Nathans en 1970, aislaron la primera enzima de restricción (ER) (11).

El papel biológico de las ER en una gran variedad de procariotes, es el de proteger a la célula contra cualquier ADN extraño invasor (por ejemplo - el ADN de un fago entrando a la bacteria). Un sistema de MODIFICACION y -- RESTRICCIÓN que estas enzimas llevan a cabo, permiten identificar el ADN propio del extraño. El ADN bacteriano es modificado (metilado) en el sitio -- blanco apropiado haciéndolo resistente a la restricción ó corte; el ADN extraño carece de la modificación característica del ADN huésped y por lo tanto es atacado por estas enzimas (3,4) (Fig. 1).

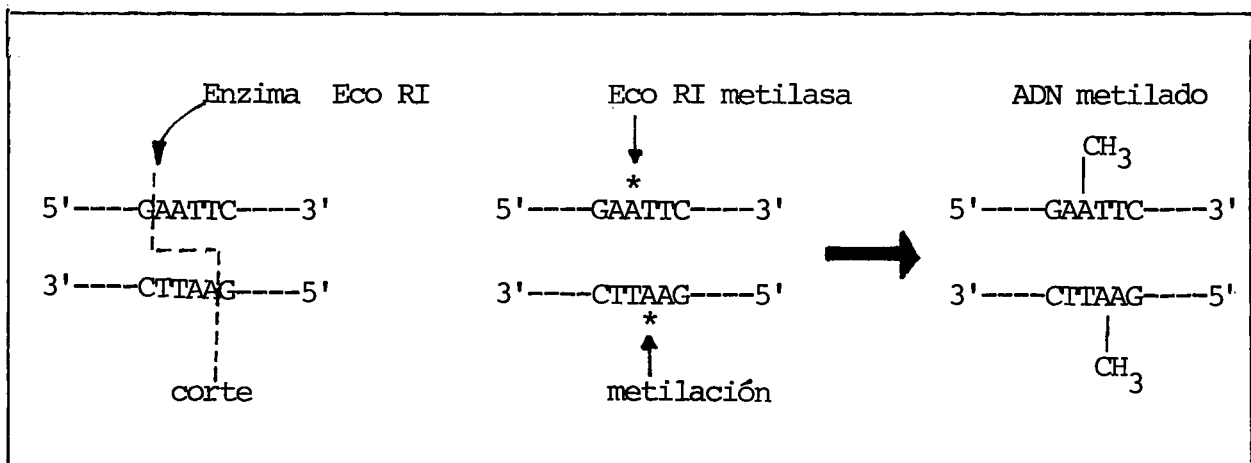


Figura 1. Las ER reconocen la secuencia blanco en el ADN y lo cortan si no está metilado.

Se han encontrado y caracterizado más de 200 ER las cuales se han agrupado en varias clases. La primera clase, consiste en aquellas enzimas con actividad Tipo II que incluye las ER más usadas en el ADN Recombinante (12). Estas tienen separada la actividad de Restricción de la actividad de Modificación, es decir, una enzima realiza el corte y otra enzima es responsable de la metilación en la misma secuencia blanco.

Generalmente la secuencia blanco o de reconocimiento, consiste en una secuencia de 4-6 pares de bases y una característica estricta es que ésta es palindrómica (Fig. 2) (13). El sitio de corte a menudo es el mismo ó muy cerca al de reconocimiento, y se ha observado que las reacciones de metilación y restricción no requieren de ATP a diferencia de las otras clases de enzimas (4).

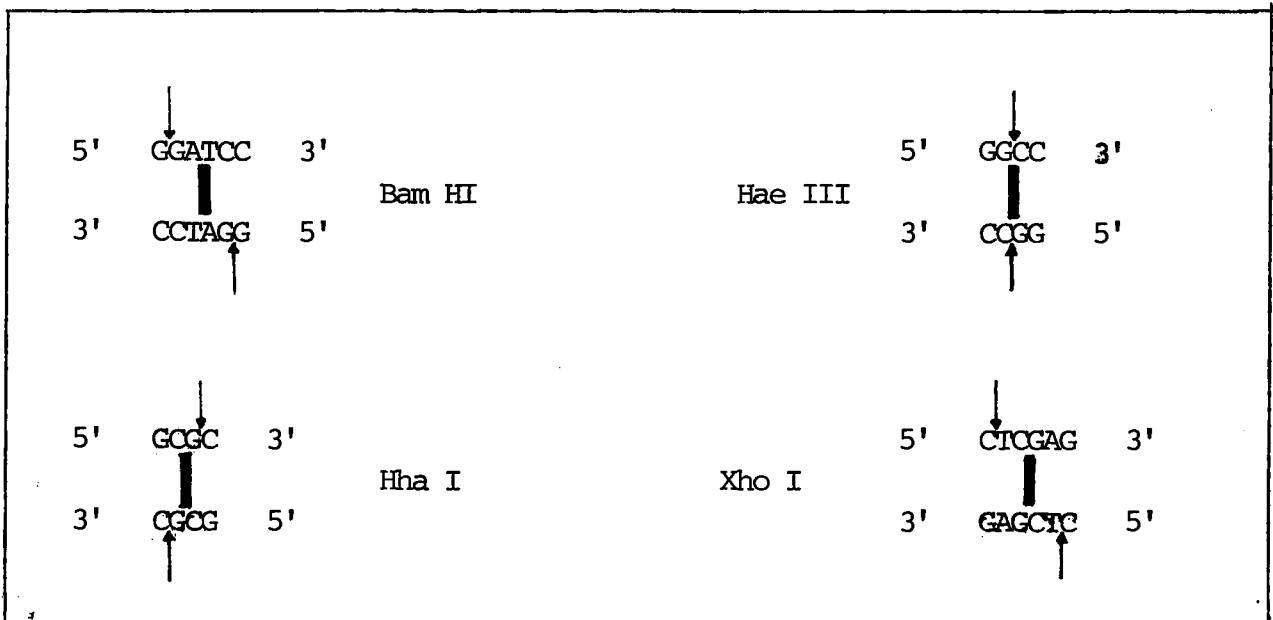


Figura 2. El sitio de reconocimiento consiste en 4-6 pares de bases y es una secuencia palindrómica.

La mayoría de las ER Tipo II, cortan el ADN en un sitio blanco no metilado; algunas realizan cortes rectos y otras hacen cortes escalonados, estos últimos dejan extremos de una sola cadena llamados extremos adherentes ó pega-

josos", ya que pueden formar pares de bases complementarias con cualquier otro extremo producido por la misma enzima (Fig. 3) (13). Esta característica es hábilmente aprovechada por la TADNR en la formación de moléculas híbridas ó recombinantes de lo que se hablará más adelante.

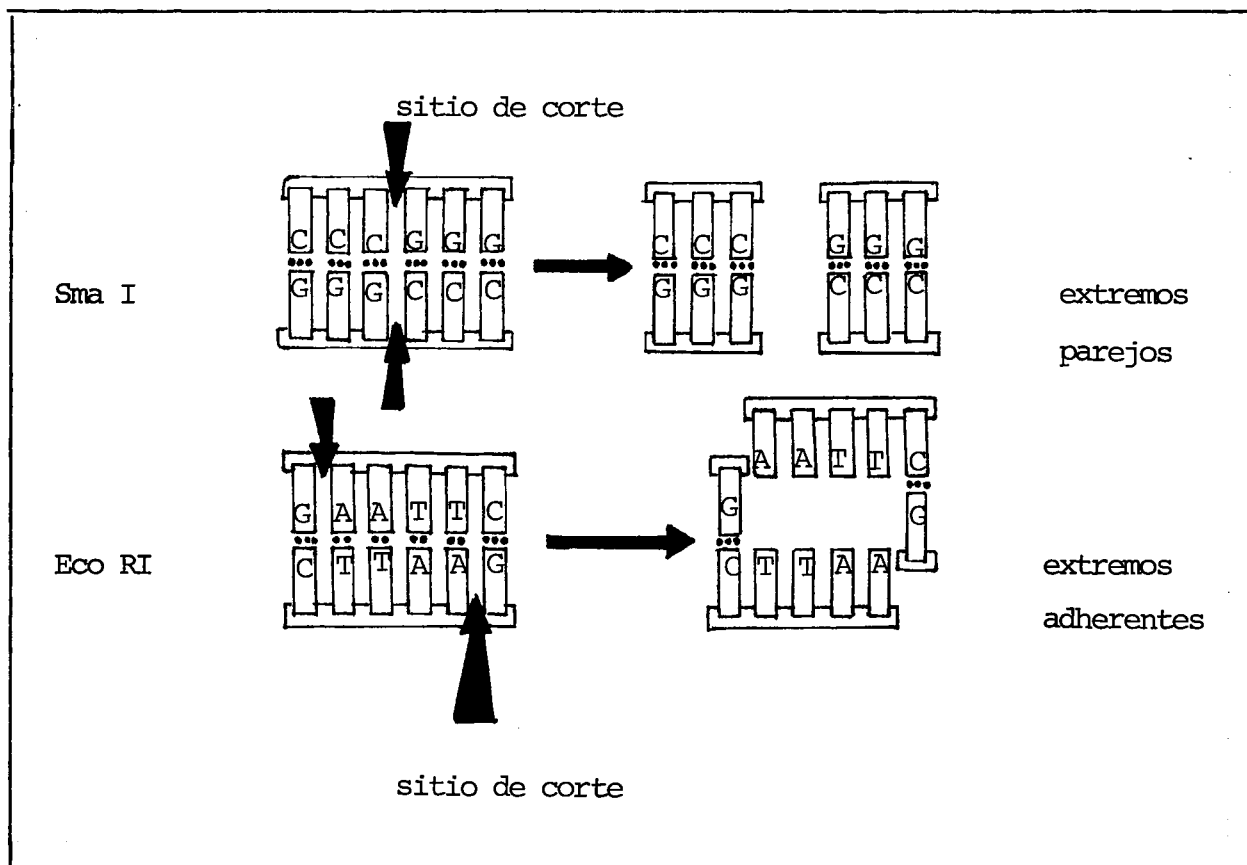


Figura 3. Algunas ER hacen cortes uno frente a otro en ambas cadenas como Sma I, dejando extremos parejos; mientras que otras como Eco RI al hacer cortes escalonados genera extremos adherentes.

La segunda clase de enzimas, consiste en aquellas que realizan actividad Tipo I y III, ambas son enzimas de varias subunidades que realizan las funciones ya sea de endonucleasa y metilasa simultáneamente (Tipo III) ó mutuamente exclusivas (Tipo I). Su mecanismo de acción difiere un poco una de la otra y no se sabe a ciencia cierta la proporción de bacterias que cuentan --

con la actividad Tipo I ó III, pero sí son menos comunes que las enzimas de actividad Tipo II (14).

Los nombres de la ER consisten en la abreviatura del nombre del organismo huésped (por ejemplo: Eco por Escherichia coli, Hind por Haemophilus influenzae, etc.), seguido de la denominación de la cepa bacteriana y un número romano cuando fué producida más de una enzima (isoesquisómero) (13).

Varias muestras de ADN de la misma fuente, pueden ser parcialmente digeridas por una serie de ER, de manera que se producen diferentes poblaciones de fragmentos de ADN de longitudes diferentes. Esos fragmentos pueden ser separados por electroforesis sobre geles, donde migran de acuerdo a su longitud. La distancia que los fragmentos recorran proporciona un cálculo de sus tamaños, así que, las distancias relativas entre los sitios de corte pueden determinarse y ordenarse en un MAPA DE RESTRICCIÓN (11,14).

La identificación de un segmento en particular, se efectúa mediante la incubación del conjunto de fragmentos con un testigo de ADN (SONDA) marcado radioactivamente, cuya secuencia de bases complementaria permite hibridizar con la especie que se desea estudiar. De éste modo segmentos específicos pueden ser identificados y separados para análisis más detallados (5).

CLONACION

El ADN testigo utilizado en la hibridización, también es llamado SONDA. Esta es un segmento de ADN conocido que puede pertenecer a un gen ó a un -- fragmento de interés particular y es obtenida mediante la Clonación del ADN (11, 12).

El término CLONACION, se refiere en general a la producción de copias - idénticas de una unidad de manera asexual. Puede utilizarse como una técnica para producir grandes cantidades de una secuencia particular de ADN, pero lo más importante es que puede emplearse para aislar en forma pura un fragmento específico entre una población de moléculas de ADN grande y heterogenea (10).

Hasta ahora se han clonado dos tipos básicos de secuencias : las aisladas de ADN Total (Genómico) y las sintetizadas de moléculas de ARN mensajero mediante la enzima Transcriptasa Inversa, formando un ADN complementario --- (ADNc) (12). En el proceso de clonación, el ADN que se desea amplificar, ya sea genómico ó complementario, debe encontrarse enlazado en forma covalente al ADN de un VECTOR, para formar la MOLECULA RECOMBINANTE ó QUIMERA y que --- esta sea capaz de replicarse en un medio bacteriano (11).

V e c t o r e s .

El ADN vector, puede ser un plásmido bacteriano, un ADN viral (bacteriófago) ó un cósmido. La característica esencial es que este puede replicarse autónomamente en un huésped apropiado (11).

Los P l á s m i d o s , son moléculas de ADN extracromosómico no esencial presentes en muchas bacterias. Al igual que el cromosoma bacteriano, es de

doble cadena circular pero de constitución genética variable y propiedades físicas diferentes. El plásmido es de mucho menor tamaño y por lo tanto puede apartarse fácilmente del cromosoma de la bacteria. Frecuentemente llevan en su secuencia 1 ó más genes que codifican para enzimas que pueden dar ciertas ventajas a la bacteria, por ejemplo: resistencia a antibióticos, y éstos pueden utilizarse como marcadores selectivos que permiten identificar aquellas bacterias que mantienen el plásmido dentro de la población (bacterias transformadas). Es común en las regiones que pertenecen a estos marcadores, encontrar una ó más secuencias de reconocimiento para ER, así que, la inserción de un fragmento de ADN extraño en estos sitios, inactiva a dicho marcador -- permitiéndolo distinguir si hubo o no formación de moléculas recombinantes, -- ya que habrá bacterias cuyos plásmidos sólo recircularizaron sin incorporar -- la secuencia extraña durante el proceso de transformación (Fig. 4) (11, 15).

El plásmido más ampliamente usado como vector de clonación, es el pBR322 y ya se han construido varios derivados de éste cuyos rendimientos de copias son mucho más elevados (12).

Otro vector de clonación muy importante es el **B a c t e r i o f a g o** . La ER Eco RI, fragmenta el genoma del bacteriofago λ en tres largos segmentos. El fragmento central no es necesario para la replicación del fago en -- E. coli, sólo funciona en la integración del ADN λ dentro del cromosoma huésped durante la fase lisogénica. Toda la información para el crecimiento e -- infección, se encuentra en los dos segmentos externos, de tal manera que el -- fragmento central puede ser eliminado y reemplazado por un fragmento de ADN extraño de aproximadamente 15 kb de longitud. Las moléculas recombinantes -- formadas de este modo, pueden ser empacadas en cabezas de fagos in vitro, y utilizadas para infectar a la bacteria huésped siguiendo la vía lítica de in-

fección del bacteriofago λ . Así el ADN extraño, puede amplificarse junto con el ADN viral y entonces empacarse en una nueva generación de partículas virales las cuales se liberan al lisarse la célula llevando a la formación de --- "placas" sobre las colonias bacterianas (11, 16, 17). Las placas pueden co--- lectarse y ya que el ADN esta perfectamente empacado, puede almacenarse y - cuando se necesite, extraerse fácilmente (Fig. 5) (12).

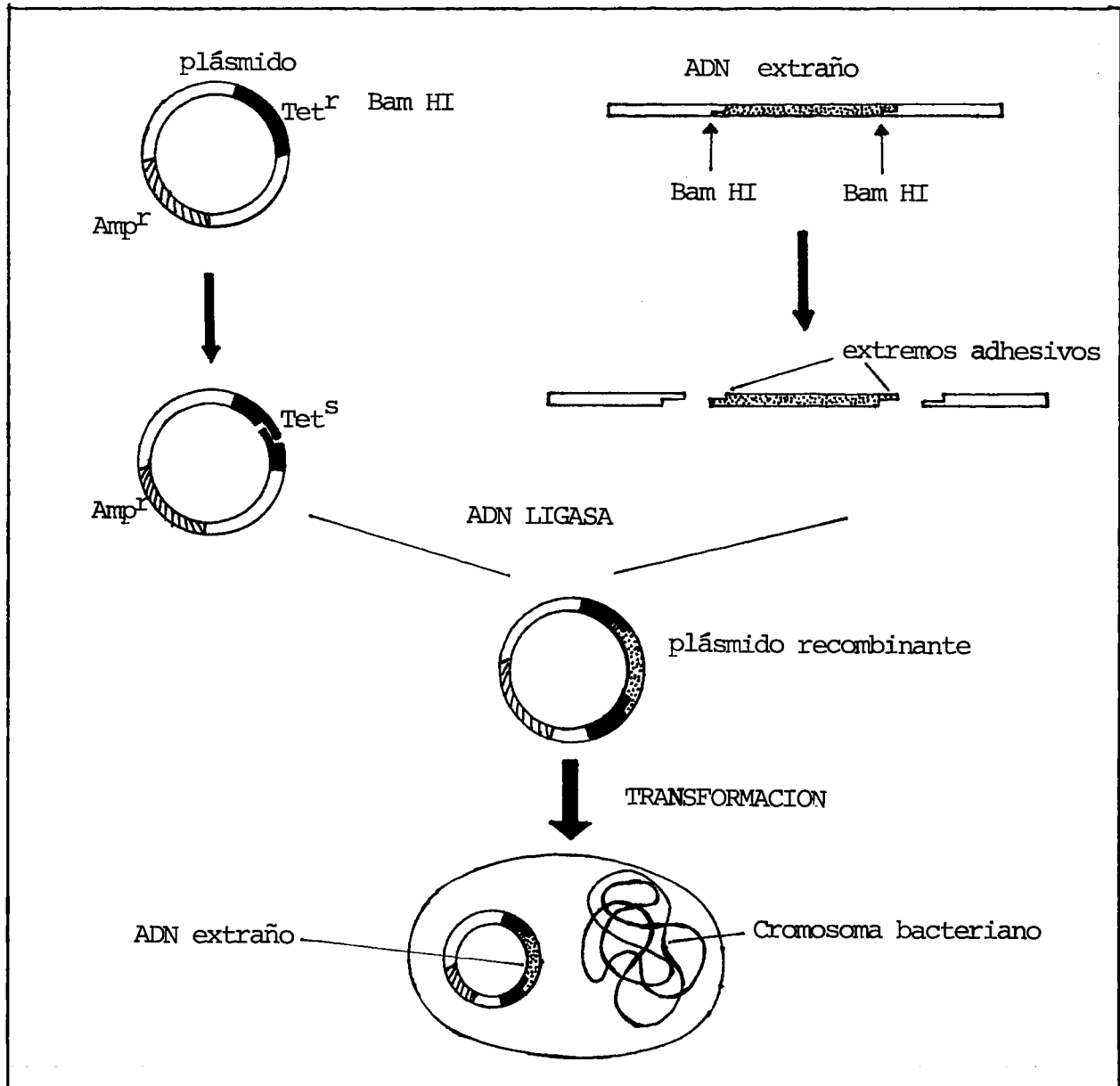


Figura 4. El plásmido es comunmente usado como vector de clonación

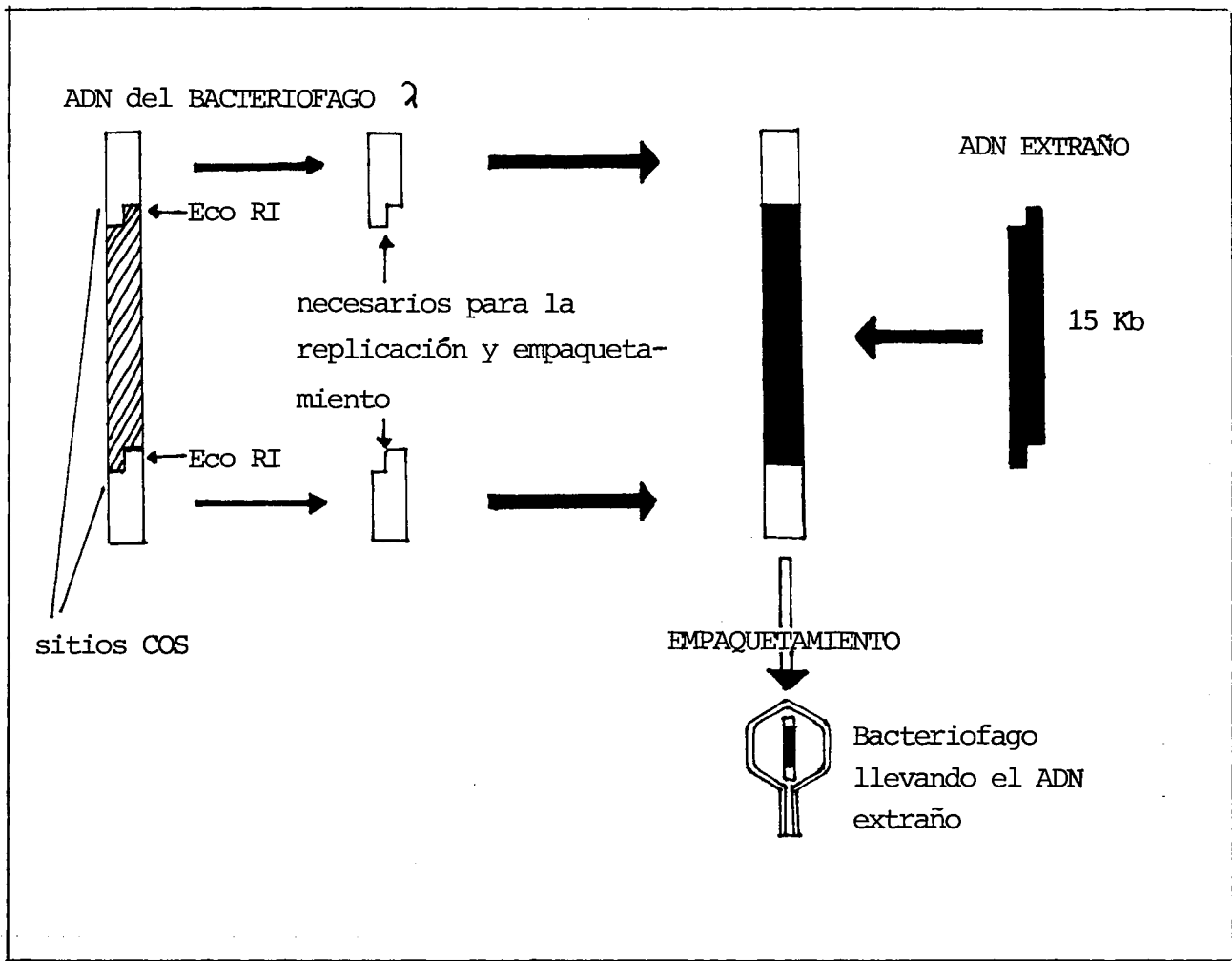


Figura 5. Clonación de ADN usando como vector al Bacteriofago λ .

Ultimamente se ha desarrollado otro vector conocido como C ó s m i d o , - este permite la clonación de segmentos grandes de ADN. Los cósmidos son una combinación de las propiedades de un plásmido y un fago. El ADN del bacteriofago λ , tiene en sus extremos secuencias complementarias de cadena sencilla llamadas "sitios COS". Los sitios COS son necesarios para la inserción y empaquetamiento del ADN dentro del fago. Estos sitios han sido insertados en el plásmido pBR322 y el ADN extraño cortado con una ER, puede unirse a los sitios COS en el plásmido fragmentado con una ER similar. Al añadir extracto λ preparado previamente, el cual lleva proteínas de fago que realizan la actividad de empaquetamiento del ADN y formación de cabezas de fagos, éstas pueden reco-

nocer y seleccionar los fragmentos de 35 a 45 Kb de ADN extraño rodeado por los sitios COS en el plásmido abierto y empaquetarlos dentro de las cabezas de fagos. Ahora, estos fagos pueden infectar *E. coli* inyectando las moléculas híbridas ADN-COS, quienes permanecen como un plásmido dentro de la bacteria (Fig. 6) (11, 12).

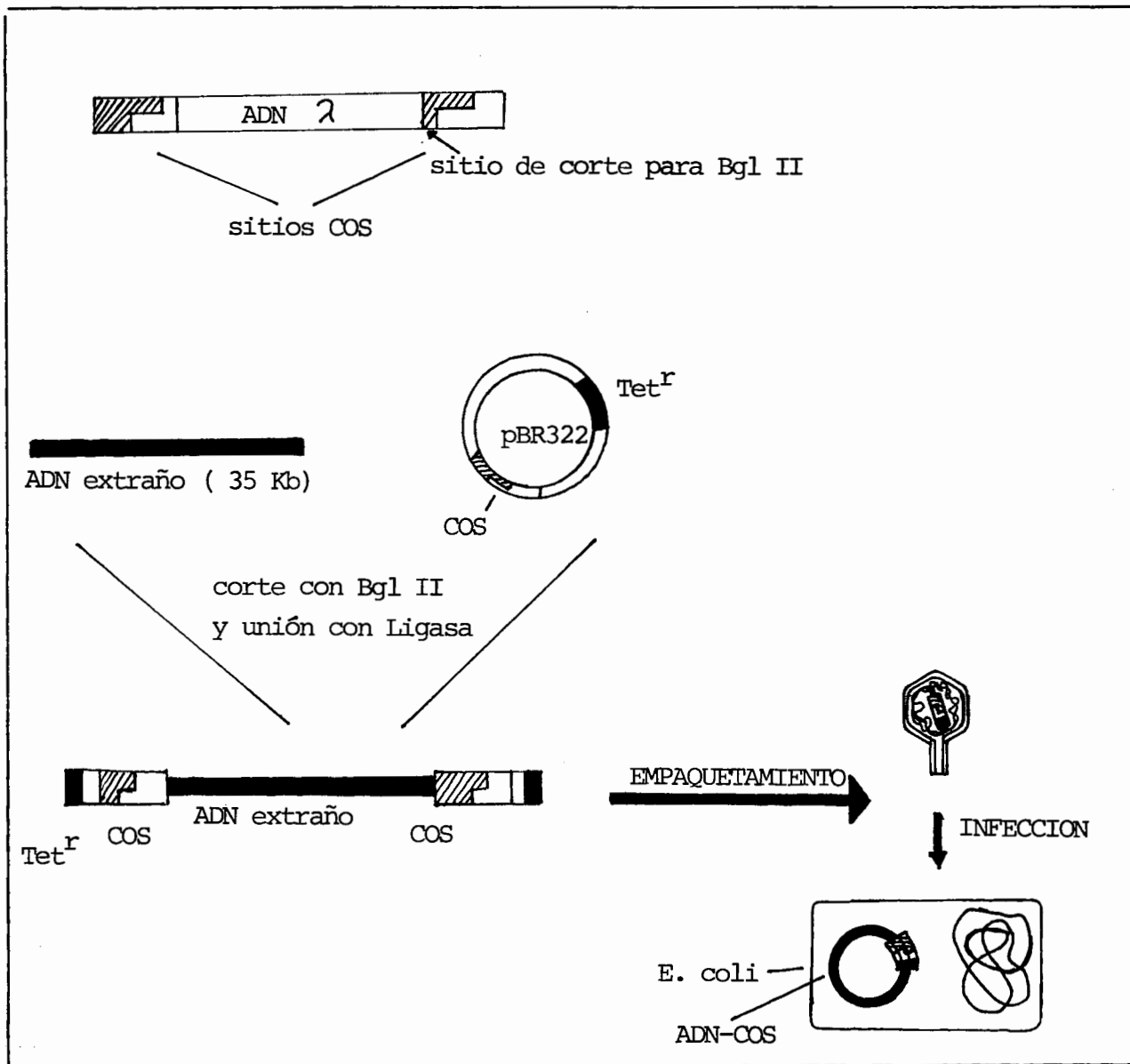


Figura 6. La construcción de un Cósmino como vector, permite la clonación de fragmentos de ADN largos.

Elaboración de la Molécula Recombinante.

Se han perfeccionado varios métodos para la construcción de Moléculas - Recombinantes, de acuerdo a la característica del fragmento que se desea introducir al vector para su posterior clonación (11).

Los fragmentos con extremos adherentes generados por las ER, pueden introducirse a un vector, sí este es cortado con la misma ER por lo tanto, ambos tendrán extremos adherentes cuyas secuencias complementarias pueden unirse y luego sellarse mediante la enzima ADN ligasa (12, 18).

Si los fragmentos son de extremos parejos, otra enzima, la Transferasa Terminal, puede utilizarse para adicionar nucleótidos en el extremo 3' de una cadena del ADN que se desea clonar, creando extremos adherentes. Por ejemplo al adicionar residuos de adenina (dA) en una cadena del fragmento a clonar, y residuos de timina (dT) a la cadena del vector, entonces los dos pueden unirse por complementaridad y después hacer permanente la unión con una enzima ligasa (12, 19).

También es posible la síntesis química de secuencias de 8 a 10 pares de bases llamadas OLIGONUCLEOTIDOS, quienes tienen sitios de restricción artificiales denominados "Ligadores". Estos ligadores oligonucleótidos pueden ser adicionados a moléculas de ADNc de doble cadena usando una ligasa. Después, los ligadores son cortados por una ER y el ADNc ahora portando los extremos adherentes hechos por la ER, es insertado dentro del vector que ha sido previamente abierto con la misma enzima (11, 18).

Introducción de la Molécula Recombinante a un Huésped.

La célula huésped más utilizada en la clonación del ADN es la bacteria E.coli. Los bacteriofagos y cósmidos poseen genes que les permiten entrar - fácilmente a la bacteria mediante infección. En el caso de los plásmidos, - es necesario ya sea tratar previamente a la bacteria con Cloruro de calcio - para hacerla temporalmente permeable a los plásmidos ó crear poros en la -- membrana mediante la aplicación de una corriente eléctrica (Electroforación) por donde entren dichas moléculas (12).

También es posible la incorporación de moléculas recombinantes en células eucarióticas, ya sea vegetales ó animales, por infección con fagos ó por microinyección del plásmido al núcleo celular (20).

Recientemente la levadura está siendo otro huésped muy eficiente aprovechando que posee sus propios plásmidos que permiten la clonación de segmentos aún más largos que en los cósmidos (21).

Selección de las Bacterias Transformadas.

Otro paso en la clonación, es determinar cuales células admitieron moléculas recombinantes llevando el segmento de interés. Ya se habló de la resistencia a antibióticos conferida por ciertos genes del vector a la bacteria, - así que esta es crecida en un medio selectivo que elimina las bacterias que - no contienen recombinantes.

Un proceso llamado "Hibridización de Placa", permite localizar cual colonia ó placa contiene el ADN clonado mediante su hibridización con una secuencia complementaria marcada radioactivamente. Las colonias ó placas seleccionadas se ponen a crecer en un medio especial obteniendo grandes cantidades -

de la secuencia deseada (12, 22). Las bacterias que contienen recombinantes, pueden guardarse para su uso posterior en forma de una colección de todas las secuencias de ADN presentes en el genoma de una determinada especie. Esta colección se conoce como una BIBLIOTECA DE ADN ó GENOTECA (12).

El ADN obtenido por clonación se puede usar para varios fines: el aislamiento y la secuenciación de genes individuales (23), proporcionar sondas para mapeo de genes (24), analizar genes in vitro (25), etc.

En el proceso de hibridización, la sonda se marca radioactivamente mediante una técnica llamada "Traslape de Muesca", aprovechando la habilidad de la ADN polimerasa I de *E. coli* para eliminar nucleótidos del extremo 5'-P, al mismo tiempo que los reemplaza por uno radioactivo en el extremo 3'-OH de una mella ó muesca hecha primeramente por una ADNasa en el ADN plantilla (en este caso la sonda) cuando se utiliza como sustrato nucleótidos marcados radioactivamente (Fig. 7) (6). Ya se están desarrollando nuevos métodos para el proceso de marcaje de la sonda, los cuales utilizan elementos no radioactivos - como la biotina con el objeto de librar los riesgos de la radioactividad (26).

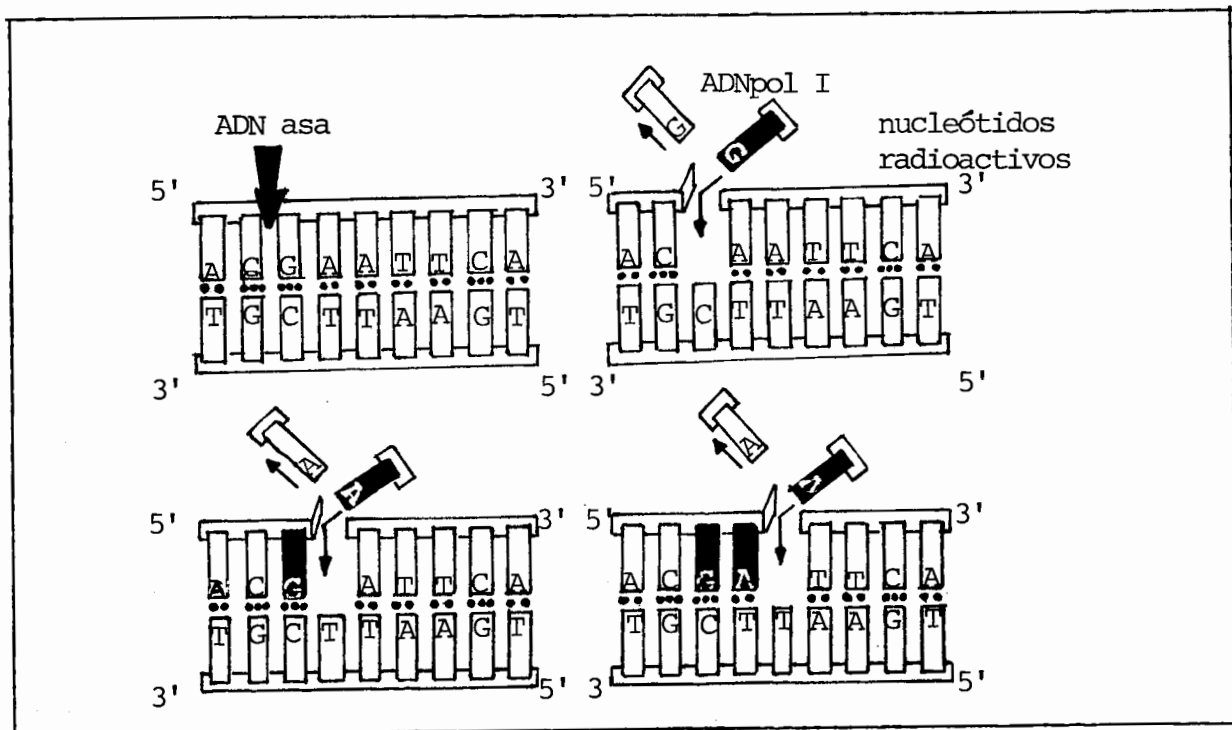


Figura 7. Técnica de "Traslape de Muesca" para el marcaje de la sonda de ADN.

ALGUNAS APLICACIONES DE LA TADNR

Las consecuencias prácticas de la TADNR son muy amplias; se ha logrado mediante ésta nueva tecnología el aislamiento, clonación así como la expresión de genes que codifican para proteínas humanas algunas de gran importancia médica como son la Insulina (27), Hormona del crecimiento (28), Interferón (29), Factor de coagulación VIII (30), etc. alcanzando en algunos casos niveles de producción con propósitos comerciales.

Para los fines anteriores, las bacterias y levaduras son los huéspedes ideales en la producción de dichas proteínas; sin embargo, algunas modificaciones post-traduccionales como el corte de polipéptidos, adición de grupos esenciales para el funcionamiento de la proteína, etc., deben hacerse fuera de la bacteria ya que ésta carece de las enzimas necesarias para hacer las modificaciones. Por este motivo, muchos genes eucarióticos pueden ser correctamente expresados sólo en huéspedes eucarióticos, por lo que se han desarrollado métodos para lograr la introducción y expresión de estos genes de interés con el fin de obtener sus proteínas producto activas en grandes cantidades (20).

Se ha trabajado también en plantas, buscando lograr la transferencia de genes extraños de interés, dentro de células vegetales con el objeto de conferirles la propiedad de fijar el nitrógeno cuando normalmente no lo hacen (como un ejemplo) y obtener mejores cosechas. Respecto a esto, se ha encontrado que la bacteria de suelo Agrobacterium tumefaciens, quien posee un plásmido llamado Ti, por un proceso de inserción entra a la planta y causa una agalla ó tumor muy cerca de la raíz. Este plásmido Ti, causante del crecimiento del tumor está siendo utilizado como un vector natural con éxito dentro de la botánica (31, 32).

Por otra parte la TADNR está haciendo una importante contribución al análisis y diagnóstico de enfermedades humanas hereditarias. Actualmente se conocen más de 3000 características mendelianas implicadas en la patología de enfermedades hereditarias y sólo muy pocas de ellas, pueden diagnosticarse prenatal y preclínicamente por análisis convencional de proteínas. Ahora la detección directa y el análisis de varios defectos genéticos a nivel del ADN, son posibles usando genes clonados ó sondas oligonucleótidas logrando el diagnóstico prenatal y preclínico del defecto (2, 33).

Cuando el ADN sufre algún cambio en su secuencia, los sitios de reconocimiento para el corte de las ER se ven alterados, ya sea por la pérdida ó formación de un nuevo sitio de restricción, modificando la longitud de los fragmentos generados por las enzimas y creando un Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (PLFR) (33). Los PLFRs constituyen marcadores genéticos ideales en el estudio del polimorfismo del ADN. La identificación de un marcador genético ligado a una enfermedad, permite seguir la herencia del gen que causa dicha enfermedad (34). La estrategia básica conocida como Análisis de Ligamiento, constituye una de las herramientas más antiguas de la genética clásica y disponiéndolo de ésta habilidad, ya se conocen PLFRs para varios genes causantes de varias enfermedades importantes (Tabla 1) (35,36).

Se ha propuesto que la información sobre la co-segregación de marcadores de ADN y PLFRs, puede ser usada para construir un Mapa de Ligamiento de todo el Genoma Humano; reuniendo esfuerzos, los investigadores podrían buscar la localización de genes causantes de enfermedades en un menor tiempo, usando un juego estándar de marcadores polimórficos espaciados igualmente por todo el genoma (36, 37)

ENFERMEDAD	LOCALIZACION CROMOSOMICA	FECHA DEL HALLAZGO
Enf. de Huntington	4p16	1983 (38)
Distrofia muscular Duchenne	Xp21	1983 (39)
Enf. Poliquística de riñón	16p13	1985 (40)
Fibrosis quística	7q21-22	1985 (41)
Enf. Granulomatosa crónica	Xp21	1985 (42)
Neurofibromatosis periférica	17cen-q21	1987 (43)
Poliposis coli familiar	5q21-22	1987 (44)
Neoplasia endócrina múltiple IIa	10q4	1987 (45,46)

Tabla 1. Algunos desórdenes genéticos cuya localización cromosómica ha sido determinada por estudios de Ligamiento Génico utilizando la TADNR.

Finalmente, se habla de una futura Terapia Génica para la cual, los procedimientos para insertar genes funcionales dentro de células somáticas, hasta ahora están siendo muy eficientes in vitro. Su aplicación en humanos, -- puede llevar a la corrección parcial de algunos desórdenes genéticos; sin embargo las posibilidades de esta terapia, se esta estudiando muy profundamente bajo principios éticos (47,48).

Ante éste enorme aporte de la TADNR tanto en áreas de las ciencias biológicas e industria, así como el gran potencial que ofrece para mejorar perspectivas de avance científico, hacen que el uso de esta tecnología se convierta en una estrategia de investigación urgente de adaptar. El propósito principal de este trabajo de tesis, es el de obtener la adaptación de las técnicas básicas de la TADNR a un costo reducido, a través de la utilización de -- los recursos disponibles en el laboratorio de Genética cuya aplicación práctica, será dirigida al diagnóstico preciso clínico y preclínico en individuos portadores o afectados de ciertas enfermedades heredables de interés entre -- otros fines.

O B J E T I V O S :

1. Lograr la adaptación de las técnicas básicas de la Tecnología del ADN Recombinante.
2. Que dicha adaptación sea alcanzada a un costo mínimo.

E S T R A T E G I A S :

- a) Selección de los protocolos metodológicos más confiables y reproducibles.
- b) Hacer uso del mayor número posible de reactivos nacionales sin afectar la fineza de los procesos.
- c) Diseño y construcción del equipo carente previa investigación de modelos.

M A T E R I A L

Los reactivos empleados en la adaptación de los métodos básicos de la - TADNR, se han dividido para su descripción en dos grupos: los que ya formaban parte del acervo de reactivos del laboratorio (Grupo I) y reactivos de nueva adquisición especialmente para la realización de éstos métodos (Grupo II)

GRUPO I

GRUPO II

- | | |
|---|---|
| * Tris (hidroximetil)amino metano (I) | * Fenol (N) |
| * Dodecil sulfato de sodio (I) | * Azul de Bromofenol (I) |
| * 8-Hidroxiquinoleína (I) | * Bromuro de etidio (I) |
| * Ficoll (I) | * Equipo para Traslapo de muesca (I) |
| * Albumina de suero de bovino (I) | * Enzimas de Restricción (I) |
| * Polivinilpirrolidona (I) | * ADN de esperma de salmón (I) |
| * Formamida (I) | * dCTP P ³² (I) |
| * Agarosa Tipo I (I) | * Membrana de nitrocelulosa (I) |
| * Sephadex (I) | |
| * Cloroformo (N) | |
| * Alcohol etílico absoluto (N) | |
| * Alcohol isoamílico (N) | |
| * Etilendiamino tetra -acético (EDTA) (N) | |
| * Bicarbonato de amonio (N) | |
| * Cloruro de amonio (I) | |

N = adquisición Nacional

I = adquisición por Importación

Las Enzimas de Restricción fueron donadas por el Centro de Ingeniería Genética de Cuernavaca.

Los reactivos señalados como I (aproximadamente el 74% de ellos) fueron adquiridos de importación obligada debido a que no se producen en el país, y aquellos reactivos de marca nacional que requirieron de mayor pureza como el caso del fenol, fué sometido a bidestilación.

El equipo utilizado en la realización de la metodología, igual que en el caso de los reactivos, varios aparatos ya se encontraban en el laboratorio, aquel equipo faltante, ya que no se fabrican en el país e importados son cotizados a muy alto costo, se investigaron varios modelos y en base a ellos se diseñaron y construyeron con la ayuda del Departamento de Diseño de la misma U. I. B. O.

La Tabla 2 es una lista del equipo utilizado, cómo fué adquirido y su uso.

Tabla 2.

EQUIPO UTILIZADO EN LA ADAPTACION DE LA METODOLOGIA BASICA DE LA TADNR

EQUIPO REQUERIDO	VIA DE OBTENCION	MODELO	UTILIDAD
Microcentrífuga	Sustituída	Centrífuga Clay-Adams de 1500 rpm	Reunir volúmenes pequeños
Selladora de bolsas	Comprada	C R U Z M E X (M. I. R.)	Sellar bolsas de hibridación
Centrífuga con refrigeración	Existente en el laboratorio	SORVALL Superspeed RC 2-B	Centrifugaciones hasta de 12000 rpm
H o r n o	" " " "	Medi - Lab (15 - 120°C)	Horneados a 37°C y 80°C
Espectrofotómetro con lámpara de luz ultravioleta	" " " "	P M Q III Zeiss	Cuantificación del ADN
Baño maría	" " " "	G C A/Precision (10°C - 90°C)	Incubaciones a 37°C
Fuente de poder	" " " "	B U C H L E R 3- 1500	Corrimientos electroforéticos
Congelador (- 20°C)	" " " "	R E V C O Ultra Low (- 40°C)	Almacenaje del ADN
Transiluminador de luz Ultravioleta	Diseñado y construido en el laboratorio (Fig. 8)	32cm x 26cm x 9cm de acero inoxidable con pantalla de vidrio y 4 lámparas de luz ultravioleta	Observación de los geles conteniendo digestiones y despues de transferir
Cámara para electroforesis	" " " " (Fig. 8)	30cm x 23cm x 10cm de acrílico de 1/4" con charola para gel y peine de 23 aplicaciones	Separación de fragmentos de ADN
Cajas para basura radioactiva	" " " "	30cm x 26cm x 8cm de acrílico de 1/4"	Recolección de basura con desecho radioactivo
Mamparas para protección a la radioactividad	" " " " (Fig. 8)	40cm x 50cm de acrílico de 1/2"	Protección a la radioactividad durante el manejo - del P ³² al marcar la sonda e hibridizar.

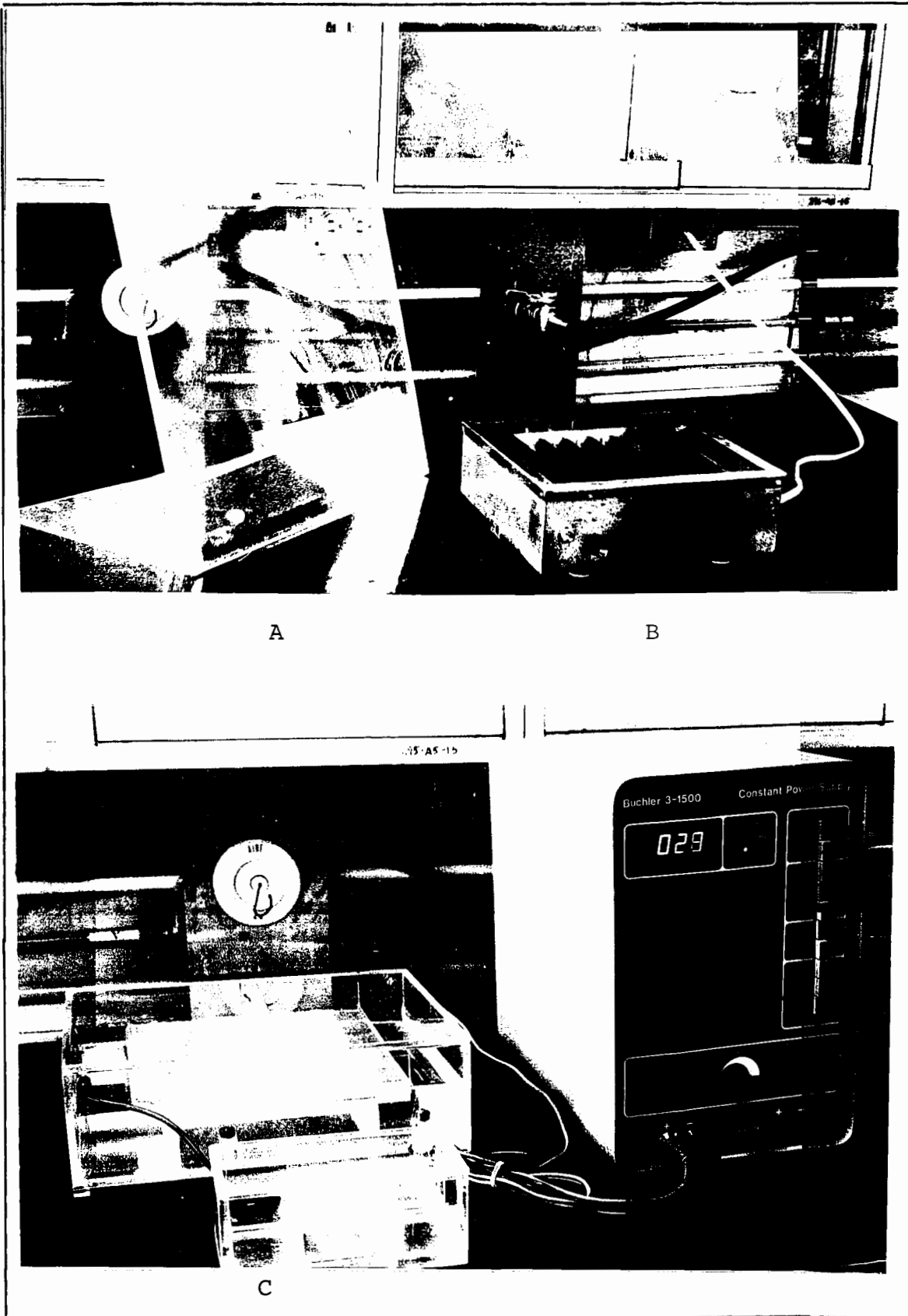


Figura 8. Equipo construido en el laboratorio : A) Mampara para protección a la radioactividad, B) Transiluminador , C) Caja para electroforesis.

M E T O D O S

Los procedimientos básicos en la TADNR fueron agrupados en seis fases -- para su adaptación bajo las condiciones del laboratorio (Fig. 9)

I. OBTENCION DE ADN

La mayoría de los protocolos descritos para la extracción de ADN son muy similares, difieren sólo en la fuente de ADN y en las estrategias realizadas para obtener el ADN con la mayor pureza posible.

En éste trabajo, se obtendrá ADN de muestras de personas control (Grupo A) y muestras de pacientes que pertenecen a un estudio de Ligamiento Génico (Grupo B) las cuales se procesaran de acuerdo a un método adaptado en el laboratorio tomando como referencia los métodos descritos por T.Maniatis (12), Sykes (49) y Madisen (50). El procedimiento adaptado consiste en los siguientes pasos :

1. Tomar 20 ml de sangre periférica con EDTA como anticoagulante para utilizar los leucocitos como fuente de ADN. Centrifugar a 2500 rpm durante 10 min. a 4°C para separar el plasma .
2. El paquete celular se resuspende en una solución 10:1 de NH_4Cl 0.144 M y NH_4HCO_3 0.01 M para lisar los eritrocitos. Se deja reposar y centrifugar a 2500 rpm por 10 min. Se desecha el sobrenadante y repetir el mismo paso. Todas las centrifugaciones se hacen a 4°C.
3. El botón de leucocitos se lava con una solución 9:1 de NH_4Cl 0.144 M y NH_4HCO_3 0.01 M . Centrifugar y si el botón permanece rojizo, volver a lavarlo.
4. Se lisan los leucocitos con una solución Tris/HCl 0.1 M pH 8.0 , EDTA 10 mM y SDS al 0.5% .

5. Incubar por 10 min. a 37°C en baño maría y agregar 2.5 ml de KCl 2 M para hacer la solución 1 M.
6. Se procede a extraer las proteínas del lisado por tratamientos con una mezcla 1:1 de Fenol y Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Centrifugar y recuperar la fase acuosa. Repetir éste paso.
7. Se extrae dos veces, con Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) para remover cualquier traza de fenol ó proteínas que pudiera haber permanecido. Centrifugar y recuperar la fase acuosa.

Todos los tratamientos para extraer proteínas requieren de agitación suave realizada en un rotador durante 10 min. antes de la centrifugación.

8. Al sobrenadante agregar 1 ml de Acetato de sodio 4 M para hacer la solución 0.25 M.
9. Añadir 30 ml de etanol frío para precipitar el ADN agitando suavemente.
10. Se separa el precipitado y se lava dos veces con etanol, centrifugando cada vez a 12,000 rpm.
11. Descartar el etanol y dejarlo secar al aire.
12. Por último, el ADN seco se redisuelve en amortiguador Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 7.5 con agitación suave en el rotador durante 1 ó 2 días en refrigeración.
13. El ADN disuelto, se conserva a 4°C ó mejor aún a -20°C.

CUANTIFICACION DE ADN

El pico máximo de absorbancia de los ácidos nucleicos es a 260 nm, y para la mayoría de las proteínas es a 280 nm; una relación de las lecturas a éstas longitudes de onda, nos informa si el ADN obtenido está contaminado con proteínas (12). El procedimiento es el siguiente :

1. Tomar una alícuota de 10 μ l de ADN y agregarle 2 ml de agua destilada.
2. Leer la densidad óptica a 300, 280, y 260 nm.
3. Determinar la concentración de ADN multiplicando la lectura en densidad óptica a 260 nm X 10,000 obtenida en mg/ml.
4. Determinar la relación en densidad óptica a 260nm / 280 nm.

II. DIGESTION

Una de las mayores dificultades al trabajar con el genoma de organismos superiores es la tremenda longitud de sus ADN's. El uso de las Enzimas de Restricción, permite fraccionar el genoma en conjuntos definidos de fragmentos específicos en forma precisa. Cada enzima requiere de ciertas condiciones especiales de temperatura y concentración de sales, necesarias para llevar a cabo la reacción de reconocimiento y corte específico. Aproximadamente 1 unidad de enzima es necesaria para digerir $1\mu\text{g}$ de ADN en 1 hora en el buffer y temperatura apropiada en una mezcla de reacción de $20\mu\text{l}$ (12).

Para la digestión del ADN obtenido de las muestras del Grupo A, se utilizaron las enzimas donadas por el Centro de Ingeniería Genética de Cuernavaca (Eco RI, Pst I y Bam HI) quienes las obtienen y purifican. A manera de comparación, algunas muestras del Grupo B fueron digeridas con la enzima Bam HI de marca comercial Boehringer.

El siguiente procedimiento fué tomado de la referencia (12) :

1. Se toman alícuotas de $10\mu\text{g}$ de ADN ($7,10$ ó $20\mu\text{l}$ según la concentración de la muestra).
2. Añadir una mezcla de reacción que contiene : β -mercaptoetanol, buffer adecuado para la enzima utilizada y agua destilada para completar volumen.
3. Poner 1 unidad de enzima, mezclar suavemente y centrifugar para reunir el volumen.
4. Incubar primero a 37°C en baño maría y después pasarla a un horno a la misma temperatura dejarla por 24 horas.
5. Al siguiente día , añadir otra unidad de enzima y centrifugar para reunir el volumen .

6. Incubar por 2 horas a 37°C en el horno.
7. proceder a separar los fragmentos obtenidos mediante electroforesis.

N O T A : Las enzimas de restricción deben permanecer en congelación a una temperatura de - 20°C, durante su transporte y tiempo de permanencia fuera del congelador, para prevenir su inactivación se recomienda mantenerlas en hielo ya que son sumamente lábiles y costosas.

Para evitar contaminaciones de cualquier índole es preferible usar guantes de látex en ésta y las siguientes fases.

III. CORRIMIENTO ELECTROFORETICO

Una vez que las ER han cortado el ADN, los fragmentos obtenidos pueden separarse en base a su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa ó poliacrilamida según la longitud del ADN cortado. Los productos de la digestión enzimática se extienden por todo el gel y se observan como una mancha continua a través de luz ultravioleta al teñirlo con Bromuro de Etidio, el cual produce una intensa fluorescencia color naranja cuando se une al ADN ; la fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN en el gel (5, 51).

1. Se prepara un gel grande de Agarosa Tipo I (de baja electroendosmosis) - al 0.8%, poniendo el peine que formará las ranuras para aplicar las muestras.
2. A cada muestra, ponerle una alícuota de azul de bromofenol como buffer - cargador (azul de bromofenol 0.25% + sacarosa al 40%), centrifugar para reunir volumen y aplicarlas al gel.
3. El gel se sumerge cuidadosamente en el amortiguador de corrimiento (Tris-ac. bórico-EDTA) en la cámara para electroforesis y se conecta de cátodo a ánodo a 40 volts durante 16-18 horas.
4. Con el fin de evaluar la digestión y separación, el gel se tiñe con una solución de bromuro de etidio (0.15 μ g/100ml) durante 1 hora, luego de enjuagarlo con agua destilada, se observa sobre un transiluminador de luz ultravioleta.

IV. TRANSFERENCIA

Los experimentos de hibridización no se pueden efectuar dentro de un gel electroforético, así que es necesario transferir el ADN del gel a un soporte fijo que puede ser una hoja de nitrocelulosa ó nylon (proceso llamado Southern blotting en honor a E.M.Southern quien inventó la técnica) (5). Los fragmentos en el gel han sido previamente desnaturalizados con el fin de que las cadenas abiertas, puedan hibridizar con el ADN testigo, y el paso de los fragmentos del gel al soporte fijo puede hacerse por capilaridad ó aplicando una corriente eléctrica (electrotransferencia) (12,52).

El siguiente proceso está basado en el fenómeno de capilaridad :

1. El ADN se desnaturaliza poniendo el gel que contiene los fragmentos en una solución de NaOH 1 M, durante una hora.
2. Se lava el gel cuidadosamente con agua destilada y se neutraliza con una solución Tris .5M/NaCl 1.5 M por 30 minutos.
3. En un recipiente, se pone una esponja del tamaño del gel y sobre ella un papel filtro del mismo tamaño humedecido previamente con una solución estándar 2X de NaCl 3 M/Citrato de Sodio .3 M (SSC 2X), luego se coloca el gel invertido.
4. Sobre el gel poner la membrana de nitrocelulosa cortada al tamaño del gel ya remojada en solución SSC 10X durante 15 min. cuidando de no dejar burbujas entre la membrana y el gel, luego colocar 3 hojas de papel filtro -- humedecidas con SSC 2X.
5. Se coloca una altura aproximada de 15 cm. de papel absorbente (periódico ó toallas de papel) cortado al tamaño de la membrana. Sobre ésta un vidrio y un peso de 500 gramos aproximadamente.
6. Agregar al recipiente hasta el borde de la esponja solución SSC 10X y dejar por 24 horas.
7. Al día siguiente lavar la membrana con SSC 2X y secarla entre dos hojas de papel filtro durante una hora en un horno a 80°C. La membrana seca puede guardarse cubierta con papel adherente a temperatura ambiente hasta el momento de la hibridización.

V. HIBRIDIZACION

El ADN unido a la membrana de nitrocelulosa es puesto a hibridizar con la sonda de interés, la cual está marcada radioactivamente. Todo este proceso se realiza detrás de mamparas para protección a la radioactividad.

La donación de una alícuota de la sonda perteneciente al Cromosoma 18, fué la utilizada en esta ocasión para la hibridización de las muestras del Grupo A y 2 del Grupo B, sin ningún motivo en particular sólo como prueba del proceso. El procedimiento siguiente fué tomado del método descrito por T. Maniatis (12) :

1. Se prepara una solución de Pre-hibridización que contiene : SSC 6X; SDS al 5%; Solución Denhardt 5X (Albumina de suero de bovino al 2%, Polivinilpirrolidona al 2%, Ficoll al 2%); ADN de esperma de salmón previamente desnaturalizado por calentamiento hasta ebullición y enfriamiento rápido en hielo. De la mezcla anterior se agregan 0.2 ml por cm^2 de la membrana a una bolsa de hibridización junto con la membrana de nitrocelulosa que lleva inmovilizados los fragmentos de ADN la cual ha sido mojada en SSC 6 X. Apretar la bolsa para quitar al máximo las burbujas y sellarla. Incubar en baño maría a 45°C toda la noche.
2. Se quita lo más que se pueda la solución de Pre-hibridización y se pone la mitad del volumen (0.1 ml por cm^2 de la membrana) de una solución de Hibridización que contiene : SSC 6X; Formamida al 50%; SDS al 5%; ADN de esperma de salmón desnaturalizado, añadir junto con el resto de la solución de hibridización la sonda marcada con P^{32} ya desnaturalizada. La sonda es marcada radiactivamente mediante la Técnica de "Traslape de muesca" como sigue (12) :
 - a) Preparar una mezcla de reacción con : nucleotidos no marcados, nucleotidos marcados radioactivamente con P^{32} , ADNasa, ADNpol. I, la sonda de ADN y amortiguador Tris-HCl.
 - b) Incubar a temperatura constante de $12-14^\circ\text{C}$ durante 2 horas.
 - c) La mezcla de reacción anterior, se hace pasar a través de una columna de Sephadex G-50 previamente empacada y equilibrada con amortiguador Tris-HCl pH 8.0. Los nucleotidos radioactivos y los no marcados sobrantes después

de la reacción, quedan atrapados en el Sephadex recuperando solamente la sonda marcada. Enseguida se desnaturaliza por calentamiento hasta ebullición y enfriamiento rápido en hielo. Así, la sonda queda lista para añadirse a la solución de hibridización.

3. Después de poner la solución de Hibridización, apretar la bolsa para quitar las burbujas, sellar la bolsa e incubar en baño maría a 45°C toda la noche.
4. Cuidadosamente cortar la bolsa y sacar el filtro, enseguida lavarlo 2 veces con una solución SSC 2X, SDS al 0.5%, durante 15 min. cada vez.
5. Lavar otras 2 veces con SSC 1X, SDS al 1% y otras dos veces con SSC 0.1X, SDS al 1% precalentada a 65°C cada vez por un tiempo de 15 minutos.
6. La membrana lavada, se seca entre dos hojas de papel filtro a temperatura ambiente y se prosigue a realizar la Autorradiografía.

VI. AUTORRADIOGRAFIA

La visualización de los fragmentos de ADN que hibridizaron con la sonda marcada radioactivamente (P^{32}), se logra mediante la Autorradiografía la cual consiste en la exposición de la membrana que contiene los híbridos a una película fotográfica adecuada . El siguiente proceso está basado en la referencia (12).

1. En un cuarto oscuro, poner la membrana hibridizada en un recipiente para rayos X y cubrirla con una película de Rayos X Kodak X-Omat AR por ambos lados de la membrana. Asegurar que están bien puestas e inmóviles.
2. Para incrementar la sensibilidad de la película, la membrana cubierta con la película es puesta entre dos pantallas intensificadoras.
3. Dejar la exposición durante 1 semana a -40°C y luego proceder al revelado.
4. Para revelar :
 - a) Poner la película de rayos X en Líquido para revelado de rayos X por 5 minutos.
 - b) Pasarla a una solución de ácido acético al 3% y luego durante 1 minuto a baño de agua.
 - c) Poner la película en fijador rápido por 10 minutos.
 - d) Pasarla en agua corriente durante 15 minutos.
 - e) Secar en horno ó a temperatura ambiente.

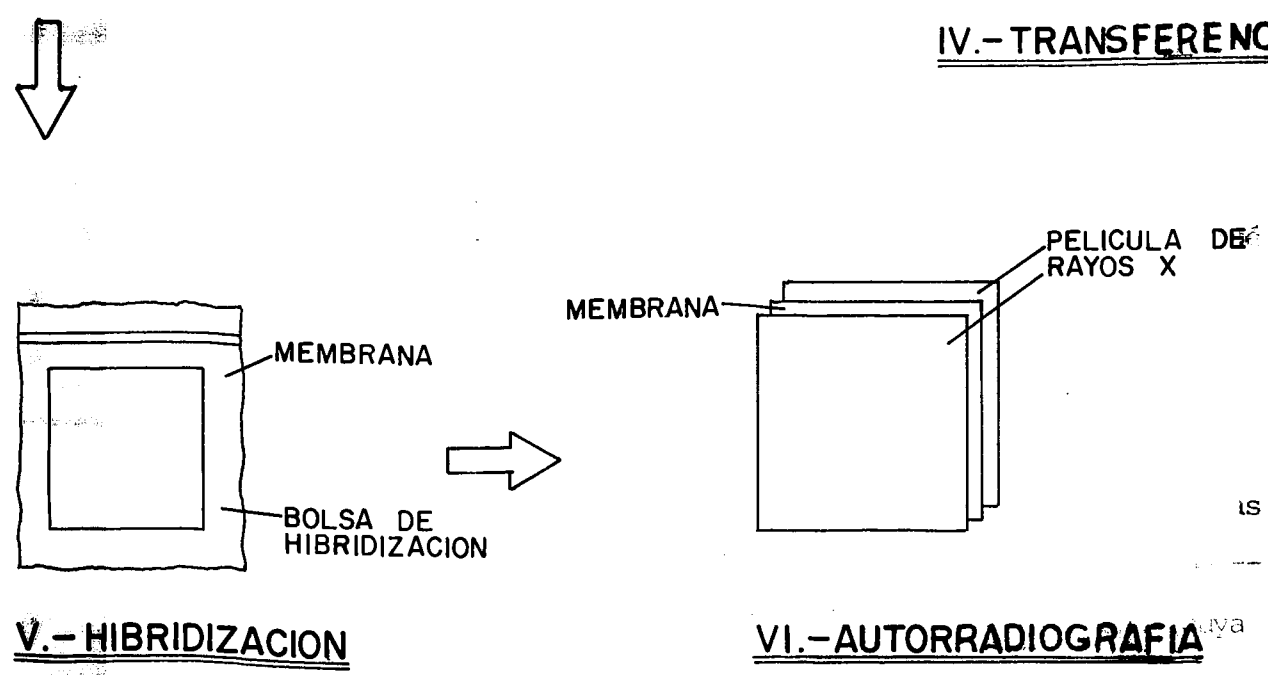
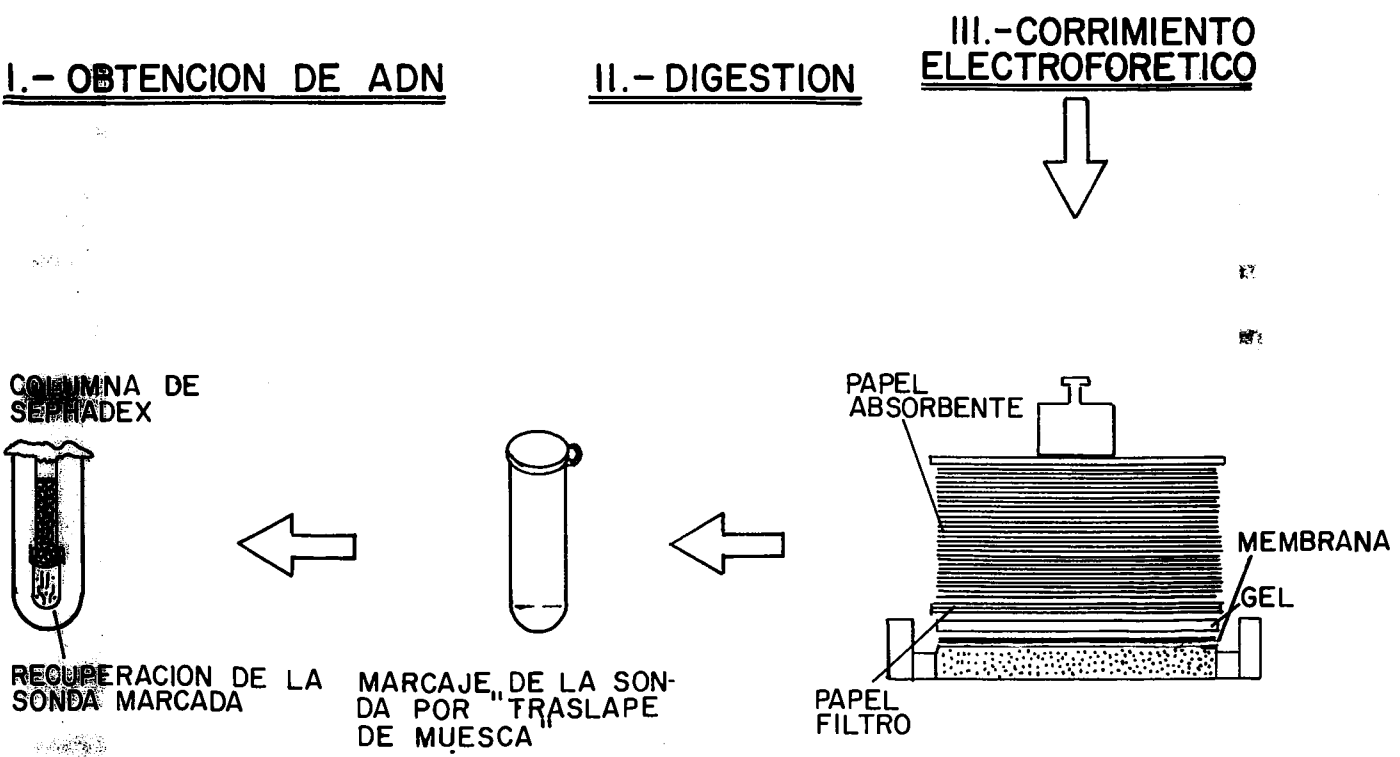
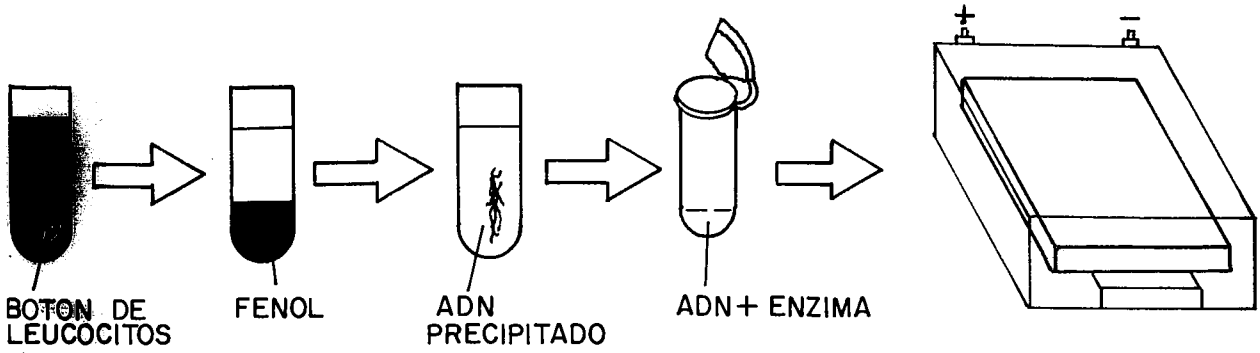


FIGURA 9

R E S U L T A D O S

El éxito de la adaptación descrita estuvo sujeta a la adecuada realización de cada uno de los procesos, y aunque el resultado final puede visualizarse hasta la autorradiografía, cada uno de los procesos como la Obtención del ADN, Digestión, Corrimiento electroforético y la Transferencia pueden -- evaluarse parcialmente con la finalidad de corregir si es necesario, las condiciones de tales procesos ya que el uso de reactivos de diferente marca comercial a la recomendada ó la sustitución de equipo, podrían alterar o fallar su reproducibilidad. A continuación se describen los resultados obtenidos en cada uno de los procesos.

OBTENCION DEL ADN

De las muestras de sangre procesadas para la obtención de ADN, 6 corresponden a individuos controles (Grupo A) y 93 forman parte de las muestras de un estudio de Ligamiento Génico (Grupo B).

La Tabla 3, presenta las relaciones de las densidades ópticas a ---- 260nm/280nm y las concentraciones del ADN obtenido. El promedio de las relaciones de las densidades ópticas en las muestras preliminares del Grupo A fué de 1.25 . Algunos protocolos definen que la evaluación de ésta relación es de 1.8 a 2.0 para un ADN puro, y sí la relación es menor se considera contaminado con proteínas ó fenol (12).

Para averiguar la causa del resultado anterior, se trataron 10 muestras del grupo B con Proteínasa K y RNasa durante la obtención como lo describe -- Maniatis (12), con el fin de eliminar al máximo las proteínas y el ARN (cuya concentración es mínima). Además, una de las muestras de ADN del grupo B ob-

tenido con el método adaptado, se trató con las mismas enzimas después de la obtención con el mismo fin depurador. Ambos resultados fueron muy semejantes a la relación 260nm/280nm de un ADN de carnero de marca comercial con menos del 3% de proteínas la cual fué de 1.33. Valores similares a los anteriores fueron obtenidos en las relaciones de densidad óptica de las 82 muestras restantes del Grupo B (Tabla 3).

Por otra parte, con respecto a las concentraciones de ADN obtenidas, estas se mantuvieron en un rango de 0.63 a 2.31 mg/ml. Esta variación fué debida principalmente al volumen de sangre del que se extrajo el ADN (5 a 20 ml.), aunque también se observó una disminución en el ADN recuperado causada por el tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y su procesamiento (de 1 hasta 7 días).

Tabla 3. RELACION $\frac{260 \text{ nm}}{280 \text{ nm}}$ Y CONCENTRACION DEL ADN OBTENIDO.

	N° de muestra	Relación $\frac{260\text{nm}}{280\text{nm}}$		Concentración de ADN (mg/ml)	
		\bar{x}	s	\bar{x}	s
ADN de carnero con menos del 3% de proteínas.	1	1.33		1.05	
Tratadas con Proteínasa K y RNasa despues de la obtención.	1	1.36		0.49	
Tratadas con Proteínasa K y RNasa durante la obtención .	10	1.27	0.080	0.85	0.23
Muestras Grupo A	6	1.25	0.060	0.77	0.51
Muestras Grupo B	82	1.37	0.087	1.34	0.34

DIGESTION Y CORRIMIENTO ELECTROFORETICO

Los corrimientos electroforéticos de las muestras digeridas en ambos grupos A y B realizados en las cámaras que se diseñaron y construyeron en el laboratorio, no presentaron alteraciones en el paso de la corriente ni aumento en el amperaje, realizándose las electroforésis sin generación de calor y con una migración uniforme del marcador (azul de bromofenol), lo cual indicó el buen funcionamiento de este equipo así como las condiciones adecuadas en estos procesos.

Igualmente el Transiluminador de luz ultravioleta construido en el laboratorio, rindió una fluorescencia tan intensa como la de los transiluminadores de marca comercial, permitiendo la observación de los geles conteniendo digestiones y su impresión fotográfica sin ningún problema.

En la fig. 10 que corresponde a 10 muestras del Grupo B digeridas con la enzima Bam HI (de marca Boehringer), la observación sobre el transiluminador permite ver que algunas muestras muestran baja fluorescencia, sugiriendo que la cantidad de ADN puesta a digerir fué insuficiente (líneas 1,2,4 y 6) y que requieren de aumentarla con el objeto de asegurar una buena hibridización. En las muestras de mayor fluorescencia, se distinguen pequeñas bandas de fluorescencia más intensa (señaladas con una flecha), demostrando que además de digestión adecuada la separación de los fragmentos obtenidos fué uniforme.

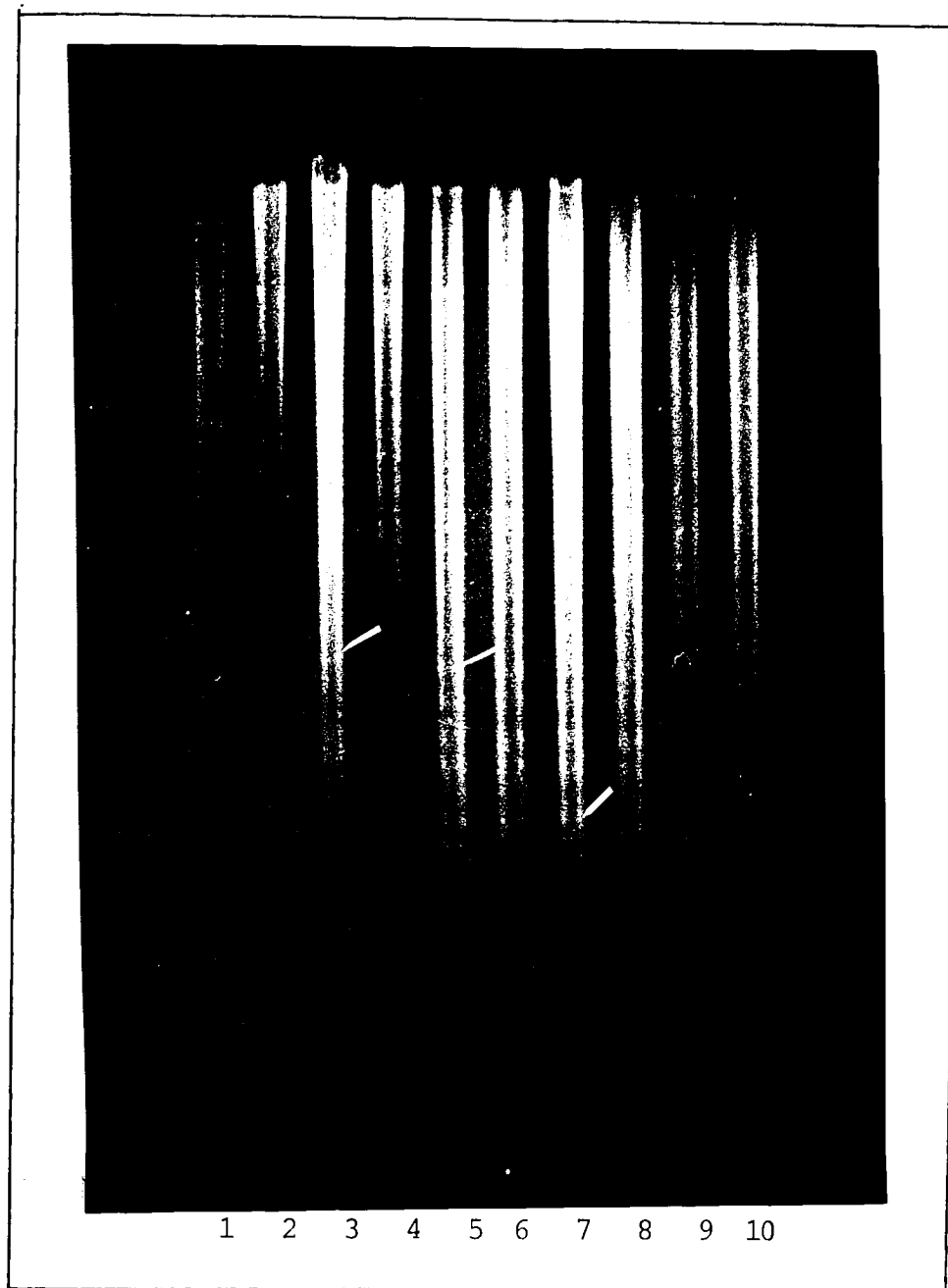


Figura 10. Digestión de 10 muestras del Grupo B con Bam HI (Boehringer). Algunas líneas son más tenues (1,2,9 y10) indicando que requieren de más ADN. Se observan también pequeñas bandas de fluorescencia más intensa en cada línea (señaladas por flechas), éstas corresponden a fragmentos de longitud similar y su evidencia sugiere uniformidad en la separación de los fragmentos obtenidos en la digestión.

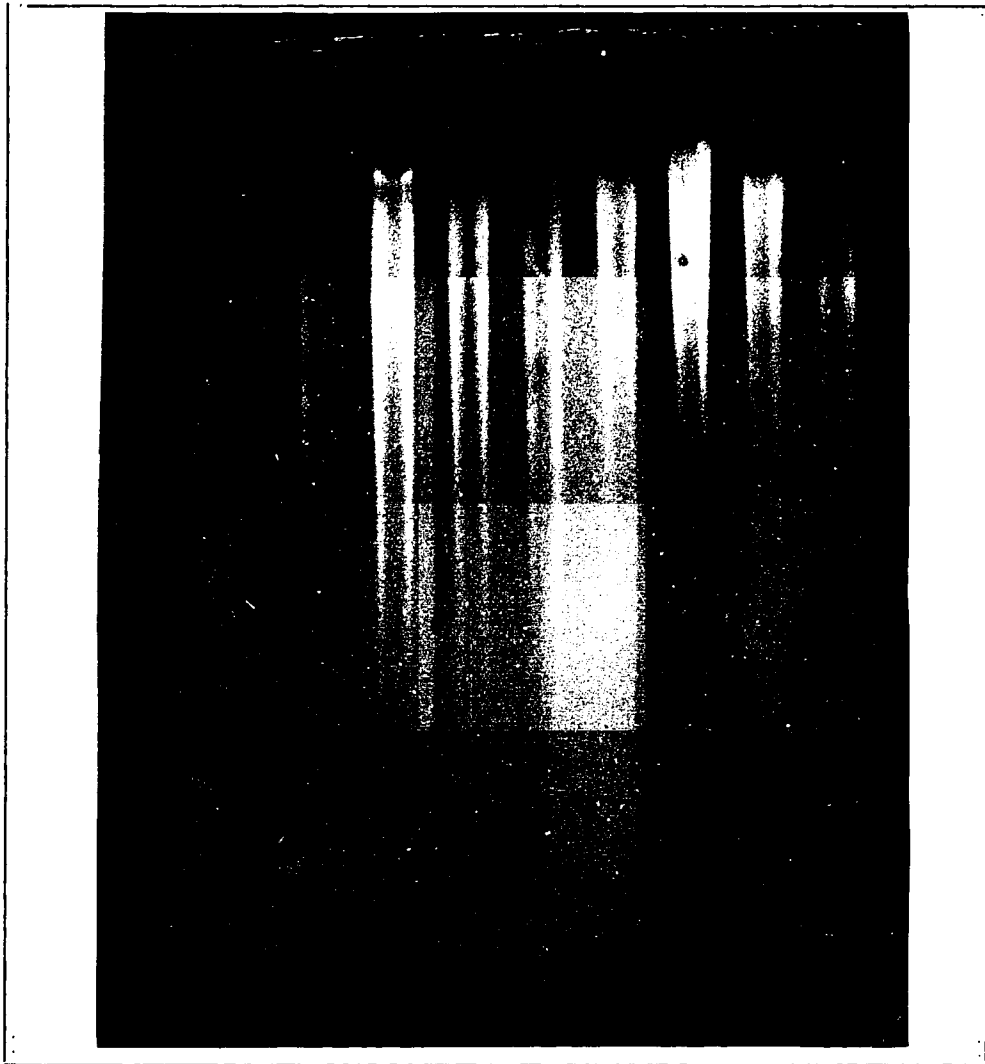


Figura 11. Fotografía del gel después de la Transferencia. Sólo permanecen los fragmentos de alto peso molecular .

TRANSFERENCIA

La verificación del paso de los fragmentos del gel a la hoja de nitrocelulosa, se realizó al observar el gel después de la transferencia sobre el transiluminador . En la fotografía de la Fig. 11 , se muestra que después de la transferencia, sólo permanecen manchas fluorescentes cercanas al punto de aplicación que corresponden a fragmentos de ADN de alto peso molecular; lo cual indica que la mayoría del ADN fragmentado fué correctamente transferido.

HIBRIDIZACION Y AUTORADIOGRAFIA

Las hibridizaciones realizadas con las 6 muestras del Grupo A, las cuales fueron digeridas con $2\mu\text{l}$ de las enzimas Eco RI, Bam HI y Pst I donadas por el Centro de Ingeniería Genética de Cuernavaca, sólo algunas muestras — dieron patrones definidos de hibridización: la muestra #1 digerida con Pst I (línea 7) y Eco RI (línea 13); la muestra #5 digerida con Pst I (línea 11) y Eco RI (línea 17) y las muestras 3,4, y 6 digeridas con Eco RI (líneas 15,16 y 18); mientras que en el resto se observan barrimientos en la zona correspondiente al ADN de alto peso molecular (Fig. 12). En el mismo autorradiograma, también se aprecia baja radioactividad basal sin gránulos inespecíficos visualizada como un fondo claro, y esto permitió tener seguridad en que fueron — adecuadas la cantidad de nucleótidos marcados con P^{32} , así como las condiciones para el "Traslape de muesca" en el marcaje y recuperación de la sonda. Por lo tanto consideramos que los barrimientos observados, son debidos a digestiones incompletas en la mayoría de las muestras sobre todo con Bam HI, causada ya sea por inactivación de las enzimas de restricción debido a la presencia de contaminantes existentes en el ADN ó bien por conservación inadecuada de las mismas.

La hibridización posterior realizada con 2 muestras del Grupo B, una obtenida mediante el método adaptado (muestra A) y otra que había sido tratada con Proteínasa K y RNasa con fines depuradores (muestra B), presentó patrones de hibridización mejor definidos cuando la muestra A fué digerida con $2\mu\text{l}$ de Eco RI (línea 1), $10\mu\text{l}$ de Pst I (línea 2) y $10\mu\text{l}$ de Bam HI (línea 5) en comparación con la muestra B digerida con $2\mu\text{l}$ de Pst I, que sólo mostró barrimientos en la zona de ADN de alto peso molecular no digerido (línea 3) (Fig.13).

Estos resultados confirman que el problema de hibridización no definida lo causó un bajo rendimiento de las enzimas usadas, dando digestiones incomple-

tas , y no por falta de pureza del ADN digerido ya que además en otros experimentos de hibridización que no pertenecen a ésta tesis, todas las muestras del grupo B fueron digeridas con Enzimas de Restricción de marca comercial e hibridizadas con otra sonda bajo las mismas condiciones de adaptación descritas en la metodología, dando patrones de hibridización excelentes.

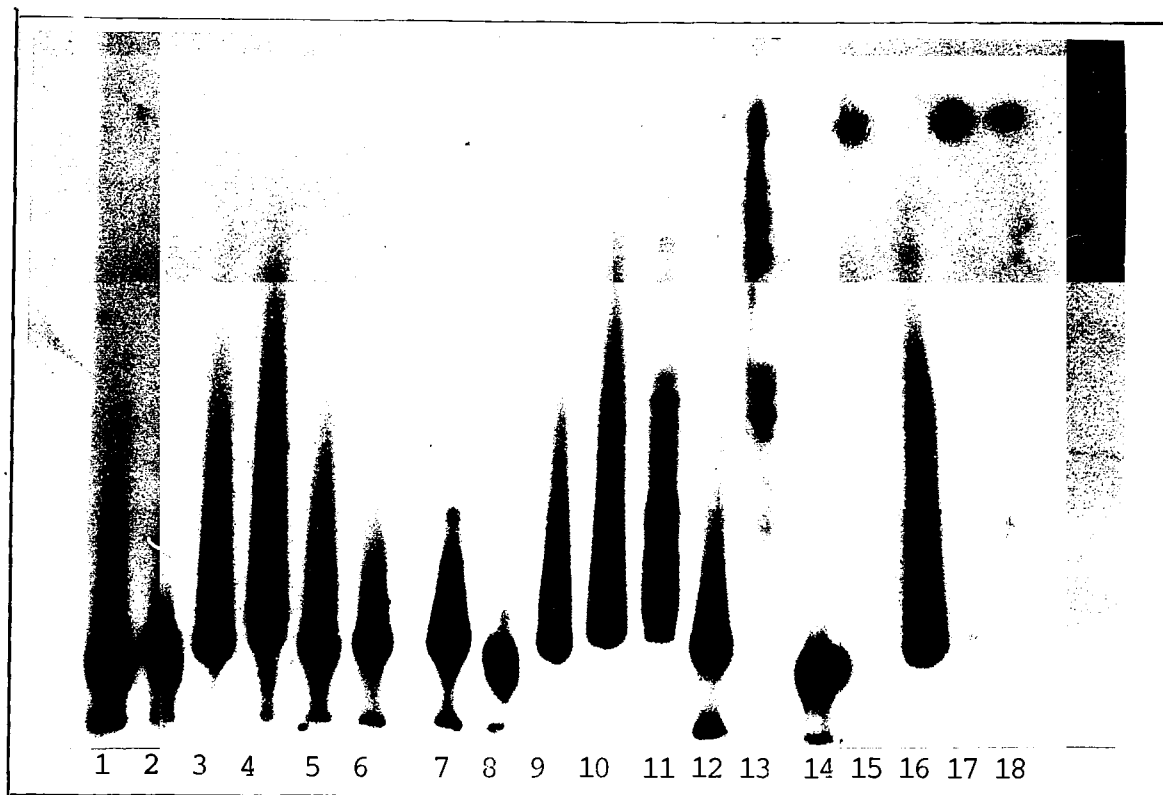


Figura 12. Autorradiograma de 6 muestras digeridas con: 2 μ l de Bam HI (líneas 1-6), 2 μ l de Pst I (líneas 7-12) y 2 μ l de Eco RI (líneas 13-18), e hibridizadas con una sonda para el cromosoma 18. Sólo en las - líneas 7,11,13,15,16,17 y 18 se definen bandas de hibridización. El - fondo claro sin gránulos oscuros inespecíficos indican baja radioac- tividad basal.

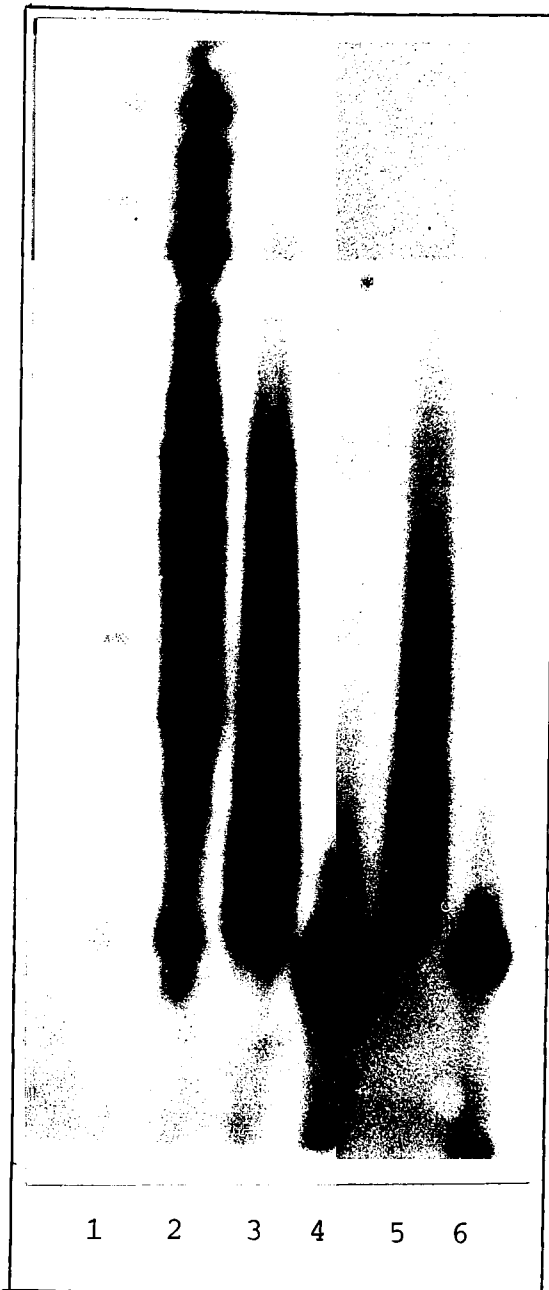


Figura 13 . Hibridización de la muestra A digerida con $2\mu\text{l}$ de Eco RI (línea 1), $10\mu\text{l}$ de Pst I (línea 2) y $10\mu\text{l}$ de Bam HI (línea 5). La muestra B fué digerida con sólo $2\mu\text{l}$ de Pst I (línea 3). Nótese también el fondo claro indicando baja radiactividad basal.

DISCUSION

Los métodos utilizados en la TADNR son de manejo delicado y requieren de algunos reactivos e implementación de equipo que no son muy comunes en un laboratorio de Genética, sin embargo, el recurrir a estrategias accesibles hicieron posible poner a nuestro alcance esta tecnología con una considerable reducción en costos y esfuerzos.

El trabajo que aquí se ha presentado no es una estandarización de métodos nuevos, sino la recopilación de protocolos relacionados con la TADNR y el aprovechamiento de los recursos disponibles en el laboratorio para lograr la adaptación de dicha tecnología. La acertada selección de los protocolos más confiables y reproducibles llevaron por una parte, a la realización exitosa de los procesos de Obtención del ADN, Digestión, Corrimiento Electroforético, Transferencia, Hibridización y Autorradiografía con sólo pequeñas diferencias observadas principalmente en el ADN obtenido, cuya relación de las densidades ópticas a 260 nm/280 nm, fué diferente a las mencionadas por Maniatis (12), sin embargo esto no alteró los procesos siguientes por lo que éstas alteraciones pueden atribuirse a diferencias en la marca comercial de los reactivos ó al espectrofotómetro usado. Asimismo, aún cuando existe la confiabilidad en los métodos seleccionados, es necesario señalar ciertas precauciones importantes para asegurar el éxito reproducible de los procesos :

- a) al manipular las muestras de ADN y Enzimas de Restricción, usar guantes de látex para evitar cualquier tipo de contaminación.
- b) conservar y transportar adecuadamente el ADN y los reactivos, principalmente las enzimas de restricción con el fin de prevenir su inactivación la cual provoca digestiones incompletas, como fué observado con las enzimas donadas por el Centro de Ingeniería Genética de Cuernavaca las cuales no fueron transportadas adecuadamente y por lo tanto hubo inactivación y bajó su rendimiento de corte;

c) tener un cuidado extremo en el manejo de los nucleótidos marcados con P^{32} , ya que las radiaciones emitidas por este isótopo están consideradas entre las más penetrantes.

Con respecto a la reducción de costos en la adaptación, si bien no fué posible lograrlo en los reactivos utilizados ya que la mayoría no se producen en el país, sí fué posible prescindir de algunos de ellos como la Proteínasa K y la RNasa -ventaja ya señalada por Sykes (49)- las cuales resultarían de alto precio puesto que serían adquiridas en cantidades importantes por el número de muestras a procesar.

Por otra parte, una reducción muy importante del 76% en los gastos de equipo de nueva adquisición, se obtuvo mediante la construcción del mismo el cual funcionó adecuadamente en todos los procesos, hecho que permitió marcadamente alcanzar las metas propuestas (Tabla 4).

De esta manera podemos mostrar, que con la utilización de los recursos disponibles y buscando las estrategias adecuadas, se puede aspirar a la adopción de metodologías aparentemente complicadas y lejanas como esta TADNR, cuya adaptación permite abrir nuevas opciones aprovechando el enorme potencial que ofrece esta tecnología, tanto en investigación como en técnicas de rutina en medicina. En el mismo laboratorio donde se realizó éste trabajo varias aplicaciones serían posibles de intentar :

1. Como estrategia de investigación, por ejemplo, lograr el conocimiento del defecto que ocasiona ciertas enfermedades genéticas de interés como la de Alzheimer, Huntington, entre otras,
2. Mejorar el asesoramiento genético al hacer el diagnóstico clínico y preclínico acertado en individuos afectados ó con alto riesgo de aquellas enfermedades que ya es posible diagnosticarlas mediante esta tecnología como la Distrofia muscular, Hemofilia, Talasemias,
3. Buscar nuevas posibilidades de Terapia efectiva para aquellas patologías que aún no la tienen.

COTIZACIONES DE EQUIPO DE MARCA COMERCIAL (Enero de 1989)

Transiluminador de luz ultravioleta (20cm x 40cm)	\$ 1,120.00
Caja grande para electroforesis con peine grande	\$ 195.00
Mampara de acrílico para protección a la radioactividad	\$ 117.00
	<hr/>
T O T A L	\$ 1,432.00 Dolares

Conversión a Pesos y pagando impuestos de importación = \$ 6'873,000.00 Pesos

GASTOS REALIZADOS EN LA CONSTRUCCION DEL EQUIPO EN EL LABORATORIO

Transiluminador de luz ultravioleta (32cm x 26cm)	\$ 600,000.00
Caja grande para electroforesis con peine grande	\$ 250,000.00
Mamparas para protección a la radioactividad (de acrílico de 1/2") (1 par)	\$ 400,000.00
Cajas para basura radioactiva (de acrílico de 1/4") (1 par)	\$ 400,000.00
	<hr/>
T O T A L	\$1'650,000.00 Pesos

COMPARANDO COTIZACIONES Y GASTOS, SE ALCANZA UNA REDUCCION DEL 76% .

Tabla 4. Cotizaciones del equipo carente en el laboratorio en comparación con los gastos realizados al construir tal equipo, resultando una reducción del 76%.

B I B L I O G R A F I A

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts., Watson, J.D. (1986) Biología Molecular de la Célula. Ed.Omega, S.A. Barcelona. pag. 194-206.
2. Weatherall, D.J. (1985). The new genetics and clinical practice. Oxford University Press. Second edition. Cap. 3.
3. Stryer, L. (1988). Biochemistry. Stanford University. W.H.Freeman and Co. /New York. Third edition. Cap. 6.
4. Smith, H.O. (1970). Nucleotide sequence specificity of Restriction Endonuclease. Science 205 : 455-462.
5. Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98 : 503-517.
6. Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C., Berg, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by Nick Translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113 : 237-251.
7. De Robertis, E.D.P., De Robertis, E.M.F. (1981). Biología Celular y Molecular . El ateneo, Buenos Aires. Cap. 21.
8. Lehninger, A.L. (1982). Bioquímica. Barcelona, Segunda edición. Cap. 31.
9. Susuki, D.T., Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Lewontin, R.C. (1986). An introduction to genetic analysis. W.H.Freeman and Co/New York. Third edition, Cap. 10 y 14 .
10. Gerald, Karp (1987). Biología Celular. Mc Graw Hill. Segunda edición. Cap. 12.
11. Watson, J.D., Tooze, J., Kurtz, D.T. (1983). Recombinant DNA, a short course. Scientific american books. W.H.Freeman and Co/New York Cap. 5 y 6.
12. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982). Molecular cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
13. Nathans, D., Smith, H.O., (1975). Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. Annu. Rev. Biochem. 44: 273-293.

14. Lewin, B. (1985). Genes. Editor Cell. New York, Second edition. Cap. 33.
15. Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W., Helling, R.B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70 (11) : 3240-3244.
16. Campbell, A.M. (1977). Inserción del ADN vírico en el ADN de la célula huésped. Investigación y Ciencia #
17. Thomas, M., Davis, R.W. (1975). Studies on the cleavage of bacteriophage lambda DNA with Eco RI restriction endonuclease. J. Mol. Biol. 91 : 315 - 328.
18. Sinsheimer, R.L. (1977). Recombinant DNA. Ann. Rev. Biochem. 46:415-438.
19. Scheller, Dickerson, R.R., Boyer, H., Riggs, A., Itakura, K. (1977). Chemical synthesis of restriction enzyme recognition sites useful for cloning. Science 196 : 177-180.
20. Anderson, W.F., Diacumakos, E.G. (1981). Genetic engineering in the mammalian cells. Sci. Am. 245 (1) : 106-121.
21. Watson, J.D., Hopkins, H.N., Robert, J.W., Stetz, J.A., Weine, A.M. (1987) Molecular Biology of the gene. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. Fourth edition. Cap. 19.
22. Benton, W.D., Davis, R.W. (1977). Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. Science 196: 180-182.
23. Gilbert, W. (1981). DNA sequencing and gene structure. Science 214:1305-1312.
24. Sanger, F. (1981). Determination of nucleotide sequences in DNA. Science 214 : 1205-1210.
25. Botstein, D., Shortle, D. (1985). Strategies and applications of in vitro mutagenesis. Science 229: 1193-1201.
26. Leary, J.J., (1985). Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose : Bio-blots. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4045-4049.

27. Johnson, I.S. (1983). Human insulin from recombinant DNA Technology. Science 219 : 632-637,
28. Goeddel, D.V., Heynecker, H.L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yan-sura, D.G., Ross, M.J., Miozzari, G., Crea, R., Seeburg, P.H. (1979). Di-rect expression in E. coli of DNA sequence coding for human growth hor-mone. Nature 281 : 544-548.
29. Péstka, Sidney. (1983). Purificación y fabricación de interferones huma-nos. Investigación y Ciencia # 85 : 18-26.
30. Lawn, M.R., Vehar, A.G. (1986). Genética molecular de la hemofilia. Inves-tigación y Ciencia # 116 : 28-38.
31. Zambryski, P., Holsters, M., Kruger, K., Depicker, A., Schell, J., Van Monta-gu, M., Goodman, M.H., (1980). Tumor DNA structure in plant cells trans--formed by A. tumefaciens. Science 209 : 1385-1391.
32. Chilton, Mary-Dell. (1983). Un vector para introducir genes en vegetales. Investigación y Ciencia # 83 : 20-30.
33. Cooper, D.N., Schmidtke. (1986). Diagnosis of genetic disease using DNA recombinant. Hum. Genet. 73 : 1-11.
34. Cooper, D.N., Schmidtke . (1984). DNA restriction fragment length polymor-phisms and heterozygosity in the human genome. Hum. Genet. 66 : 1-16.
35. White, R., Lalouel, J.-M. (1988). Chromosome mapping with DNA markers. Sci. Amer. 258 (2) : 20-28.
36. Gusella, J.F., (1986). DNA polymorphism and human disease. Ann. Rev. Bio-chem. 55 : 831-854.
37. Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using Restriction fragment lenght poly-morphisms. Am. J. Hum. Genet. 32: 314-331.
38. Gusella, J.F., Wexler, N.S., Conneally, P.M., Naylor, S.L., Anderson, M.A., Tamzi, R.E., Watkins, P.C. Ottina, K. Wallace, M.R., Sakaguchi, A.Y., Young, A.B., Shoulson, I., Bonilla, E., Martin, J.B., (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. Nature 306:234-238.

39. Monaco, A., Neve, R., Colletti-Feener, C., Bertelson, C., Kurnit, D., Kunkel, L. (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323 : 646-650.
40. Reeders, S.T., Breuring, M.H., Davies, K.E., Nicholls, R.O., Jarman, A.P., Higgs, D.R., Pearson, P.L., Weatherall, D.J., (1985). A highly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16. *Nature* 317 : 542 - 544.
41. Tsui, L.C., Buchusald, M., Barker, D., Braman, J.C., Knowlton, R., Schumm, J. W., Eiberg, H., Mohr, J., Kennedy, D., Plausic, N., Zsiga, Met. (1985). Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 230 : 1054-1057.
42. Royer-Pokora, B., Kunkel, C.M., Monaco, A.P., Goff, S.C., Newburger, P.E., Baehner, R.L., Cole, F.S., Curnutte, J.T., Orkin, S.H. (1986). Cloning the gene for an inherited human disorder - chronic granulomatous disease - on the basis of its chromosomal localization. *Nature* 322: 32-38.
43. Barker, D., Wright, E., Nguyen, K., Cannon, L., Fain, P., Goldgar, D., Bishop, D.T., Carey, J., Baty, B., Kivlin, J., Willaid, H., Waye, J.S., Greig, D., Leinwand, L., Nakamura, Y., O'Connell, P., Leppert, M., Lalouel, J.-M., White, R., Skolnick, M. (1987). Gene for von Recklinghausen neurofibromatosis is in the pericentromeric region of chromosome 17. *Science* 236 : 1100-1102.
44. Bodmer, W.F., Bailey, C.J., Bodmer, J., Bussey, H.J.R., Ellis, A., Gorman, P., Lucibello, F.C., Murday, V.A., Rider, S.H., Scambler, P., Sheer, D., Solomon, E., Spurr, N.K. (1987). Localization of the gene for familial adenomatous polyposis in chromosome 5. *Nature* 328 : 614-616.
45. Mathew, C.G.P., Chin, K.S., Easton, D.F., Thorpe, K., Carter, C., Liou, G.F., Fong, S.L., Bridges, C.P.B., Haak, H., Kruseman, A.C.N., Schifter, S., Hansen, H.H., Telenius, H., Telenius-Berg, M., Ponder, B.A.J. (1987) A linked genetic marker for multiple endocrine neoplasia type 2a on chromosome 10. *Nature* 328 : 527-528.
46. Simpson, N.E., Kidd, J., Goodfellow, P.J., Mc Dermid, H., Myers, S., Kidd, J.R., Jackson, C.E., Duncan, A.M.V., Farrer, L.A., Brasch, K., Castiglione, C., Genel, M., Gertner, J., Greenberg, G.R., Gusella, J.F., Holden, J.J.A., White, B.N. (1987). Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2a to chromosome 10 by linkage. *Nature* 328 : 528-530.

47. Anderson, W.F. (1984). Prospects for human gene therapy. *Science* 226 : 401-409.
48. Müller, H.J. (1987). Human gene therapy: possibilities and limitations. *Experientia* 43 : 375-378.
49. Sykes, B.C. (1983). DNA in heritable disease. *Lancet* 1 : 787-788.
50. Madisen, L., Hoar, D.I., Holroyd, C.D., Crisp, M., Hodes, M.E. (1987). DNA banking : the effects of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA. *Am.J. of Med. Genet.* 27: 379-390.
51. AAIJ, C., Borst, P., (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochimica et Biophysica acta* 269 : 192-200.
52. Reed, K.C., Mann, D.A. (1985). Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucl. Acid. Res.* 13(20) : 7207-7221.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente

Número 125/89

SRITA. CARIDAD AUREA LEAL CORTES
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "ADAPTACION DE LA METODOLOGIA PARA USO DEL ADN RECOMBINANTE" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptada como Directora de dicha Tesis la Dra. Ma. de Lourdes Ramírez Dueñas.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"

Guadalajara, Jal., Enero 31 de 1989

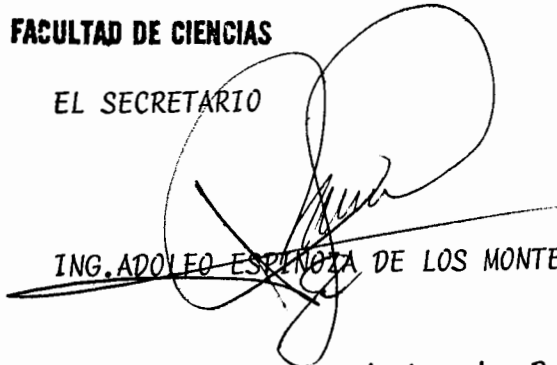
EL DIRECTOR



DR. CARLOS ASTENGO OSUNA

FACULTAD DE CIENCIAS

EL SECRETARIO


ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS.

c.c.p. La Dra. Ma. de Lourdes Ramírez Dueñas, Directora de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd

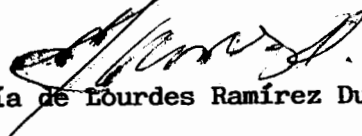
GUADALAJARA JAL. 15 DE JUNIO DE 1989.

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS
C. DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E :

Sr. Director :

Por medio de la presente me permito manifestar que la C. Caridad Aurea Leal Cortès realizó la Tesis ADAPTACION DE LA METODOLOGIA PARA EL USO DEL ADN RECOMBINANTE, observando durante el desarrollo de la investigación y la redacción del trabajo todas las indicaciones impuestas por el reglamento de tesis y por la que suscribe, dándole autorización para que la imprima.

A t e n t a m e n t e :


Dra. María de Lourdes Ramírez Dueñas