

1993-B

093072316

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y AMBIENTALES



**"PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA
LA CITRATO SINTASA DE *Pseudomonas aeruginosa*"**

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA:

MARIA FERNANDA NIETO JACOBO

LAS AGUJAS, NEXTIPAC, ZAPOPAN, JALISCO, 19 DE FEBRERO DE 1999

C.
DIRECTOR DE LA DIVISION DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó la pasante MARIA FERNANDA NIETO JACOBO, código 093072316, con el título "PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA LA CITRATO SINTASA DE *Pseudomonas aeruginosa*", consideramos que ha quedado debidamente concluído, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva dar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

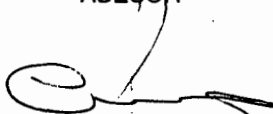
Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. Enero de 1999

DIRECTOR DE TESIS



Dr. Angel Arturo Guevara García

ASESOR



Dr. Luis Rafael Herrera Estrella

SINODALES

Nombre

Alma Rosa Villalobos Arámbula

Anne Santoro

Galina Zaitseva Petrova

Firma

Alma Rosa Villalobos 15/01/99

A. Santoro 15/01/99

[Signature] 21.01.99

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Herrera Estrella, porque con la realización de esta tesis he aprendido muchísimo más de lo que esperaba, gracias por sus consejos, apoyo y paciencia.

Al Dr. Arturo Guevara García, director de esta tesis, porque sus enseñanzas han sido determinantes para mi persona.

A mis sinodales, la Dra. Galina Zaiseva, la Dra. Anne Santerre, y la Dra. Alma Rosa Villalobos por la revisión del presente escrito.

A los Biólogos Verence Ramírez y José López, por la realización de las construcciones genéticas, a Esmeralda Beltrán por las soluciones, a Silvia Vigil por la siembra de las semillas de tabaco y a TODOS mis compañeros de laboratorio y los que no lo son, que me ayudaron durante el transcurso del trabajo, Quim. Beatriz Jiménez, Biol. Milusqui Verástegui, Biol. Rafael Peña, Biol. Tztziqui Chávez, Biol. Verónica Limones y Biol. Luis Figueroa. Gracias principalmente a todos por su amistad.

A mis amiguillas, Atala Gamboa, por TODOS los trámites para la titulación, Elizabeth Ramírez por sus correos, y Verónica Rosas y Marijose Maraña, por los ánimos.

Al Secretario Académico de la División de Cs. Biológicas y Ambientales, el M. en C. Salvador Velázquez, por su ayuda en los trámites para la titulación.

A la Dra. Mónica Riojas, la M. en C. Martha Cedano, la M. en C. Patricia Castro, el Dr. Eulogio Pimienta, el M. en C. Sergio Guerrero, el M. en C. Rafael Soltero, el M. en C. José Luis Navarrete y a todos mis profesores de la División de Ciencias Biológicas, por su apoyo y por todo lo que he aprendido de Ustedes.

A Citrato, por los anticuerpos.

DEDICATORIAS

Por todo aquello que no soy capaz de entender,

A DIOS

Porque el amor es más grande que la distancia que nos separa,

A MIS PADRES

Arnulfo y Elisa

**Por la confianza, el apoyo, la comprensión y por ser en parte
padres,**

A MIS HERMANOS

Arnulfo, Laura

Esthela, Esthela, Arturo, Octavio, Graciela, Jorge, Hilda,
Rogelio, Ignacio y Laura.

Porque son un motivo más,

A MIS SOBRINOS

Arnulfo, Rogelio,

Pablo, Daniela, Lalo, George, Joaquín y Mariana.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección
del Dr. Angel Arturo Guevara García
y la asesoría del
Dr. Luis Rafael Herrera Estrella,
en el Laboratorio de Regulación Genética e Ingeniería
Metabólica, del Departamento de Ingeniería Genética
de Plantas.
CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato.

LISTA DE ABREVIATURAS

Al ³⁺	Ion aluminio
ADES	Agua desionizada estéril
AntiCS	Antisuero contra la enzima citrato sintasa
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fostato
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CoA	Coenzima A
CS	Citrato sintasa
CS/P.a	Citrato sintasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
DNA	Acido desoxiribonucleico
cDNA	DNA complementario
DTNB	5,5'-DITHIO-bis(Acido 2-nitrobenzoico) (Reactivo de Ellman)
EDTA	Sal sódica de etilen diamino tetracético
FR	Fracción
IgG	Inmunoglobulinas G
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactosido
K	Equivalente a 1000 revoluciones por minuto
NADH	Dinucleótido de nicotina reducido
NBT	4-Nitro blue tetrazolium chloride (Azul de tetrazolio)
Ni ₂	Ion níquel
rNA	Acido ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
NPTII	Gen de neomicina fosfotransferasa (resistencia a kanamicina)
pb	Pares de bases
PBS	Buffer salino de fosfatos
pnos	Promotor del gen de nopalina sintetasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pQE32/CS-MOB	Cepa Mob154 de <i>Escherichia coli</i> transformada con el plásmido pQE-32 que porta el gen CS/P.a.
Prom	Promotor
PT	Proteína total
RBS	Sitio de unión de ribosomas
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Gel desnaturizante de poli(acrilamida).
TBE	Buffer tris-boratos/EDTA
TBS	Buffer tris-salino
tocs	Secuencia terminadora del gen de octopina sintetasa
tT7	Secuencia terminadora del genoma del bacteriófago T7
V	Voltios

RESUMEN

En Ingeniería Genética, las técnicas de inmunología son ampliamente utilizadas, como las técnicas de inunodetección, que consisten el uso de anticuerpos específicos dirigidos contra proteínas de interés, las cuales son una de las herramientas más valiosas con que se disponen los biólogos moleculares para identificar y seleccionar individuos transgénicos portadores de un gen heterólogo.

En el Laboratorio de Regulación Genética e Ingeniería Metabólica de la Unidad Irapuato del CINVESTAV, se han producido plantas transgénicas que portan y expresan el gen de la enzima CS/P.a, las cuales muestran resistencia a concentraciones tóxicas de aluminio y resultan excelentes modelos de trabajo para estudiar el mecanismo de resistencia a la toxicidad por aluminio y otros metales presentes en el suelo.

La producción de anticuerpos contra la enzima CS/P.a que permitan monitorear la expresión del gen en individuos transgénicos crecidos bajo diferentes condiciones de cultivo, resulta indispensable para la selección de líneas transgénicas sobresalientes.

Para cumplir este objetivo, clonás del gen CS/P.a en vectores de expresión capaces de complementar una cepa mutante de *Escherichia coli* que carece de la enzima, se utilizaron para realizaron cinéticas de inducción para monitorear la sobreexpresión de la enzima y purificarla mediante cromatografía de afinidad. Con la CS pura se inmunizaron conejos para obtener anticuerpos policlonales. La funcionalidad y especificidad de los anticuerpos generados se verificó en plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y algas clorofitas (*Tetraselmis suecica*) portadoras del gen heterólogo CS/P.a.

INDICE GENERAL

	Página
I. Introducción	1
1.1 LA RESPUESTA INMUNE	
1.1.1 Anticuerpos	
1.1.2 Anticuerpos policlonales	
II. Antecedentes	6
2.1 IMPORTANCIA DE LA INMUNOLOGIA EN BIOLOGIA MOLECULAR	
2.2 PURIFICACION DE PROTEINAS	
2.2.1 Cromatografía de afinidad	
2.3 FUNCION METABOLICA DE LA ENZIMA CITRATO SINTASA	
2.4 TOXICIDAD POR ALUMINIO EN SUELOS Y CUERPOS DE AGUA	
2.5 CLONACION Y CARACTERIZACION DEL GEN DE CITRATO SINTASA	
2.5.1 Clonación y caracterización del gen CS/P.a	
2.6 PRODUCCION DE ORGANISMOS TRANSGENICOS QUE PORTAN EL GEN CS/P.a	
2.7 CONSTRUCCIONES PARA SOBREEXPRESAR EN <i>Escherichia coli</i> EL GEN CS/P.a	
III. Hipótesis	15
IV. Objetivos	15
V. Estrategia Experimental	16
VI. Material y Métodos	17
6.1 MATERIAL BIOLÓGICO	
6.2 REACTIVOS	
6.3 METODOS	
6.3.1 Sobreexpresión de la enzima CS/P.a. en <i>E. coli</i> .	
6.3.2 Determinación de la concentración y detección de la proteína.	
6.3.3 Purificación de la enzima	

- 6.3.4 Producción y recuperación de anticuerpos
- 6.3.5 Especificidad y título de los anticuerpos
- 6.3.6 Inmunodetección y determinación de actividad enzimática de CS en extractos proteicos de tabaco y algas.

VII. Resultados	30
7.1 SOBREENPRESION DE LA ENZIMA CS/P.a EN <i>E. coli</i> .	
7.2 PURIFICACION DE LA ENZIMA	
7.3 INMUNIZACION Y RECUPERACION DE ANTICUERPOS	
7.4 ESPECIFICIDAD Y TITULO DE LOS ANTICUERPOS	
7.5 INMUNODETECCION DE CS EN EXTRACTOS PROTEICOS DE TABACO TRANSGENICO	
7.6 INMUNODETECCION DE CS EN EXTRACTOS PROTEICOS DE MICROALGAS TRANSGENICAS	
VIII. Discusión	38
IX. Conclusiones	42
X. Perspectivas	43
XI. Bibliografía	44
XII. Anexo	49
12.1 MEDIOS Y SOLUCIONES	
12.2 PLANTAS DE TABACO ANALIZADAS	
12.3 LINEAS DE MICROALGAS ANALIZADAS	
12.4 MAPAS DE LOS PLASMIDOS	

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
FIGURAS	
1 Diagrama de la estructura cuaternaria de un anticuerpo	3
2 Afinidad de la resina Ni ₂ por 6xHIS	8
3 Ruta de biosíntesis de citrato	9
4 Secuencia de oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen CS/P.a por PCR.	14
5 Cepa pQE32/CS-MOB en medio selectivo	14
6 Esquema de electrotransferencia	26
7 Cinética de inducción de la cepa pQE32/CS-MOB	30
8 SDS-PAGE de las fracciones puras	31
9 Inmunodetección con AntiCS	33
10 Titulación del suero AntiCS con la enzima pura	34
11 Titulación del suero AntiCS en extractos de pQE32/CS-MOB	34
12 Inmunodetección en extractos de tabaco	35
13 Western-blot de las muestras seleccionadas de tabaco	35
14 Western-blot de las líneas transgénicas de microalgas	36
 TABLAS	
1 Tipos de anticuerpos	5
2 Valores de absorbancia, concentración de proteína y actividad de CS en los diferentes tiempos de inducción	31
3 Proteína obtenida y actividad de CS en las fracciones nativas	32
4 Concentración de IgG en los sueros	32
5 Actividad de CS en líneas de tabaco seleccionadas	36
6 Actividad de CS en líneas transgénicas de microalgas	37

I. INTRODUCCION

1.1 LA RESPUESTA INMUNE

Los mamíferos y otros vertebrados superiores reaccionan a la invasión de microorganismos o sustancias extrañas mediante la respuesta inmune. Dicha respuesta está compuesta de una vasta cadena de moléculas y células cuya función es proteger al organismo contra la invasión de patógenos, como bacterias, hongos, virus y protozoarios que penetran al organismo, así como contra las toxinas que producen (Wolfe, 1993). El sistema inmune de los organismos consta de dos componentes (Stryer, 1995):

- Elementos de la respuesta inmune humoral, que incluye proteínas llamadas anticuerpos, producidos por las células plasmáticas, denominadas linfocitos B, que se originan y llevan a cabo gran parte de su maduración en la médula ósea; y
- Elementos de la respuesta inmune celular, en la que intervienen células plasmáticas denominadas linfocitos T, así como los denominados macrófagos, encargados de matar a las células que contienen las sustancias extrañas (Stryer, 1995).

La generación de anticuerpos constituye la primera línea de defensa del organismo, y a las sustancias que son capaces de estimular su producción se les conoce como antígenos. Virtualmente todas las proteínas extrañas y la mayoría de los polisacáridos pueden actuar como antígenos, pero incluso cierto tipo de ácidos nucleicos y otro tipo de moléculas contenidas en sustancias artificiales son capaces de desencadenar la respuesta inmune (Wolfe, 1993).

Los vertebrados tienen la capacidad de producir anticuerpos que, si bien son específicos, pueden reaccionar con millones e incluso billones de antígenos diferentes. Esta diversidad es resultado de sofisticados arreglos genéticos programados, que a partir de un número relativamente pequeño de subunidades genéticas (cientos o

miles), soporta diferentes combinaciones para producir un gran número de genes funcionales, que a lo largo del proceso de transcripción del DNA en RNA, dan lugar a millones o billones de anticuerpos diferentes (Lewin, 1994).

1.1.1 Anticuerpos. Los anticuerpos son grandes proteínas globulares, también denominadas inmunoglobulinas. Cada anticuerpo establece una precisa combinación tridimensional con toda o una parte de la molécula antigénica, a esta parte que reconoce se le llama epítotope. Una vez formados, los anticuerpos aparecen en la superficie de las células B, de donde son liberados hacia la corriente sanguínea y otros fluidos corporales para proteger al organismo contra ataques posteriores (Wolfe, 1993).

Cada anticuerpo es una molécula larga y compleja formada por cuatro subunidades polipeptídicas. Las dos subunidades más pequeñas (cadenas livianas), son idénticas en estructura y cada una está formada por aproximadamente 220 residuos aminoácidos. Las dos subunidades largas (cadenas pesadas), son idénticas entre sí, pero diferentes de las livianas y cada una contiene cerca de 440 residuos aminoácidos (Wolfe, 1993) (Figura 1).

Por otra parte, cada cadena proteica consiste de dos regiones principales: la región variable (RV) amino terminal, y la región constante (RC) carboxilo terminal. Como su nombre lo indica, las regiones variables muestran cambios considerables entre las secuencias de una inmunoglobulina y otra, en tanto que las regiones constantes son mucho más conservadas (Stryer, 1995).

La diversidad de la respuesta inmune es generada por la asociación entre las regiones variables de las cadenas livianas, que conforman el dominio responsable del reconocimiento del antígeno. Como cada inmunoglobulina tiene estructura parecida a una Y, en la cual los brazos son idénticos, cada brazo tiene una copia del dominio RV. La producción de dominios RV de diferentes especificidades es producto de la respuesta a diversos antígenos (Lewin, 1994).

En humanos y en ratones se han encontrado dos familias de cadenas livianas, lamda (λ) y kappa (κ); y una familia de cadenas pesadas. Una molécula completa de anticuerpo contiene un par de

cadenas livianas λ o un par de cadenas livianas κ , en combinación con un par de cadenas pesadas (Wolfe, 1993).

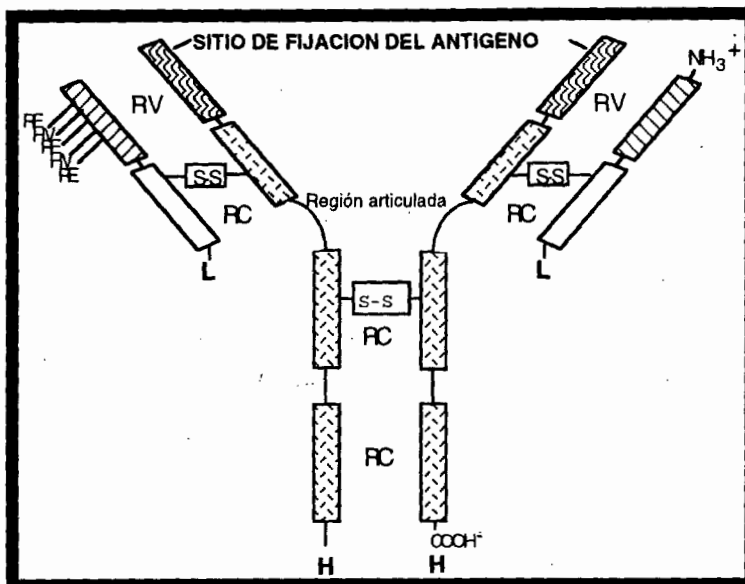


Figura 1. Diagrama de la estructura cuaternaria de un anticuerpo. Las cadenas pesadas y livianas están unidas por puentes disulfuro (-S-S-). Cada cadena liviana (L) y pesada (H) consisten en regiones constantes (RC) y regiones variables (RV). Las regiones variables están divididas internamente en regiones hipervariables (HV), en donde está concentrada la mayor variabilidad de la secuencia de aminoácidos, y regiones estructurales (RE), las cuales son más conservadas (Adaptado de: Wolfe, 1993).

Los anticuerpos que reaccionan con diferentes antígenos tienen diferentes regiones variables, pero todos los del mismo tipo formados por una misma célula B, que reconocen un antígeno específico son idénticos en sus regiones variables. Así, dependiendo de la combinación de los dominios de la cadena pesada usados para su ensamblaje, los anticuerpos de un mismo tipo, se subdividen en 5 clases mayores denominadas A, G, D, E o M (Wolfe, 1993). La función específica de cada clase se resume en la Tabla 1.

En resumen, las regiones variables de las cadenas livianas y pesadas determinan el tipo de antígeno que se une al anticuerpo. La región constante de la cadena pesada, la cual forma la cola de la Y, determina la clase, función completa y localización primaria de la molécula en el organismo (Lewin, 1994).

Por otra parte, las moléculas de anticuerpos poseen grupos de carbohidratos, que dependiendo de su clase pueden variar desde el 2 hasta el 14% de su estructura en peso. Por lo tanto, los anticuerpos no son proteínas puras, sino glicoproteínas, en las que la función de los grupos carbohidrato que se unen covalentemente a las regiones constantes de las cadenas pesadas, es todavía desconocida (Wolfe, 1993).

1.1.2 Anticuerpos Policlonales. La parte del antígeno reconocida por un anticuerpo es llamada determinante antigénico o epítotope. Como ya se mencionó, del amplio repertorio de células productoras de anticuerpos con que cuentan los animales, cada una de ellas produce anticuerpos con una especificidad única. Un antígeno puede actuar mediante la estimulación en la proliferación de un pequeño número de células, cada una de las cuales reconoce un determinante antigénico diferente. De tal modo, cada una de estas células producirá anticuerpos que reconozcan diferentes epítotes del antígeno. Por lo tanto, al conjunto de anticuerpos que reconocen un antígeno en particular, a través de diferentes determinantes antigénicos, se les conoce como policlonales, por ser originados de varias poblaciones de células B (varios clones) y diferir en su especificidad y afinidad por el antígeno. Por el contrario, los anticuerpos generados de una sola población de células B, que son

sintetizados por una población de células idénticas (un clon) y reconocen el mismo determinante antigénico, son llamados monoclonales (Stryer, 1995).

Tabla 1. Tipos de anticuerpos. (Basado en: Wolfe, 1993; Stryer, 1995).

CLASE	TIPO DE CADENA PESADA	MASA (kD)	CONCENTRACION EN SUERO (mg/ml)	FUNCIONES Y/O LOCALIZACION
IgA	α	180-500	3	Secreciones corporales como saliva, lágrimas, secreciones intestinales, del tracto respiratorio y leche.
IgG	γ	150	12	Circulación sanguínea y linfática. Neutraliza toxinas, virus y bacterias en fluidos corporales; activa al sistema complementario y macrófagos, cuando se unen a antígenos.
IgD	δ	175	0.1	Receptores en superficies de linfocitos.
IgE	ϵ	200	0.001	Superficies celulares. Control de infecciones parasitarias, elevados en personas con reacciones alérgicas.
IgM	μ	950	1	Sangre y circulación linfática, receptores en superficies de linfocitos. Unión a antígenos grandes con múltiples sitios de unión como virus y bacterias; activa al sistema complementario y macrófagos, cuando se unen a antígenos.

II. ANTECEDENTES

2.1 IMPORTANCIA DE LA INMUNOLOGIA EN BIOLOGIA MOLECULAR

Gran parte de los avances tecnológicos en el campo de la biología molecular descansan en los avances que a su vez se han realizado en el campo de la inmunología. La importancia de estos métodos a favor de los primeros, reside en el uso de anticuerpos como reactivos analíticos en técnicas para purificación de proteínas mediante cromatografía de inmunidad e inmunoprecipitación, detección de antígenos mediante "Western-blot", escrutinio en genotecas de expresión de cDNA de proteínas cuya secuencia no se encuentra disponible para diseñar secuencias de oligonucleótidos, selección de mRNA de la proteína deseada y cuantificación de proteínas y antígeno en suero (Ausbel, et al.; 1994; Stryer, 1995).

Los anticuerpos policlonales, por reaccionar con el antígeno independientemente de su conformación, son particularmente útiles para detectar y medir la cantidad total del antígeno presente en preparaciones crudas o extractos celulares (Sambrook, et al.; 1989). Este tipo de anticuerpos se obtienen inyectando animales, por lo general conejos, con el antígeno puro, para después, a partir de la obtención del suero sanguíneo del animal inmunizado, recuperar la fracción de IgG correspondiente al antígeno infiltrado (Stryer, 1995).

Sin duda alguna, el "Western-blot" es una de las técnicas más utilizadas en biología molecular, y no es más que la inmunodetección de antígenos específicos reconocidos por anticuerpos monoclonales o policlonales (Sambrook, et al.; 1989). Para el caso, las proteínas son resueltas en SDS-PAGE y transferidas a una matriz inmóvil, sobre la cual es posible la detección de proteínas usando anticuerpos específicos (Towbin, et al.; 1979). La eficiencia de la técnica está dada por sus niveles de detección, que pueden llegar hasta los 10 pg

(10⁻¹²g) de la proteína de interés en extractos crudos (Bollag, et al.; 1996)

2.2 PURIFICACION DE PROTEINAS

La recuperación de una proteína pura contenida en una célula o tejido, puede hacerse aprovechando las características bioquímicas de las proteínas en solución. Mezclas de proteínas pueden separarse con base en su solubilidad, carga eléctrica, propiedades de adsorción o afinidad biológica por otras moléculas (Lehninger, 1982).

De entre las técnicas disponibles para la purificación de proteínas destacan las técnicas cromatográficas. Estos procesos se caracterizan por el paso uniforme de una mezcla fluida (gas o líquido), a través de otra sustancia relativamente inmóvil (líquido o sólido), la cual permite la migración diferencial de los componentes de la mezcla, por diferencias en el grado con el que los componentes individuales de la fase móvil interactúan con la fase estacionaria (Bohinski, 1991).

2.2.1 Cromatografía de afinidad La cromatografía de afinidad se basa en la capacidad de unión específica no covalente de las proteínas con otras moléculas, llamadas ligandos. Su empleo permite aislar proteínas a partir de mezclas muy complejas, con un grado de purificación muy elevado y frecuentemente en un solo paso. Cuando una mezcla de proteínas se introduce en una columna de afinidad, las moléculas de la enzima que es capaz de unirse íntima y específicamente al ligando inmóvil, se adhieren a él fuertemente, mientras que todas las demás proteínas, que carecen de centro específico de unión al ligando, pasan a través de la columna. Posteriormente, la proteína unida específicamente a las partículas de la columna puede ser separada, empleando una solución concentrada de la molécula de ligando libre (Lehninger, 1982).

El principio básico de la cromatografía de afinidad se empleó para diseñar el sistema de expresión y purificación de proteínas recombinantes conocido como 6xHIS (QIAexpress System; Xpress™ System). Dicho sistema se basa en la selectividad de resinas que poseen ligandos Ni₂ por proteínas recombinantes a las que se les ha

fusionado, en su extremo amino o carboxilo terminal, un pequeño fragmento de 6 histidinas continuas. La afinidad de la resina Ni_2 por los residuos de histidinas es tan fuerte y selectiva, que permite que cualquier proteína que interfiera con la unión sea eliminada mediante lavados de alta astringencia (Figura 2).

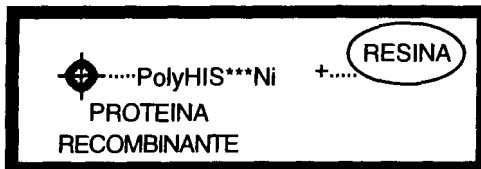


Figura 2. Afinidad de la resina Ni_2 por 6xHIS

2.3 FUNCION METABOLICA DE LA ENZIMA CITRATO SINTASA

La enzima citrato sintasa (Ec 4.1.3.7), también conocida como enzima condensante, enzima citrato condensante, citrogenasa u oxalato transacetasa (Manchenko, 1994), se encuentra en todos los seres vivos y es responsable de facilitar la entrada del carbono al ciclo de Krebs. Este ciclo, también conocido como de los ácidos tricarbóxicos o del ácido cítrico, representa una etapa muy importante para la oxidación de moléculas portadoras de energía y es fuente de compuestos intermediarios para muchas otras vías metabólicas (Lehninger, 1982).

La CS cataliza la formación de citrato a partir de oxalacetato y CoA, a través de una condensación aldólica entre el grupo metilo del Acetil CoA y el grupo carbonilo del oxalacetato con hidrólisis del enlace tioéster y formación de CoA-SH libre. Como intermediario no disociado en el sitio activo se forma citril-CoA, que luego es hidrolizado por la misma enzima (Stryer,1995).

La reacción química catalizada por la CS se presenta en la Figura 3.

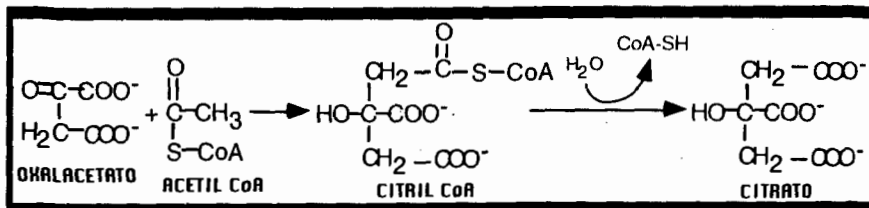


Figura 3. Ruta de biosíntesis de citrato.

En organismos eucariotes, bacterias Gram positivas y arqueobacterias, la CS posee una forma homodimérica, mientras que en la mayoría de las eubacterias Gram negativas, la enzima es un homohexamero (Miur, et al., 1995). Indistintamente de su naturaleza oligomérica, todas las CS tienen subunidades polipeptídicas de peso molecular de 42-49 kD y sus secuencias presentan alta homología (Remington, 1992).

En plantas, existen dos isozimas para la CS, una de ellas involucrada en el ciclo del glioxilato, que se lleva a cabo en los glioxisomas, y la otra, que participa en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, llevado a cabo en las mitocondrias (Kato, 1995).

Las CS presentan tanto diferencias estructurales, como diversidad de actividades catalíticas y regulación alostérica, respetando una fuerte correlación con el estatus taxonómico del organismo en que se encuentran. Los hexámeros presentes en bacterias, como *Escherichia coli*, *Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas* spp., muestran inhibición alostérica por NADH. En tanto, en anaerobios facultativos Gram negativos, la enzima está sujeta a una inhibición adicional por 2-oxoglutarato. En contraste, los dímeros presentes en el resto de los organismos, son inhibidos por ATP e insensibles a NADH y 2-oxoglutarato (Pullen, 1985).

En condiciones *in vitro*, la velocidad de reacción se encuentra determinada por la disponibilidad de CoA y oxalacetato, así como por la concentración de succinil CoA, que compite con el acetil CoA e inhibe la actividad de la enzima (Lehninger, 1982).

2.4 TOXICIDAD POR ALUMINIO EN SUELOS Y CUERPOS DE AGUA

En zonas tropicales, la toxicidad por Al^{3+} es uno de los principales problemas asociados a suelos ácidos, los cuales abarcan el 40% de las tierras agrícolas en el mundo.

El aluminio es uno de los principales factores limitantes para el desarrollo de plantas, cuando se encuentra en su forma soluble Al^{3+} . Normalmente se encuentra formando parte de compuestos no tóxicos como aluminosilicatos (Delhaize and Ryan, 1995). Sin embargo, la solubilización del aluminio de estos compuestos es favorecida por una disminución en los valores de pH a 5.5 e inferiores. La acidificación es causada en algunas ocasiones por las mismas propiedades naturales del suelo, pero en las últimas décadas ha sido acelerada por prácticas agrícolas y la lluvia ácida (Foy, 1978).

Muchas plantas cultivadas, como maíz, soya, frijol, algodón, trigo y la mayoría de los frutos tropicales, presentan baja productividad en suelos ácidos con problemas de Al^{3+} , por ejemplo, el maíz llega a reducir su rendimiento hasta en un 80% cuando es cultivado en estas condiciones (Herrera-Estrella, 1998). Entre los síntomas que presentan las plantas a causa de la toxicidad por este metal, se encuentra la reducción del área radicular, mayor susceptibilidad a la sequía y el decremento en el aprovechamiento de los nutrimentos minerales presentes en el suelo (Taylor, 1988).

El problema de toxicidad por aluminio en suelos es importante en el sureste de México, donde se reconocen alrededor de 4 millones de hectáreas afectadas. En otras regiones tropicales del mundo la problemática es mayor, en particular en países de Sudamérica, como Colombia y Brasil, donde se reportan más de 300 millones de hectáreas afectadas, y países del Sureste Asiático, Australia y Nueva Zelanda (Herrera-Estrella, 1998).

En los cuerpos de agua dulce, el problema de acidificación también ha recibido considerable atención, ya que la acidez reduce las poblaciones de productores primarios presentes, como son las poblaciones de microalgas. Otro problema asociado a la acidificación de aguas es la presencia de altas concentraciones de metales como aluminio, cobre, cadmio o zinc, que llegan a ser tóxicas para todos los organismos. En peces, el Al^{3+} interfiere con la regulación de la

permeabilidad de las branquias, las cuales son obstruidas por la presencia de mucosidad y se impide la respiración, lo que a largo plazo causa su muerte (Mason, 1996).

La importancia actual de este problema, ha ocasionado que por todo el mundo se lleven a cabo estudios para esclarecer los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la toxicidad y resistencia al aluminio. Las evidencias experimentales en plantas que de manera natural presentan resistencia a este metal, sugieren que el mecanismo está de alguna manera relacionado a la exclusión del metal mediante la liberación de ligandos, como podrían ser los ácidos orgánicos, a la rizósfera. Estos ligandos quelan al metal y previenen su entrada a las células vasculares (Hue, et al.; 1986).

En experimentos *in vitro*, se ha demostrado que los ácidos orgánicos disminuyen el efecto tóxico del aluminio, y que el citrato es más efectivo que el succinato o el malato para estos fines (Hue, et al.; 1986).

En aguas dulces, se ha observado que el efecto negativo del aluminio sobre poblaciones animales, es menos drástico en aguas tratadas con citrato (Mason, 1996).

2.5 CLONACION Y CARACTERIZACION DEL GEN DE CITRATO SINTASA

Dada la importancia que tiene el ciclo de Krebs en el metabolismo de los organismos vivos, numerosos intentos se han hecho para caracterizar e incluso clonar algunos de los genes de las enzimas involucradas en la síntesis de sus compuestos intermediarios.

La CS se ha caracterizado bioquímicamente de manera detallada en diferentes organismos, incluyendo animales y vegetales. Entre los primeros trabajos que se tienen sobre su purificación, se encuentran los realizados por Srere, quien purificó la enzima de tejido muscular de pichón, y desarrolló un método para determinar su actividad enzimática (Srere, et al.; 1963). Este mismo grupo de investigación, posteriormente purificó la CS de *E. coli* (Faloona and Srere, 1969).

Otra línea de investigación que ha resultado fundamental para los estudios de esta enzima, es la encaminada a aislar mutantes de *E.*

coli auxótrofas para glutamato (mutantes *gltA*), que carecen del gen que codifica para la CS (Gilvarg and Davis, 1956; Asworth, et al., 1965). Dichas mutantes, se caracterizan por su incapacidad para utilizar acetato como única fuente de carbono y energía; son incapaces de crecer en medio mínimo, y requieren ser cultivadas en medio adicionado con L-glutamina o L-prolina (Guest, 1980).

Utilizando estas cepas como receptoras, así como técnicas de DNA recombinante, se han logrado clonar diferentes genes de la citrato sintasa en plásmidos recombinantes, que han permitido la sobreproducción de la enzima y facilitado su purificación. Los primeros trabajos de este tipo, son los realizados con la CS de *E. coli* y de *Rickettsia prowazekii* (Duckwort and Bell, 1982; Wood, et al., 1983).

Con técnicas de biología molecular, se han aislado más de 200 genes CS de bacterias, levaduras, hongos, animales y plantas. Entre los de plantas se incluyen tanto los de mitocondrias, como los de glioxisomas (GenBank Database. National Center for Biotechnology Information. www2.ncbi.nlm.nih.gov/genebank/query-form-html).

Actualmente, con el uso de cromatografía de afinidad metálica, asociada al uso de mutantes *gltA*, se han mejorado los rendimientos de purificación de la enzima, pero más importante es el hecho de que esta purificación es mucho más rápida.

2.5.1 Clonación y caracterización del gen CS/P.A La CS de bacterias del género *Pseudomonas*, presenta propiedades cinéticas intermedias entre las CS de otras bacterias Gram negativas, como *Acinetobacter* spp. y *E. coli*. (Donald et al., 1989). Dentro de este género, la CS/P.a fue la primera que se obtuvo en forma pura, aunque anteriormente se hicieron intentos para obtenerla de otros miembros del mismo género (Flechtner and Hanson, 1970; Harford and Weitzman, 1975; Higa, et al., 1971).

El gen CS/P.a fué aislado a partir del escrutinio de una librería genómica, usando como sonda el gen CS de *E. coli*. Con el gen aislado se construyó el plásmido pKB, que se introdujo en la cepa MOB154 de *E. coli* *gltA* (cepa pKB). A partir de extractos crudos de las cepas recombinantes se purificó la enzima mediante cromatografía de

intercambio iónico. La proteína purificada fue empleada como antígeno para producir anticuerpos policlonales en conejo (Donald et al., 1989).

2.6 PRODUCCION DE ORGANISMOS TRANSGENICOS QUE PORTAN EL GEN CS/P.a

Con la idea de probar si el incremento en la producción de citrato, podía conferir tolerancia al Al^{3+} , en el Laboratorio de Regulación Genética e Ingeniería Metabólica del Departamento de Ingeniería Genética de Plantas, del CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato, se produjeron plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y papaya (*Carica papaya*) que sobreexpresan el gen CS/P.a en su citoplasma. En dichas plantas se demostró claramente que la sobreproducción de citrato se correlaciona con la resistencia a niveles tóxicos de dicho metal (De la Fuente, et al.; 1998).

Plantas transgénicas de tabaco fueron regeneradas a partir de eventos de transformación independientes, empleando el plásmido pB2 (Anexo) como vector de transformación. En dicho plásmido, el gen CS/P.a se encuentra fusionado en su extremo 5' a un promotor doble 35S del virus del mosaico de la coliflor y en su extremo 3' al tocs, para asegurar su correcta expresión en tejidos vegetales.

En dos eventos de transformación independientes, se generaron las líneas Cit1 y Cit2, cuyos integrantes fueron seleccionados por su capacidad de crecer *in vitro* en diferentes concentraciones de Al^{3+} (Anexo); los individuos seleccionados fueron mantenidos en invernadero para la producción de semilla por autofecundación.

Por otra parte, persiguiendo el mismo objetivo, y para establecer la factibilidad de integración y expresión estable de un transgen en microalgas, el plásmido pB2 (Anexo) se utilizó para intentar transformar por biobalística a la especie *Tetraselmis suecica*. Líneas transgénicas fueron seleccionadas por su capacidad de amortiguar el pH de un medio de crecimiento acidificado con aluminio (Sánchez, 1998).

2.7 CONSTRUCCIONES PARA SOBREEXPRESAR EN *E. Coli* EL GEN CS/P.a

El gen CS/P.a se amplificó por PCR (Guevara-García, et al.; 1997), empleando como templado el plásmido pKB (Donald, et al.; 1989) y como iniciadores de la reacción, los oligonucleótidos mostrados en la Figura 4.

Primer 5': ACCCGGGGATATCGGAGGCCATCATGCC
 Primer 3': AAAGCTTCGAGCTCGGGTTTGA GCGCG

Figura 4. Secuencia de oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen CS/P.a por PCR. Se muestran subrayados el codón de iniciación (ATG) y terminación de la transcripción del gen (TGA).

El producto de PCR (1303 pb), que incluye 10 pb hacia el extremo 5' del ATG y 6 pb hacia el extremo 3' del TGA, se clonó en el vector PCR™II de Invitrogen® (Anexo), de donde se subclonó en las diferentes versiones del vector de expresión pQE (30, 31 y 32) de QUIAGEN Inc. (QIAexpress System) como un fragmento EcoRV-HindIII. Previo a la subclonación, el producto de PCR se verificó por secuenciación coincidiendo 100% con lo reportado (Donald et al., 1989).

Con los diferentes vectores pQE se transformó la cepa MOB154 de *E. coli* gtlA (Wood, et al.; 1983), seleccionando la clona pQE32-CSMOB, por su capacidad de complementar la mutación y permitir el crecimiento de la mutante en medio mínimo (Figura 5).

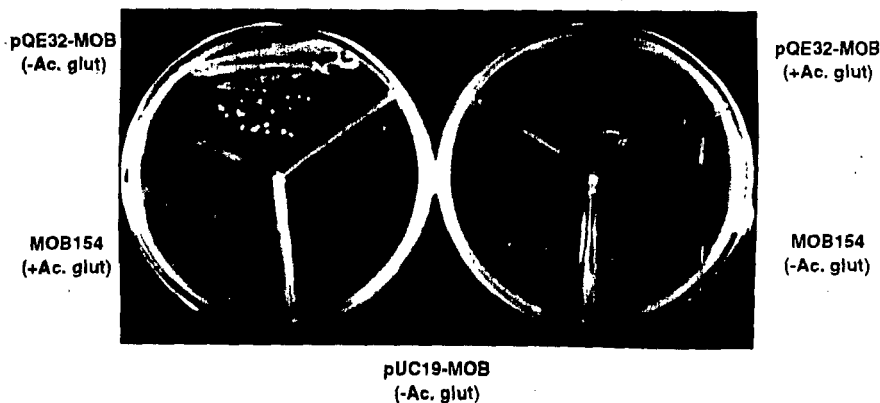


Figura 5. Cepa pQE32/CS-MOB en medio selectivo

III. HIPOTESIS

La enzima citrato sintasa de *P. aeruginosa* correspondiente a un producto de PCR, subclonado y sobreexpresado en *E. coli*, puede ser purificada por técnicas cromatográficas de afinidad y ser utilizada como antígeno para la producción de anticuerpos policlonales en conejo.

IV. OBJETIVOS

GENERALES

1. Sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante CS/P.a, producto de PCR, sobreexpresada en *E. coli*.
2. Producción de anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante.

PARTICULARES

- 1.1. Establecer el tiempo óptimo de máxima inducción de la CS/P.a clonada en *E. coli*, mediante el establecimiento de cinéticas de inducción.
- 1.2. Determinar la actividad de CS en cepas bacterianas portadoras de un producto de PCR correspondiente a la enzima CS de *Pseudomonas aeruginosa*.
- 1.3. Evaluar la expresión del transgen CS/P.a en líneas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y algas clorofitas (*Tetraselmis suecica*) mediante análisis de inmunodetección.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental diseñada para cumplir los objetivos planteados, incluye los siguientes pasos:

1. Establecimiento de cinéticas de inducción de la expresión de una proteína recombinante, clonada en el vector pQE-32, en la cepa MOB154 de *E. coli*.
2. Purificación de la enzima recombinante mediante cromatografía de afinidad metálica.
3. Inmunización de conejos, utilizando como antígeno la proteína purificada.
4. Obtención del antisuero de los conejos inmunizados.
5. Evaluación de la especificidad y título del antisuero.
6. Realización de ensayos tipo "Western-blot" sobre extractos proteicos de líneas transgénicas de microalgas y plántulas de tabaco que portan el gen CS/P.a.
7. Determinación de la actividad de citrato sintasa sobre líneas transgénicas de microalgas y plántulas de tabaco.
8. Comparación de las señales de inmunodetección con los niveles de las actividades enzimáticas de las líneas transgénicas evaluadas.

VI. MATERIAL Y METODOS

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para la purificación de la enzima, la producción de anticuerpos y los ensayos de inmunodetección se emplearon, respectivamente:

- 1) La cepa pQE32/CS-MOB de *E. coli*.
- 2) Un conejo hembra de 3 kg de la raza Nueva Zelanda, obtenido del Centro Nacional de Cunicultura (Km 4 Carretera Irapuato-León)
- 3) Líneas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L var. xanthi) Cit1 y Cit2, y líneas transgénicas de microalgas clorofitas (*Tetraselmis suecica*), ambas portadoras del gen CS/P.a.

6.2 REACTIVOS

Los reactivos utilizados son de grado analítico de las casas comerciales Bio-Rad, Difco, Gibco BRL, Merck, Pharmacia y Sigma. La formulación de los medios y soluciones utilizados se especifican en el Anexo.

6.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

6.3.1 Sobreexpresión de la enzima CS/P.a. en *E. coli*.

Cinéticas de inducción (Xpress™ System Protein Expression TrcHis).

- Inocular 2 ml de medio líquido LB/cb100 (Anexo) con la cepa pQE32/CS-MOB y crecer bajo agitación durante la noche a 37°C (preinóculo).
- Simultáneamente, incubar en las mismas condiciones, un matraz de 250 ml con 50 ml del medio líquido LB/cb100.
- Al día siguiente, inocular los 50 ml de medio con 250 µl del preinóculo y crecer hasta alcanzar A_{600} de 0.6 (4 h aproximadamente) (Espectrofotómetro DU640, Beckman Instruments, USA).

- Colectar dos muestras, una de 1 ml y otra de 1.5 ml. Marcar como T0 (tiempo cero).
- Agregar al cultivo IPTG a una concentración final de 1mM e incubar en agitación a 37°.
- Colectar muestras durante 5 h a intervalos de 1 h y etiquetar cada una como tiempos de inducción sucesivos (T1, T2...). A las muestras de 1 ml registrar A₆₀₀.
- Centrifugar las muestras de 1.5 ml (centrífuga eppendorf) a 14K, durante 2 minutos y respender las pastillas en 200µl de Buffer de fosfatos 0.1 M/pH 7.0 (Anexo).
- Congelar las muestras con N₂ líquido y descongelar en baño maría a 37°C, dos veces.
- Añadir lisozima (10mg/ml en tris pH 8.0), e incubar durante 30 min en hielo.
- Centrifugar a 14K por 2 min.
- Recuperar el sobrenadante y conservar las muestras a -20°C, hasta la cuantificación de proteína y análisis en SDS-PAGE.
- Para el análisis en SDS-PAGE, cargar 20µg de proteína total de cada muestra.

6.3.2 Determinación de la concentración y detección de la proteína.

Cuantificación de proteína por el Método de Bradford (Bradford, 1976).

- Del reactivo comercial de Bradford (Bio-Rad Laboratories), preparar una dilución 1:4 con agua desionizada.
- Mezclar en tubos eppendorf 990µl de la dilución del Reactivo de Bradford con 10µl de la muestra correspondiente, homogenizar la reacción durante 5 min., aproximadamente.
- Evaluar la A₅₉₅ de cada muestra, utilizando como blanco 1 ml de la dilución del Reactivo de Bradford. Referir la lectura correspondiente a una curva patrón elaborada previamente con BSA, para determinar la concentración de proteína en µg/µl.

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Desnaturalizante (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Preparar geles verticales de 1 mm, a una concentración del 5% de poliacrilamida para el gel concentrador y del 10% para el separador, según las especificaciones dadas en el Anexo. Resolver los geles a 30V hasta que las muestras alcancen el gel separador y entonces aumentar a 90V en una cámara Hoefer de 8 x 7 cm (Hoefer Scientific instruments), empleando Buffer de corrida para geles de poliacrilamida 1X (Anexo). Antes de ser cargadas en el gel, mezclar los μ l necesarios para la cantidad de proteína requerida en cada caso de las muestras con medio volumen de Buffer de carga Laemmli 4X (Anexo).

Tinción rápida de Coomassie para SDS-PAGE (Sambrook et al, 1989).

- Terminada la electroforesis, teñir el gel con Solución para tinción rápida de Coomassie (Anexo) en agitación, durante 1 hora, a temperatura ambiente.
- Retirar la solución, enjuagar con agua desionizada y añadir Solución para desteñir geles (Anexo). Mantener el gel en agitación, y cambiar varias veces la solución, hasta que las bandas de las proteínas sean visibles.

6.3.3 Purificación de la enzima.

Crece dos inóculos de la cepa pQE32/CS-MOB de la manera descrita para la cinética de inducción, sin realizar colecta cada hora de las muestras.

5 horas después de la adición de IPTG, proceder a la obtención de extractos proteicos y a la purificación de la enzima, utilizando los reactivos y recomendaciones del sistema para purificación de proteínas recombinantes Xpress™ System. Protein Purification, de Invitrogen®.

Obtención de extractos proteicos nativos.

- Centrifugar el cultivo (50 ml) a 10K durante 10 min en rotor Sorvall HB4.

- Resuspender la pastilla en 10 ml del Buffer de unión nativo pH 7.8 (Anexo).
- Añadir 100µg/ml de lisozima, e incubar la muestra en hielo durante 15 min. Simultáneamente, sonicar 3 veces a intensidad media, con pulsos de 10 seg (sonicador VirSonic 60, VirTis Inc.)
- Congelar en nitrógeno líquido y descongelar a 37°C en baño maría.
- Agitar el tubo y repetir este último paso una vez más.
- Adicionar RNAsa y DNAsa, ambas a una concentración final de 5µg/ml e incubar durante 15 min en hielo.
- Centrifugar a 10K durante 15 min para remover los desechos Insolubles.
- Recuperar el sobrenadante en tubos de vidrio y mantener a -20°C o en hielo hasta proceder a la purificación.

Obtención de extractos proteicos desnaturalizados.

- Equilibrar el Buffer de Lisis Guanidina (Anexo), a 37°C.
- Centrifugar el cultivo (50 ml) a 10K durante 10 min en rotor Sorvall HB4.
- Resuspender la pastilla en 10 ml del Buffer de Lisis Guanidina (Anexo) y agitar suavemente durante 5-10 min a temperatura ambiente.
- Sonicar el lisado celular, en hielo, con tres pulsos de 5 seg cada uno.
- Remover los desechos insolubles mediante centrifugación a 10K durante 15 min.
- Recuperar el sobrenadante en tubos de vidrio y mantener a -20°C o en hielo hasta proceder a la purificación.

Preparación de las columnas para la purificación.

Utilizar columnas con resina Ni-NTA de QIAGEN (QIAGEN Inc.), preparadas de la siguiente manera:

- Resuspender la resina invirtiendo la columna varias veces.
- Retirar ambas tapas de la columna y colocar en un tubo falcon 2059, centrifugar a 800xg durante 2 min en centrífuga de mesa refrigerada o sedimentar la resina por gravedad, en posición vertical durante 5-10 min.
- Agregar 7 ml de ADES a la columna y tapar los extremos.

- Resuspender como en el primer paso y centrifugar de la manera descrita anteriormente.
- Hacer un lavado más con ADES.
- Para hacer la purificación en condiciones nativas, añadir a la columna 7 ml de Buffer de unión nativo pH 7.8 (Anexo) y, para la purificación en condiciones desnaturizantes, añadir a la columna 7 ml de Buffer de unión desnaturizante (Anexo).
- Resuspender la resina y centrifugar de la manera descrita anteriormente.
- Hacer dos lavados más, con los buffers correspondientes, a cada columna y preceder a la purificación de la enzima.

Unión de la proteína a la columna.

- A cada columna (nativa y desnaturizante) añadir 5 ml del lisado bacteriano correspondiente, tapar y agitar, invirtiendo suavemente durante 10 min para permitir la unión de la proteína a la resina.
- Eluir el extracto destapando ambos extremos de la columna y dejarla en posición vertical durante 10 min.
- Añadir los 5 ml restantes de cada extracto a la columna correspondiente, y repetir el proceso de unión y elusión del extracto.

Elusión de la enzima bajo condiciones nativas.

- Lavar 2 veces la columna a la que se le unió el extracto nativo con 4 ml de Buffer de unión nativo pH 7.8. En cada lavado, resuspender la resina, agitando lentamente por inversión y eliminar el sobrenadante por centrifugación a 800xg durante 2 min en centrífuga de mesa refrigerada.
- Hacer 4 lavados como los anteriores con Buffer de lavado nativo (Anexo) pH 6.0 y centrifugar como en el paso anterior.
- Eluir la enzima recombinante, colocando la columna en posición vertical y quitando las tapas de ambos extremos. Aplicar consecutivamente 5 ml de cada uno de los Buffers de elusión imidazol en concentraciones crecientes (50 mM, 200mM, 350 mM y 500 mM) (Anexo) cada uno después de que el anterior haya eluido.
- Colectar fracciones de 1 ml en tubos eppendorf.

- Dializar estas fracciones contra ADES en agitación a 4°C, durante toda la noche.
- Determinar la concentración de proteína a cada una de las fracciones dializadas y conservar las muestras con las mayores concentraciones para analizar pureza y actividad específica mediante SDS-PAGE.

Determinación de la actividad enzimática específica para CS (Srere, 1969).

La actividad enzimática se determina mediante la reacción acoplada con DTNB:

- Preparar la mezcla de reacción con TBE (Anexo) 10 mM; DTNB 10 mM; oxalacetato 10 mM y 5 µg de proteína total.
- Iniciar la reacción añadiendo Acetil CoA a 10 mM. Seguir la cinética de actividad utilizando el programa Time Kinetics a 412 nm durante 1min de un Espectrofotómetro DU640 (Beckman Instruments, USA).
- Como blanco para cada muestra, utilizar la mezcla de reacción con ADES, en lugar de Acetil CoA.

Elusión de la enzima bajo condiciones desnaturalizantes.

- Lavar 2 veces la columna con 4 ml de Buffer de unión desnaturalizante (Anexo). En cada lavado, resuspender la resina, agitando lentamente por inversión y eliminar el sobrenadante por centrifugación a 800xg durante 2 min en centrífuga de mesa refrigerada.
- Hacer 2 lavados con 4 ml de Buffer de lavado desnaturalizante pH 6.0 (Anexo), resuspendiendo, agitando la columna suavemente durante 2 min y centrifugando entre cada paso como se describió anteriormente.
- Hacer otros 2 lavados con 4 ml de Buffer de lavado desnaturalizante pH 5.3 (Anexo); resuspendiendo, agitando y centrifugando la columna entre cada lavado.
- Eluir la proteína recombinante quitando ambas tapas de la columna y colocándola en posición vertical. Aplicar 5 ml de Buffer de elusión desnaturalizante (Anexo) pH 4.0, dejar eluir y colectar fracciones de 1ml.

- Dializar las fracciones durante toda la noche, en agitación a 4°. contra una solución elaborada de Tris pH 8.0, 10 mM con Tritón X-100 al 0.1%.
- Determinar la concentración de proteína en cada fracción y conservar las muestras con las mayores concentraciones para analizar pureza mediante SDS-PAGE y actividad específica.

Regeneración de las columnas

Las columnas empleadas en la purificación pueden regenerarse para usos posteriores (3 usos máximo) de la siguiente manera:

- Lavar dos veces la columna con 8 ml de EDTA 50 mM, para remover los iones Ni_2^+ quelados.
- Lavar dos veces con 8 ml de NaOH 500 mM y dos más veces con 8 ml de ADES.
- Recargar la columna con 16 ml de una solución acuosa de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ a 5 mg/ml.
- Lavar con 16 ml de ADES
- Adicionar etanol al 20% y conservar a 4°C, para posteriores usos.

Liofilización de las muestras

Una vez comprobada la pureza de la enzima en SDS-PAGE y determinada su actividad enzimática (en el caso de la proteína nativa), las muestras se liofilizan (Liofilizadora Speed Vac SC 110, Vacuum) y se conservan a -20°C.

6.3.4 Inmunización de conejos y recuperación de anticuerpos.

La inmunización se realizó con CS/P.a desnaturalizada, empleando muestras liofilizadas resuspendidas en PBS estéril (Anexo).

Esquema de inmunización.

- Inyección intradérmica en lomo con 65µg CS/P.a, resuspendidos en 1ml de PBS y emulsificado con 1ml de Adyuvante Completo de Freund. Hacer varias infiltraciones a lo largo del lomo.
- Reposo durante 10 días.

- Inyección intramuscular en muslo con 100 μ g CS/P.a, resuspendidos en 0.5 ml de PBS y emulsificados con 0.5 ml de Adyuvante Incompleto de Freund.
- Reposo durante 15 días.
- Inyección intravenosa en oreja con 100 μ g CS/P.a, resuspendidos en 1ml de PBS estéril (Anexo).
- Reposo durante 10 días.
- Inyección en cavidad del peritoneo: 150 μ g CS/P.a, resuspendidos en 0.5 ml de PBS estéril, hacer varias infiltraciones a lo largo de la cavidad.
- Reposo durante 15 días.
- Inyección intravenosa como se describió anteriormente.

Obtención del antisuero.

Como controles, tomar una muestra de aproximadamente 10 ml de sangre antes de comenzar la inmunización (suero preinmune) y a la mitad del ciclo de inmunización, antes de la primera inyección intravenosa (medio tiempo).

Recuperar el suero inmune de muestras de sangre de \approx 30 ml colectadas dos semanas después del último refuerzo intravenoso. El método empleado para el sangrado y la obtención del suero es el sugerido por Harlow and Lane (1988):

- Limpiar con etanol la oreja del conejo y localizar la vena marginal.
- Aplicar xilol sobre la vena y esperar 30 seg aproximadamente hasta observar dilatación de la vena.
- Hacer una incisión transversal con navaja estéril nueva y colectar la la sangre en tubos Falcon estériles.
- Una vez finalizado el sangrado, limpiar la oreja del conejo con abundante agua para eliminar el xilol.
- Dejar reposar la muestra de sangre a 37°C de 2-4 hrs, introduciendo una varilla de cristal estéril, para facilitar su coagulación.
- Separar el cuáguulo sacando la varilla del tubo y centrifugar el suero a 5K durante 10 min para limpiarlo.
- Pasar el sobrenadante a tubos de vidrio estériles y proceder a la precipitación de las IgG.

Precipitación y cuantificación de las Inmunoglobulinas totales.

- Centrifugar el suero a 15K durante 15 min a 4°C en rotor Sorvall HB4.
- Añadir sulfato de amonio (ultra puro) a razón de 29.1 g del reactivo por cada 100 ml de suero.
- Incubar en agitación 30 min a 4°C.
- Centrifugar a 10K durante 10 min a 4°C y resuspender el precipitado en 2 y medio volúmenes del suero original con PBS estéril (Anexo).
- Cuantificar las IgG presentes en el antisuero haciendo una dilución 1:20 de la muestra y midiendo la A_{280} .
- Determinar la cantidad total de proteína, con la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína total (mg)} = A_{280} \times \text{dilución} \times \text{volumen (ml)} / 1.4.$$
- Agregar azida de sodio al 0.02% al antisuero y conservar en alícuotas de 1 ml a -20°C y a -70°C. Algunas de las muestras se pueden conservar liofilizadas.

6.3.5 Especificidad y título de los anticuerpos

Resolver en SDS-PAGE 20µl de extractos proteicos crudos de las cepas de *E. coli* MOB154, pKB (control) y pQE32/CS-MOB. Incluir en el gel muestras con diferentes concentraciones de la enzima pura (control positivo), mezcladas con 50µg de proteína total de extractos de plántulas silvestres de tabaco. Hacer la electroforesis por duplicado en geles separados, emplear uno de ellos para la detección de proteína y el otro para la inmunodetección.

Realizar la titulación del antisuero en extractos crudos de cultivos inducidos con IPTG de la cepa pQE32/CS-MOB. Resolver en geles muestras separadas, cada una con 15µg del extracto proteico. Hacer la inmunodetección sobre diferentes secciones de membranas de nitrocelulosa procedentes de la electrotransferencia del gel, correspondientes al corrimiento de cada muestra, probando las siguientes diluciones de AntiCS: 1:1,000, 1:3,000, 1:5,000, 1:8,000, 1:10,000, 1:15,000, 1:20,000, 1:30,000 y 1:50,000.

Electrotransferencia del SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa, "Western-Blot".

Como matriz de inmovilización, se utilizan membranas de nitrocelulosa de 0.45 μ m (Gibco BRL). La electrotransferencia se realiza con una cámara Mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories). Las proteínas en SDS-PAGE se transfieren a las membranas, humedecidas con ADES 30min antes de su uso, y construir un el bloque de electrotransferencia, como el mostrado en la Figura 6. Aplicar 60V durante 45 min (el líquido en la cámara debe estar en agitación continua).

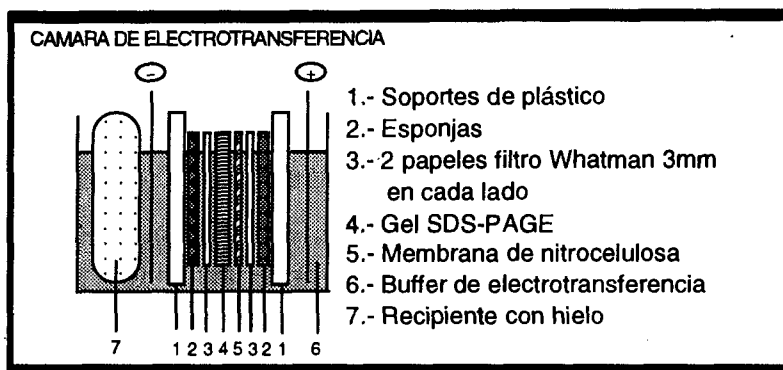


Figura 6. Esquema de electrotransferencia.

Inmunodetección con anticuerpos acoplados a Fosfatasa Alcalina (Towbin, 1979; Burnette, 1981).

- Enjuagar 3 veces la membrana con TBS (Anexo), para remover restos del buffer de electrotransferencia.
- Enjuagar con ADES y agregar el colorante Ponceau S (Anexo), manteniendo la membrana en agitación orbital durante 3 min .
- Enjuagar con ADES, hasta detectar las bandas correspondientes a las proteínas. Desteñir la membrana con TBS.
- Añadir Solución de bloqueo (Anexo) y dejar 2-4 hrs en agitación orbital, a temperatura ambiente.

- Cambiar la Solución de bloqueo por Solución de bloqueo con el anticuerpo a la dilución deseada y dejar en agitación orbital durante toda la noche a 4°C.
- Recuperar la solución y conservarla a -20°C. para posteriores usos.
- Enjuagar la membrana 3 veces con TBS (último enjuague durante 10min), e incubar durante 5min en TBS con 0.1% de BSA.
- Retirar la solución e incubar con Solución de bloqueo con el segundo anticuerpo (IgG de chivo Anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina) a una dilución 1:1000, durante 1 h en agitación orbital a temperatura ambiente.
- Retirar la solución con el segundo anticuerpo y enjuagar 3 veces la membrana con TBS (último enjuague durante 10 min).
- Equilibrar la membrana con Solución sustrato para fosfatasa alcalina (Anexo) Mantener durante 5 min en agitación orbital.
- Revelar la membrana utilizando 5 ml de la Solución sustrato para fosfatasa alcalina con 15µl de NBT y 15µl de BCIP (Gibco, BRL).

Titulación del antisuero con la enzima pura mediante inmunodetección en punto ("Dot-Blot").

- Cortar una membrana de nitrocelulosa al tamaño de la cámara y humedecer con ADES. Colocar en una cámara minifold (Filtration Minifold SRC-96/0, MINIFOLD®), sobre dos capas de papel filtro Whatman 3 MM, también humedecidas.
- Transferir 10ng de CS/P.a desnaturalizada pura, aplicando vacío.
- Procesar la membrana de la forma descrita para el "Western-blot", a partir de que se le añade la Solución de bloqueo. Realizar la inmunodetección en secciones de membrana correspondientes a un pozo, empleando diferentes diluciones de AntiCS 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:250 000, 1:500 000, 1:1 000 000 y 1:2 000 000.

6.3.6 Inmunodetección y determinación de actividad enzimática de CS en extractos proteicos de tabaco y algas.

Preparación de extractos proteicos de tabaco para la inmunodetección.

- Utilizar plantulas germinadas *in vitro* durante 1 mes en medio MS sólido, suplementado con kanamicina (100mg/ml) (Anexo).

- Preparar extractos crudos a partir de 0.3 g de tejido vegetal. Para ello, congelar y macerar las plántulas con N₂ líquido y resuspender en 900µl del Buffer de carga Laemlii para proteínas (Anexo).
- Calentar las muestras a 95°C durante 10-15 min y centrifugar en centrífuga eppendorf a 14K durante 2 min.
- Recuperar el sobrenadante y se emplear 25µl (60µg aprox.) de cada muestra para resolver en SDS-PAGE.
- Realizar el "Western-blot" con los geles de la manera antes descrita, usando una dilución de AntiCS 1:3000.

Preparación de extractos proteicos de tabaco para determinación de actividad enzimática de CS.

- A partir de 3 plántulas crecidas *in vitro*, de cada una de las líneas seleccionadas, se obtienen macerados que se resuspenden en 750µl de TBE (Anexo).
- Determinar la concentración de proteína de cada una de las muestras y emplear para medir actividad específica de CS a 20µg de proteína total, utilizando el protocolo descrito anteriormente.

Preparación de extractos proteicos de microalgas precipitados con sulfato de amonio.

- Concentrar 20 ml del cultivo de algas en fase estacionaria (Sánchez, 1998), en un tubo eppendorf, mediante centrifugaciones sucesivas a 14K durante 5 min, en alícuotas de 1.5 ml en el mismo tubo, para formar una pastilla densa.
- Macerar la pastilla en congelación con N₂ líquido y resuspender en 1.5 ml de Buffer de fosfatos 0.1 M/pH 7.0 (Anexo). Incubar en hielo durante 30 min.
- Centrifugar a 14K durante 2 min y recuperar el sobrenadante.
- Añadir al 0.18 g de sulfato de amonio (ultra puro), y homogenizar invirtiendo lentamente varias veces hasta que el sulfato de amonio se disuelva completamente.
- Centrifugar a 14K durante 2 min y recuperar el sobrenadante.
- Añadir al 0.46 g de sulfato de amonio y repetir el paso de homogenización.
- Centrifugar a 14K durante 5 min y recuperar el sobrenadante.

- Resuspender la pastilla en 150 μ l de Buffer de fosfatos 0.1 M/pH 7.0 (Anexo).
- Pasar el extracto a columnas Bio-Spin de 1.2 ml (Bio-Rad, Laboratories) cargadas con Sefadex-50, previamente equilibradas con Buffer de fosfatos 0.1 M/pH 7.0, y centrifugar a 5K durante 5 min, para remover el exceso de sales.
- Utilizar 10 μ g de proteína total de cada extracto para la inmunodetección por Wester-blot y para la determinación de actividad enzimática de CS, utilizando los protocolos descritos.

VII. RESULTADOS

7.1 SOBREENPRESION DE LA ENZIMA CS/P.a. EN *E. coli*.

Un gel de la cinética de inducción se muestra en la Figura 7. Como puede verse, hay inducción de una banda del peso molecular estimado para la CS recombinante (51 kD aprox.), alcanzándose un máximo de expresión después de 5 horas de la inducción con IPTG.

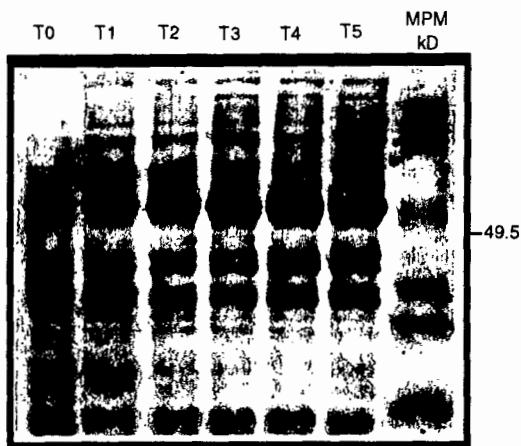


Figura 7. Cinética de inducción de la cepa pQE32/CS-MOB

En la Tabla 2, se incluyen los valores correspondientes a la absorbancia y concentración de proteína para cada tiempo de inducción, así como la actividad enzimática específica de CS, antes y 5 horas posteriores a la inducción. Se observa un aumento gradual en los valores de absorbancia y de proteína total, la cual alcanza su máximo a las 3 horas, para luego decaer. Por otro lado, 5 horas después de la inducción se observa una mayor concentración de la

banda inducida (Fig. 7), que coincide con un aumento de 10 veces en la actividad enzimática de CS (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de absorbancia, concentración de proteína y actividad de CS en los diferentes tiempos de inducción

TIEMPO DE INDUCCIÓN	A ₆₀₀	µg PROTEÍNA/µl MUESTRA	ACTIVIDAD (µmolCoA/µgPT/min)
T0	0.6090	0.60	1.0
T1	0.9484	0.71	---
T2	1.2550	0.88	---
T3	1.3411	0.89	---
T4	1.4142	0.77	---
T5	1.4860	0.69	100

(--- No estimada)

7.2 PURIFICACION DE LA ENZIMA

En la Figura 8 se muestra el SDS-PAGE de las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación de la proteína, tanto en condiciones nativas, como desnaturizantes. Como puede observarse, todas las fracciones contienen una proteína prácticamente pura del peso molecular estimado para CS.

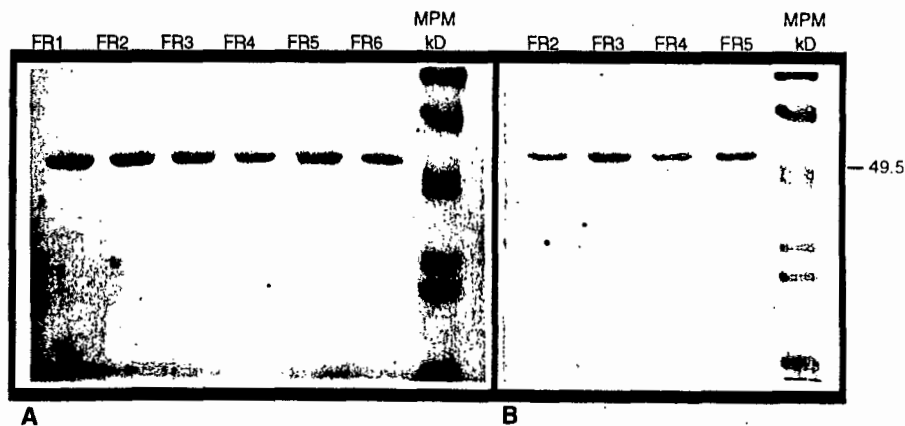


Figura 8. SDS-PAGE de las fracciones puras

A) Purificación nativa; B) Purificación desnaturizante (FR=Fracción)

En cada fracción se determinó la concentración de proteína total, considerando que cada fracción consta de 1 ml de eluido. En la Tabla 3 se registra la cantidad de enzima por 1µl de la fracción y la estimación de proteína total recuperada por cada 50ml del cultivo bacteriano, así como la actividad de las fracciones nativas, que demuestra que todas ellas conservaron su actividad.

Tabla 3. Proteína obtenida y actividad de CS en las fracciones nativas

FR	PROTEINA NATIVA (µg/µl)	ACTIVIDAD EN FR NATIVAS (mmCoA/mgPT/min)	PROTEINA DESNATURALIZADA (µg/µl)
1	0.05	25	0.20
2	0.11	150	0.20
3	0.02	250	0.27
4	0.02	250	0.29
5	0.71	250	- - -
6	0.05	250	- - -
TOTAL	960 mg	- - -	960 mg

7.3 INMUNIZACION Y RECUPERACION DE ANTICUERPOS

La cantidad total de IgG presentes en el suero sanguíneo del conejo aumentó conforme avanzó el programa de inmunización, tal como puede verse en la Tabla 4.

Al final del programa de inmunización, se registró un aumento aproximado del 43% en la concentración de IgG presentes en el suero con respecto al suero preinmune.

Tabla 4. Concentración de IgG en los sueros

SUERO	IgG TOTALES (mg/ml)	INCREMENTO (%)
Preinmune	4.17	- - -
Medio tiempo	4.48	7
Antisero final (AntiCS)	6	43

7.4 ESPECIFICIDAD Y TITULO DE LOS ANTICUERPOS

El antisero final se utilizó directamente para detectar la enzima CS/P.a en extractos de las cepas de *E. coli* y en extractos de plantas de tabaco mezclados con CS pura. En la cepa MOB154 (que no contienen el gen CS) no se detectó señal, al contrario de las cepa pKB

(de la cual se clonó originalmente la CS/P. a) y la cepa pQE32/CS-MOB (sobreexpresión del gen CS/P.a), en las cuales aparece la señal correspondiente a la enzima (Figura 9)

Debido a que la muestra de la cepa pQE32/CS-MOB se tomó 5 hrs después de haber transcurrido la inducción del gen, la sobreexpresión del mismo dió lugar a una mayor producción de la enzima, lo cual es evidente por una banda más gruesa (Carril 9, Fig. 9).

En cuanto a los extractos de plantas de tabaco, se puede ver que no se detecta señal en el extracto de la planta silvestre (Carril 6, Fig. 9). La detección sobre extractos vegetales de la enzima pura se realizó para comprobar que ningún compuesto presente en estos tejidos interfiere en la inmunodetección de la enzima. Se observa que en mezclas de estos extractos con diferentes concentraciones de la enzima purificada, el AntiCS detecta una banda de peso molecular correspondiente a la enzima, con un límite de detección de 100 ng (Carriles 1-5, Fig. 9).

En cuanto a la titulación del suero AntiCS, se encontró que fue capaz de detectar 10ng de la enzima pura hasta un límite de dilución de $1:2 \times 10^6$ (Fig. 10) y en una dilución de 1: 50 000 en 10 μ g de extracto proteico de la cepa pQE32/CS inducida con IPTG (Fig. 11).

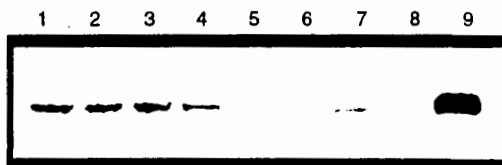


Figura 9. Inmunodetección con AntiCS. Dilución del anticuerpo 1:1000.

Los carriles 1-6 corresponden a los extractos de plantas silvestres de tabaco mezclados con las siguientes concentraciones de CS/P.a pura:

- 1) 1 μ g, 2) 750ng, 3) 500ng, 4) 250ng, 5) 100ng, y 6) -CS.
- Los extractos de las cepas de *E. coli* se muestran en los carriles:
- 7) pKB, 8) MOB154, y 9) pQE32/CS-MOB.

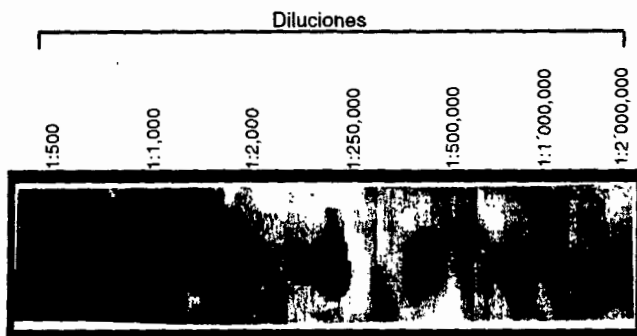


Figura 10. Titulación del suero AntiCS con la enzima pura

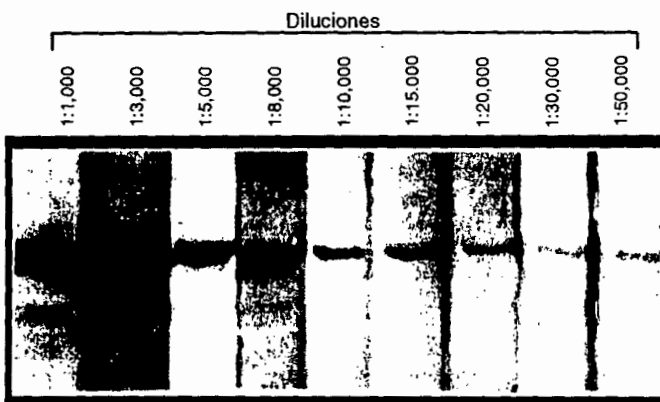


Figura 11. Titulación del suero AntiCS en extractos de pQE32/CS-MOB

7.5 INMUNODETECCION DE CS EN EXTRACTOS PROTEICOS DE TABACO TRANSGENICO

Para detectar la enzima en extractos de plantas transgénicas de tabaco, se utilizó una dilución del AntiCS en 1:3000. Inicialmente, se analizaron algunas líneas para comprobar la inmunodetección de la enzima. Como se observa en la Figura 12, en diferentes muestras con aproximadamente la misma cantidad del extracto proteico (Panel A), se detecta la presencia de diferentes niveles de CS (Panel B), los cuales pueden corresponder a su nivel de expresión.

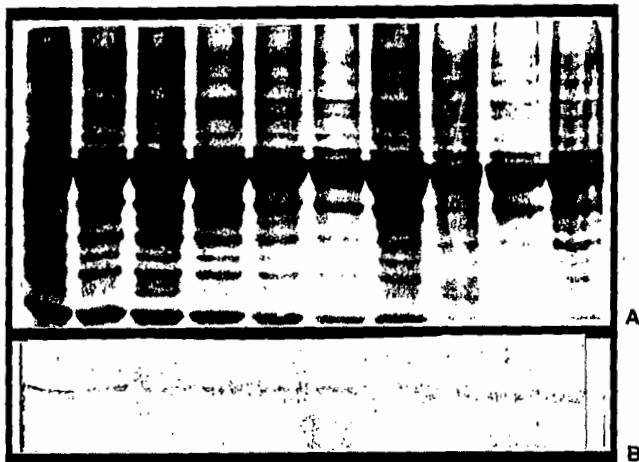


Figura 12. Inmunodetección en extractos de tabaco
A) SDS-PAGE; B) Western-blot

En total, se analizaron 61 líneas de plantas transgénicas de tabaco, y se seleccionaron 9 líneas, que mostraron diferente intensidad de la señal de CS (Figura 13).

En la Tabla 6, se muestran los valores de actividad enzimática de las líneas transgénicas seleccionadas, y como puede verse, al compararse la actividad con la señal de inmunodetección, parece haber una relación directa entre ambas variables. Esto confirma que la enzima, producto del gen heterólogo, está activa dentro de plantas y que su actividad pudiera correlacionarse con la intensidad de las bandas detectadas mediante el "Western-blot".

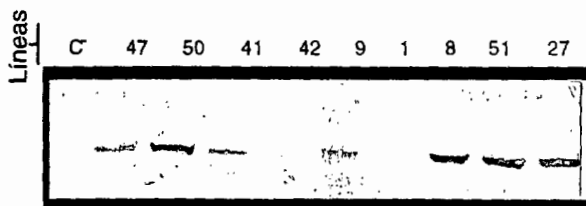


Figura 13. Western-blot de las muestras seleccionadas de tabaco

Tabla 5. Actividad enzimática de CS de las líneas de tabaco seleccionada

LÍNEA	ACTIVIDAD ($\mu\text{mCoA}/\mu\text{gPT}/\text{mIn}$)	INCREMENTO EN ACTIVIDAD
C	3.5	---
50	11	3.1
47	5	1.4
41	6	1.7
42	6.5	1.8
9	9	2.5
1	5	1.4
8	9	2.5
51	9	2.5
27	8	2.2

7.6 INMUNODETECCION DE CS EN EXTRACTOS PROTEICOS DE MICROALGAS

El resultado de la inmunodetección de la enzima CS en líneas transgénicas de microalgas se muestra en la Figura 14, en ella se observa que si bien en estos extractos el antisuero reacciona inespecíficamente con otras proteínas (bandas superiores), el anticuerpo también detecta bandas correspondientes a la CS, que coinciden con la banda presente en el control positivo (Carril 6), representado por la línea 8 de tabaco transgénico (Fig. 13, Carril 8).



Figura 14. Western-blot de las líneas transgénicas de microalgas
Carriles: 1) Línea 3, 2) Línea 16, 3) Línea 20, 4) Línea 21, 5) silvestre, y 6) Línea 8, tabaco transgénico.

Los bajos niveles de detección de CS en el "Western-blot" de las microalgas, coinciden con los resultados de la actividad enzimática (Tabla 7), en donde el mayor incremento de actividad, con respecto al control negativo (carril 5), fue de aproximadamente 1.7 veces. Esto reafirma que los niveles de inmunodetección pueden relacionarse directamente con la actividad enzimática del producto del transgen.

Tabla 6. Actividad de CS en líneas transgénicas de microalgas

LÍNEA	ACTIVIDAD ($\mu\text{mCoA}/\mu\text{gPT}/\text{min}$)	INCREMENTO EN ACTIVIDAD
Silvestre	1.28	- - -
3	2.22	1.73
16	2.03	1.58
21	1.62	1.27
20	2.08	1.63

VIII. DISCUSION

La cinética de inducción del gen de la enzima CS/P.a, clonada en el vector de expresión pQE, se hizo con la intención de encontrar el tiempo de máxima producción de la misma en *E. coli*, el cual es diferente para cada proteína que se desee sobreexpresar utilizando estos vectores (Invitrogen®. Xpress™ System Protein Purification). En nuestro caso, se observa que la mayor expresión de la CS se alcanza después de 5 horas de haber inducido el medio con IPTG (Fig. 7). Entre las 4 y 5 horas, no se observa diferencia significativa en aumento de la densidad de la banda que corresponde al peso molecular estimado para la CS/P.a recombinante, si bien, la densidad de células en el cultivo aumenta y la concentración de proteína total por ml de muestra disminuye (Tabla 2). Con base en estas observaciones, puede suponerse que la producción de la enzima no aumentará significativamente a mayores tiempos de inducción. Además, como la densidad de la banda correspondiente no disminuye, puede suponerse que la disminución en la concentración de proteína total en el T5 corresponde a otras proteínas presentes en el extracto y no a la CS, y por lo tanto, en el extracto del T5, hay más enzima en relación a otras proteínas que en el T4.

La banda que aumentó en el transcurso del tiempo de inducción corresponde al peso molecular estimado a la CS/P.a (Donald et al., 1989). Sin embargo, se midió actividad enzimática a los extractos, previo a la inducción (T0) y mayor producción de la enzima (T5), para comprobar su asociación con la CS. Como se observa en la Tabla 2, la actividad enzimática aumentó significativamente en respuesta al tratamiento inductivo. Así, puede asumirse que la proteína cuya producción aumenta como consecuencia de la inducción con IPTG, corresponde a la CS. Tomando en cuenta este resultado y considerando

la cinética de producción, se seleccionó un tiempo de 5 horas de inducción, para proceder a la purificación de la enzima.

Para comparar los rendimientos entre ambos métodos, la purificación de la enzima se realizó en condiciones nativas y desnaturalizantes para seleccionar aquel que diera los mejores resultados. En ambos casos, la cantidad de enzima recuperada, así como su pureza fueron similares (Tabla 3 y Fig. 8). La actividad enzimática de CS se midió en las fracciones nativas, obteniéndose niveles de actividad elevados, como era de esperarse para fracciones puras (Tabla 3). Por otro lado, en cuanto a la elusión de la enzima nativa, se observó que la enzima eluye en las primeras 6 fracciones, que se obtienen al emplear las dos primeras concentraciones de imidazol del buffer de elusión usado para la purificación. De tal manera, puede establecerse que el método de purificación nativa puede simplificarse, eliminando el uso de las dos últimas concentraciones del buffer de elusión.

El método aquí descrito para la purificación de proteína, de fusión del gen a una secuencia que codifica para una cola de polihistidinas, complementado con la purificación del producto en resinas Ni₂, resulta muy eficiente para la purificación de proteínas recombinantes (Hengen, 1995); además, sobrepasa a los métodos convencionales de purificación, que por lo general producen niveles de recuperación bajos (Schmitt et al., 1993). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo se ven apoyados por los resultados de Connaris (1998), quien en la purificación de la CS de la arqueobacteria *Sulfolobus solfataricus*, obtuvo 28 mg de enzima pura por litro de cultivo (Connaris, et al.; 1998). Por nuestra parte, nosotros recuperamos aproximadamente 19 mg de enzima por litro de cultivo (Tabla 3). La purificación de la CS/P.a y la CS de otras bacterias, como *E. coli* y *Acinetobacter*, había sido reportada anteriormente mediante el uso de cromatografía de intercambio iónico (Duckworth and Bell, 1982; Donald and Duckworth, 1986; Donald et al., 1989), y aunque no se reportan cifras en cuanto al rendimiento, la ventaja del método empleado por nosotros reside en la purificación rápida y eficiente de la enzima en un solo paso.

Una vez obtenida la proteína pura, la inmunización de conejos para la obtención de anticuerpos puede realizarse con proteína nativa o desnaturalizada, sin embargo, cuando se dispone de ambas opciones, es preferible utilizar enzima desnaturalizada. En estas condiciones, la proteína presenta más sitios antigénicos expuestos, y por lo tanto, se generan más clones de células B, productoras de anticuerpos dirigidos contra la enzima, y en consecuencia, se aumenta considerablemente el nivel de detección de los anticuerpos contra la enzima de interés.

El grado de pureza de la enzima, junto con el esquema de inmunización diseñado, resultó en un incremento gradual de la concentración de inmunoglobulinas en el antisuero (Tabla 4). Estos resultados coinciden con la afirmación de que cuando se dispone de una buena cantidad de antígeno puro para realizar inmunizaciones repetidas, es posible obtener anticuerpos policlonales específicos con alta afinidad (Klinman and Press, 1975). El aumento de la concentración de las inmunoglobulinas entre el suero preinmune y el antisuero final (43%), puede suponerse en gran medida resultado del incremento de las IgG dirigidas contra CS/P.a. Esta suposición se confirmó con los ensayos de inmunodetección, en los que se observa una fuerte especificidad del antisuero por la enzima (Fig. 9). De igual manera, la titulación del antisuero, que aún en diluciones muy elevadas fué capaz de reconocer, tanto a la enzima presente en extractos de *E. coli* (dilución 1:50 000), como a la enzima pura (dilución 1:2 000 000), confirma la alta concentración de IgG contra la CS/P.a presentes en la sangre del conejo inmunizado con la enzima desnaturalizada pura.

Es importante resaltar el hecho de que la CS es una enzima muy conservada durante el transcurso de la evolución de todos los organismos, y por lo tanto, el nivel de especificidad alcanzado sobrepasa lo esperado por nosotros. También es importante recordar que nuestro gen, clonado en el vector de expresión, es un producto de PCR susceptible a sufrir mutaciones puntuales que pueden alterar la estructura primaria de la proteína y el reconocimiento de sitios antigénicos por las IgG.

En función de los resultados descritos y de nuestros objetivos, se decidió utilizar directamente el antisuero, para los ensayos

dirigidos contra extractos de plantas de tabaco, a una dilución 1:3000, y no purificar las IgG.

Sobre los extractos de bacterias, el antisuero producido mostró una alta especificidad por la CS/P.a presente en extractos de plantas transgénicas de tabaco (Fig. 12), y resultó mejor que el producido por Donald (Donald, et al.; 1989), el cual se utilizó previamente para la detección de la enzima en las líneas transgénicas de tabaco y papaya, reportadas por De la Fuente (De la Fuente, et al.; 1998), a una dilución 1:500 (Comunicación personal).

El análisis de las líneas transgénicas de tabaco se realizó con la idea de seleccionar tanto aquellas que presentaran señal más intensa, como líneas con niveles contrastantes de CS. Las líneas seleccionadas mediante estos ensayos se pretenden utilizar para experimentos sobre el comportamiento fisiológico de las plantas bajo diferentes condiciones de cultivo y en respuesta a condiciones adversas.

Por otro lado, el análisis de las líneas transgénicas de microalgas se realizó con la finalidad de comprobar la expresión estable del gen CS y utilizar los anticuerpos para verificar eventos de transformación sobre otras especies de algas.

Para confirmar la utilidad de la selección con anticuerpos, a las líneas seleccionadas de tabaco y microalgas se les midió actividad enzimática, comprobando que existe una estrecha relación entre la densidad de la banda presente en el "Western-blot" (Figs. 13 y 14), y los valores de actividad de CS en cada una de las muestras analizadas (Tablas 5 y 6). De tal manera, los anticuerpos producidos contra la CS/P.a son empleados en la selección de individuos con niveles altos y/o bajos de CS. Así, la producción de estos anticuerpos resulta de gran utilidad como apoyo para la línea de investigación que pretende esclarecer el papel de la CS en la tolerancia al Al^{3+} y otras condiciones desfavorables.

Finalmente, cabe mencionar que durante el desarrollo del presente trabajo, se utilizaron técnicas novedosas de DNA recombinante, actualmente utilizadas por varios grupos de investigación en el mundo y que representan tecnología de frontera en el área biológica (Canton et al., 1996; Kawakami et al., 1997; Shapira et al., 1997).

IX. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas del presente trabajo son:

- 1) Se logró la sobreexpresión de un producto de PCR de la CS/P.a en *E. coli*.
- 2) El tiempo óptimo de inducción para la CS/P.a en *E. coli* es de 5 horas.
- 3) Se logró purificar la CS/P.a tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes, mediante cromatografía de afinidad metálica, obteniéndose un rendimiento de alrededor de 1 mg de enzima por cada 50 ml de cultivo, en ambas condiciones
- 4) Se obtuvieron anticuerpos policlonales en conejo específicos contra la CS/P.a, los cuales permiten la detección de la misma en extractos de plantas transgénicas de tabaco y microalgas de manera específica y reproducible.
- 5) El antisuero AntiCS permite la inmunodetección de CS/P.a tanto en estado puro, como en extractos de *E. coli* y plantas, con los siguientes niveles de detección:

Enzima pura (10ng) 1:2 000 000
Extractos de <i>E. coli</i> (15µg) 1:50 000
Extractos vegetales (20µg) 1:3000
Extractos de microalgas (10µg) 1:1000

X. PERSPECTIVAS

Tanto la proteína purificada como los anticuerpos derivados del presente trabajo pueden ser utilizados posteriormente para los siguientes fines:

- Implementación de la técnica de inmunodetección ELISA ("Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assays") para el análisis rápido de numerosas muestras.
- Selección de líneas de plantas transgénicas sobresalientes por análisis de inmunodetección, de especies vegetales que se están produciendo en el laboratorio (maíz, arroz, papa).
- Análisis de la expresión diferencial y/o inducible en tejidos y etapas de desarrollo, sobre plantas transgénicas portadoras del gen CS/P.a.

XI. BIBLIOGRAFIA

- Ashworth, J. M.; Nothmahn D. L. and Kornberg, H. L. (1965). Location of the structural gene for citrate synthase on the chromosome of *Escherichia coli* K12. *Journal of Molecular Biology*, **11**:654-657.
- Ausbel, F. M. et al. eds. (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*. V. 2. John Wiley and Sons, Inc., USA. Vol 2.
- Bohinski, R. C. (1991). *Bioquímica*. 5a. ed. Addison-Wesley Iberoamericana, USA. 739 pp.
- Bollag, D. M.; Rozycki, M. D. and Edelstein, S. J. (1996). *Protein Methods*. 2nd. ed. Willey-Liss Inc., USA. 415 pp.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal Biochem.* **72**:248-254.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-poliacrilamide gels to unmodified nitrocelulose and radiographic detection with antibody and radiotinated protein A. *Annal Biochem.* **112**:195-203.
- Canton, F. R.; García-Gutiérrez, A.; Crespillo, R. and Canovas, F. M. (1996). Hight-level expression of *Pinus sylvestris* glutamine synthetase in *Escherichia coli*. Production of polyclonal antibodies against the recombinante protein and expression studies in pine seedlings. *FEBS Letters.* **393**:205-210.
- Connaris, H.; West, S. M.; Hough, D. W. and Danson, M. J. (1998). Cloning and overexpression in *Escherichia coli* of the gene encoding citrate synthase from the hyperthermophilic Archeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles.* **2**:61-66.

- De la Fuente, J. M.; Ramírez-Rodríguez, V.; Cabrera-Ponce, J. L. and Herrera-Estrella, L. (1998). Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science*. **276**:1566-1568.
- Delhaize, E. and Ryan, P. R. (1995). Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* **107**:315-321.
- Donald L. J.; Molgat, G. F and Duckworth, H. V. (1989) Cloning, sequencing, and expression of the gene or NADH-sensitive citrate synthase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. **171**:5542-5550.
- Duckworth, H. W. and Bell, A. W. (1982). Large-scale production of citrate synthase from a cloned gene. *Can. J. Biochem.* **60**:1143-1147.
- Faloon, G. R. and Srere P. A. (1969). *Escherichia coli* citrate synthase. Purification and the effect of potassium on some properties. *Biochemistry*. **8**:4497-4503.
- Foy, C. D., Chaney, R. L. and White, M. C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**:511-523.
- Guevara-García, A.; Herrera-Estrella, L. and Olmedo-Alvarez, G. (1997). Use of PCRs in Plant Molecular Biology. In: Clarck, M. S. (ed). *Plant Molecular Biology*. Springer-Verlag, England. p 54-74.
- Gilvarg, C. and Davis B. D. (1956). The role of the tricarboxylic acid cycle in acetate oxidation in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. **222**:307-319.
- Guest, J. R. (1980). Hybrid plasmids containing the citrate synthase gene (*gltA*) of *Escherichia coli* K12. *Journal of General Microbiology*. **124**:17-23.
- Harford, S. and Weitzman, P. D. J. (1975). Evidence for isosteric and allosteric nucleotide inhibition of citrate synthase from multiple-inhibition studies. *Biochem J.* **151**:455-458.
- Harlow, E. and Lane D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.

- Hengen, P. (1995). Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*. Trends Biochem Sci. 20:285-286.
- Herrera-Estrella, L. (1998). Plantas resistentes al aluminio: la biotecnología al rescate de los bosques tropicales. Avance y Perspectiva. 17:167-169.
- Higa, A. L.; Massarini, E. and Cazzulo, J. J. (1978). Purification and some properties of the citrate synthase from marine *Pseudomonas*. Can J. Microbiol. 24:215-221.
- Hue, N. V.; Craddock, G. R. and Adams, F. (1986). Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. Soil Sci. Soc. Am. J. 50:28-34.
- Hurtado M., D. V. y Merino M., M. E. (1987). Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas, México. 232 pp.
- Invitrogen®. Xpress™ System Protein Expression TrcHis: A Manual of Methods for Expression of Polyhistidine-Containing Recombinant Proteins Using the pTrcHis Vector System. Version 2.2.
- Invitrogen®. Xpress™ System Protein Purification: A Manual of Methods for Purification of Polyhistidine-Containing Recombinant Proteins.
- Kato, A.; Hayashi, M.; Mori, H. and Nishamura, M. (1995). Molecular characterization of a glyoxysomal citrate synthase that is synthesized as a precursor of higher molecular mass in pumpkin. Plant Molecular Biology. 27:397-390.
- Kawakami, Y.; Battles, J. K.; Kobayashi, T.; Ennis, W.; Wang, X.; Tupesis, J. P.; Marincola, F. M.; Robbin, P. F.; Hearing, V. J.; Gonda, M. A. and Rosenberg, S. A. (1997). Production of recombinant MART-1 proteins and specific antiMART-1 polyclonal and monoclonal antibodies: use in the characterization of the human melanoma antigen MART-1. J. Immunol Methods. 202:13-25.
- Klinman, N. R. and Press, J. (1975). The B Cell specificity repertoire: Its relationship to definable subpopulations. Transplant. Rev. 24:41-83.
- Laemli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.

- Lehninger, A. L. (1982). *Bioquímica: Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular*. 2a. ed. Omega, España. 1117 pp.
- Lewin, B. (1994). *Genes V*. Oxford University Press, USA. 1272 pp.
- Manchenko, G. P. (1994) *Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels*. CRC Press, USA. 341 pp.
- Mason, C. F. (1996). *Biology of Freshwater Pollution*. 2nd. ed. Longman Scientific & Technical, USA. 351 pp.
- Massarini, E. and Cazzulo, J. J. (1975). Two forms of citrate synthase in a marine pseudomonad. *FEBS Letters*. **57**:134-138.
- Miur, J. M.; Russell, R. J.; Hough, D. W. and Danson, M. J. (1995). Citrate synthase from the hyperthermophilic Archean, *Pyrooccus furiosus*. *Protein Eng.* **8**:583-592.
- Pullen, A. J.; Budgen, N.; Danson, M. J and Hough, D. W. (1985). Citrate synthase: an immunochemical investigation of interspecies diversity. *FEBS Letters*. **182**:163-166.
- Remington, S. J. (1992). Structure and mechanism of citrate synthase. *Current Topics in Cellular Regulation*. **33**:209-229.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. ed. 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. Vol 2.
- Sánchez A., E. L. (1998) *Transformación Genética de la Microalga *Tetraselmis suecica*, Mediante la Biobalística*. Tesis (Biólogo) Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C.N. 90 pp.
- Shapira, R.; Paster, N.; Menasherov, M.; Eyal, O.; Mett, A.; Meiron, T.; Kuttin, T. and Salomon, R. (1997). Development of polyclonal antibodies for detection of aflatoxigenic mold involving culture filtrate and chimeric proteins expressed in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* **63**:990-995.
- Schmitt, J.; Hess, H. and Stunnenberg, H. G. (1993). Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Mol. Biol. Rep.* **18**:223-230.

- Srere, P. A.; Brazil, H. and Gonen, L. (1963). The citrate condensing enzyme of pigeon breast muscle and moth flight muscle. *Acta Chem. Scand.* **17(S)**:129-134.
- Srere, P. A. (1969). Citrate synthase. *Methods in Enzymology.* **13**:3-11.
- Stryer, L. (1995). *Biochemistry.* 4th. ed. Freeman and Co., USA. 1064 pp.
- Sutherland, K. J.; Danson, M. J.; Hough, D. W. and Towner, P. (1991). Expression and purification of plasmid-encoded *Thermoplasma acidophilus* citrate synthase from *Escherichia coli*. *FEBS Letters.* **282**:132-134.
- Taylor, G. J. (1988). The physiology of aluminum phytotoxicity (In: *Metal Ions in Biological Systems: Aluminum and its Role in Biology.* Driscoll and Scherer Eds.) p 123-163.
- Towbin, H.; Staehelin, T. and Gonen, L. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**:4350-4354.
- Voegel, H. and Bonner, D. M. (1956). A convenient growth medium for *E. coli* and some other microorganisms. *Microbial Genetics Bulletin.* **13**:43-44.
- Wolfe, S. L. (1993). *Molecular and Cellular Biology.* Wodsworth, Inc., USA. 1145 pp.
- Wood, D. O.; Atkinson, W. H.; Sikorski, R. S. and Winkler, H. H. (1983). Expression of the *Rickettsia prowazekii* citrate synthase gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* **155**:412-416.

XII. ANEXO

12.1. MEDIOS Y SOLUCIONES

12.1.1 MEDIO DE CULTIVO PARA LA CEPA MOB154 (Vogel & Bonner, 1956)

Solución stock (5X)

En 670 ml de agua destilada añadir:

MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
Acido cítrico·H ₂ O	10 g
K ₂ HPO ₄ ·anhídrido	50. g
NaNH ₄ PO ₄ ·4H ₂ O	17.5 g

Preparación (250 ml)

- A 50 ml de la solución stock añadir 150 ml de agua destilada, ajustar pH 7.0 y agregar 0.8% de bacto-agar.

Esteriliza en autoclave.

Suplementos (Wood, et al., 1983)

Cuando el medio está todavía tibio, añadir en campana:

- 50 ml de agua destilada con 1.25 g de glucosa (concentración final 5 g/L), esterilizada en autoclave.

- L-Acido glutámico (2 mM), tiamina·HCl (2 µg/ml) y uracilo (40 µg/ml), preparados en soluciones patrón concentradas previamente esterilizados mediante ultrafiltración.

12.1.2 CINÉTICAS DE INDUCCIÓN

Medio LB/cb100

Para 1L, añadir a 950 ml de agua desionizada:

1.0%	Bacto-triptona
0.5%	Extracto de levadura
1.0%	NaCl

Agitar hasta que los solutos se hayan disueltos, ajustar pH a 7.0 con NaOH y aforar la solución a 1L. Añadir bacto agar 18 g/L y esterilizar en autoclave. Suplementar con 100 mg/ml de carbenicilina.

Buffer de Fosfatos pH 7.0/0.1M

Solución 1: Fosfato de Sodio Dibásico 0.2 M

Solución 2: Fosfato de Sodio Monobásico 0.2 M

Esterilizar las soluciones 1 y 2 en autoclave y mezclar: 30.5 ml de la solución 1, 19.5 ml de la solución 2 y 50 ml de ADES.

12.1.3 DETECCIÓN DE LAS PROTEINAS

Acrilamida al 30%*

Acrilamida 285 g

Bisacrilamida 15 g

ADES 700 ml

A la solución anterior, agregar 20 g/L de resina para desionizar y mantener en agitación lenta durante 1 h. Filtrar en papel Whatman 3MM y aforar a 1L. Se guarda en frasco de plástico a 4°C.

*Para su preparación utilizar guantes, bata y gafas protectoras.

Geles de poliacrilamida

Gel concentrador al 5%. Para 6 ml:

- Acrilamida al 30% 1.00 ml
- Tris 1M, pH 6.8 0.75 ml
- Agua desionizada 4.25 ml
- SDS 20% 30 µl
- Temed 8 µl
- Persulfato de Amonio al 10% 30 µl

Gel separador al 10%. Para 20 ml:

- Acrilamida al 30% 6.66 ml
- Tris 1M, pH 6.8 7.52 ml
- Agua desionizada 5.82 ml
- SDS 20% 100 µl
- Temed 20 µl
- Persulfato de Amonio al 10% 100 µl

Buffer de Corrida Laemlii 4X (100 ml)

Tris base 0.605 g

SDS 4 g

Glicerol 40 ml

Azul de Bromo Fenol 50 mg

β-mercaptoetanol 5 ml

Buffer de Corrida para Geles de Poliacrilamida (10X)

SDS 10 g

Tris base 30 g

Glicina 144 g

Ajustar pH a 8.5 y aforar a 1L con agua desionizada estéril

Solución para Tinción Rápida de Coomassie

Azul de Coomassie 2 g

Metanol 300 ml

Acido glacial acético 100 ml

Añadir el azul de Coomassie al ácido acético glacial y disolver, luego añadir el metanol y aforar a 1L con agua destilada.

Solución para desteñir geles

Metanol 100 ml

Acido acético glacial 100 ml

Aforar a 1L con agua desionizada

12.1.4 PURIFICACION DE LA PROTEINA

Hacer diluciones 1X de las soluciones A (10X: 200 mM NaH_2PO_4 ; 5M NaCl) y B (10X: 200 mM Na_2HPO_4 ; 5M NaCl) del sistema para purificación de proteínas, Protein Expression and Purification (Invitrogen® Xpress™ System) con ADES. Preparar 100 ml de cada una para cada purificación.

Buffer de Unión Nativo pH 7.8

Contenido en el sistema de purificación, para 50 ml: combinar 2.9 ml de solución A (1X) y 47.1 ml de la solución B (1X). Ajustar pH a 7.8 usando la solución B (1X) para alcalinizar pH y la solución A (1X) acidificar.

Buffer de Lavado Nativo pH 6.0

Contenido en el sistema de purificación, para 50 ml: combinar 37 ml de solución A (1X) y 13 ml de solución B (1X). Ajustar pH a 6.0, de la manera descrita.

Buffer de Lisis Guanidina

Contenido en el sistema de purificación. Ajustar pH a 7.8 usando, si es necesario NaOH 1N y HCl 1N.

Para su preparación en laboratorio:

6M Guanidina·HC

20 mM Fosfato de Sodio (monobásico y dibásico)

500 mM NaCl

Buffers de Elusión imidazol

Contenidos en el sistema de purificación, combinar los siguientes volúmenes de Buffer Nativo de Lavado pH 6.0 y solución stock Imidazol 3M pH 6.0:

	<u>Imidazol 3M</u>	<u>Buffer Nativo de Lavado</u> <u>pH 6.0</u>
50 mM	0.08 ml	4.92 ml
200 mM	0.33 ml	4.67 ml
350 mM	0.58 ml	4.42 ml
500 mM	0.83 ml	4.17 ml

Buffer de Unión Desnaturalizante

Contenido en el sistema de purificación. Ajustar pH a 7.8 usando, si es necesario NaOH 1N y HCl 1N, para alcalinizar y acidificar, respectivamente.

Para su preparación en laboratorio:

8 M	Urea
20 mM	Fosfato de Sodio (monobásico y dibásico)
500 mM	NaCl

Buffer de Lavado Desnaturalizante pH 6.0

Contenido en el sistema de purificación. Ajustar pH a 6.0 a 10 ml del Buffer Desnaturalizante de Lavados contenido en el sistema de purificación, usando NaOH 1N y HCl 1N.

Para su preparación en laboratorio:

8 M	Urea
20 mM	Fosfato de Sodio (monobásico y dibásico)
500 mM	NaCl

Buffer de Lavado Desnaturalizante pH 5.3

Contenido en el sistema de purificación. Ajustar pH a 5.3 a 10 ml del Buffer Desnaturalizante de Lavados contenido en el sistema de purificación, usando NaOH 1N y HCl 1N.

Para su preparación en laboratorio:

8 M	Urea
20 mM	Fosfato de Sodio (monobásico y dibásico)
500 mM	NaCl

Buffer de Elusión Desnaturalizante pH 4.0

Contenido en el sistema de purificación. Ajustar pH a 4.0 a 10 ml del Buffer Desnaturalizante de Lavados contenido en el sistema de purificación, usando NaOH 1N y HCl 1N.

Para su preparación en laboratorio:

8 M	Urea
20 mM	Fosfato de Sodio (monobásico y dibásico)
500 mM	NaCl

12.1.5 ACTIVIDAD ENZIMATICA

Buffer Tris-Boratos/EDTA (TBE) (5X/100 ml)

Tris base	5.40 g
Acido bórico	2.75 g
EDTA 0.5 M	2 ml

Esterilizar en autoclave

Acetilación de la Coenzima A (1ml)

CoA	0.007 g
ADES	0.9 ml
KHCO ₃	100 µl
Anhídrido Acético	13 µl

12.1.6 INMUNIZACION DE CONEJOS

Buffer Salino de Fosfatos (PBS) (10X)

137.0 mM	NaCl
2.7 mM	KCl
4.3 mM	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O
1.4 mM	KH ₂ PO ₄

Ajustar pH a 7.4. Aforar a 1L con agua destilada y esterilizar en autoclave.

12.1.7 INMUNODETECCION

Buffer de Electrotransferencia

25 mM	Tris base
192 mM	Glicina
20% v/v	Metanol

Ajustar con ADES

Buffer Tris-Salino (TBS)

150 mM	NaCl
50 mM	Tris pH 7.6

Ajustar con ADES

Ponceau S

0.2%	Ponceau S
3.0%	Acido tricloracético
3.0%	Acido 5-Sulfosalicílico
Ajustar con ADES	

Solución de Bloqueo

5.0%	Leche descremada comercial en polvo
0.1%	Poliexietilen sorbitan monoclorato (Tween 20)
Aforar con TBS	

Solución Sustrato para Fosfatasa Alcalina

100 mM	NaCl
5 mM	MgCl
100 mM	Tris pH 9.5
Ajustar con ADES	

12.1.8 INMUNODETECCION EN PLANTULAS DE TABACO

Medio MS (Murashige y Skoog, 1962; Tomado de: Hurtado y Merino, 1987)

Macroelementos	mg/L
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	332.20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	180.70
KH ₂ PO ₄	170

Microelementos

H ₃ BO ₃	6.20
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.80
MnSO ₄ ·4H ₂ O	16.90
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8.60
KI	0.83
Na ₂ MO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
COCl ₂ ·6H ₂ O	0.025

Otros

Na ₂ EDTA	37.31
----------------------	-------

Adicionar 3% de sacarosa y ajustar pH a 5.8.

Para medio sólido agregar 0.7% de agar.

El medio para plantas transgénicas se suplementa con kanamicina (100 mg/ml).

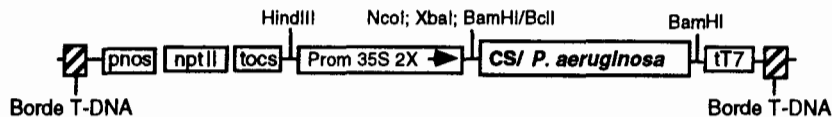
12.2 PLANTAS DE TABACO ANALIZADAS

CONSTRUCCION	CONCENTRACION SELECTIVA DE ALUMINIO	NUMERO DE PLANTAS SELECCIONADAS	CLAVES (#)
CIT2-1000	1mM	6	1 a 16
CIT1-1000	1mM	12	7 a 18
CIT2-500	500 μ M	10	19 a 28
CIT1-500	500 μ M	7	29 a 35
CIT2-100	100 μ M	11	36 a 46
CIT1-100	100mM	5	47 a 51
CIT2-0	0	8	52 a 58
CIT1-0	0	3	59 a 61
Control*	- - -	2	62 y 63

(*)Plantas transformadas con gen diferente a CS

12.3 MAPAS GENETICOS

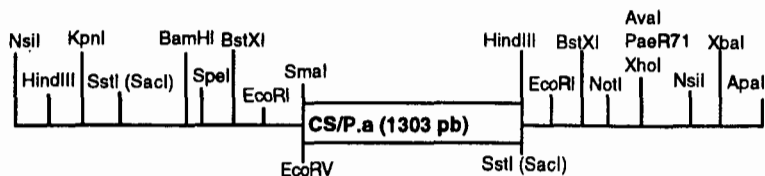
pB2



Marcador de selección: kanamicina

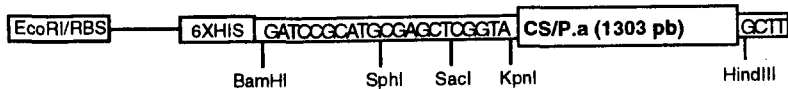
Tamaño del plásmido: 10.7 Kpb

pCRII-CS



Marcadores de selección: ampicilina y kanamicina

Tamaño del plásmido (con inserto): 5.2 Kpb

pQE32-CS

Marcadores de selección: ampicilina y kanamicina