

Universidad de la República
Facultad de Ciencias

Informe de Pasantía
Profundización Biología Molecular

**Identificación de los genes responsables de las proteínas
coriónicas en un recurso pesquero de importancia para
Uruguay**

Silvana D'Alessandro

Orientadoras: Mag. Cora Chalar (Sección Bioquímica); Dra. Nibia Berois (Sección Biología Celular)

Montevideo, Uruguay
2008

Índice

Introducción	páginas 3-7
Materiales y métodos	página 8
- Animales.....	página 8
- Extracción de ARN.....	página 8-11
- Tratamiento con DNasa.....	página 11-12
- Obtención de secuencias codificantes para coriogeninas.....	página 12-20
- Clonación de los productos de PCR.....	página 10-28
Resultados	página 29
- Evaluación del ARN obtenido	página 29-30
- Análisis electroforético del ARN.....	página 31
- Análisis del tratamiento con DNasa.....	página 32
- Retrotranscripción.....	página 32
- Ensayos de PCR.....	página 32-34
- Extracción de ADN de las bandas de agarosa.....	página 34-35
- Clonado del producto de PCR y análisis de los plásmidos recombinantes	página 35-36
- Digestión con endonucleasa <i>EcoRI</i>	página 36-37
- Secuenciación.....	página 37-43
- Estudios de expresión génica	página 44-4
Discusión	página 46-49
Bibliografía	página 50-53
Apéndice: Fundamento teórico de las Técnicas utilizadas	página 54
- Preparación del material.....	página 54
- Extracción de ARN con TRIzol.....	página 55-57
- Bases de la medición de Densidad Óptica (DO).....	página 57-59
- Transcripción Reversa (RT).....	página 58-59
- Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	página 60-62
- Oligonucleótidos sintetizados por métodos Químicos.....	página 62

- Electroforesis en gel de agarosa.....página 63-64
- Transformación.....página 64-65
- Conceptos básicos sobre ADN recombinante.....página 65-69
- Métodos de secuenciación.....página 69-71
- Procesamiento, alineamiento y comparación con las bases de datos mediante BLAST.....página 72-73
- Bibliografía.....página 74**

Introducción

Los ovocitos de los vertebrados están rodeados por una cubierta acelular que recibe diferentes nombres según el grupo zoológico: corion o envoltura vitelina en los peces, envoltura vitelina en anfibios, capa previtelina en reptiles y aves, y membrana pelúcida en mamíferos. A pesar de las diferentes denominaciones, la estructura global y función de esta cubierta son similares, por lo que se hace referencia a ella colectivamente como zona pelúcida o ZP (Lyons y col. 1993). En vertebrados ovíparos esta capa se deposita en forma paralela a la vitelogénesis y cumple papeles importantes en los procesos reproductivos y del desarrollo. Está involucrada en el reconocimiento especie-específico, la unión del espermatozoide (exceptuando a los peces teleósteos), la reacción acrosomal, el bloqueo de la polispermia y la protección del embrión durante el desarrollo (Vazquez-Levin y col. 1990; Murata y col. 1997; Barisone y col. 2007). Por el contrario, en peces teleósteos, el espermatozoide- que carece de acrosoma- no atraviesa la zona pelúcida sino que existe una región especializada, el micropilo, y es en este sitio por donde ingresa el espermatozoide. A pesar de esta diferencia, cuando se analiza comparativamente la organización de la zona pelúcida (ZP) en vertebrados alejados filogenéticamente como teleósteos y mamíferos, se encuentra que ambas están compuestas por unas pocas glicoproteínas de alto peso molecular que conforman una malla, y ambas experimentan una reacción de endurecimiento durante la fecundación, la cual involucra alteraciones en la estructura proteica (Lyons y col. 1993)

La Zona Pelúcida en general está compuesta por glicoproteínas unidas por puentes disulfuro entre sus residuos de cisteína. Los primeros estudios en ratón (*Mus musculus*) y rata (*Rattus norvegicus*) identificaron mediante electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) tres componentes glicoproteicos. Estos componentes fueron denominados ZP1, ZP2, y ZP3 del más alto al más bajo peso molecular aparente respectivamente (Spargo y Hope. 2003). Subsecuentemente las glicoproteínas ZP fueron denominadas de acuerdo a diferentes criterios incluyendo peso molecular aparente de la glicoproteína, largo de la secuencia proteica e identidad de secuencia comparativa. Por su parte, los genes *zp* se conocieron hasta mediados de los 90 con nombres inconsistentes, lo cual llevaba a un sistema de nomenclatura confuso. Para superar esta dificultad, Harris y colaboradores (1994) propusieron un sistema

unificado de nomenclatura en el que los genes *zp* fueran nombrados según la longitud de su secuencia codificante, de la más larga a la más corta. Bajo estos criterios los genes *zp* de ratón quedan ordenados en *zp2*, *zp1* y *zp3*. Para evitar la confusión surgida de cambiar el orden de *zp1* y *zp2* en ratones, se introdujo un sistema basado en letras solamente. Así se agrupan las tres subfamilias: *zp1* o *zpB*, *zp2* o *zpA* y *zp3* o *zpC*. El nuevo sistema de nomenclatura propuesto no fue aceptado universalmente, por lo que el sistema de números y el sistema de letras están siendo usados simultáneamente por diferentes grupos de investigación (Spargo y Hope. 2003).

En un pez teleosteo de agua dulce, medaka (*Oryzias latipes*), la capa interna del corion comprende dos grupos de subunidades, ZP1,2 y ZP3. El primer grupo se asumía compuesto de dos proteínas ZP1 y ZP2, pero se considera actualmente que consiste de tres proteínas similares con masa molecular relativa desde 74,000 hasta 76,000. El segundo grupo consta de una sola proteína, ZP3, con un peso molecular relativo de 49,000. Las proteínas ZP1,2 juntas y ZP3 fueron aisladas y parcialmente caracterizadas mediante SDS-PAGE y análisis cromatográficos (Murata y col. 1997). En el análisis inmunoquímico usando anticuerpos específicos contra cada grupo de subunidades, se determinó que las proteínas precursoras son sintetizadas en el hígado de peces hembras en período de desove y en machos tratados con estradiol 17 β (E2) bajo condiciones naturales y experimentales respectivamente. Por lo tanto, los precursores de ZP1,2 y ZP3 fueron llamados sustancias específicas femeninas del desove de peso molecular alto y bajo (SF-H y SF-L) respectivamente.

Se purificaron SF-L y SF-H y se encontró que la primera era una única proteína similar a la ZP3 y la segunda comprendía tres proteínas correspondientes a las proteínas ZP1,2 (Murata y col. 1997). Actualmente existe acuerdo en llamar dentro de los teleosteos a SF-L y SF-H como coriogenina L y coriogenina H respectivamente.

La familia de proteínas ZP se caracteriza por poseer un dominio conservado: el dominio ZP. Este dominio ZP consiste de aproximadamente 260 aminoácidos, con 8 cisteínas conservadas que participan en la formación de puentes disulfuro intramoleculares. Aunque su estructura tridimensional aún no ha sido determinada, se sostiene que el dominio ZP se caracteriza por formar una estructura bipartita: dos mitades conectadas por una región sensible a proteasas (Callebaut y col. 2007).

El dominio ZP ha sido encontrado en una amplia variedad de proteínas extracelulares, y cumple un rol esencial en la polimerización de las proteínas que los

contienen. Asimismo, entre las proteínas de la familia ZP están caracterizados otros tipos de dominios tales como el trébol (proteína ZP1), CUB (CPR-*ductin gene products*), EGF/EGF-like (*Tamm-Horsfall protein*) (Callebaut y col. 2007).

Por su parte las ZP de la envoltura vitelina, a excepción de la ZP3, contienen una secuencia adicional hacia el N terminal del dominio ZP que es menos conservada entre las proteínas ortólogas sugiriendo que esta región puede tener una función en el reconocimiento gamético especie-específico (Callebaut y col. 2007).

Expresión de los genes de la envoltura vitelina

Con respecto al órgano de expresión de los genes *zp*, se encuentran diferencias entre peces y mamíferos. En mamíferos, la síntesis de proteínas ZP es exclusiva del ovario; en peces teleósteos se ha demostrado síntesis en el ovario, en el hígado o en ambos, dependiendo de las especies (Conner y Hughes. 2003). Esta situación ha sido atribuida a una duplicación génica ocurrida durante la evolución. Se postula que inicialmente la expresión era ovárica, como sucede en todos los otros vertebrados, y luego a partir de la duplicación uno de los genes comenzó a expresarse en el hígado, perdiéndose, en algunos grupos, su expresión ovárica (Conner y Hughes. 2003).

La generación de niveles de complejidad mediada por el proceso de duplicación génica está aceptada ampliamente (Ohno 1970), y se cree que subyace a la diversidad de fenotipos de vertebrados. En este sentido, otro ejemplo muy analizado lo constituyen los grupos de genes *hox*. La presencia de siete grupos de genes *hox* en el pez cebra (*Danio rerio*) ha llevado a sugerir una duplicación génica adicional ocurrida en peces teleósteos en comparación con otros vertebrados (Amores y col. 1998).

Asimismo varios grupos de investigación se han interesado en la expresión de las coriogeninas de teleósteos; estos estudios fueron abordados mediante diferentes técnicas y en la actualidad existe una profusa bibliografía sobre la síntesis de las mismas en diferentes teleósteos entre la cual citamos las siguientes: en medaka (*Oryzias latipes*) (Tesoriero 1977; Hamazaki y col. 1989), bacalao (*Gadus macrocephalus*) (Oppen-Berntsen y col. 1990), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Brivio y col. 1991); (Hyllner y col. 1991), róbalo (*Dicentrarchus labrax*) (Scapigliati y col. 1994), pez cebra (*Danio rerio*) (Bonsignorio y col. 1996), dorada (*Sparus aurata*) (Del Giacco y col. 1998).

Como forma de ilustrar la diversidad de lugares de síntesis, se mencionan los siguientes ejemplos: en la dorada y la trucha arco iris se demostró la expresión de las proteínas mayoritarias de la cubierta vitelina en el hepatocito (Del Giacco y col. 1998; Hyllner y col. 1991), por lo que en estos teleósteos se trataría de una membrana terciaria (síntesis en un órgano que no integra el aparato reproductor); en carpa y pez cebra, la síntesis ocurre en el ovario (Chang y col. 1996; Wang y Gong. 1999), por lo tanto, en estas especies se trataría de una membrana primaria. El problema de la expresión ovárico-hepática está lejos de haberse agotado por lo que la incorporación de otras especies contribuirá a esclarecer la temática.

La síntesis de las proteínas reproductivas está regulada hormonalmente, y en particular la síntesis hepática está bajo el control del estradiol. Durante la vitelogénesis, en vertebrados ovíparos se producen cambios en el hígado bajo los efectos del estrógeno, incluyendo la modificación de la expresión de genes específicos (Lyons y col. 1993).

El más estudiado de éstos es el gen de la vitelogenina, que codifica la proteína del vitelo sintetizada en todos los vertebrados ovíparos estudiados. Además de la vitelogenina otros genes de síntesis hepática son inducidos por estrógeno. El Ep45 (un miembro de la familia de las serina-proteasas) en *Xenopus laevis* y apoVLDL -11 (un gen que codifica una proteína del vitelo) en el pollo (*Gallus gallus*). Entre los teleósteos, ULER2 fue identificado como un importante ARNm de 1.8 Kb inducido por estrógeno en el hígado de *Oncorhynchus mykiss*; en la platija americana (*Pleuronectes americanus*) se encontró una especie de ARNm similar de 1.9 Kb específico de hembras y producido en el hígado (wf♀ ARNm) a altos niveles durante la vitelogénesis (Lyons y col. 1993).

Proteínas reproductivas y contaminación

El impacto que tienen los contaminantes en el medio ambiente acuático ha recibido particular atención desde hace unos años. En especial los xenoestrógenos, sustancias que pertenecen a un grupo grande y heterogéneo de contaminantes ambientales (agroquímicos, compuestos industriales y de uso doméstico) que remedan la acción de las hormonas e interfieren con el funcionamiento del sistema endócrino en general, y del sistema reproductivo en particular. En peces se ha visto que cuando los machos y las hembras inmaduros son expuestos a estrógenos, se induce la producción de vitelogeninas (Oppen-Berntsen y col. 1990). Por esta razón, la cuantificación de

vitelogenina es utilizada por varios autores como biomarcador de contaminación por compuestos perturbadores del sistema endócrino (Arukwe y col. 2003).

En adición a lo anterior ha comenzado a aparecer información sobre el valor del corion de teleósteos como biomarcador de contaminación (Arukwe y col. 2000; Arukwe y col. 2003). Asimismo, se ha vinculado la expresión hepática a una mayor susceptibilidad a la contaminación. Las especies de teleósteos en las que las coriogeninas se sintetizan en el hígado bajo el control del estrógeno serían por lo tanto más susceptibles que aquellas cuya síntesis se produce en el ovario (Lee y col. 2002).

La especie analizada en la presente pasantía

La corvina blanca (*Micropogonias furnieri*), es el sciaénido más abundante del Río de la Plata y el segundo recurso pesquero de Uruguay. Se ha sugerido que existe una disminución en la abundancia de la población de corvina en el estuario rioplatense relacionada con la sobreexplotación y los niveles crecientes de contaminación (Vizziano y col. 2002). Existen antecedentes locales de estudios acerca de la estrategia reproductiva y requerimientos experimentales para la fecundación *in vitro* de corvina blanca (Berois y col. 2004). Con respecto a la temática de la envoltura vitelina, el mismo grupo estableció la ultraestructura del proceso de deposición así como la composición química del corion utilizando ejemplares provenientes de áreas con niveles de contaminación inferiores al Nivel Guía internacional (Berois y col. 2007). Estos datos son de especial relevancia para el posible uso del corion de corvina blanca como biomonitor, ya que ofician de línea de base para estudios comparativos ulteriores.

En este contexto, con el objetivo de seguir avanzando en el conocimiento de la composición, la síntesis y la organización de las proteínas de la envoltura ovocitaria, y comenzar a evaluar la importancia del corion de la corvina blanca como posible biomarcador de contaminación, en el presente trabajo nos propusimos:

- 1) Identificar los genes que codifican las proteínas coriónicas.
- 2) Establecer su patrón de expresión.

Materiales y Métodos

Se señala que los fundamentos de las técnicas utilizadas se describen en detalle en el apartado Apéndice.

1. Animales

Se utilizaron cuatro ejemplares hembras adultas de corvina blanca (*Micropogonias furnieri*) con un tamaño entre 38 y 63 cm, capturadas por pescadores artesanales en la costa de Montevideo (latitud: 34° 52'S; Longitud: 57°W). Las mismas se colectaron y transportaron vivas en tanques con agua de la bahía y aireación permanente.

Una vez en el laboratorio, los ejemplares fueron sacrificados por decapitación según las Normas Internacionales de Cuidado de Animales Aprobadas por la CHEA, y se les extrajeron muestras de hígado y de ovario en condiciones libres de RNAsas.

Las muestras fueron almacenadas en TRIzol[®] (1:3 m/V), rotuladas según el número de ejemplar (1-4) y tipo de tejido y reservadas a -80° C para su posterior uso.

2. Extracción de ARN

2.1 Preparación del material

El material para la extracción de ARN fue acondicionado para su uso en condiciones libres de RNAsas. El material de plástico (Tubos eppendorf de 500µL, 1500µL; Falcon[®] de 15mL y 50mL; puntas de micropipetas de 10µL, 200µL y 1000µL) fue comprado en condiciones estériles y guardado en un ambiente libre de RNAsas por lo que fue utilizado directamente.

Las micropipetas, al igual que la mesada de trabajo fueron limpiadas con etanol 70%. Los homogeneizadores y tubos Corex fueron lavados y sumergidos en agua con DEPC (dietilpirocarbonato 1:1000) y colocados en estufa toda la noche a 37° C (El DEPC reacciona con las histidinas e inactiva las RNAsas). Posteriormente se autoclavaron durante 40 a 50 minutos a 1 atm y se secaron en estufa (El calor remueve el DEPC porque rompe la molécula en CO₂ y etanol).

2.2. Método de extracción

El ARN total de las muestras de tejidos fue aislado empleando una modificación del método de extracción de Chomczynski y Sacchi (1987) usando el reactivo TRIzol[®]. El TRIzol[®] es un reactivo comercial (Life Technologies Inc., Gibco BRL), consistente en una solución de fenol y tiocianato de guanidina que permite aislar ARN total de células y tejidos mediante un solo paso de extracción. Durante el proceso, el TRIzol[®] permite separar el ARN del ADN y las proteínas y demás componentes celulares.

2.2.a Homogeneización del tejido

Las muestras procedentes de ovarios de los ejemplares 2 y 3; y las dos muestras de hígado de los mismos ejemplares guardadas como se indicó, se homogeneizaron en homogeneizador Potter-Ehlvejem eléctrico hasta la disgregación del tejido. El TRIzol[®] permite preservar la integridad del ARN durante la homogeneización del tejido al mismo tiempo que se disgregan y rompen las células y los componentes celulares.

Los homogenatos se transfirieron a tubos de vidrio y se midió su volumen:

Muestra 1: ovario 3.5 mL	}	Ejemplar 2
Muestra 2: hígado 3.5 mL		
Muestra 3: ovario 4.5 mL	}	Ejemplar 3
Muestra 4: hígado 3.5 mL		

2.2.b Separación de fases

Luego de la homogeneización se removió el material insoluble por centrifugación (Centrífuga BECKMAN modelo J2_21) a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4° C. Las muestras se transfirieron a tubos limpios y se incubaron a temperatura ambiente (TA) por 5 minutos. Este paso permite la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas.

A cada muestra se le adicionaron 0.2 mL de cloroformo por cada mL de TRIzol[®] agregado inicialmente. Se agitaron a mano vigorosamente durante 15 segundos y se incubaron a TA durante 2 a 3 minutos. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm durante 20 minutos a 4 °C.

Cada muestra se separó en dos fases, una orgánica inferior (fenol - cloroformo), una fase acuosa superior que contiene el ARN y una interfase que contiene el ADN. El volumen de la fase acuosa recuperada es aproximadamente el 60% del volumen de TRIzol[®] usado para la homogeneización.

2.2.c Precipitación del ARN

A la fase acuosa recuperada, se le agregaron 0.5 mL de alcohol isopropílico por mL de TRIzol[®] usados inicialmente en la homogeneización. Se guardaron las muestras a 4° C toda la noche lo que aumenta el sedimento de la precipitación.

Posteriormente se centrifugaron a 10000 rpm a 4° C durante 30 minutos. El precipitado de ARN fue visualizado, como un *pellet* tipo gel.

2.2.d Lavado del ARN

Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó colocando un mL de etanol 75% por cada mL de TRIzol[®] utilizado en la homogeneización. Se vortexearon las muestras y posteriormente fueron centrifugadas a 7500 rpm durante 5 minutos a 4° C.

2.2.e Resuspensión del ARN

Luego de la centrifugación se retiró el alcohol y los tubos se invirtieron sobre papel absorbente. Luego se colocó parafilm en la boca de cada tubo, se le practicaron orificios y los precipitados se secaron bajo lámpara pero no completamente para facilitar su resuspensión.

Se resuspendió el ARN en 500 µL de agua miliQ y se almacenó a -20° C toda la noche. Al día siguiente, los tubos se incubaron a 60° C durante 10 minutos para terminar de solubilizar el ARN.

2.2.f Valoración del ARN obtenido

El ARN obtenido se cuantificó midiendo absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu UV 160A). Se utilizó como blanco agua miliQ.

Las concentraciones de ARN de las muestras se calcularon sabiendo que 1 D.O. corresponde a 40 µg/mL de ARN (Ausubel y cols, 2005). Para la medición se utilizó una dilución de ARN 1:100 en una cuba de cuarzo. Se midió también la absorbancia a 280 nm y se calculó la relación A 260/280 para estimar la pureza de las preparaciones de ARN (la relación sin contaminación proteica es cercana a 2).

Para comprobar la integridad del ARN se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (BrEt, 0,5 µg/ml) en buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X. La cuba y el peine utilizados fueron tratados previamente con H₂O₂ al 3% en H₂O DEPC durante 20 minutos y posteriormente enjuagados en agua tratada con DEPC para eliminar las RNasas.

Luego de la corrida el gel se visualizó en transiluminador con UV y se tomó registro fotográfico. Todas las muestras fueron guardadas a -80° C.

3. Tratamiento con DNasa

Se realizó el tratamiento con DNasa I para liberar el ARN del posible ADN genómico contaminante, como paso previo a la retrotranscripción (Maniatis y cols., 1989)

Se trataron: ARN ----- 4µg
 Buffer RQ1 (Promega 10 X) ----- 3µL
 Inhibidor RNasas (RNAsin) ----- 1µL
 DNasa RQ1 (1 U/µL Promega) ---- 2µl
 H₂O libre RNasas cantidad suficiente para completar un volumen final de 30µl.

Luego de incorporar todos los componentes en tubos *ependorf*, se incubaron a 37 °C durante una hora. Se agregaron 70µL de agua libre de RNasas y 100 µL de fenol (pH 4,5) (El fenol ácido permite remover el ADN que eventualmente no haya sido digerido y dirigirlo hacia la fase orgánica) y se vortexearon. A continuación se centrifugaron las muestras a 10000 rpm a 4° C durante 20 minutos.

Se recuperó la fase acuosa y se agregó 1/10 volumen de acetato de sodio 3M pH=5 y 2,5 volúmenes de EtOH 95%. Las muestras fueron guardadas a -20°C durante 24 horas.

A continuación se centrifugaron a 12000 rpm a 4°C durante 30 minutos. El precipitado fue lavado con etanol 75% previamente enfriado. Se volvió a centrifugar y se descartó el sobrenadante.

Las muestras fueron protegidas con parafilm y se colocó bajo lámpara para su secado. El ARN se resuspendió en 10 μL de agua milliQ y fue colocado a 60°C durante 10 minutos, lo que favorece su resuspensión. A continuación se llevó a -20°C durante toda la noche.

Posteriormente se le midió la absorbancia a 260 y 280 nm. Fue calculada la concentración de ARN en cada muestra corrigiéndose los cálculos por el factor de dilución.

A alícuotas de las muestras se les agregó buffer de corrida (azul de bromo fenol, xilen - cyanol) y se corrieron en gel de agarosa al 1% conteniendo BrEt en TAE 1X. Como control de la corrida electroforética se usaron muestras de concentración conocida de ARN total extraído de útero de rata. Las muestras se guardaron rotuladas a -80°C .

4. Obtención de secuencias codificantes para coriogeninas

Una vez obtenido el ARN se procedió a la preparación del ADNc mediante transcripción reversa (ver 4.1). Se probó el estado del ADNc usándolo como molde en una reacción de PCR con oligonucleótidos de actina, y luego de comprobar que estaba en buenas condiciones se realizó PCR con los oligonucleótidos *CVf1* y *CVf2* (Diseñados para amplificar secuencias codificantes de coriogeninas).

4.1. Transcripción Reversa (RT)

Las muestras fueron retiradas del freezer de -80°C y colocadas en hielo. Se calculó el volumen de ARN previamente cuantificado teniendo en cuenta que se debían usar 3 μg de muestra por reacción (Ausubel y col., 2005).

Se efectuaron dos reacciones de retrotranscripción:

- 1) ARN de ovario ----- 2 μ L
oligo dT (200 μ M) ----- 0.5 μ L
dNTPs (1mM) ----- 1 μ L
Agua MilliQ ----- 9,5 μ L

- 2) ARN de hígado ----- 2,5 μ L
oligo dT (200 μ M) ----- 0,5 μ L
dNTPs (1mM) ----- 1 μ L
Agua MilliQ ----- 9 μ L

Los tubos se incubaron a 65°C durante 5 minutos, se colocaron en hielo, luego se centrifugaron durante 1 minuto a 12000 rpm.

A cada tubo se le agregó:

- Buffer 5X First-Strand (Invitrogen) ----- 4 μ L
- DTT 0.1 M (Invitrogen) ----- 1 μ L
- RNase OUTTM (40 unidades/ μ L) (Invitrogen) ----- 1 μ L
- Enzima Super-ScriptTM III RT (200 units/mL) (Invitrogen) ----- 1 μ L

Se incubaron las muestras a 50°C durante 60 minutos. Luego de esto se procedió a inactivar la enzima colocando las muestras a 70 °C durante 15 minutos. Finalmente los ADNc obtenidos fueron guardados a -20 °C rotulados con fecha y nombre.

4.2 Oligonucleótidos

Para la obtención en corvina de secuencias codificantes de coriogeninas, en el presente trabajo se diseñaron dos juegos de oligonucleótidos a ser usados en reacciones de PCR. El primero (CVF1 y CVR1) fue el utilizado por Del Giacco y cols. (Del Giacco y col. 2000) y el segundo (CVF2 y CVR2) se construyó en base a un alineamiento de Del Giacco y cols. (Del Giacco y col. 2000) para el cual se obtuvieron secuencias anotadas como *zps* en el GenBank, cuyas traducciones *in silico* luego fueron alineadas con el programa ClustalW. Se identificaron las regiones más conservadas y alejadas convenientemente dentro de alineamiento y con ellas se diseñó el otro par de cebadores degenerados (ver esquema 1). Se buscó disminuir la degeneración de los

oligonucleótidos eligiendo entre las regiones conservadas aquellas que no tuvieran aminoácidos codificados por varios codones; recurrir al uso de bases neutras como pueden ser inosinas en posiciones en las cuales no se pudo evitar una alta degeneración. Para la anotación de los oligonucleótidos degenerados el código utilizado fue: B=CGT, D=AGT, H=ACT, K=GT, M=AC, N=AGCT, R=AG, S=CG, V=ACG, W=AT y Y=CT. Los oligonucleótidos de actina amplifican un fragmento de 341 pb de secuencia codificante de *Danio rerio* (número de acceso AF057040).

Cebadores:

Oligonucleótidos para actina:

μ-ACTINA-RSA-1

5' GCC GGT TTT GCT GGA GAT GAT 3' Tm 64 °C

μ-ACTINA-RSA-2

5' ATG GCA GGG GTG TTG AAG GTC 3' Tm 66°C

Oligonucleótidos para coriogeninas:

CvF1

5' CAC STS CCI CTS CKT GTK TWY 3' Tm 63 °C

CvR1

5' YTT CAN RDB RCA BKK NAT GTA 3' Tm 57 °C

CvF2

5' NGA CCT CAC YYT NGG 3' Tm 56 °C

CvR2

5' RRT GRC AGG TGA TRTA 3' Tm 51 °C

saZPC	1	-----MVMKCASVCLVALVLLGSFCDAQWD--KPSK	29
ZI-3	1	-----MMKFTAVCLVVLALLDGFCDAQHNYGKPSY	30
caZPC	1	MGLIQYVVLVLLVLLVDFDKNAFGSLRSSQSPKSKHQSPASRVPVSSQVLGNTLQKA	58
ccZPC	1	MGFLQGVLLVLLVIVAFDLKNAWGSIRYSQSPSIMKQPASAPASRGPVSSQGFINPFLQKA	59
xiZPC	1	-----MSQWG	5
mmZPC	1	-----	0
hsZPC	1	-----	0
saZPC	30	PTYP RPVPQREPTKQKSHEPQSQKQLIEKPLI W V Y P E D P K P E V P A E V I V E L R Y P V - P A A	87
ZI-3	31	PPTGSKTTPQD-PT-----QQ-KQLHEKELITWKYPADPQPEAKPVVPPFEQRYPV-PA	79
caZPC	59	SLSQSLDYRGFAQEPGLGQEKQVLQGGPVKPLDWRFPITVPEVPSSEMAVDFHLRQPVTPSS	117
ccZPC	60	SQFQSFDSRKFADPLGSRQEKQLMGQGGPVKPLDWRFPITVPEVPSRELAVDFHLRQPVTPSS	118
xiZPC	6	KLNFLVLLVLLADSIVAERSRRLQGNWQDYGHVVSNLGPTRGANGLAFGSRQL-PPVSPON	63
mmZPC	1	-----MASSYFLFLCILLCGGPELCLNSQTLWLLPGGGTPTPVGSSS	40
hsZPC	1	-----MELSYRLEFLCILVGGSTELCYEQPLWLLQGGASHPEITTSVQ	40
saZPC	88	TVAVECRERDAVVEYKDMFGIGQFINFADLIEGN--CAA-VG-EDNNAHIVLITQAEHL	142
ZI-3	80	TVAVECREDLAHVEAKKDLFGIGQFIIDPADLITLGT--C-PPSA-EDPAAQVLIFFBSPLQ	134
caZPC	118	IVAIQCENRNVHVEVQDDEFNSGELIQPSGLITLGG--C-PVVG-LVPSKVLVDFDNLQ	171
ccZPC	119	IVAVQCSENRNVHVEVKKDLFSNGQLIQPSGLITLGG--C-PVYRFEDSASGVLIFBYELQ	173
xiZPC	64	FVSVRCDEADKMVVTOTDLYGLGKMKVKAHEITLGPQRCSPPSQ-STSTA-VLIFQVALQ	119
mmZPC	41	PVKVECLEAEELVVTISRDLYGTGKLVQPEGLTEGSEGCQPRVS-VDT-D-VVRFNAQLH	96
hsZPC	41	PMLVECEAEATLMVYVSKDLEFGTGKLTIRAADLITLGPCEPELVS-MDTE-D-VVRFVGLH	97
saZPC	143	QCGSILITITDKSLIYTFLLNYPNQPIGAAFPVVRTSSAVVIVECHYQRHHNVSSILPDLPL	201
ZI-3	135	NCGSVLIMTEDSLVYTFLLNYPNQPIGAAFPVVRTSSQAVVIVECHYQRKHNVSILALDPL	193
caZPC	172	DCNSVLMMTKDELVYTFALTYPPEAFAGTPTIRAGGAVIGVQCHYQRFQNVSGNALKPT	230
ccZPC	174	DCNSVLMMTENELVYTFALTYPPEAFAGTPTIRAEAGALVGMQCHYQRFNVSSNALKPT	232
xiZPC	120	DCGNSLQMTNPLVYSTNLTYPAPLRNVPITIRMGAKMLI-OCFYPNPNVSSKATKPT	177
mmZPC	97	ECCNSRVMTKDALVYSTLFLHDPKRVVGNLSILRTNRVEMPIEGRYPRQGNVSSALPPT	155
hsZPC	98	ECCNSMQVITDALVYSTLFLHDPKRVVGNLSILRTNRVEMPIEGRYPRQGNVSSALPPT	156
saZPC	202	WLPFSAVKVSEEFLYETIKLMTDDWQYERFLYQYFLGDIINTEASVKQYHVPRLRVYLD	260
ZI-3	194	WVPFSAAKMAEFLLYETIKLMTDDWQYERFLYQYFLGDIINTEASVKQYHVPRLRVYLD	252
caZPC	231	WVPYASTEAGEEVLVLSIKLMDWDSYERFNSYELGDIINVEASVKVYHVPRLRVYLD	289
ccZPC	233	WVPYASTEVEGDLVLSIKLMDWDSYERFNSYELGDIINTEASVKVYHVPRLRVYLD	291
xiZPC	178	WVPFSTITISAEEDRLAFSLRLMDDWYQYERFLYQYFLGDIINTEASVNIANHAPMTIYAD	236
mmZPC	156	WVPFRATVSPLEKLAFAFSLRLMDDWYQYERFLYQYFLGDIINTEASVNIANHAPMTIYAD	214
hsZPC	157	WLPFRTITVFSSEKLTFLSLRLMEEENWNAEKRSPTFHLGDAHLQAEHTGSHVPLRLVYLD	215
saZPC	261	NCVATLSPDR--SINPNYAFI-DNHGCLVDARITGSDSKFM-ARTADNVLRFQLEAFRF	315
ZI-3	253	RCVATLSPDA--NSSPSYAFI-DNYGCLVDGRITGSDSKFV-SRPAENKLDFOLEAFRF	307
caZPC	290	SCVATQVPDV--NALPRYLFI-ENHGCLVDARVITASSSRFM-PRSQEDKTRFQLEAFMF	344
ccZPC	292	SCVATRVPDV--NSVPRYSEI-ENHGCLVDARVITASSSRFM-PRIQEDKTRFQLEAFMF	346
xiZPC	237	SCVATVTPDVNSN-PRYEII-NONGCLVDGKLDSSSAFIPSPRPQDKLQFSVDAFRF	292
mmZPC	215	HCVATPSPLPDPNSSP-LYHFI-VDFHGCLVDG-LISPSISAFQVPRPRTLQFTVDVDFRF	271
hsZPC	216	HCVATPTPDQ--NASPIY-HTLVDFHGCLVDG-LITDASSAFKVPRPRTLQFTVDVDFRF	270
saZPC	316	KGADSGLLIYITCHLKATSVAY-PIIDSHRACS--IGWKEASGADACGSCESGLP-369	
ZI-3	308	QGADSGMIYITCHLKATSAAY-PLDALHACS--IGWKEVSGADPILCASCESGGFE362	
caZPC	345	QGGDSPIYIMTCLKATLASA-PSDALHKS-CSF--ANGWLAADGNHQVCGCCDST-397	
ccZPC	347	QGGDSPIYITCTVKATLASA-PSDALHKS-CSF--ANGWLAADGNHQVCGCCDST-397	
xiZPC	293	TTSDSAVLYITCNLRAAATQVPPDMNKACSFSSKANSWSPLOGPNICSCCCTGNV350	
mmZPC	272	ANSSRLIYITCHLKVAPANQIP-DKLNKACSFNKTSQSWLPVEGDADICDCCSHGNCS329	
hsZPC	271	ANSSRNMIYITCHLKVTLAEQDP-DELNKACSFSSKPSNSWSPVVEGADICCCNKGD328	
saZPC	370	V--N--SGSSGTGSGSWTGGATSPSNPGRKSRVAVSETQQMVWEWEGEVTLGPPIVGEKV	423
ZI-3	363	MHANAVVSHGISTLSGGGHTGTGK-PSIDSRKRTREAAKTEV-IWEWEGEVTLGPPIEERR	419
caZPC	398	-----ASPFGLQWEGKASLGPVVVQEHKKTLAGLQ	428
ccZPC	401	PVGVSAAPVGGVQWEGNALSIVL	422
xiZPC	351	SVPGOSRRLGPFYFSGSRWNOKREAVHYSKMBEEHSLATLGPILVVPVETQTKTQAVKQE	409
mmZPC	330	NSSSISQFQIHGPRQWSKLVSRNRHRVITDEADMTVGPPLIELGKANDQIVEGWTASQTPV	388
hsZPC	329	TPSHSRRQPHVMSQWSRSASRNRHRVITDEADMTVGPPLIELDRRGDHEVEQWALPSTDSV	387
saZPC	424	VA	425
ZI-3	420	V	420
xiZPC	410	LEGKTLDELWELTALGSLGLVLAHA-CI AVIATKLA KRKQYISTI QK	454
mmZPC	389	ALGLGLATVAFLLTAAIVLAVTRK-CHSSSYLVSILPQ	424
hsZPC	388	VLLGVGLAVVVSLLTAVLTLVLTTRRQRTASSHPVSNSE	424

Esquema 1: Comparación de secuencias aminoacídicas del dominio ZP en diferentes especies. Sea bream saZPC, medaka ZI-3, goldfish caZPC, carpa ccZPC, *Xenopus* xiZPC, ratón mmZPC, humano hsZPC. Alineamiento utilizado para la producción de los oligonucleótidos. Con corchetes se señala los sitios seleccionados para el diseño de los oligonucleótidos. El alineamiento fue tomado de Del Giacco y col. 1998.

4.3 PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa)

4.3a. PCR con cebadores de Actina

Con el objetivo de evaluar el ADNc obtenido en la retrotranscripción se realizó una PCR utilizando los cebadores de actina. Asumiendo el grado de conservación de esta proteína, se esperaba obtener, en corvina, un fragmento de 360 pb que es el tamaño del amplicón de actina de *Danio rerio*.

Para cada tubo de reacción se usaron:

Agua milliQ ---- 18,9 μ L

Buffer 10 X (Taq) ---- 2,5 μ L

MgSO₄ (50mM) 1 μ L.

dNTPs (10 mM) ----0.5 μ L

Oligo 1 (10 μ M) ---- 0.5 μ L

Oligo 2 (10 μ M) ---- 0.5 μ L

Taq Platinum (Invitrogen) (5U/ μ L) ----0.1 μ L

ADNc ----1 μ L

Volumen final de reacción de 25 μ L.

Se preparó mezcla madre para 3 tubos y se colocaron 24 μ L de esta mezcla por tubo de reacción. A cada uno de ellos se le agregó 1 μ L de la muestra correspondiente:

Tubos	Muestras	ADNc (μ L)	Agua milliQ (μ L)	Volumen total
1	ADNc1	1		25
2	ADNc 2	1		25
3	Control negativo		1	25

Los tubos fueron brevemente centrifugados y se colocaron en el termociclador (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) programado de la siguiente forma:

	Temperatura °C	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94	3 min	} Ciclos: 32
Desnaturalización	94	30 seg	
Hibridación	52	1 min	
Extensión	68	1 min	
Extensión final	68	7 min	

Los productos finales de la PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 1% conteniendo BrEt 0.5 µg/ml en TAE 1 X. El gel de agarosa fue preparado con 1 gramo de agarosa en 100 mL de TAE 1X. Se disolvió en microondas. Una vez disuelta la agarosa y que la temperatura alcanzara aproximadamente los 45°C se procedió a agregarla en el soporte para el armado del gel. Se colocó el peine y se esperó una hora para que solidificara. La corrida se realizó en TAE 1X a 0,8 mA/cm².

Carriles	Muestra	µL de muestra	µL Buffer de carga 10X
1	Tubo 1	18	2
2	Tubo 2	18	2
3	Tubo3	18	2
4	MPM 123 pb	6	

El gel fue visualizado en transiluminador UV y se tomó registro fotográfico.

4.3b PCR con cebadores CVR2 y CVF2

Una vez corroborado el buen estado del ADNc se procedió a hacer la PCR con los oligonucleótidos degenerados para amplificar coriogeninas. En este caso y de acuerdo a las coriogeninas reportadas, esperábamos obtener un fragmento de aproximadamente 680 pb.

Por tubo de reacción se usaron:

Agua milliQ ----- 17,9 μ L

Buffer 10 X (Taq) ----- 2,5 μ L

MgSO₄ (50mM) ----- 1 μ L

dNTPs (10 mM) ----- 0,5 μ L

Oligo CVF2 (10 μ M) ----- 0,5 μ L

Oligo CVR2 (10 μ M) ----- 0,5 μ L

Taq Platinum (Invitrogen) (5U/ L) ----- 0,1 μ L

ADNc ----- 2 μ L

En un volumen final de 25 μ L.

Para la reacción se preparó una mezcla madre (mix) omitiendo el ADNc, que se repartió en tres tubos de reacción.

Tubos	muestra	MIX (μ L)	ADNc (μ L)	Agua milliQ (μ L)	Volumen total (μ L)
1	ADNc1(Ovario)	23	2		25
2	ADNc2(Hígado)	23	2		25
3	Control negativo	23		2	25

Los tubos fueron brevemente centrifugados y se colocaron en el termociclador programado de la siguiente manera:

	Temperatura	Tiempo	Ciclos: 32
Desnaturalización inicial	94	3 min	
Desnaturalización	94	30 seg	
Hibridación o <i>annealing</i>	44	1 min	
Extensión	68	1 min	
Extensión final	68	7 min	

Los productos finales de la PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 1% conteniendo BrEt 0,5 μ g/ml en TAE 1 X.

Carriles	Muestra	μL de muestra	Buffer de carga μL
1	Tubo 1	18	2
2	Tubo 2	18	2
3	Tubo3	18	2
4	MPM 123 Pb	6	

El resto del procedimiento fue el mismo que en el paso anterior con idénticas condiciones de corrida, visualización y registro, habiendo comprobado y registrado la amplificación de un fragmento del entorno de 680 pb en hígado. Vale recordar que cantidades equivalentes de ARN total de hígado y total de ovario fueron retrotranscriptas y el ADNc obtenido se usó en igual cantidad como molde en cada ensayo de PCRs.

Con la finalidad de obtener suficiente cantidad de fragmento para clonar, se procedió a hacer una PCR en idénticas condiciones, con varios tubos de reacción para esa muestra positiva. El gel con los productos de aproximadamente 680 pb obtenidos fue observado en transiluminador UV el mínimo tiempo necesario de forma de no dañar el ADN. Con un bisturí previamente esterilizado se recortaron las bandas y se guardaron en tubos *ependorf* rotulados. Estas muestras fueron guardadas a -20 grados toda la noche para su buena conservación.

5 Clonación de los productos de PCR

5.1. Preparación del material para Clonación

1) **Medio de cultivo líquido.** Se prepararon 300 mL de medio LB

“*Luria_Bertani.*”

Para un litro de LB:

- Bacto-triptona 10g
- Extracto de levadura 5g
- NaCl 10g
- Ajustar pH a 7 con 5N NaOH

2) **Tubos de precultivo.** Se colocó 3 mL de LB por tubo y luego se taparon con algodón.

3) Medio de cultivo sólido. A partir del medio LB se preparó LB-Agar para ser usado en placas. Para esto se utilizaron 3 g de agar en 200 mL de LB (agar 15 g/L).

Todo el material se llevó a autoclave durante 20 minutos a 1 atm.

4) Soluciones Stock. Para su uso en la preparación de las placas de cultivo.

- **X-gal.** (5-bromo 4-cloro 3-indolyl β -D galactósido) 20 mg/mL. Se utiliza para su preparación dimetilformamida. Debe ser protegido de la luz y guardado a -20 °C (Ausubel y cols., 2005)

-**PTG.** (Isopropiltiogalactósido) 200 mg/ml. Para su preparación se utiliza agua milliQ y se guarda a -20 °C (Ausubel y cols., 2005)

-**Ampicilina.** 100 mg/mL. Para su preparación se utiliza agua milliQ y se guarda a -20 °C (Ausubel y cols., 2005)

5) Preparación de las placas. Luego de autoclavado se dejó enfriar el LB-agar hasta una temperatura en la cual aún se mantenía en estado líquido manipulable y se agregaron: 400 μ L X-gal, 40 μ L IPTG, 200 μ L ampicilina de las respectivas soluciones stock en 200 mL de LB-agar. Se llevó a placas de cultivo colocando 20 mL por placa en condiciones de esterilidad, que se dejaron solidificar, y se guardaron a 4°C invertidas para su posterior uso.

Los tubos de precultivo y el LB restante se guardaron luego de alcanzar temperatura ambiente.

5.2 Preparación del ADN para clonación

5.2.a Elución del ADN

Con el fin de recuperar los productos de PCR es necesario eluir el ADN de las bandas de agarosa previamente recortadas. Para ello se usó el Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences). Se pesaron las bandas recortadas y por diferencia de peso con el tubo *ependorf* vacío se obtuvo el peso de la agarosa recortada. Por cada 10 mg de agarosa se le agregó 10 μ L de buffer de captura (Solución tampón acetato y agente caotrópico). Se mezcló por vortexo vigorosamente y se incubó el tubo *ependorf* a 60°C hasta que la agarosa se disolvió completamente. Se hizo una centrifugación corta a 12000 rpm y luego las muestras fueron transferidas a una columna colocada en un tubo de recolección. Se incubó 1 minuto a temperatura

ambiente y se centrifugó la columna GFX con la muestra a 13000 rpm durante un minuto. Lo que quedó en el tubo de recolección fue descartado. Esto se repitió hasta haber pasado toda la muestra por la columna. Luego se agregó a la columna 500 μL de tampón de lavado (Tris-HCL 10 mM pH 8, EDTA 1mM, Etanol 80%), se centrifugaron nuevamente a 13000 rpm por un minuto y se descartó el líquido del tubo de recolección. Se volvió a centrifugar en idénticas condiciones que el paso anterior para eliminar todo el alcohol.

La columna se colocó en un tubo eppendorf limpio de 1,5 mL y se agregaron 30 μL de agua milliQ. Por último, se centrifugó a la misma velocidad que en el paso anterior por un minuto para eluir el ADN. La columna se descartó.

El ADN recuperado se analizó en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X con BrEt. La concentración de ADN en el volumen corrido se estimó por la intensidad de la banda visualizada en el transiluminador UV.

carril	Muestra	μL de muestra	μL de buffer de carga
1	ADN eluido	15	2
2	MPM	2.5	1

5.2.b Ligación

Se utilizó el vector pGEM-T easy (Promega) que es apropiado como explicamos en el apéndice para clonar los productos de PCR que nosotros obtuvimos (**Figura 1**).

Para preparar la mezcla de ligación se incorporaron en un tubo *eppendorf*:

- Tampón de Ligación LigB 2X (Tris-HCl 60mM, pH 7,8; MgCl_2 20mM; DTT 20mM; ATP 2mM; polietilenglicol 10%) ----- 5 μL
- pGEM-T (50 ng/ μL) ----- 1 μL
- Producto de PCR (Amplicón de coriogenina de corvina) ---- 3 μL (~ 25 ng)
- T4 ADN ligasa 3 U/ μL (Promega) ----- 1 μL

La mezcla se incubó a 8 °C durante toda la noche.

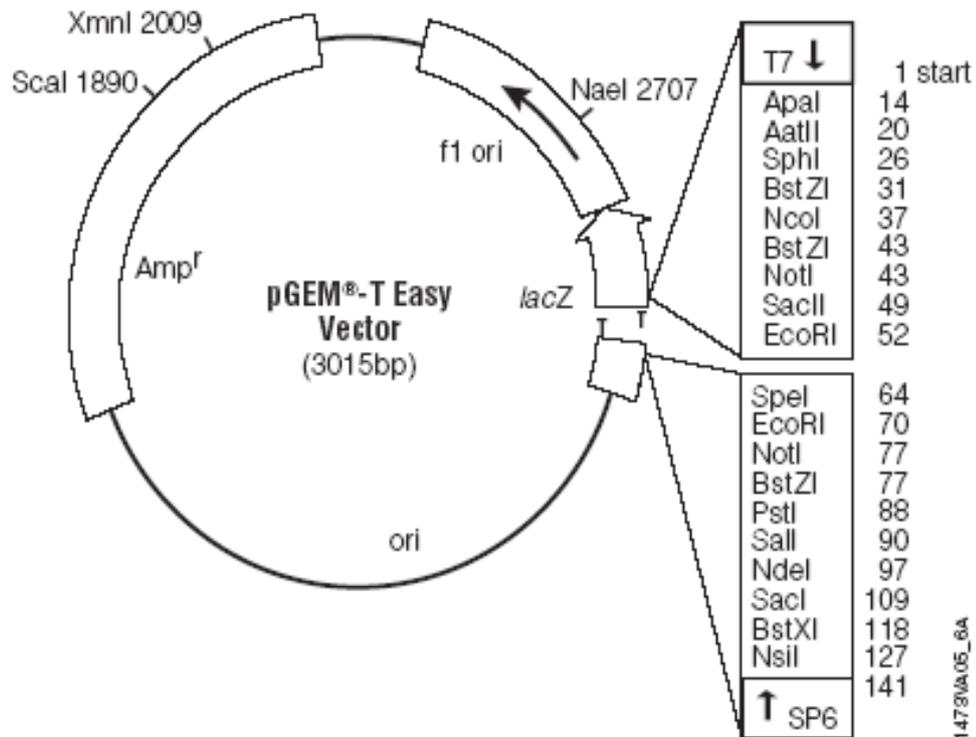


Figura 1: Mapa del plásmido *pGEM-T-Easy Vector* (Promega). El tamaño del plásmido es 3015 pares de bases (pb) como se indica en el centro de la figura. En el mapa se indica la localización de secuencias específicas que posee el vector, que incluyen además del origen de replicación (*ori*) y el gen que confiere resistencia a la ampicilina (*Amp^r*); el sitio de iniciación de la transcripción de la ARN polimerasa del fago T7 (posición 1 en la secuencia del plásmido); el sitio de iniciación de la transcripción de la ARN polimerasa de SP6 (141); el promotor de la ARN polimerasa de T7 (-17 a +3, 2999-3); el promotor de la ARN polimerasa de SP6 (-17 a +3: 139-158); una región de clonación múltiple (10-128, en la que se indican las posiciones de los sitios de reconocimiento específicos para distintas enzimas de restricción); el codón de iniciación de *lac Z* (180); secuencias del operón *lac* (2836-2996, 166-395); el operador *lac* (200-216); una región codificante de la β -lactamasa (1337-2197).

5.2.c Transformación de bacterias *Escherichia coli*

Para la transformación se utilizaron células de *E. coli* TOP10 competentes por métodos químicos (*Invitrogen*) mantenidas a -80.

Se descongeló en hielo una alícuota (50 µL) de células competentes a la cual se agregó la mezcla de ligación sin retirarla del hielo y se mezcló suavemente. Se incubó en hielo durante 30 minutos y luego se llevó a baño a 42°C durante 30 segundos. Con un previo pasaje por hielo durante 2 minutos, se le agregaron 250 µL de medio SOC. La mezcla de transformación se llevó a 37°C con agitación durante 1 hora.

Medio SOC:

- Tryptona 2%
- NaCl 0.5mM
- KCl 2.5mM
- MgCl₂ 10 mM
- MgSO₄ 10 mM
- Glucosa 20mM

Las placas previamente preparadas (ver 4.1) fueron secadas en estufa a 37°C y sembradas en área estéril con 100 µL de la mezcla de transformación. Una vez absorbido el volumen rastrillado, las placas se colocaron en estufa a 37 °C invertidas para que se produjera el crecimiento, durante 12 horas. Comprobado el crecimiento, las placas se mantuvieron a 4°C durante 4 horas aproximadamente, etapa que mejora la visualización (el color blanco se hace más evidente) de las colonias que han incorporado el inserto. Se picaron en total de esta placa, 17 colonias blancas y 1 azul, las cuales fueron cultivadas en medio líquido. Se picó cada colonia con un escarbadiantes previamente autoclavado y éste se colocó en un tubo de precultivo con ampicilina (100 µg/mL, dilución 1:1000). Se los precultivó a 37 °C durante 12 horas con agitación.

5.2.d Purificación de plásmidos

Para la obtención del ADN plasmídico se utilizó el kit GFX Micro Plasmid Prep (Amersham Biosciences) de minipreparaciones. En este paso se procesaron 18 muestras incluyendo el control (colonia azul), siguiendo las indicaciones del fabricante. En breve, se transfieren de 1 a 1,5 mL del precultivo a tubos *ependorf* y se centrifuga descartando el sobrenadante. Esto se hace hasta completar la centrifugación de los 3 mL

del tubo de precultivo. El *pellet* se resuspende en 300µL de solución I (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, EDTA 10 mM; RNasa I 400µg/ml) y se vortexea vigorosamente. Se colocan 300 µL de solución II (NaOH 1M, SDS (w/v) 5,3%) se invierten los tubos unas 10 a 15 veces, luego se le agregan 600 µL de la solución III (tampón acetato y agente caotrópico). Los tubos se centrifugan durante 5 minutos a 13 000 rpm.

Se preparan las columnas GFX se colocan en tubos de recolección, por ella se hace pasar el sobrenadante incubándolo un minuto a temperatura ambiente, se centrifuga la columna a 12000 rpm durante 30 segundos. Se repite la operación hasta completar el pasaje de todo el sobrenadante. Luego de la centrifugación se agregan 400 µL de buffer de lavado (Tris-EDTA, etanol 80%) y se centrifugan nuevamente durante un minuto, se descarta lo que queda en el tubo de colección y se centrifuga nuevamente para eliminar todo el etanol.

Las columnas GFX se pasan a tubos *ependorf* y se le agregan 50 µL de agua miliQ, se incuban un minuto a temperatura ambiente y se centrifuga a 12000 rpm por un minuto con el fin de recuperar el ADN plasmídico. El ADN plasmídico obtenido se guardó a -20 °C.

5.3 Evaluación de los plásmidos purificados.

5.3.a Análisis de los plásmidos en gel de agarosa.

Los plásmidos purificados se analizaron en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X con BrEt. De cada muestra procesada se corrieron 3 µL con 2 µL de buffer de carga. Como control se utilizó la colonia azul. El gel fue visualizado en transiluminador UV y se tomó registro fotográfico.

5.3.b Digestión del ADN plasmídico.

Entre los plásmidos retrasados en su migración respecto al control, para ser digerido se seleccionó el número cuatro. Se utilizó la enzima *EcoRI* la cual permite liberar el inserto, ya que en el vector flanqueando el sitio de inserción del inserto hay dos sitios *EcoRI* (**Figura 1**).

Reacción de digestión:

- Agua miliQ ----- 2.5 μ L
- Buffer *Eco*RI 10X. (*Buffer* H; NaCl 1000mM) ----- 1.5 μ L
- ADN ----- 10 μ L
- *Eco*RI (10 U/mL, Fermentas) ----- 1 μ L

Se llevó a baño a 37 °C durante dos horas. El producto de la digestión fue corrido en un gel de agarosa al 1 % en TAE 1X. Además se cargó como control el mismo plásmido sin digerir y como marcador de tamaño se uso MPM de 123 pb. El gel fue visualizado en transiluminador UV y se tomó registro fotográfico.

5.4 Secuenciación

Se escogieron 7 muestras (4, 7, 8, 9, 10, 13, 15) debido a que, al haber utilizado oligonucleótidos degenerados, era probable que obtuviéramos secuencias de distintas coriogeninas, y otro tipo de secuencias.

La secuenciación de los plásmidos recombinantes fue realizada por métodos automáticos en el equipo ABI 3130 (Applied Biosystem) del Instituto Pasteur de Montevideo (www.pasteur.edu.uy).

El ADN de cada muestra de los plásmidos fue secuenciado en sus dos hebras utilizando los oligonucleótidos universales T7 y Sp6 complementarios a secuencias del vector.

T7 – 5' TAA TAC GAG TCA CTA TAG GG 3'

Sp6 - 5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG 3'

5.4.a Análisis de las secuencias obtenidas

Las secuencias obtenidas se visualizaron con el programa CHROMAS huit versión 2.01 (<http://www.technelysinm.com.ar/chromas.html>). Se buscó dónde comenzaba la secuencia clonada. Esto se hace a partir de las zonas del plásmido que flanquean al inserto (**ver mapa Figura 1**) y también en algunas ocasiones se hizo a partir de las secuencias de los oligonucleótidos degenerados utilizados en la PCR. Las secuencias se corrigieron manualmente en los casos que fue necesario.

5.4.b Búsqueda de secuencias homólogas

La búsqueda de máxima homología se realizó mediante el programa BLAST, que realiza búsquedas por alineamientos locales, (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) contra la base de datos Genbank completa.

Las traducciones conceptuales de las secuencias del ADN obtenidas fueron hechas en el programa GeneRunner versión 3.05 (Hastings Software, Inc).

5.5. Alineación de secuencias

Para el análisis de la secuencia de la coriogenina Czp de *Micropogonias furnieri* y la búsqueda de regiones de máxima homología se utilizaron las secuencias de *Liparis atlanticus* AAS55644, *Oryzias latipes* AAM91819s, *Sparus aurata* CAA63709, *Danio rerio* AAI16532, *Gallus domesticus* AAV35194, *Bos taurus* AAX46460, y la secuencia de la coriogenina Czp10 *Micropogonias furnieri*.

Los alineamientos nucleotídicos y de aminoácidos se realizaron en el programa ClustalW en el modo de alineamiento múltiple.

Resultados

1. Evaluación del ARN obtenido

Luego de haber obtenido el ARN mediante el método de extracción de Chomczynski y Sacchi (1987) usando el reactivo TRIzol[®] se cuantificó el mismo midiendo la absorbancia a 260 nm y en 280 nm para hacer la relación 260/280 de las muestras analizadas (**Cuadro 1**).

Un gráfico de los valores de absorbancia medidos en el espectrofotómetro se puede ver en la **Figura 1**. Lo que mostramos es un examen de la absorbancia de la solución de ARN entre 220 y 280 nm, que muestra el pico de absorbancia a 260 nm. Además medimos A_{260} y A_{280} , cuyos valores deben dar un coeficiente cercano a 2, indicativo de que no existe contaminación proteica.

Por los datos arrojados en las medidas de absorbancia, en nuestro caso podemos notar que tenemos contaminación proteica en todas las muestras.

Cuadro 1. Medidas de absorbancia (dilución 1:500) de las preparaciones de ARN realizadas.

Muestra	Absorbancia 260	Relación A260/280
1 ovario	0.766	1.88
2 Hígado	0.962	1.80
3 ovario	1.293	1.83
4 Hígado	0.453	1.77
5 control ARN útero de rata	0.049	1.66

Absorbancia

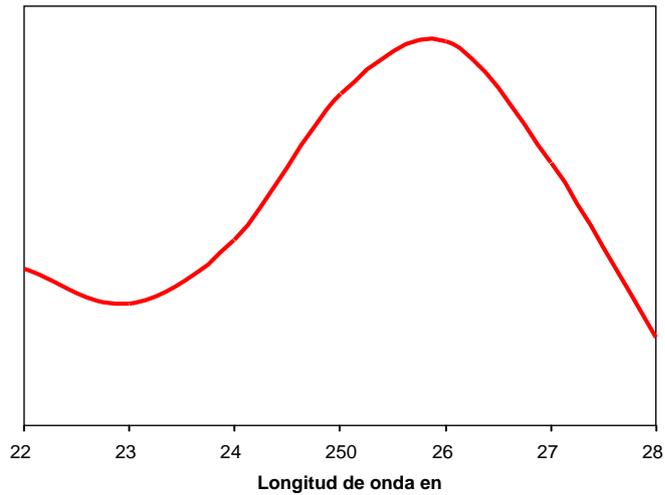


Figura 1: Grafico de absorbancia en función de longitud de onda. Se puede observar la curva del ARN con su pico de absorbancia en 260 nm.

La lectura a 260 nm permitió calcular la concentración de cada muestra utilizando la ley de Lambert-Beer.

Los valores de concentración calculados fueron los siguientes:

- 1- Ovario de corvina: 15,320 mg/mL
- 2- Hígado de corvina: 19,240 mg/mL
- 3- Ovario de corvina: 25,860 mg/mL
- 4- Hígado de corvina: 8,700 mg/mL
- 5- Control Útero de Rata: 0,980 mg/mL

La muestra control utilizada fue ARN total extraído de útero de rata de concentración previamente determinada.

Cabe destacar que a 260 nm, la absorbancia a la cual nosotros medimos no solamente absorbe el ARN sino también otros ácidos nucleicos por lo que si arrastramos ADN en el proceso de purificación, en esta primera evaluación de la muestra estaríamos sobrevalorando la concentración de ARN presente.

2. Análisis electroforético del ARN

Por medio del análisis electroforético se comprobó la integridad del ARN obtenido (**Figura 2**).

La separación tiene lugar debido a la diferente movilidad que presentan las macromoléculas cargadas cuando son sometidas a la influencia de un campo eléctrico. Los ácidos nucleicos son macromoléculas cargadas negativamente, debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura.

La electroforesis en gel de agarosa separa las moléculas lineales de ARN de acuerdo a su tamaño; la movilidad está relacionada al logaritmo del Peso Molecular, las especies mas pequeñas de ARN se mueven a mayor distancia. La tinción con BrEt nos permitió visualizar la banda correspondiente a los ARN de transferencia que son más pequeños y de tamaños similares. Los ARN ribosomales difieren en sus Pesos Moleculares y se visualizan como bandas discretas, siendo identificables el 28S (4700 nt) y el 18S (1900 nt).

El componente de ARN mensajero presente como pequeña proporción (1-5 %) del total de ARN y formado por variedades grandes de moléculas diferentes, aparece como un *smear*.

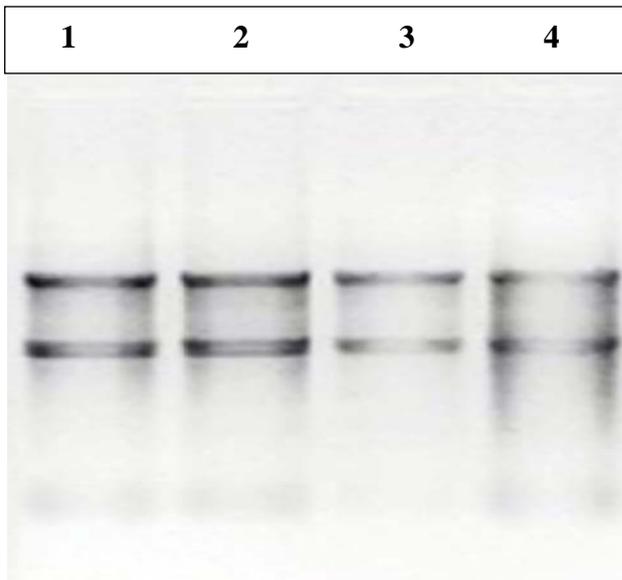


Figura 2: Corrida electroforética de los ARN obtenidos. Carril 1: ARN 1, ovario de corvina; carril 2: ARN 2, hígado de corvina; carril 3: ARN 3, ovario de corvina; carril 4: ARN 4, hígado de corvina.

3. Análisis del tratamiento con DNasa

Como paso previo a la retrotranscripción, al ARN obtenido se le realizó un tratamiento de DNasa. Este paso se realiza para eliminar todo el ADN genómico contaminante que puede haber quedado luego de la extracción de ARN lo cual nos interferiría en los pasos siguientes.

Luego del tratamiento con DNasa I se midió la absorbancia a 260nm y se calculó la concentración de la muestra de la forma ya descrita en resultados (ver apéndice 1) (Tabla 2).

También se midió la absorbancia a 280 nm y se hizo la relación 260/280 para evaluar la contaminación con proteínas.

Cuadro 2. Medida de la absorbancia y relación A260/A280 luego de la digestión con DNasa I. Dilución 1:250 en agua milliQ.

Muestras	Absorbancia: A260	Relación A260/A280	Cálculo de las concentraciones:
1 ovario corvina 2	0.322	1.86	3.220 µg/mL
2 hígado corvina 2	0.236	1.83	2.360 µg/mL

4. Retrotranscripción

Debe destacarse que cantidades equivalentes de ARN total de hígado y ovario fueron retrotranscriptas (ver materiales y métodos N° 4.1).

5. Ensayos de PCR.

Asimismo, destacamos que el ADNc obtenido se usó en iguales cantidades como molde en los ensayos de amplificación de actina y en las reacciones en las que se usaron los oligonucleótidos degenerados.

5.a Evaluación del ADNc obtenido

Con el propósito de evaluar la calidad de los ADNc sintetizados, se realizaron primeramente ensayos de PCR empleando oligonucleótidos que amplifican el gen de actina. El análisis por electroforesis de los productos obtenidos, permitió visualizar tal como se muestra en la **figura 3**, que tanto la reacción correspondiente al ADNc de hígado como en la de ovario, aparece un fragmento de aproximadamente 341 pb. El tamaño de estos amplicones coincide con los obtenidos en ensayos con ADNc de pez cebra (M. Concha, comunicación personal). Por otra parte, la intensidad de la banda obtenida con los dos ADNc es apreciablemente similar

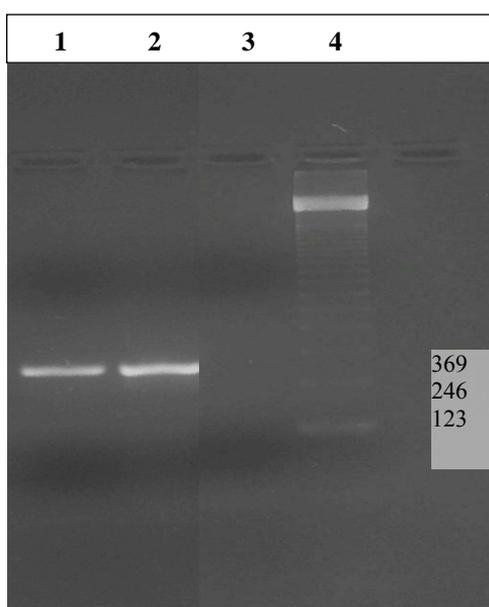


Figura 3: Electroforesis de los productos de PCR con *oligonucleótidos de actina*. Carril 1, ADNc muestra 1, ovario de corvina; carril 2 pez cebra pez cebra, ADNc muestra 2, hígado de corvina, carril 3, control negativo, carril 4, MPM 123 pb.

5.b. Ensayos de PCR con oligonucleótidos degenerados CVR2 y CVF2

Una vez comprobada la calidad del molde y habiendo demostrado que los ADNc no tenían inhibidores de la PCR, procedimos a realizar ensayos con los oligonucleótidos degenerados CVR2 y CVF2.

Esperábamos de acuerdo al procedimiento utilizado en el diseño de los oligonucleótidos y las referencias bibliográficas (Del Giacco y col. 1998) la obtención de productos de PCR aproximadamente 680 pb.

La reacción de PCR fue visualizada por electroforesis en gel de agarosa. Se constató la presencia de un fragmento de aproximadamente 680 pb, es decir del tamaño esperado, únicamente en el carril correspondiente a la reacción que usó como molde el ADNc de hígado.

6. Extracción de ADN de las bandas de agarosa.

Una vez eluido el ADN de la banda de agarosa, el mismo fue nuevamente analizado en gel para corroborar su tamaño y estimar su concentración (**Figura 4**).

La elución logró purificar de las bandas recortadas el ADN amplificado y en el pocillo donde se cargó un volumen de 15 μ L del eluido, se observa una banda con una migración en el entorno de 680 pb, como se esperaba.

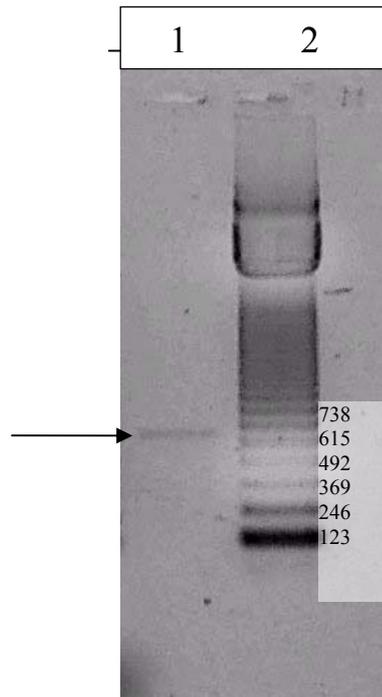


Figura 4: Electroforesis del producto de la purificación del fragmento de PCR. En el carril 1 se puede observar el producto de la purificación. En el carril 2 se observa el marcador de peso molecular de 123 pb. La flecha señala la banda en el entorno de 680.

7. Clonado del producto de PCR y análisis de los plásmidos recombinantes

El fragmento de ADNc obtenido y purificado lo clonamos en un vector pGEM-T, un vector especial preparado para clonar productos de PCR. El pGEM-T tiene el gen de resistencia a la ampicilina (ampR) que permite la selección de las bacterias que incorporaron el plásmido. Además, el sitio de clonación está dentro de la región codificante de la enzima β -galactosidasa que permite la selección por color de colonias que incorporaron el plásmido recombinante (**Ver Apéndice**). Con el producto de ligación se transformaron bacterias competentes *E. coli* TOP10.

Seleccionamos 17 colonias blancas y una azul y con ellas se realizaron minipreparaciones de plásmidos. Se analizaron los productos obtenidos por electroforesis en gel de agarosa (**figura 5**). Podemos observar en las diferentes preparaciones distintas formas plasmídicas, de las cuales se destacan la superenrollada

(la forma más adelantada en la migración de cada preparación) y presumiblemente la lineal (por la proximidad con la banda del superenrollado)

La visualización de los ADN plasmídicos nos permitió identificar los plásmidos recombinantes. Podemos ver cómo los plásmidos correspondientes a los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 11, 14 y 15 están retardados con respecto al control (colonia azul) del carril 7.

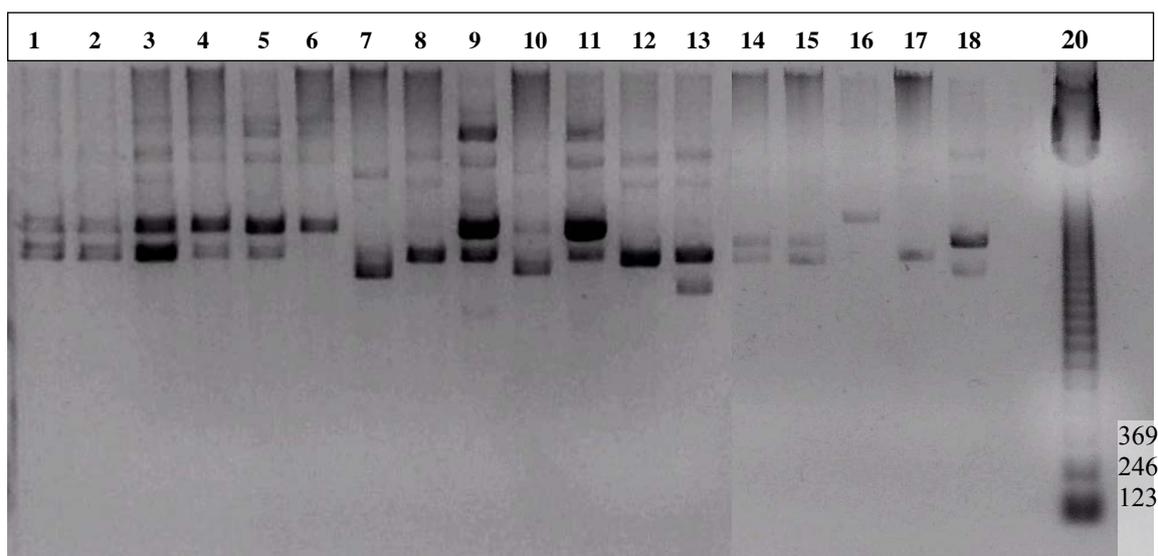


Figura 5: Corrida electroforética de los productos de las minipreparaciones. Carriles 1 al 6 y del 8 al 18 corresponden a los productos de minipreparaciones de colonias blancas. En el carril 7 se cargó el plásmido control extraído de una colonia azul. Carril 20 corresponde al MPM de 123 pb.

8. Digestión con endonucleasa *EcoRI*

Para demostrar que los plásmidos de migración retrasada efectivamente eran recombinantes, procedimos a liberar el inserto mediante digestión con la endonucleasa de restricción *EcoRI*. Como ya se mencionó, (ver vector) a los lados del sitio de clonado (sitio *EcoRV*) el vector presenta dos sitios *EcoRI* por lo que en una sola digestión podemos liberar el inserto. El plásmido de la muestra 4 fue elegido para la reacción y el producto de la digestión se corrió en un gel de electroforesis para su análisis (**figura 6**). Se comprobó la presencia del fragmento de 680 pb, que señala a este plásmido como efectivamente recombinante.

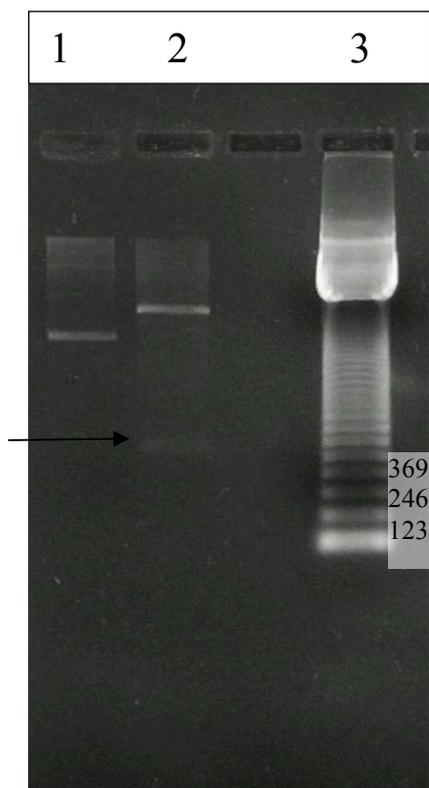


Figura 6: Liberación del inserto mediante la digestión con la endonucleasa *EcoRI* de la muestra 4. Carril 1 plásmido sin digerir, carril 2 plásmido digerido, carril 3 marcador de peso molecular de 123 pb. La flecha indica el fragmento obtenido.

9. Secuenciación

Habiendo comprobado por medio de la digestión que el plásmido 4 contenía el inserto, asumimos que los otros plásmidos de migración retardada tenían incorporado el ADN proveniente de la PCR, se secuenciaron en ambos sentidos los plásmidos N° 4, 7, 8, 9, 10, 13 y 15 (**figura 5**). Una vez corregidas manualmente en el programa CHROMAS, se compararon entre ellas las secuencias obtenidas (**figura 7**). Como mencionamos anteriormente, debido al diseño experimental se esperaba obtener más de un tipo de secuencia codificante. Sin embargo, el inserto de los plásmidos recombinantes analizados resultó ser idéntico. La única secuencia obtenida fue sometida a comparación con todas las secuencias depositadas en el GenBank. La herramienta informática usada fue el BLAST 2.2.17 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Las mejores puntuaciones que mostró el análisis fueron: 85 % de identidad con el ADNc de hígado de hembra adulta de *Liparis atlanticus* que codifica para la proteína L del corion

y 82 % de identidad con el ADNc también de hígado de hembra adulta de *Oryzias latipes* que codifica para la coriogenina L. A la luz de este resultado que mostraba la similitud de la secuencia obtenida con proteínas coriónicas, pasamos a denominarla **czp** (c= corvina; zp= dominio zp).

Por su parte, el análisis de la secuencia aminoacídica deducida (**figura 8**) mostró que **czp** comparte 81 % de identidad y 89 % de homología con la proteína coriónica mayoritaria de *Sparus aurata* que se expresa en hígado de hembras adultas y en el hígado de machos tratados con estradiol 17-β; y 78 % de identidad y 89 % de homología con la coriogenina L de *Oryzias latipes* (**figura 9 y 10**).

Con el objetivo de profundizar el análisis de **czp**, obtuvimos del GenBank las siguientes secuencias de coriogeninas:

- *Liparis atlanticus* AAS55644
- *Oryzias latipes* AAM91819
- *Sparus aurata* CAA63709
- *Gallus gallus* AAV35194
- *Danio rerio* AAI16532
- *Bos Taurus* AAX46460.

Las secuencias obtenidas se llevaron al formato de archivo FASTA, y se sometieron al programa CLUSTALW 2.0 donde se realizó el alineamiento en la modalidad de alineamientos múltiples de secuencias. Se esperaba revelar cuál o cuáles de las características conservadas entre las secuencias homólogas reportadas están presentes en **czp**. El resultado se muestra en la (**figura 12**). Se señalan las identidades con asterisco; las conservaciones con doble punto.

La búsqueda de dominios proteicos conservados se realizó en la base de datos PROSITE (<http://ca.expasy.org/prosite/>). El rastreo efectuado con la secuencia **czp** de 213 aminoácidos trae un único perfil: el dominio zp_2 (PS51034) de 260 aminoácidos. De acuerdo a este resultado, en la figura - se señalan en celeste siete residuos Cys invariables. Cabe consignar, que el octavo residuo Cys invariable que presentan los dominios ZP como ya se mencionó, (**ver Introducción**) se encuentra por fuera de la secuencia que abarca **czp**.

Secuencias

Secuencia obtenida con el oligonucleótido universal Sp6.

ggacctcactctgggaacctgaaaagctgtgcagaggacgctgccgctcaagtgttgaccttgaatctgaactgcatgcgtg
tggcagcacattattgatgacagaagattccctcatctacaccttactctaaactataatccccaaccttggggcggtctcctgt
ggtgaggaccggccctgctgttgaattgcggaatgccactaccaaggaggcacaatgtgagcagccttctcttgatcctct
gtggatcccgttctctgctgtaagatatcagaagaatacttatacttaccctgaaactcatgactgatgactggcaatacagaga
ggccaagctaccagtattacctgggagacatcattaatattgaggcaatcgtcaagcagtactccacgtgccctcctggtttat
gtggacagctgtgctgctactctttcacctgacatgaaactcaacccagatatgctttcattgaaaacctggatgtttggtgat
gctaggatcacaggctctaactctaagttcatggctcgcactgtaaagaacaagcttcagttccagttggaggccttcaggttcc
aggggtgctgacagtgggactgctctcatcacctgcatca

Secuencia obtenida con el oligonucleótido universal T7.

tggacctcactctgggaacctgtaatgctgttgcagaggacgctgccgctcaagtgttgattttgaatctgaactgcatgcgtg
tggcagcacattattgatgacagaagattccctcatctacaccttactctaaactataatccccaaccttggggcggtctcctgt
ggtgaggaccggccctgctgttgaattgcggaatgccactaccaaggaggcacaatgtgagcagccttctcttgatcctct
gtggatcccgttctctgctgtaagatatcagaagaatacttatacttaccctgaaactcatgactgatgactggcaatacagaga
ggccaagctaccagtattacctgggagacatcattaatattgaggcaatcgtcaagcagtactccacgtgccctcctggtttat
gtggacagctgtgctgctactctttcacctgacatgaaactcaacccagatatgctttcattgaaaacctggatgtttggtgat
gctaggatcacaggctctaactctaagttcatggctcgcactgtagagaacaagcttcagttccagttggaggccttcaggttcc
aggggtgctgacagtgggactgctctacatcacctgcatc

Figura 7: Secuencia de czp. La secuenciación de los plásmidos recombinantes fue realizada por métodos automáticos en el equipo ABI 3130 (Applied Biosystems) del Instituto Pasteur de Montevideo (www.pasteur.edu.uy).

DLTLGTCNAVAEDAAAQVLIFESELHACGSTLLMTEDSLIYTFLLNYPQLGGSPVVRTGPAVV
IAECHYPRRHNVSSLPLDPLWIPFSAVKISEEYLYFTLKLMTDDWQYERPSYQYYLGDIIIEAIVK
QYFHVPLRVYVDSCVATLSPDMNSNPYAFIENHGCLVDARITGSNSKFMARTVENKLFQLEA
FRFQGADSGLLYITCHQ

Figura 8: Secuencia proteica deducida czp

Oryzias latipes mRNA for L-SF precursor, complete cds
Length=1428

Score = 536 bits (594), Expect = 3e-149
Identities = 450/554 (81%), Gaps = 0/554 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 12  TGTGGCAGCACATTATTGATGACAGAAGATTCCCTCATCTACACCTTTACTCTAAACTAT 71
      ||||| ||| ||| ||||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 411  TGTGGGAGCGTGTTAACAATGACAGAGGACTCCCTGGTCTACACCTTCACTCTGAATTAT 470

Query 72  AATCCCCAACCCCTGGGCGGNTCTCCTGTGGTGAGGACCGGCCCTGCTGTTGTAATTGCG 131
      || ||| ||||| ||||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 471  AACCCCAAACCCCTGGGCAAGTGCCTGTGGTGAGGACGAGCCAAGCTGTTGTTATCGTG 530

Query 132  GAATGCCACTACCCAAGGAGGCACAATGTGAGCAGCCTTCCTCTGATCCTCTGTGGATC 191
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 531  GAATGTCACTACCCAAGAAAGCACAATGTGAGCAGTCTGGCTCTCGATCCTCTGTGGT 590

Query 192  CCGTCTCTGCTGTTAAGATATCAGAAGAATACTTATACTTCACCTGAAACTCATGACT 251
      || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 591  CCATTCTCTGCAGCAAAGATGGCAGAAGAATCTTGTATTTCACTTTGAAACTCACGACA 650

Query 252  GATGACTGGCAATACGAGAGGCCAAGCTACCANTATTACCTGGGAGACATCATTAATAT 311
      || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 651  GACGACTTCCAATTTGAGAGGCCAAGCTACCAGTATTTCCCTTGGGAGACTTGATCCACATA 710

Query 312  GAGGCAATCGTCAAGCAGTACTTCCACGTGCCCTCCGTGTTTATGTGGACAGCTGTGTC 371
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 711  GAGGCTACCGTCAAGCAGTACTTCCACGTGCCCTCGCTGTTTACGTGGACAGATGTGTT 770

Query 372  GCTACTCTTTCACCTGACATGAACTCCAACCCAGATATGCTTTCATTGAAAACCATGGA 431
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 771  GCTACTCTTTCACCTGATGCAAACTCAAGCCCCAGTTATGCCTTCATTGACAACTATGGA 830

Query 432  TGTFTGGTTGATGCTAGGATCACAGGCTCTAACTCTAAGTTCATGGCTCGCACTGTAGAG 491
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 831  TGTFTGCTTGACGGCAGAATCACAGGCTCTGACTCAAAGTTCGTGTCTCGACCAGCTGAA 890

Query 492  AACAAAGCTTCAGTTCAGTTGGAGGCCCTTCANGTTCAGGGTGCTGACAGTGGACTGCTC 551
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 891  AACAAAGCTTGACTTCAGCTGGAAGCCTTCAGGTTCCAGGGTGCTGACAGTGAATGATT 950

Query 552  TACATCACCTGCCA 565
      ||||| |||||
Sbjct 951  TACATCACCTGCCA 964

```

Figura 9: La secuencia de ADN obtenida se analizó con el software BLAST 2.2.17 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) para la búsqueda de secuencias homólogas en el GenBank. En la figura se muestra la comparación de la secuencia de corvina que llamamos *czp*, con la del ARNm de la proteína coriónica L de *Oryzias latipes*.

Sparus aurata mRNA for chorion protein
Length=1373

Score = 643 bits (712), Expect = 0.0
Identities = 479/563 (85%), Gaps = 0/563 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 3   CTGCATGCGTGTGGCAGCACATTATTGATGACAGAAGATTCCCTCATCTACACCTTTACT 62
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 428  CTGCACCAGTGTGGCAGCACGTTAACGACAACAGACAAGTCCCTCATCTACACCTTCCTT 487

Query 63  CTAAACTATAATCCCAACCCCTGGGCGGNTCTCCTGTGGTGAGGACCGGCCCTGCTGTT 122
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 488  CTGAACTACAATCCTCAACCTCTGGGTGACGCTCCTGTGGTGAGGACCAGCTCAGCTGTT 547

Query 123  GTAATTGCGGAATGCCACTACCCAAGGAGGCACAATGTGAGCAGCCTTCTCTTGATCCT 182
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 548  GTCATTGTAGAAATGCCACTACCAAAGGCATCAACAATGTGAGCAGCCTTCTCTGGACCG 607

Query 183  CTGTGGATCCCGTTCTCTGCTGTTAAGATATCAGAAGAATACTTATACTTCACCTGAAA 242
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 608  CTGTGGATCCCGTTCTCTGCTGTTAAGGTGTCTGAGGAATTCTGTACTTCACCTTAAA 667

Query 243  CTCATGACTGATGACTGGCAATACGAGAGGCCAAGCTACCANTATTACCTGGGAGACATC 302
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 668  CTCATGACTGATGACTGGCAGTATGAGAGGCCAATCTACCAGTACTTCTGGGAGACATC 727

Query 303  ATTAATATTGAGGCAATCGTCAAGCAGTACTTCCACGTGCCCTCCGTGTTTATGTGGAC 362
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 728  ATTAATATTGAGGCTTCCGTCAAGCAGTTCTATCACGTGCCCTCCGTGTTTACTTTGGAC 787

Query 363  AGTGTGTCGCTACTCTTTCACCTGACATGAACTCCAACCCAGATATGCTTTCATTGAA 422
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 788  AACTGTGTCGCTACTCTTCTCCTGACAGGTCCCTCCAACCCAACTATGCCTTCATTGAC 847

Query 423  AACCATGGATGTTTGGTTGATGCTAGGATCACAGGCTCTAACTCTAAGTTCATGGCTCGC 482
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 848  AACCATGGGTGTTTGGTTGATGCTAGGCTCACAGGCTCAGACTCTAAGTTCATGGCTCGC 907

Query 483  ACTGTAGAGAACAAGCTTCAGTTCCAGTTGGAGGCCTTCANGTTCAGGGTGCTGACAGT 542
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 908  ACTGCAGATAACGTGCTGCGGTTCCAGTTGGAGGCCTTCAGGTTCAAGGGCGCTGACAGT 967

Query 543  GGACTGCTCTACATCACCTGCCA 565
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 968  GGACTGCTCTACATTACATGCCA 990

```

Figura 10: La secuencia de ADN obtenida se analizó con el software BLAST 2.2.17 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) para la búsqueda de secuencias homólogas en el GenBank. En la figura se muestra la comparación de la secuencia de corvina que llamamos *czp*, con la del ARNm de la proteína coriónica L de *Sparus aurata*.

Chorion protein [*Sparus aurata*]

Length=425

Score = 328 bits (841), Expect = 1e-88

Identities = 153/188 (81%), Positives = 169/188 (89%), Gaps = 0/188 (0%)

Frame = +3

```
Query 3   LHACGSTLLMTEDSLIYTFLLNYPQPLGGSPVVRTGPAVVIAECHYPRRHNVSSLPLDP 182
          LH CGSTL T+ SLIYTF LNYNPQPLG +PVVRT AVVI ECHY R HNVSSLPLDP
Sbjct 141  LHQCGSTLTTTDDKSLIYTFLLNYPQPLGAAPVVRTSSAVVIVECHYQRHHNVSSLPLDP 200

Query 183 LWIPFSAVKISEEYLYFTLKLMTDDWQYERPSYXYLGDIIINIEAIVKQYFHVPLRVYVD 362
          LWIPFSAVK+SEE+LYFTLKLMTDDWQYERP Y Y+LGDIIINIEA VKQ++HVPLRVY+D
Sbjct 201  LWIPFSAVKVSEEFYLYFTLKLMTDDWQYERPIYQYFLGDIIINIEASVKQFYHVPLRVYLD 260

Query 363 SCVATLSPDMNSNPNRYAFIENHGCLVDARITGSNSKFMARTVENKLFQLEAFXFQGADS 542
          +CVATLSPD +SNP YAFI+NHGCLVDAR+TGS+SKFMART +N L+FQLEAF F+GADS
Sbjct 261  NCVATLSPDRSSNPNRYAFIDNHGCLVDARLTGSDSKFMARTADNVLRQLEAFRFKQGADS 320

Query 543 GLLYITCH 566
          GLLYITCH
Sbjct 321  GLLYITCH 328
```

Figura 11: Comparación de las secuencias aminoacídica czp y la proteína coriónica L de *Sparus aurata*.

Análisis comparativo de secuencias de coriogeninas usando el método de múltiples alineamientos:

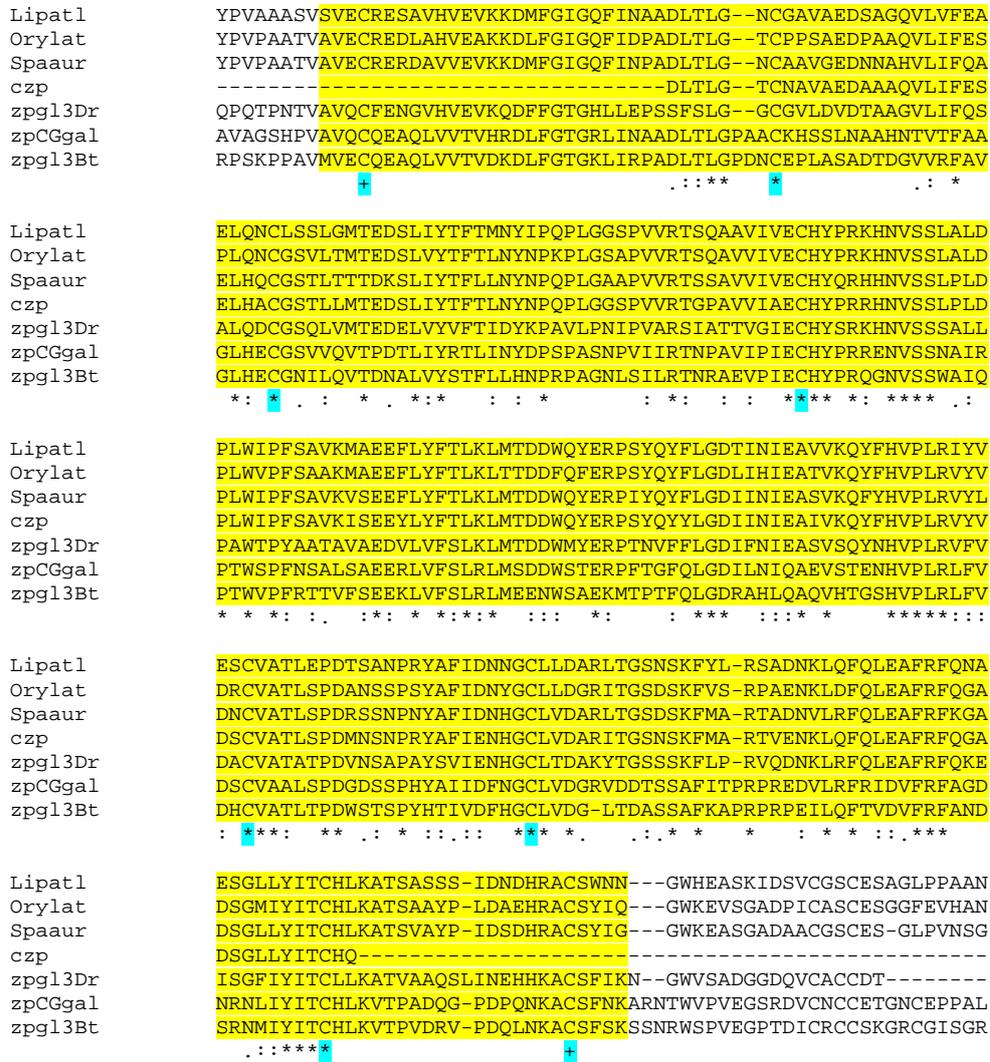


Figure 12: Alineamiento de secuencias, lipart (*Liparis atlanticus*), Orylap (*Oryzias latipes*), Spaaur (*Sparus aurata*), czp (*Micropogonias furnieri*), zpgl3Dr (*Danio rerio*), zpCGgal (*Gallus domesticus*) y zpgl3Bt (*Bos taurus*). Se señalan las identidades con asterisco; las conservaciones con doble punto. En amarillo se marca el dominio ZP, en celeste se marcan los residuos cisteína conservados.

10. Estudios de expresión génica

El análisis de la expresión del gen que codifica para *czp*, se realizó mediante la combinación de la retrotranscripción y la reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR). Los estudios de RT-PCR se hicieron sobre ARN total de ovario e hígado de corvina de hembra adulta. De manera de prevenir la amplificación del ADN genómico, se realizó la digestión con DNasa antes de realizar la transcripción inversa. Como control interno se eligió la amplificación del gen de β -actina. El resultado de este estudio que se muestra en la **figura 13** permite comparar la abundancia del transcripto *czp* en las diferentes muestras. La amplificación del control interno (**figura 13- B**) permitió la normalización del ARN de partida: en ambos tejidos la intensidad de la banda del amplicón de β -actina es sensiblemente igual. Por su parte, la banda correspondiente al amplicón de *czp* está sólo presente en la muestra de hígado. En base a estos resultados se puede concluir que la coriogenina de corvina identificada se expresaría en el hígado de las hembras adultas pero no así en el ovario de las mismas.

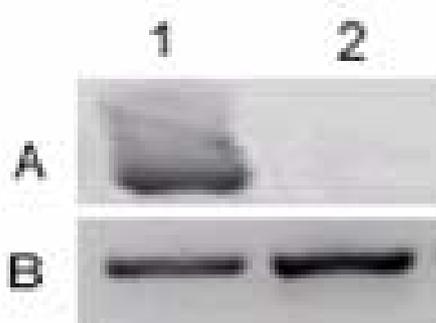


Figura 13: Estudio de expresión por RT-PCR. Carril1: ARN de hígado de corvina hembra. Carril 2: ARN de ovario de corvina. En A, la amplificación se hizo con los oligonucleótidos CVF2 y CVR2. En B, se utilizó el par de oligonucleótidos que amplifica β -actina.

Discusión

Durante el presente trabajo de pasantía, hemos aislado y caracterizado un fragmento de ADNc de un gen de corvina blanca (*M. furnieri*), que fue denominado *czp* (corvina zona pelúcida), siendo uno de los primer fragmento de un gen clonado hasta el momento en esta especie. Este ADNc codifica para un probable componente del corion: contiene un dominio ZP que caracteriza a la mayoría de los componentes de la envoltura del ovocito de los vertebrados estudiados hasta ahora.

Czp fue obtenido en reacciones de PCR que usaron como molde ADNc. Previamente, los diferentes ADNc sintetizados se habían usado en ensayos de PCR con oligonucleótidos de actina que nos fueron donados (**Ver Materiales y Métodos**), con el objetivo de evaluar su calidad. Si bien este par de oligonucleótidos fue diseñado para amplificar de manera específica un gen de actina de pez cebra, la conservación de la actina a lo largo de la escala evolutiva justifica su uso en los ensayos de corvina. Asimismo, cabe señalar que previamente con este mismo juego de oligonucleótidos, se realizaron ensayos de PCR sobre ADN genómico y sobre ADNc de diferentes tejidos procedentes de *Austrolebias charrua* que permitieron verificar que se diseñaron para amplificar una secuencia que incluye un intrón: el amplicón en el ADN genómico es de unos 700 pb, mientras que el obtenido en el ADNc es un amplicón de 341 pb.

En los ensayos de PCR que condujeron al clonado de *czp*, los oligonucleótidos utilizados (CVF1 y CVR1) son derivados de secuencias aminoacídicas, por lo que tuvieron que ser necesariamente degenerados. En su diseño buscamos disminuir la degeneración por medio de los siguientes procedimientos: elegir regiones conservadas que evitaran, en lo posible aminoácidos que sean codificados por varios codones; en posiciones en las cuales no se podía evitar una alta degeneración se recurrió al uso de bases neutras, inosinas, reduciendo así la degeneración.

Este juego de oligonucleótidos degenerados nos hacía esperar la aparición en los ensayos de PCR, de un fragmento de aproximadamente 680 pb. Este fue el tamaño que efectivamente tuvo la banda obtenida, en la que debido al diseño experimental esperábamos tener más de una secuencia codificante de coriogeninas. En este mismo sentido, en varias de las especies de teleósteos en las que el corion viene siendo

estudiado, se ha podido caracterizar más de un componente proteico mayoritario (Murata y col. 1997). Recientemente (Modig y col. 2006) se identificaron y caracterizaron las proteínas ZP1 (que presenta dos isoformas, ZP1a y ZP1b), ZP2 y ZPX del corion de *Sparus aurata*, una especie perteneciente al mismo Orden que *M. furnieri*. Sin embargo, el inserto de los siete plásmidos secuenciados resultó ser el mismo. Además, si bien el gel 2D de las proteínas del corion de corvina (Berois y col. 2007) muestra la presencia de 14 *spots*, nada se puede afirmar tampoco acerca del número de componentes proteicos del mismo ya que no fue posible identificar ninguno de los *spots* y se desconoce si alguno de ellos corresponde a modificaciones post traduccionales de algún/os componente/s.

El examen del ADNc clonado revela tal como esperábamos, la similitud de su secuencia aminoacídica deducida con el dominio ZP, un dominio altamente homólogo existente en los componentes de las envolturas del ovocito de vertebrados. Las mayores identidades las comparte con la coriogenina L de *Liparis atlanticus* y de *Oryzias latipes*; y con la proteína del corion *gp49* de *Sparus aurata*. Asimismo, es homóloga a la proteína ZP3 (ZPC) de *Gallus domesticus* y a la proteína ZP3 de *Bos taurus*. En mamíferos la proteína ZP3 está directamente involucrada a través de sus O-glicosilaciones, en la interacción ovocito-espermatozoide, y en la reacción acrosomal (Murata y col. 1997). El espermatozoide de los peces teleósteos se caracteriza por carecer de acrosoma y por tanto de reacción acrosomal, por lo que no cabe esperar un componente coriónico involucrado en esta función. Además, en peces el espermatozoide penetra sólo por el micrópilo abierto en la superficie del corion, y hay escasas evidencias de una interacción específica entre el espermatozoide y el corion (Amanze y Iyengar. 1990, Pillai y col. 1993). Ésta podría ser una de las razones por las que la proteína coriónica de peces homóloga a la ZP3 de mamíferos no presenta sitios de O-glicosilación. En cuanto a su función, se sostiene que cumple un papel estructural en el que estarían implicados puentes disulfuro formados por sus residuos Cys (Del Giacco y col. 1998; Wang y col. 1999).

El estudio por RT-PCR nos permitió identificar al hígado como el órgano de expresión de *czp*. Cabe destacar que el mismo organo fue identificado para los genes ortólogos de *S. auratus* y *O. latipes*. (Hamazaki y cols., 1987; Del Giacco y col. 1998)

En los estudios de expresión, nuestro objetivo no era determinar en forma absoluta el número de moléculas de transcripto *czp*, sino determinar la existencia de diferencias en la expresión tisular de este gen. Sin embargo, previo a esta determinación, debíamos eliminar la variación debida al “efecto tubo” (diferencias producidas por la degradación parcial del ARN en alguna de las muestras; distinta eficiencia en la transcripción inversa de las mismas; errores de pipeteo, etc). De aquí la necesidad de usar un control interno para la normalización y la elección que se hizo fue la de un gen de expresión abundante y relativamente invariable en los distintos tejidos como es el gen de la β -actina. Luego, realizamos una determinación cualitativa de la expresión del gen problema y en las condiciones experimentales en las que se hizo el estudio, se puso de manifiesto que el gen que codifica para la coriogenina L de corvina tiene expresión hepática.

Con los datos obtenidos y en la medida en que sólo hemos identificado una coriogenina, no es posible asegurar que la síntesis de las coriogeninas en corvina blanca sea exclusivamente hepática. Con el juego de oligonucleótidos utilizado sólo fue posible la identificación de una coriogenina del tipo L. Sin embargo, en otros teleósteos ha sido caracterizada más de una coriogenina como se detalló en la Introducción. Es por esto que consideramos que los presentes resultados son preliminares y justifican la continuación de los estudios. Como consignamos en Materiales y Métodos, disponemos de otro juego de oligonucleótidos degenerados que podrán ser usados a la brevedad. En las especies de teleósteos donde se ha demostrado la síntesis hepática de las coriogeninas, la regulación de su expresión se encuentra bajo el control del estradiol, lo cual las haría más susceptibles a la acción de xenoestrógenos (Oppen-Berntsen y col. 1990). Dada la importancia económica de la corvina blanca como recurso pesquero, resultaría interesante evaluar si la expresión del gen identificado se encuentra regulada por estrógenos así como su valor como biomonitor de contaminación. En este mismo sentido, los análisis de tipo proteómico pueden ser una herramienta valiosa para el análisis de variaciones en los niveles de contaminación hídrica. Cabe destacar que nuestro grupo cuenta con análisis electroforéticos 2D (Berois y col. 2007) que sirven de patrón para evaluar en forma comparada los posibles efectos que la contaminación podría tener sobre la envoltura vitelina de esta especie. El abordaje molecular de esta problemática permite obtener evaluaciones de grandes volúmenes de muestras, de forma relativamente rápida y económica, lo que representa un atractivo adicional a la expansión del conocimiento en la temática. Nos encontramos así frente a un tema que

presenta un atractivo básico, y abre un posible campo de desarrollo aplicado al diseño de ensayos para monitorear el estado sanitario de nuestras aguas frente a la contaminación por xenoestrógenos.

Bibliografia

- Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E & Lipman D (1990), Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215:403-410
- Amanze D & Iyengar A (1990), The micropyle: a sperm guidance system in teleost fertilization, *Development* 109:495-500
- Amores A, Force A & Yan Y (1998), Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution, *Science* 282:1711-1714
- Arukwe A, Celius T, Walther B & Goksøyr A (2000), Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Aquat. Toxicol.* 49:159-170
- Arukwe A & Goksøyr A (2003), Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption, *Comp. Hepatol.* 2:4
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K. (eds), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 2005
- Barisone G, Krapf D, Correa-Fiz F, Arranz S & Cabada M (2007), Glycoproteins of the vitelline envelope of Amphibian oocyte: biological and molecular characterization of ZPC component (gp41) in *Bufo arenarum*, *Mol. Reprod. Dev.* 74:629-40
- Berois N, Arezo M, Chalar C, Brauer M & Barros C (2007), Ultrastructure and protein composition of the oocyte envelope in the whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823, Sciaenidae, Perciformes), *J. App. Ichtyol.* 23:34-39

- Berois N, Bolatto C, Brauer M & Barros C (2004), Gametogenesis, histological gonadal cycle and *in vitro* fertilization in the whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823), *J. App. Ichthyol.* 20:169-175
- Bonsignorio D, Perego L, Del Giacco L & Cotelli F (1996), Structure and macromolecular composition of the zebrafish egg chorion, *Zygote* 4:101-8
- Brivio M, Bassi R & Cotelli F (1991), Identification and characterization of the major components of the *Oncorhynchus mykiss* egg chorion, *Mol. Reprod. Dev.* 28:85-93
- Callebaut I, Mornon J & Monget P (2007), Isolated ZP-N domains constitute the N-terminal extensions of Zona Pellucida proteins, *Bioinformatics* 23:1871- 1874
- Chang Y, Wang S, Tsao C & Huang F (1996), Molecular cloning, structural analysis, and expression of carp ZP3 gene, *Mol Reprod. Dev.* 44:295-304
- Conner S & Hughes D (2003), Analysis of fish ZP1/ZPB homologous genes-evidence for both genome duplication and species-specific amplification models of evolution, *Reproduction* 126:347-352
- Chomczynski P & Sacchi N (1987), Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162(1):156-9
- Del Giacco L, Vanoni C, Bonsignorio D, Duga S, Mosconi G, Santucci A & Cotelli F (1998), Identification and spatial distribution of the mRNA encoding the gp49 component of the gilthead sea bream, *Sparus aurata*, egg envelope, *Mol. Reprod. Dev.* 49:58-69
- Del Giacco L, Diani S & Cotelli F (2000), Identification and spatial distribution of the mRNA encoding an egg envelope component of the Cyprinid zebrafish, *Danio rerio*, homologous to the mammalian ZP3 (ZPC), *Dev. Genes Evol.* 210:41-6

- Hamazaki T, Iuchi I & Yamagami K, (1987), Production of a “spawning female specific substance” in hepatic cells and its accumulation in the ascites of the estrogen-treated adult fish, *Oryzias latipes*. *J. Exp. Zool.* 242,325-332.
- Hamazaki T, Nagahama Y, Iuchi I & Yamagami K (1989), A glycoprotein from the liver constitutes the inner layer of the egg envelope (zona pellucida interna) of the fish, *Oryzias latipes*, *Dev. Biol.* 133:101-10
- Hyllner S, Oppen-Berntsen D, Helvik J, Walther B & Haux C (1991), Oestradiol-17 beta induces the major vitelline envelope proteins in both sexes in teleosts, *J. Endocrinol.* 131:229-236
- Modig C, Modesto T, Canario A, Cerdà J, Hofsten J & Olsson P (2006), Molecular Characterization and Expression Pattern of Zona Pellucida Proteins in Gilthead Seabream (*Sparus aurata*), *Biol. Reprod.* 75: 717 – 725
- Murata K, H Sugiyama, S Yasumasu, I Iuchi, I Yasumasu, K Yamagami (1997), Cloning of cDNA and estrogen-induced hepatic gene expression for choriogenin H, a precursor protein of the fish egg envelope (chorion). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94:2050 - 2055
- Lee C, Jeon S, Na J, Park K (2002), Sequence analysis of choriogenin H gene of medaka (*Oryzias latipes*) and mRNA expression, *Environ. Toxicol. Chem.* 21:1709-14
- Lyons C, Payette K, Price J, Huang R (1993), Expression and structural analysis of a teleost homolog of a mammalian zona pellucida gene, *J. Biol. Chem.* 268:21351-21358
- Ohno S, *Evolution by Gene Duplication* Allen and Unwin; London Springer-Verlag, New York, 1970

- Oppen-Berntsen D, Helvik J, Walther B (1990), The major structural proteins of cod (*Gadus morhua*) eggshells and protein crosslinking during teleost egg hardening, *Dev. Biol.* 137:258-65
- Pillai M, Shields T, Yanagimachi R & Cherr G (1993), Isolation and partial characterization of sperm motility initiation factor from the eggs of the Pacific herring, *Clupea pallasii*, *Journal of Experimental Zoology* 265:336-342
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T, *Molecular Cloning*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- Scapigliati G, Carcupino M, Taddei A, Mazzini M (1994), Characterization of the main egg envelope proteins of the sea bass *Dicentrarchus labrax* L. (Teleostea, Serranidae), *Mol. Reprod. Dev.* 38:48-53
- Spargo S & Hope R (2003), Evolution and Nomenclature of the Zona Pellucida Gene Family, *Biol. Reprod.* 68:358-362
- Swanson JW & Vacquer VD (2002), The rapide evolution of reproductive proteins. *Nature Rev. Gen.* 3:137-144
- Tesoriero J (1977), Formation of the chorion (zona pellucida) in the teleost, *Oryzias latipes*. I. Morphology of early oogenesis, *J. Ultrastruct. Res.* 59:282-291
- Vazquez-Levin M, Kaplan P, Sandler B, Garrisi G, Gordon J & Navot D (1990), The predictive value of zona-free hamster egg sperm penetration assay for failure of human in vitro fertilization and subsequent successful zona drilling, *Fertil. Steril.* 53:1055-9
- Vizziano D, Puig P, Mesones C & Nagy G. (Eds), *The Río de la Plata. Research to Manage the Environment, Fish resources and Fishery in the saline front*. Ecoplata Program, Montevideo, Uruguay, ISBN 9974-7646-5-3, 2002

Wang H & Gong Z (1999), Characterization of two zebrafish cDNA clones encoding egg envelope proteins ZP2 and ZP3, *Biochim. Biophys. Acta* 1446:165-160

Watson JD, Baker TA, Bell SP & Gann A, *Biología Molecular del Gen*, 5ª ed., Editorial Médica Panamericana, 2006

Apéndice 1

Fundamento teórico de las Técnicas utilizadas.

1. Preparación del material.

El material de vidrio de uso general del laboratorio, así como otras herramientas necesarias como por ejemplo, los homogeneizadores de vidrio, con émbolo de teflón, fue tratado con dietilpírocarbonato (DEPC), que es un fuerte inhibidor (aunque no absoluto) de las RNasas (Fedorcsak y Ehrenberg, 1966). Brevemente, el tratamiento consiste en llenar y/o sumergir todo el material en una solución de agua bidestilada con DEPC (Sigma, 0.01%) e incubar a 37°C durante toda la noche. Posteriormente el material es autoclavado durante 40 minutos a 1 atmósfera para remover las trazas de DEPC.

Las micropipetas reservadas para trabajar con ARN, fueron tratadas con alcohol previo a ser usadas, al igual que la zona de la mesada de manera de que estuviera libre de RNasas.

Las cubas utilizadas para electroforesis de ARN también fueron tratadas: se lavan con detergente, se enjuagan bien con agua corriente, luego con agua destilada y por último con etanol 95% y se dejan secar. Posteriormente se llenan con una solución de H₂O₂ (3%) y se dejan incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos, luego de lo cual son enjuagadas con agua tratada con DEPC.

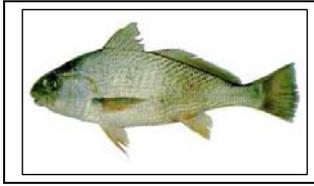
Todo el material empleado estaba identificado como exclusivo para ARN y fue mantenido en un lugar limpio y estéril designado para trabajo con ARN. De todos modos, excepto el material de plástico descartable, los tratamientos antes mencionados fueron aplicados previo a cada experimento.

2. Extracción de ARN con TRIzol

La extracción del ARN total de hígado y ovario de corvina fue realizada empleando una modificación del método de extracción de Chomczynski y Sacchi (1987) con el método de TRIzol, antes mencionado. La simplicidad del método permite

procesar un gran número de muestras de forma simultánea. Brevemente, se disecan ovario e hígado bajo condiciones de esterilidad y se procede a su homogeneización con TRIzol (1mL/100mg de muestra). La disgregación mecánica de los tejidos mediante su pasaje por un homogeneizador de vidrio con émbolo de teflón (tratados con DEPC), junto con la acción química del TRIzol permite romper las células y disolver los componentes celulares manteniéndose la integridad del ARN, ya que el TRIzol inactiva las RNAsas. Las muestras fueron seguidamente centrifugadas (12.000 g, 10 minutos) a 4°C para remover el material insoluble de los homogenatos. Este es un paso adicional en el método de TRIzol, recomendado cuando se trabaja con muestras que poseen un alto contenido proteico, lipídico, polisacáridos y abundante material extracelular como los tejidos musculares y adiposos. El *pellet* resultante de la centrifugación de los homogenatos contiene membranas extracelulares, polisacáridos y ADN de alto peso molecular, mientras que el sobrenadante posee el ARN. A su vez, se obtiene una capa superficial de lípidos que debe ser removida cuidadosamente antes de transferir el sobrenadante (homogenato limpio) a un tubo estéril. A continuación, las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente se agregó cloroformo (0,2mL/ mL TRIzol utilizado en la homogeneización), se taparon los tubos y se agitó manualmente de forma vigorosa durante 15 segundos, luego de lo cual las muestras fueron incubadas durante 3 minutos a temperatura ambiente. La adición de cloroformo seguida de una centrifugación (7150g, 25 minutos) a 4°C separa la solución en una fase orgánica (fenol-cloroformo), una interfase –donde quedan las proteínas y ADN- y una fase acuosa –en donde se encuentra exclusivamente el ARN (**Figura 1**).

Corvina Hembra



(*Micropogonias furnieri*)



Disección

Hígado y ovario (tratados de forma aislada)



Agregado de TRIzol
homogeneización
Centrifugación

Remoción de capa lipídica superficial

Recolección de la fase acuosa



Agregado de cloroformo
Centrifugación

Recolección de la fase acuosa (ARN)

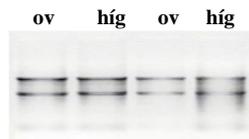


Agregado de isopropanol
Centrifugación

Pellet



Lavado con
etanol 75%



Solubilización del ARN

Figura 1: Diagrama que esquematiza el protocolo seguido para la extracción del ARN total de hígado y ovario de corvina blanca (*Micropogonias furnieri*), Ov: ovario, híg: hígado. La figura inferior muestra la foto adquirida digitalmente del gel de agarosa teñido con BrEt y visualizado bajo luz ultravioleta en el cual se corrieron electroforéticamente alícuotas de las muestras de ARN extraídas. Nótese la integridad del ARN y cómo las distintas moléculas de ARN presentes en cada muestra fueron separadas de acuerdo al tamaño. Las de menor tamaño como los ARN de transferencia,

son las que migran más (bandas inferiores), mientras que los ARN ribosómicos se pueden visualizar como bandas definidas y las distintas moléculas de ARNm se visualizan como un *smear* dado que poseen tamaños muy variados.

Seguidamente, se transfiere la fase acuosa a un tubo nuevo y se precipita el ARN con isopropanol (0.5mL / mL TRIzol utilizado en la homogeneización). Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos y luego centrifugadas (12000g, 10 minutos, 4°C). El ARN suele formar un precipitado en el costado y fondo del tubo. Los sobrenadantes fueron descartados y se lavó el ARN precipitado (pellet) con etanol (75% en agua DEPC) (1mL EtOH75% / mL TRIzol utilizado en la homogeneización). Luego de agregar el etanol se rompieron los pellets con el vortex para que se lavara bien el ARN, tras lo cual se centrifugó (7500g, 6 minutos, 4°C) y se removió inmediatamente el etanol. Las muestras se dejaron secar al aire y se resuspendió el ARN con agua bidestilada libre de RNAsas haciendo pasar la muestra varias veces por un tip e incubándolas 10 minutos a 60°C, para favorecer la resuspensión.

3. Bases de la medición de Densidad Óptica (DO)

En óptica, la ley de Beer-Lambert, también conocida como ley de Beer o ley de Beer-Lambert-Bouguer es una relación empírica que relaciona la absorción de luz con las propiedades del material atravesado. Para ARN, 1 DO_{260nm} (en cuba de un centímetro de espesor) es igual a una concentración de 40 µg/mL.

Ley de Lamber-Beer:

$$A = \alpha lc$$

$$\frac{I_1}{I_0} = 10^{-\alpha lc}$$

$$A = -\log \frac{I_1}{I_0}$$

$$\alpha = \frac{4\pi k c l}{\lambda}$$

Donde:

- A es la absorbancia (o absorción)
- I_0 es la intensidad de la luz incidente
- I_1 es la intensidad de la luz una vez ha atravesado el medio
- l es la distancia que la luz atraviesa por el cuerpo
- c es la concentración de sustancia absorbente en el medio
- α es el *coeficiente de absorción* o la absorbancia molar de la sustancia
- λ es la longitud de onda del haz de luz
- k es el coeficiente de extinción

En resumen, la ley explica que hay una relación exponencial entre la transmisión de luz a través de una sustancia y la concentración de la sustancia, así como también entre la transmisión y la longitud del cuerpo que la luz atraviesa. Si conocemos l y α , la concentración de la sustancia puede ser deducida a partir de la cantidad de luz transmitida.

Las unidades de c y α dependen del modo en que se exprese la concentración de la sustancia absorbente. Si la sustancia es líquida, se suele expresar como una fracción molar. Las unidades de α son la inversa de la longitud (por ejemplo cm^{-1}). En el caso de los gases, c puede ser expresada como densidad (la longitud al cubo, por ejemplo cm^{-3}), en cuyo caso α es una *sección representativa de la absorción* y tiene las unidades en longitud al cuadrado (cm^2 , por ejemplo). Si la concentración de c está expresada en moles por volumen, α es la absorbancia molar normalmente dada en mol cm^{-2} .

El valor del coeficiente de absorción α varía según los materiales absorbentes y con la longitud de onda para cada material en particular. Se suele determinar experimentalmente. La ley tiende a no ser válida para concentraciones muy elevadas, especialmente si el material dispersa mucho la luz. La relación de la ley entre concentración y absorción de luz está basada en el uso de espectroscopía para identificar sustancias.

4. Transcripción Reversa (RT)

La transcripción reversa (RT) nos permite convertir ARNm en ADN copia utilizando una enzima de origen viral denominada transcriptasa reversa, que es una ADN polimerasa- ARN dependiente.

En nuestro trabajo se utilizó Super-Script™ IIIRT (200 units/mL). También se adiciona en el tubo de reacción una mezcla de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP, concentración final 1mM cada uno); oligonucleótido cebador (primer) en nuestro caso se utilizó un oligo(dT)₁₅, solución tampón (Tris-HCl 10mM, pH 9,0 a 25°C; MgCl₂ 5mM; KCl 50mM; Triton X-100 0,1%), (Reverse Transcription System, Promega) y en presencia de un inhibidor de ribonucleasas (RNAsin, 1 U/μL). Los oligo(dT)₁₂₋₁₈ se asocian con la cola poli(A) del extremo 3' de los ARN mensajeros y al tener un grupo hidroxilo libre en el carbono 3' del cebador, la retrotranscriptasa sintetiza hebras complementarias a los ARN mensajeros (**Figura 2**). Luego de un período de incubación de una hora a 50°C la enzima se inactivó elevando la temperatura de la mezcla de reacción a 70°C durante 5 minutos y bajándola luego a 4°C por 5 minutos, para prevenir su unión a moléculas de ADNc.

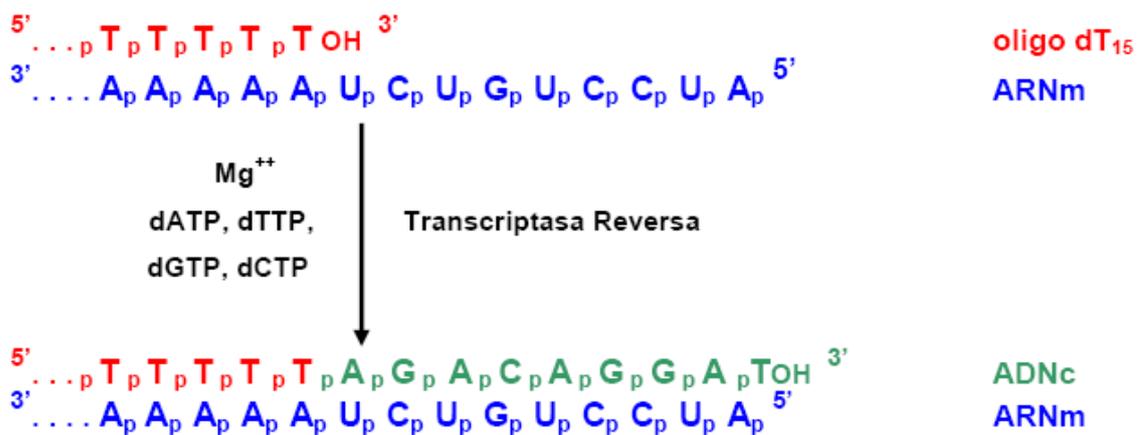


Figura 2: Representación esquemática de la reacción de retrotranscripción. La transcriptasa reversa (RT) es una ADN polimerasa que posee actividad 5'-3'. En el esquema se indica un ejemplo, mostrándose una hebra de ARN (azul) y como el Oligo(dT) (rojo) hibridiza con ésta y actúa de cebador para la RT, la cual en presencia

de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y condiciones adecuadas sintetiza hebras de ADN complementarias (verde) al molde.

5. Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa):

La PCR o reacción en cadena de la polimerasa permite amplificar rápidamente determinadas secuencias de ADN sin necesidad de utilizar ninguna célula viva, siempre y cuando se conozca al menos parte de la secuencia de nucleótidos de la región que se desea amplificar.

Esta técnica se basa en la acción polimerizadora de la ADN polimerasa. Esta enzima requiere de un cebador (o primer) para comenzar a añadir nucleótidos a la nueva cadena de ADN. Por lo tanto, si se conoce parte o la secuencia completa del fragmento que se desea amplificar, se diseñan los cebadores para que se hibriden correctamente al ADN.

El procedimiento consiste en ciclos de tres etapas que se repiten tantas veces como sea necesario (por lo general de 20 a 40 ciclos, obteniendo una cantidad exponencial del producto de tamaño y secuencia específicos, al finalizar todos los ciclos). La primera etapa consiste en elevar la temperatura de manera de separar las hebras del ADN, etapa de desnaturalización. Luego se baja la temperatura para provocar la unión de los cebadores (que están en gran exceso), etapa de hibridación (“*annealing*”) y por último la ADN polimerasa puede comenzar su acción ya que cuenta con los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato para polimerizar a partir del extremo 3’ del cebador, etapa de síntesis. Vale aclarar que se utiliza la *Taq* polimerasa que es aislada de una bacteria termófila y que es mucho más estable a temperaturas elevadas de modo que no se desnaturaliza por calentamientos repetidos, al ser una enzima termoestable. Existen otras enzimas termoestables además de la *Taq* que se utilizan también para la PCR, como es el caso de la *Pfu*. A diferencia de la *Taq*, que comete un error cada 5000 nucleótidos, ésta posee actividad endonucleasa de corrección de errores.

Por lo tanto en una mezcla para PCR se deben incluir: el fragmento de ADN o molde a amplificar, los cebadores (en exceso respecto al ADN molde), los cuatro dNTPs, *Taq* polimerasa u otra ADN polimerasa termoestable, MgCl₂ (que actúa como cofactor de la *Taq* polimerasa, aunque puede utilizarse otra sal dependiendo de la *Taq*

utilizada, como en nuestro trabajo que se empleó $MgSO_4$), un buffer apropiado para la reacción de PCR y agua hasta completar el volumen apropiado para la reacción.

Actualmente la reacción se realiza en un termociclador, que es un equipo que permite variar la temperatura para que se produzca la reacción y realizar la cantidad de ciclos que sea necesaria. Cada ciclo dura aproximadamente 5 minutos y este sistema automático permite amplificar de forma exponencial un fragmento de ADN en algunas horas, por ejemplo, luego de 30 ciclos se obtienen 270 millones de copias del fragmento deseado.

El método de PCR es tan sensible que puede detectar en una muestra una sola molécula de ADN. Esta sensibilidad también acarrea problemas, debido a que una pequeña contaminación con ADN foráneo arruinaría los resultados. Si los *oligonucleótidos* se hibridaran en algún lugar de este ADN foráneo, amplificarán de esta manera fragmentos no deseados.

Otras aplicaciones de la PCR son: cuantificar cantidades de un determinado gen mediante el uso de PCR cuantitativa, PCR *in situ* (PCR sobre tejidos), para determinar la presencia de agentes infecciosos (por ejemplo virus), para analizar la estructura de transcritos de ARN (mediante el uso de oligo-dT que se unen a la cola poli-A de los ARNm permitiendo que la transcriptasa reversa copie sus secuencias completas), análisis de variación de secuencias alélicas. Una variación es el Nested PCR, técnica que aumenta la sensibilidad de la PCR tradicional, se realizan 2 Rounds de PCR: en el primero se amplifica con un juego de oligonucleótidos determinado, en cambio, en el segundo round se utiliza un segundo juego de oligonucleótidos que se hibridan en una región más interna asegurando la amplificación del fragmento deseado.

6. Oligonucleótidos sintetizados por métodos Químicos.

Los oligonucleótidos son segmentos cortos de ADN diseñados a medida. Aunque las ADN polimerasa son las máquinas más eficientes para sintetizar moléculas de ADN, estos compuestos pueden ser sintetizados también con procedimientos químicos. Los métodos químicos usados con mayor frecuencia para la síntesis se llevan a cabo sobre soportes sólidos con máquinas que automatizan el proceso. Los precursores empleados para el agregado de nucleótidos son moléculas con protección química denominadas fosfoamidinas. El crecimiento de la cadena de ADN se efectúa por medio del agregados de moléculas al extremo 5', a diferencia de la dirección de crecimiento de la cadena cuando se emplea ADN polimerasa.

La síntesis química de moléculas de ADN es eficiente y precisa y sólo tarda unas pocas horas. Este procedimiento es sistemático: el investigador puede hacer uso de un sistema de un sintetizador de ADN para construir oligonucleótido por medio de la introducción de la secuencia de bases en la computadora que controla la máquina. No obstante, una vez que la molécula se torna más larga el producto final es menos uniforme debido a las fallas intrínsecas que se producen durante cualquiera de los ciclos del proceso. Por ende las moléculas que tienen más de 100 nucleótidos son difíciles de sintetizar en la cantidad y con la precisión deseable en cualquier análisis molecular

7. Electroforesis en gel de agarosa:

Es una técnica muy efectiva para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN de 0.5 a 25 kb o más. Esta técnica puede ser dividida en tres pasos:

- 1) Preparación del gel con una concentración de agarosa apropiada para el tamaño de los fragmentos de ADN que se quiere separar
- 2) Carga de las muestras en los pocillos del gel y corrida a un determinado voltaje por un período de tiempo para alcanzar una óptima separación.

El voltaje aplicado en el extremo del gel, genera un campo eléctrico. Las moléculas de ADN expuestas a este campo eléctrico migran hacia el ánodo debido a su carga negativa.

La velocidad de migración es limitada por la fuerza de fricción impuesta por la matriz del gel.

- 3) Tinción del gel con bromuro de etidio. Éste puede ser incorporado al gel o al buffer de electroforesis (por ejemplo TAE) o luego de la corrida electroforética sumergir el gel en un recipiente que contenga BrEt. Por último el ADN en el gel es visualizado por iluminación con luz UV en un transiluminador.

7.1. Parámetros que afectan la migración del ADN:

Concentración de agarosa. Las moléculas de ADN lineales migran a través de la matriz del gel con una velocidad que es inversamente proporcional al logaritmo en base diez de su peso molecular. El peso molecular del fragmento de interés puede de esa manera ser determinado mediante la comparación de su movilidad con la movilidad del ADN estándar de peso molecular conocido.

La concentración de agarosa juega un rol importante en la separación electroforética ya que determina el rango de tamaño de moléculas de ADN que pueden ser adecuadamente resueltas. Concentraciones de agarosa de 0.5 a 1% son usadas para separar fragmentos de 0.5 a 30 Kb. Sin embargo, bajas concentraciones (0.3 a 0.5 %) son usadas para separar fragmentos de ADN de 20 a 60 Kb y altas concentraciones de agarosa (1.5 a 2%) sirven para la resolución de pequeños fragmentos de ADN.

Voltaje aplicado. En general los fragmentos de ADN migran a través del gel de agarosa a una velocidad que es proporcional al voltaje aplicado. Sin embargo, al incrementar el voltaje las moléculas grandes de ADN migran proporcionalmente más rápido que las moléculas pequeñas de ADN. Por lo tanto, para separar fragmentos grandes de ADN, lo más apropiado es correr un gel con una baja concentración de agarosa y también una baja aplicación de voltaje.

Buffer de electroforesis. Los dos buffer más usados son el TAE y el TBE. La elección entre los dos depende de su capacidad de buffer. El TAE (Tris-acetato EDTA) es el que se usa más comúnmente a pesar del hecho de que es el que más fácilmente se agota durante extendidas electroforesis de alto voltaje. El TBE (Tris-borato EDTA) tiene una gran capacidad buffer pero se evita su uso cuando se quiere clonar ADN a partir de la purificación del gel luego de una corrida por que inhibe a la ADN polimerasa.

Conformación del ADN. Moléculas de ADN con diferente conformación (por ejemplo ADN circular cerrado, ADN circular con un *Nick* (*una vuelta*) y ADN lineal) y de diferente peso molecular migran a diferente velocidad a través del gel. Los ADNs que han perdido su superenrollamiento (por ejemplo circular con un *Nick*) migran más lentamente que su contraparte superenrollada. El BeEt intercalado en la molécula de ADN reduce la movilidad del ADN lineal y tiene un efecto pronunciado en la movilidad de ADN circular cerrado.

El BrEt cambia la densidad de moléculas circulares cerradas por inducir supervueltas positivas. Al incrementar la concentración de BrEt las supervueltas negativas son gradualmente removidas causando la concomitante reducción en la movilidad de las moléculas de ADN.

7.2. Interpretación de la separación del ADN a través del gel

Muestra de ADN. La mínima cantidad de ADN cargada para ser determinada por la intercalación de BrEt es 5 ng y 200 ng es el máximo. Por encima de 10 ug el ADN puede ser adecuadamente resuelto para muestras que contengan numerosos fragmentos de diferente tamaño, por ejemplo, digestión de ADN genómico con enzimas de restricción.

Buffer de carga. La forma más común de monitorear el proceso de una separación electroforética es siguiendo la migración mediante la incorporación de colorantes de localización al buffer de carga. Los colorantes comúnmente usados que muestran diferentes movilidades electroforéticas son el Bromo Fenol Blue y el Xilene Cyanol. El primero migra con los fragmentos de ADN de 0.5 Kb y el segundo migra junto con los fragmentos de ADN de 5 Kb. El Bromo Fenol Blue es indicado para el monitoreo de fragmentos rápidos y el Xilene Cyanol es indicado para el movimiento de corridas largas. Ambos pueden interferir en la visualización de los fragmentos porque comigran con ellos.

Bromuro de Etidio. Es comúnmente usado para la visualización del ADN en el gel. Se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos y emite fluorescencia (en el rojo-naranja a 560 nm) cuando es iluminado con luz UV. Pequeñas cantidades de ADN pueden ser detectadas (5 ng). Tiene pequeños efectos en la movilidad del ADN.

Marcador de peso Molecular. Con la finalidad de contar con valores de peso molecular de referencia, en una corrida electroforética, uno de los carriles debe contener

una serie de fragmentos de ADN de tamaños conocidos. A partir de estos, y una vez obtenido el gel, se puede hacer una curva estándar para el cálculo del tamaño de los fragmentos de ADN desconocidos. Los marcadores de peso molecular son generados por enzimas de restricción. Estos productos pueden ser comerciales y cubren un amplio rango de tamaños de ADN.

8. Transformación

Es un proceso en el cual un segmento de ADN desnudo penetra directamente en una célula receptora competente para recibirlo. El estado de competencia implica que la célula es capaz de aceptar el ingreso de ADN foráneo. Ciertas bacterias poseen la capacidad natural de entrar en competencia dependiendo de su estado fisiológico, del medio en que crecen y de la etapa del ciclo de crecimiento en que se encuentran. Estas bacterias son susceptibles de experimentar “transformación natural”. Por ejemplo, en un cultivo de *Streptococcus pneumoniae*, se observa que existe un corto período en la mitad de la fase exponencial de crecimiento en el que la “competencia” de la población aumenta mucho e inmediatamente después disminuye tan rápidamente como aumentó. Muchas otras bacterias como *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, no se hacen competentes en condiciones naturales de cultivo pero sí lo hacen si son sometidas a altas concentraciones de cationes divalentes y a temperaturas cercanas a 0°C. Se habla en este caso de “transformación artificial”.

Se denomina eficiencia de una transformación a la probabilidad de que una molécula de ADN sea ingresada a una célula competente. Esta capacidad puede evaluarse desde dos puntos de vista: el del ADN y el de la célula. Se expresa como el número de colonias transformantes por microgramo de ADN implicado en la transformación.

9. Conceptos básicos sobre ADN recombinante

Consiste en crear *in vitro* nuevas combinaciones de ADN a partir de ADN preexistente. El resultado es siempre una nueva molécula con capacidad de automantenerse como replicón, que se introduce en las células, en general por transformación.

Cuando se quiere estudiar una porción discreta de ADN, el clonado de la misma permite quitarla del contexto complejo y en general desconocido en que naturalmente se encuentra, e integrarla en un replicón pequeño y bien conocido. Ese pequeño replicón donde se inserta el segmento de ADN en estudio se llama vector. En la mayoría de los casos, los vectores son plásmidos o genomas de fagos debidamente modificados para facilitar la tarea de clonado. Los plásmidos son moléculas de ADN (pequeñas) extracromosómico que se replican independientemente del cromosoma del hospedador.

Las enzimas de restricción llamadas de tipo II, de las que hay gran variedad procedentes de distintas bacterias, reconocen cada secuencia específica de bases y cortan el enlace fosfodiéster del ADN en un punto específico.

Para clonar un segmento de ADN de interés, llamado inserto, en un ADN vector, se cortan ambos ADNs con las mismas enzimas de restricción, se mezclan los ADN digeridos y se ligan con la enzima ADN ligasa. El experimento de clonado terminará transformando una estirpe bacteriana con la mezcla de ligación.

9.1. Plásmidos

Existen plásmidos de longitudes variables y pueden ser de cadena simple o doble. Para que un plásmido sea efectivo como vector de clonación tiene que tener las siguientes características principales:

Replicador:

El replicador es una zona del ADN que contiene un sitio de inicio de la replicación y también incluye genes que codifican para algunos ARN y proteínas necesarias para la replicación.

Los plásmidos pueden clasificarse según el número de copias dentro de la célula:

- Número de copias alto: > 20 copias en bacterias crecidas en medio líquido LB.

- Número de copias bajo: < 20 copias en bacterias crecidas en medio líquido LB.

Presencia de marcadores seleccionables:

Los marcadores seleccionables son necesarios para la detección e identificación de las células que contienen plásmido. Se pueden utilizar diversos marcadores seleccionables tales como genes de resistencia a antibióticos, resistencia a metales pesados, sensibilidad a mutágenos, sensibilidad o resistencia a bacteriófagos, etc.

En la presente pasantía se utilizó un plásmido que contiene el gen de resistencia a la ampicilina.

El procedimiento consiste en transformar las células con el plásmido y plaquearlas en medio LB-agar que contiene el antibiótico adecuado (el antibiótico al cual el plásmido es resistente). Sólo las bacterias que contengan el plásmido crecerán en este medio selectivo.

En este caso utilizamos el medio selectivo LB-agar-Xgal-IPTG que permite seleccionar las colonias que no han incorporado el vector con inserto gracias a la alfa complementación del gen *lacZ*, y ampicilina como selección negativa debido a que la ampicilina impide el crecimiento de bacterias que no han incorporado el vector que posee el gen de la beta lactamasa.

Sitio de Clonado: El sitio de clonado es un sitio de corte de una endonucleasa de restricción en el cual es insertado ADN foráneo sin interferir con la capacidad del plásmido de replicarse, ni con el fenotipo selectivo que el plásmido proporciona al huésped.

Actualmente se cuenta con una nueva generación de vectores que tienen sitios de policlonado (o *polylinker*) lo que los hace más útiles y más fáciles de manejar. El sitio de policlonado es un fragmento corto de ADN con muchos sitios de restricción diferentes (en general un único sitio de restricción por cada enzima, o sea que cada enzima de restricción actúa una sola vez sobre el *polylinker*), cada uno de ellos único para el vector.

Para facilitar la identificación de los plásmidos que contienen inserto ADN foráneo en el sitio de policlonado se han modificado los *polylinkers* de modo que la introducción de ADN en los mismos resulte en un fenotipo identificable.

En este trabajo se utilizó plásmido pGEM que posee el gen de resistencia a la ampicilina –que facilita la selección de las bacterias transformadas- y una región de

clonación múltiple que contiene varios sitios de reconocimiento de enzimas de restricción flanqueado por dos promotores de ARN polimerasas, la polimerasa del Streptococo SP6 y del fagoT7, que se encuentra interrumpiendo una unidad de codificación cuyo producto se determina con facilidad.

Otra ventaja que posee este plásmido es que está diseñado especialmente para clonar productos de PCR. El pGEM-T-Easy Vector (Promega) es previamente preparado por el proveedor: se lineariza con EcoRV y se le agregan desoxitimidinas (dT) en los extremos 3'. De esta manera, al ser linealizado en el sitio de clonaje, la presencia de T en los extremos 3' aumenta la eficiencia de ligación de un producto de PCR en dicho sitio debido a que en la amplificación por PCR ciertas polimerasas termoestables suelen agregar (de forma independiente del molde) una adenina (A) en los extremos 3' de los fragmentos amplificados.

Se utilizó el método de alfa complementación del gen lacZ. El vector elegido contiene el gen lacZ con una delección del extremo 3', que codifica para un fragmento amino terminal inactivo de la β -galactosidasa llamado fragmento α . Por otro lado, el huésped (la bacteria) tiene una delección del extremo 5' del gen lacZ que codifica para un fragmento carboxi-terminal inactivo de la β -galactosidasa llamado ω (la bacteria es lacZ). Si la célula contiene los dos genes, uno dirige la síntesis del fragmento α y el otro dirige la síntesis del fragmento ω y se observa actividad de la β -galactosidasa. Este fenómeno se conoce como **α -complementación** o **complementación intracistrónica en α para β -galactosidasa**. Las células que contienen el vector se cultivan en un medio conteniendo IPTG (isopropiltiogalactopiranosido) que es un inductor gratuito del operón lac (inhibe al represor lac pero no se metaboliza) y X-gal (análogo de la galactosa que es sustrato de la β -galactosidasa). La acción de la β -galactosidasa sobre X-gal hará que la colonia bacteriana se vuelva azul. De lo anterior se concluye que si la colonia es azul, la β -galactosidasa de las bacterias será funcional. Dichas bacterias, **bacterias transformantes**, son resultantes de α -complementación y tienen fenotipo Lac +.

La inserción de un fragmento de ADN foráneo en el sitio de policlonado del plásmido resulta en la producción de un fragmento α que no es capaz de α -complementación, proceso llamado **inactivación intracistrónica**. En consecuencia, las bacterias que poseen plásmidos recombinantes, **bacterias recombinantes**, formarán

colonias blancas ya que la β -galactosidasa de las mismas no es funcional y por lo tanto, no puede ejercer su acción sobre X-gal.

El método utilizado para poder transformar plásmidos en bacterias es tratar a estas últimas con soluciones frías de CaCl_2 (Sambrook y col. 1992) y luego someterlas a un breve choque térmico (42 °C). Existen variantes de esta técnica que aumentan la eficiencia de la transformación, por ejemplo exponiendo las cepas bacterianas a cationes divalentes o tratando las bacterias con DMSO, agentes reductores, etc. Con estos tratamientos se producen poros en la pared bacteriana, volviendo el medio interno bacteriano accesible al ADN foráneo del vector. La transformación tiene tres etapas:

Asociación: en esta etapa el ADN se asocia a la pared celular en la zona de adhesión.

Entrada: dentro de las zonas de adhesión se forman complejos que hacen posible la entrada del ADN foráneo a la célula huésped. Para que la entrada termine se aplica un choque térmico.

Establecimiento: El ADN foráneo ingresado se pliega, conformación que lo haría inaccesible a las nucleasas, y luego se replica.

Otras formas de incorporar un vector en una célula huésped, son las siguientes:

Transfección: con vectores virales o con liposomas.

Electroporación: el ADN foráneo ingresa a la célula huésped a través de poros generados por descarga eléctrica.

La eficiencia de transformación (ET) antes mencionada se define como:

$$ET = \frac{\text{n}^\circ \text{ colonias totales (unidades formadoras de colonias)}}{\mu\text{g de ADN de plásmido}}$$

Se han realizado múltiples mejoras en la transformación de bacterias de modo que la ET no sea un factor limitante en la clonación.

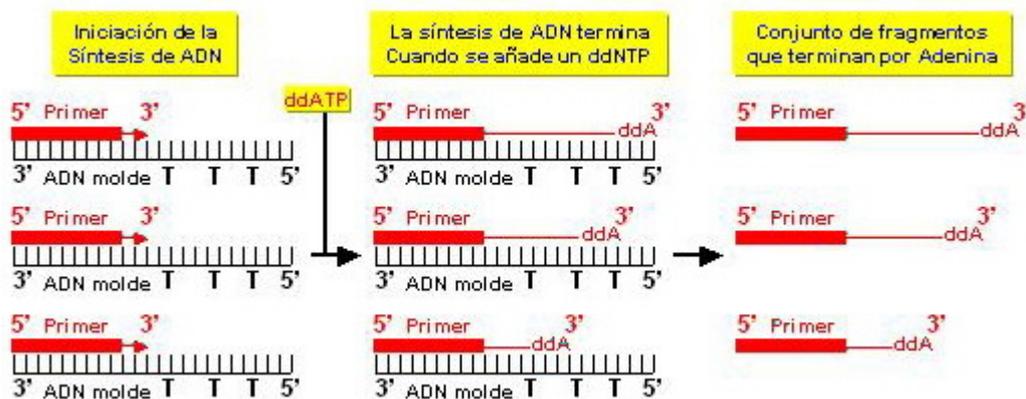
Las bacterias competentes están disponibles en forma comercial o pueden prepararse en el laboratorio.

10. Métodos de secuenciación

El método de secuenciación utilizado fue desarrollado por Sanger. Está basado en el empleo de dideoxinucleótidos que carecen de uno de los grupos hidroxilo, de

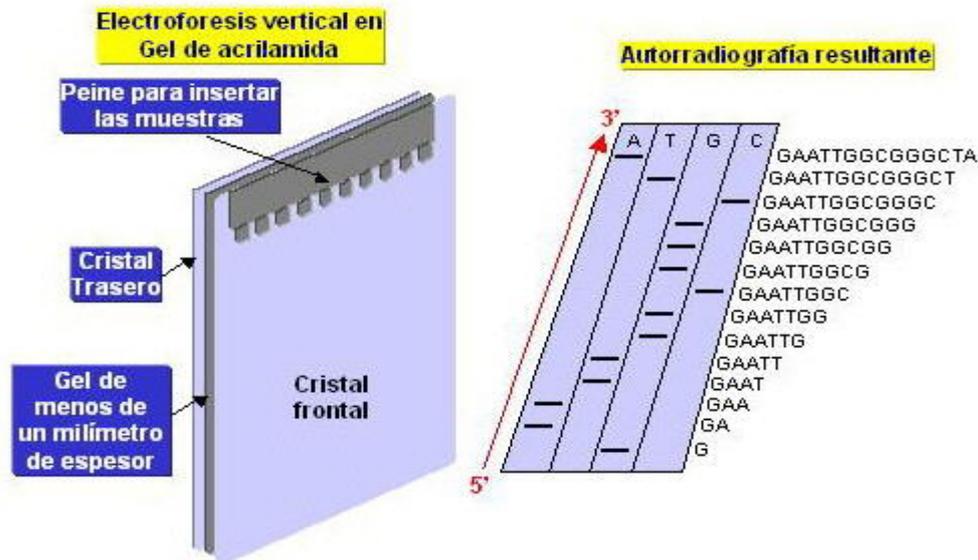
manera que cuando uno de estos nucleótidos se incorpora a una cadena de ADN en crecimiento esta cadena no puede continuar elongándose por el requerimiento de que la ADN polimerasa necesita un extremo 3'OH para añadir el siguiente nucleótido y el dideoxynucleótido incorporado carece de este grupo hidroxilo.

Primeramente se aísla y se clona el ADN que se desea secuenciar, se desnaturaliza y se emplea una sola hebra en la secuenciación. Se utiliza además un cebador o “primer” que suministra el extremo 3'OH que necesita la ADN polimerasa. Se preparan cuatro tubos de reacción, cada uno con el ADN molde de la hebra sencilla que se desea secuenciar, con ADN polimerasa, con el cebador y con los cuatro nucleótidos trifosfato (similar a PCR pero con ADN de cadena sencilla). A cada tubo se le añade una pequeña proporción de un desoxinucleótido trifosfato marcado radiactivamente, un tubo con ddATP, otro con ddTTP, el tercero con ddGTP y el cuarto con ddCTP. Por lo tanto, en cada uno de estos tubos se producirán cadenas de ADN de distintas longitudes, terminando todas en el lugar en el que se incorporó el dideoxynucleótido correspondiente añadido al tubo tal como se muestra en la figura (Ausubel y col. 1994):



Posteriormente, estas piezas de ADN se separan mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida (permite separar fragmentos de ADN que difieren en una base). Las piezas más pequeñas migran más rápidamente que las grandes y la secuencia se puede leer directamente sobre la placa autoradiográfica.

En el siguiente esquema (Ausubel 1994) se indican los resultados que se obtendrían al realizar la lectura del gel de secuenciación:



La secuenciación automática es una alternativa al método de Sanger. Consiste en marcar el cebador o los terminadores (dideoxinucleotidos) con un compuesto fluorescente y activar la reacción de secuencia tal como se realiza en el método de Sanger. En el caso en que se marca los dideoxinucleotidos, cada uno de éstos es marcado con un fluoróforo distinto (uno para A, otro para C, otro para G y otro para T). Estos fluoróforos son puestos junto con los dNTPs y el segmento a secuenciar en un mismo tubo de reacción. Cada uno de los fluoróforos emite una intensidad distinta de luz la cual es captada por el láser del secuenciador y posteriormente analizadas por un software especial, que las registra como un color distinto. De esta forma los productos de la reacción se detectan directamente durante la electroforesis. Este método es mucho más rápido y permite secuenciar distintos fragmentos, al mismo tiempo.

11. Procesamiento, alineamiento y comparación con las bases de datos mediante BLAST.

La herramienta genómica usada con mayor frecuencia es el BLAST (Basic local alignment search tool = herramienta de búsqueda de alineación local básica).

Hay varios tipos de programas BLAST, pero todos comparten la característica común de hallar regiones similares entre diferentes genes o productos génicos. Los resultados de la búsqueda aparecen como una lista de coincidencias principales y luego como detalles de puntuación e identidades.

Los programas BLAST utilizan métodos estadísticos para determinar la probabilidad de que los aciertos (genes o proteínas codificadas identificadas por la secuencia búsqueda) posean una función similar.

Bibliografía

- Alberts B, Jonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P, *Molecular biology of the cell*, 5th ed., Garland, New Cork, USA, 2008
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K. (eds), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 2005
- Freifelder D, *Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular*, Editorial Reverté, 1991
- Lodish H, Berk A & Zipursky SL, *Molecular Cell Biology*, 4th ed., W.H. Freeman, 2000
- Brock Thomas D & Madigan MT, *Biología de los microorganismos*, 6a ed., Prentice Hall, 1999
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T, *Molecular Cloning*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- Slater RJ, *Experiments in Molecular Biology*, Humana Press, Clifton, New Jersey, (1985).
- Watson JD, Baker TA, Bell SP & Gann A, *Biología Molecular del Gen*, 5^a ed. Editorial Médica Panamericana, 2006

Agradecimientos:

A todas esas personas que me acompañaron en este camino. En especial a mis padres (Elisa Irigoin y Jorge D'Alessandro) , mis tutoras (Nibia Berois y Cora Chalar) y a la persona que mas fuerza me dió desde que entro en mi vida mi hijo (Manuel Gonzales D'Alessandro).