

Serie Actas

1

º 1

0777
ISSN 017-4810

INIA



METODOS AGRINTER EN BIOLOGIA MOLECULAR VEGETAL

FIRST INTERNATIONAL INIA - CARILLANCA
WORKSHOP AND COURSE ON PLANT BIOTECHNOLOGY

15 - 26 NOVIEMBRE, 1999
CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACION CARILLANCA
TEMUCO, CHILE

BIBLIOTECA CENTRAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS
Casilla 439 Correo 3
Santiago - Chile



EDITORES

MANUEL GIDEKEL
ANA GUTIERREZ
LETICIA BARRIENTOS
RAUL HERRERA
HUGO CAMPOS



desde 1959

SERIE ACTAS N° 1

C 217-
ISSN 017-4810

Métodos en Biología Molecular Vegetal

First International INIA Carillanca
Workshop and Course on Plant Biotechnology

15 - 26 Noviembre, 1999
Centro Regional de Investigación Carillanca
Temuco, Chile

EDITORES

MANUEL GIDEKEL
ANA GUTIERREZ
LETICIA BARRIENTOS
RAUL HERRERA
HUGO CAMPOS

Editores:

Manuel Gidekei, Ing. Agr. Dr.¹
Ana Gutiérrez M., Biol. Dr.¹
Leticia Barrientos D., Biol. M. Sc.²
Raúl Herrera F., Bioq. Ph. D.²
Hugo Campos de Q., Ing. Agr. Ph. D.¹

¹Centro Regional de Investigación Carillanca

²Universidad de Talca.

Cita bibliográfica correcta:

Serie Actaⁿº 1. Instituto de Investigaciones Agropecuarias

© 1999. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA.
Camino Cajón - Vilcún Km. 10. Temuco, Teléfono (45) 21-5706.
Fax (45) 21-6112. Casilla 58-D, Temuco, Chile

ISSN 0717-4810

Prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin permiso del Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Ministerio de Agricultura.

Comité Editorial: Fernando Ortega K., Lilian Avendaño F.

Diseño y diagramación: ARTCLUB Limitada

Impresión: Imprenta Páginas

Cantidad de ejemplares: 200

Temuco, Chile, 1999.

El desafío del siglo XXI está en manos de los jóvenes. A través de su vocación, creatividad, innovación y asociatividad lograrán enfrentar los problemas existentes en Latinoamérica. Hoy, el Centro de Investigación INIA Carillanca los invita a ser partícipes del conocimiento en un área tan importante de la investigación científica, aplicada al desarrollo silvoagrícola de la Región.

INDICE

	página
Autores	
Agradecimientos	
Biotecnología de plantas, nuevos desafíos para el próximo milenio	1
I. Análisis de la expresión de genes	6
Estudio de la Expresión Génica Diferencial	7
Protocolo 1. mRNA Differential Display	8
Protocolo 2. cDNA-AFLP: Una nueva técnica para el estudio de expresión diferencial de genes	19
Protocolo 3. Secuenciación automática de ADN	26
II. Marcadores Moleculares y Diagnóstico	32
Protocolo 4. Análisis RAPD de ADN genómico en plantas	33
Protocolo 5. Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs)	39
Protocolo 6. Secuencias microsatélites en el estudio de diversidad genética de poblaciones	45
Protocolo 7. Hibridación <i>in situ</i> de ácidos nucleicos virales en plantas.	48
Protocolo 8. Genes de resistencia en plantas	52
III. Transformación Genética	59
Protocolo 9. Transformación genética de plantas	60
Protocolo 10. Floral dip: un método fácil de transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	66
Protocolo 11. Transformación por biobalística de <i>Trichoderma harzianum</i>	71

Autores

Dr. Patricio Arce
Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile
parce@genes.bio.puc.cl

M. Sc. Leticia Barrientos
INIA Carillanca, Temuco, Chile
bardleti@carillanca.inia.cl

Dr. León Bravo
Universidad de Concepción, Concepción, Chile
lebravo@udec.cl

Dr. Hugo Campos
INIA Carillanca, Temuco, Chile
hcampos@carillanca.inia.cl

Dr. Manuel Gidekel
INIA Carillanca, Temuco, Chile
mgidekel@carillanca.inia.cl

Dra. Ana Gutiérrez
INIA Carillanca, Temuco, Chile
agutierr@carillanca.inia.cl

Dr. Alfredo Herrera - Estrella,
CINVESTAV U-Irapuato, México.
aherrera@irapuato.ira.cinvestav.mx

Dr. Raúl Herrera
Universidad de Talca, Talca, Chile
raherre@pehuenche.secom.otalca.cl

Dra. Luz María Pérez
Universidad de Chile, Santiago, Chile
Lab de Bioquímica
lperez@abello.dic.uchile.cl

Dr. Humberto Prieto
INIA La Platina, Santiago, Chile
hprieto@platina.inia.cl

Biotecnología de plantas, nuevos desafíos para el próximo milenio

Manuel Gidekel
Leticia Barrientos

Las proyecciones demográficas indican que la población mundial podría llegar a 11.000 millones el año 2050 y considerando que la mayor parte de este crecimiento se producirá en las regiones de África, Asia y América Latina, el gran desafío del sector agrícola será duplicar la producción de alimentos el año 2025 y triplicarla para el 2050, en una menor superficie arable per cápita, con menos recursos hídricos y bajo condiciones ambientales cada vez más cambiantes y adversas, todo esto enmarcado en limitaciones al uso de productos químicos nocivos y a un mayor respeto y cuidado del medio ambiente, la salud y el bienestar de las personas (Vasil 1998).

Ha ocurrido una nueva revolución en la agricultura. Grandes áreas de cultivo de soja, maíz, algodón y raps genéticamente modificados (GM) han sido cultivadas exitosamente en el hemisferio norte. En 1999 se sembraron 29 millones de hectáreas de soja en los Estados Unidos, de las cuales el 50% estuvo sembrado con semilla GM con resistencia a herbicidas. Al utilizarse semilla resistente a herbicida, las malezas se controlaron fácilmente, se realizó un menor laboreo del suelo y se minimizó la erosión. Mundialmente, en 1999, se sembraron alrededor de 28 millones de plantas transgénicas. Algunos expertos predicen que esta superficie se triplicará en los próximos 5 años (Abelson and Hines, 1999).

En los últimos años, se han generado variedades transgénicas de cultivos que toleran mejor la acidez del suelo, con mayor resistencia al calor, resistentes a virus, tolerantes a herbicidas de amplio espectro y poco contaminantes o nuevos cultivos cuyos genotipos codifican para proteínas con propiedades insecticidas. También se han producido genotipos con mejores características agroindustriales, con mayor contenido de aminoácidos esenciales, con frutos que soportan mejor el transporte y de maduración retardada. Una de las características de la biotecnología es la rapidez con que se ha trascendido desde el laboratorio al ámbito de las aplicaciones, principalmente en el campo agrícola. A la vez, uno de los principales riesgos para los países en desarrollo es estar rezagado con respecto a estas innovaciones

tecnológicas, necesarias para la modernización de la agricultura y desarrollo de nuestros países.

Desarrollo de cultivos y variedades resistentes a estrés abióticos y bióticos

Agentes abióticos

Un tercio de la superficie de Chile es desértica y aproximadamente dos tercios del país tienen problemas de aridez. El problema se ve agravado por la tendencia del siglo a una disminución en las precipitaciones y por el avance del desierto de Atacama hacia el sur (300-400 m/año). Esto, junto a la alta radiación y temperaturas extremas, dificulta la adaptación de las plantas cultivadas. Mejorar esta adaptación de modo de disminuir las fluctuaciones interanuales de los rendimientos, aumentar la productividad y ampliar las áreas de cultivo constituye un objetivo importante para el país.

A pesar de los millones de hectáreas existentes en Latinoamérica con serios problemas de estrés abióticos (salinidad, metales pesados, altas y bajas temperaturas, alta radiación y sequía), los programas de mejoramiento convencional son débiles en relación a la producción de variedades con resistencia o tolerancia a estos factores adversos. Las plantas adaptadas naturalmente, que viven en estos lugares extremos, poseen adaptaciones que no han sido estudiadas en profundidad en nuestros países. Estas plantas pueden ser una fuente de genes con potencialidad biotecnológica. La escasez de estudios fisiológicos y moleculares de las plantas nativas es una de las limitantes para la debida identificación de genes responsables de mecanismos de tolerancia a estrés ambientales. Estos conocimientos, junto con generar biotecnologías para el agro, permitirían además, una mejor comprensión del funcionamiento de los individuos en los ecosistemas naturales y con ello se facilitaría el manejo y conservación de estos recursos.

Agentes bióticos

En la actualidad, el control de enfermedades e insectos en agricultura está basado en la aplicación de agroquímicos, labores culturales y el uso de variedades resistentes. A pesar del incalculable valor de los agroquímicos en la prevención de enfermedades, su alto costo los hace inaccesibles a muchos productores. Más aún, su

impacto ambiental negativo y el posible efecto sobre la salud humana de sus residuos, ha generado muchos debates que apuntan a la limitación de su uso en agricultura. Adicionalmente, aplicaciones de agroquímicos sostenidas, han reducido su efectividad debido a la coevolución de patógenos tolerantes o resistentes. De esta forma la protección de los cultivos contra estos patógenos representa un gran desafío a la investigación para mantener, y de manera ideal, aumentar la producción agrícola en calidad y cantidad, cumpliendo con la creciente demanda de la humanidad por alimentos más sanos, de mayor calidad, y en cantidad suficiente.

Los programas de mejoramiento genético vegetal clásicos han permitido obtener un gran número de nuevos cultivares con características deseables de resistencia. Sin embargo, estos programas están basados en técnicas de larga duración y pueden llegar a ser poco efectivos por la rápida evolución y diseminación de patógenos resistentes y la necesidad de incrementar y mejorar la productividad de los cultivos (Vasil and Herrera Estrella, 1995).

Las pérdidas de rendimiento de los cultivos ocasionadas por el ataque de hongos alcanzan 10-20% en promedio, pudiendo ser más severas en epifitias localizadas. Actualmente, el control de enfermedades fungosas en agricultura se realiza mediante manejo integrado, asociado al uso de cultivares mejorados con resistencia a razas específicas de hongos. Las estrategias que se evalúan apuntan a desarrollar plantas con un amplio rango de tolerancia a enfermedades mediante ingeniería genética.

Las plantas responden naturalmente al ataque fúngico mediante una compleja red de mecanismos de defensa, que incluyen síntesis de polímeros que forman barreras físicas (cutina, lignina, calosa), metabolitos antimicrobianos (fitoalexinas) y proteínas relacionadas con patogénesis (proteínas PR), dentro de las que se encuentran enzimas hidrolíticas como β -1,3-glucanasa y quitinasa, las cuales degradan polisacáridos estructurales de la pared celular del hongo. Muchas de estas enzimas han mostrado inhibición del crecimiento del patógeno *in vitro*, y por tanto son potenciales genes antifúngicos para su sobre expresión en plantas transgénicas.

Las plagas de insectos son la principal causa de daño a los cultivos a nivel mundial. Las estrategias de control dirigidas a reducir la pérdida de los cultivos se basan primariamente en el uso de insecticidas químicos. Se estima que de los US\$ 8.1 billones gastados anualmente en insecticidas a nivel mundial, aproximadamente US\$ 2.7 billones podrían ser reemplazados por aplicaciones biotecnológicas

(Krattiger, 1997). Alternativamente, los cultivos transgénicos con tolerancia intrínseca a plagas ofrecen una alternativa promisorio y en continuo desarrollo. La primera generación de plantas transgénicas resistentes a insectos estaban basadas en las λ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) y actualmente una segunda generación de plantas resistentes a insectos en desarrollo incluyen nuevos mecanismos de acción y diferente espectro de actividad contra las plagas de insectos (Estruch *et al.*, 1997), como inhibidores de proteasas y productos naturales.

Problemas y perspectivas

Debido a que las plantas son consumidas por los animales, la salud nutricional y el bienestar de los humanos es completamente dependiente de la alimentación vegetal ya sea directa o indirectamente. Las plantas proveen casi todas las vitaminas, minerales esenciales y un número de otros fitoquímicos promotores de la salud. Puesto que la concentración de micronutrientes es a menudo baja en los cultivos, los investigadores están buscando entender y manipular la síntesis de micronutrientes para mejorar la calidad de los cultivos. Esto es de especial interés en los países en desarrollo, donde la mayoría de la población tiene dietas simples (pobres en macronutrientes y micronutrientes). En realidad, más de 250 millones de niños presentan avitaminosis. La carencia de vitamina A, conlleva trastornos en el aprendizaje y cada año 500 mil niños sufren ceguera irreversible por deficiencia de ésta (DellaPenna, 1999).

En otro sentido, recientemente fue aprobada la nueva ley F.Q.P.A. (Food Quality Protection Act.) por parte del Congreso de los Estados Unidos de Norte América (1996) y que busca minimizar el uso de agroquímicos en el mundo y así evitar la incidencia que éstos tienen para el consumo humano y la vida silvestre; materias trascendentales que competen a nuestros países como principales exportadores de productos agrícolas al hemisferio norte y que incluyen el re-estudio de todos los agroquímicos y de sus tolerancias.

Estos desafíos imponen soluciones creativas, y basadas en un mayor conocimiento de los procesos bioquímicos y moleculares que regulan la producción de alimentos, por lo cual la ingeniería genética se presenta como una serie de herramientas muy promisorias y factibles de actuar en forma sinérgica con las técnicas convencionales de mejoramiento genético, para así poder aumentar y proteger la biodiversidad de los organismos vivos.

El conocimiento exhaustivo de los genes y sus secuencias regulatorias ofrece la posibilidad de aumentar la tolerancia al estrés

biótico y abiótico, mediante su manipulación y utilización en plantas transgénicas, desarrollando paralelamente múltiples aplicaciones en el fitomejoramiento vegetal, la fisiología experimental y la biología molecular. En este sentido los protocolos de este manual son algunas de las técnicas más avanzadas en este campo y proveen un espacio para la interacción entre los científicos de países en desarrollo de Latinoamérica con los científicos líderes mundiales en diferentes áreas de la biología molecular de plantas. Confiamos en satisfacer plenamente sus expectativas y que su estadía en el Centro Regional de Investigación INIA Carillanca perdure en vuestra memoria.

Referencias y lecturas recomendadas

- Abelson H. and Hines P. 1999 The Plant Revolution. *Science* 285 :367-368.
- Conway G. 1998. The doubly green revolution: Food for all in the 21st Century. Cornell University Press, Ithaca NY, pp 44-65.
- DellaPenna D. 1999. Nutritional Genomics: Manipulating Plant Micronutrients to Improve Human Health. *Science* 285 :375-379.
- Estruch J, Carozzi N., Desai N., Duck N., Warren G. and Koziel M. 1997. Transgenic Plants: An Emergin Approach to Pest Control. *Nature Biotechnology* 15: 137-141.
- Krattiger, AF. 1997 Insect resistance in crops. A Case Study of *Bacillus Thuringiensis* (Bt) and its Transfer to Developing Countries. International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications. ISAAA briefs N°2. ISAAA, Ithaca, NY.
- Vasil I. 1998. Biotechnology and Food Security for the 21st Century: A Real-World Perspective. *Nature Biotechnology* 16: 399-400.
- Vasil I. and Herrera-Estrella L. 1995. Molecular Biology: An Important Tool for Crop Improvement and the Understanding of Plant Development. Second International Training Course on the Analysis and Manipulation of the Plant Genome

Análisis de la expresión de genes

Estudio de la Expresión Génica Diferencial

Introducción

Los organismos superiores contienen cerca de 100.000 genes diferentes, de los cuales sólo una pequeña fracción, aproximadamente el 15%, son expresados en una célula individual. La elección de que genes son expresados determina los procesos celulares que tendrán lugar. Estos incluyen el desarrollo, la diferenciación, homeostasis, respuestas a estrés, estímulos, regulación del ciclo celular, edad y muerte celular programada, así como también las alteraciones patológicas de los mismos que conducen a la enfermedad. La comparación de la expresión de genes en diferentes tipos celulares o células creciendo bajo diferentes condiciones puede proveer la información necesaria para comprender los procesos biológicos que controlan la vida.

Gracias al enorme interés por este campo de estudio se han desarrollado varias técnicas que permiten identificar genes expresados diferencialmente. Los primeros métodos estuvieron basados principalmente en las técnicas de hibridación diferencial, como la hibridación sustractiva y/o construcción de bibliotecas de ADN complementario (ADNc) sustractivas. Recientemente, la utilización de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) en diferentes laboratorios hizo posible el desarrollo de métodos basados en ella, que se caracterizan por ser más rápidos y versátiles que sus predecesores. En general, estos métodos permiten apreciar la expresión diferencial de genes a través de la comparación de perfiles de ADNc generados por PCR y separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturantes. A continuación se presentan dos de estos métodos, correspondientes a "mRNA Differential Display" (Pardee & Liang, 1992, 1993) y "cDNA-AFLP" (Bachem y cols., 1996; Money y cols., 1996; Habu y cols., 1997).

"mRNA DIFFERENTIAL DISPLAY"

Ana Gutiérrez
Manuel Gidekel
Lorena Mujica

El "mRNA Differential Display", desarrollado por Pardee & Liang (1992), es una herramienta relativamente nueva para identificar y clonar genes expresados diferencialmente (5). Este método involucra la transcripción reversa de una fracción de los mensajero (ARNm), mediante la utilización de un oligo-dT₁₁ modificado por la presencia de dos bases adicionales (dT₁₁XN). El oligonucleótido es complementario a aquellas colas poly(A) precedidas del par de bases adicionales del oligonucleótido empleado y, por lo tanto, permite seleccionar una subpoblación de los ARNm. Enseguida se realiza una reacción de PCR sobre los productos de la transcripción reversa, en la presencia de un segundo oligonucleótido correspondiente a un decámero de secuencia arbitraria. La subpoblación de ADNc amplificada, determinada por las dos bases adicionales al oligo-dT, son separados en un gel de secuenciación (Figura 1) (4,6). Esto nos proporciona una huella digital de los ARNm de un tejido en forma análoga a la electroforesis de dos dimensiones para visualizar proteínas. La comparación de los perfiles obtenidos para diferentes muestras de ARNm permite la identificación de genes expresados diferencialmente. Luego, los fragmentos diferenciales pueden ser recuperados del gel de secuenciación y re-amplificados para utilizarlos como sondas e identificar, ya sea el ADNc correspondiente o los clones genómicos.

Esta técnica ha sido exitosa para la clonación de genes expresados diferencialmente de células animales (1, 7,11), plantas (4) y hongos (3).

El "mRNA Differential Display" tiene una serie de ventajas técnicas comparado con otros métodos:

1. **Simple:** Técnicamente se basa en la PCR y en la electroforesis de secuenciación de ADN.
2. **Sensibilidad:** 2 mg. de ARN total es suficiente para realizar las reacciones utilizando todas las combinaciones de oligo-dT₁₁XN y 20

decámetros arbitrarios. Estadísticamente, esto permitiría visualizar todos los ARNm al menos una vez.

3. **Reproducibilidad:** 90-95% de las bandas de ADNc son reproducibles de un experimento a otro.
4. **Versatilidad:** Más de dos muestras de ARNm pueden ser comparadas al mismo tiempo, identificándose genes específicos de un proceso determinado.
5. **Velocidad:** Dentro de cinco días se puede obtener el patrón de ARNm en un estadio a elección. La reamplificación de los productos diferenciales y su confirmación por "Northern Blot" toma tiempo adicional. Lo más importante, es que puede evaluarse paso a paso su éxito y no esperar hasta el final del procedimiento para determinar si la técnica ha sido efectiva, lo que sucede comúnmente con otros métodos.

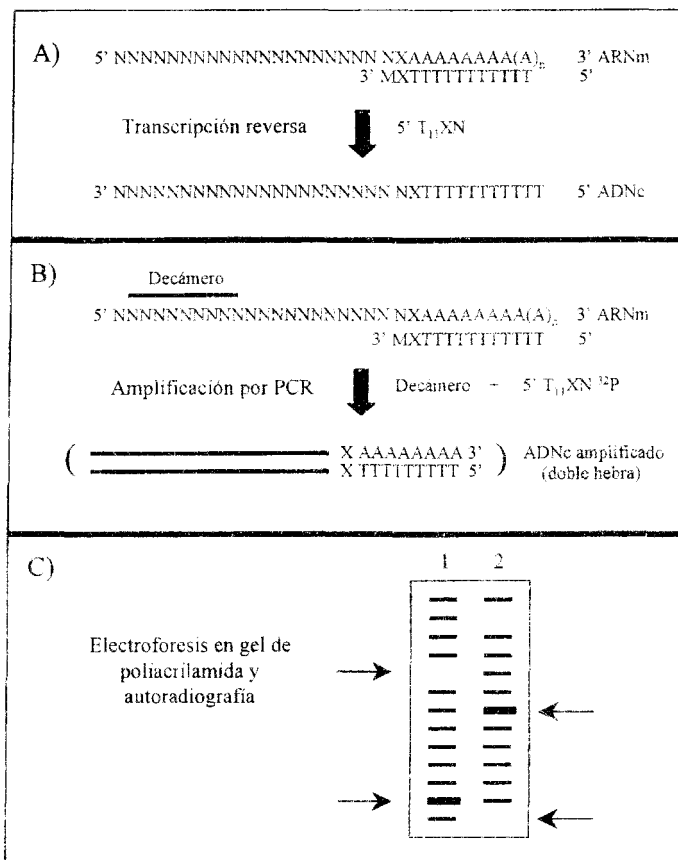
Recientemente, se realizó una revisión rigurosa de los métodos más comunes utilizados para la identificación de genes expresados diferencialmente (9) lo que permitió concluir que el "mRNA Differential Display" presenta mayores ventajas, puesto que permite identificar ARNm independientemente de su abundancia, utiliza cantidades pequeñas de ARN e identifica simultáneamente aumento y/o disminución del nivel basal de expresión.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aiello L., Robinson G, Lin Y, Nishio Y and King G. 1994. Identification of multiple genes in bovine retinal pericytes altered by exposure to elevated levels of glucose by using mRNA differential display. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. 91: 6231 - 6235.
- 2.- Bauer D, Muller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P and Strauss M. 1993. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Research*. 21: 4272 - 4280.
- 3.- Benito E, Prins T and van Kan J. 1996. Application of differential display RT-PCR to the analysis of gene expression in a plant-fungus interaction. *Plant Molecular Biology*. 32 914 - 957.
- 4.- Callard D, Lescure B and Mazzolini L. 1994. A method for the elimination of false positives generated by the mRNA Differential Display technique. *BioTechniques* 16: 1096 - 1102.

- 5.- Liang P and Pardee A. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971.
- 6.- Liang P, Averboukl and Pardee A. 1993. Distribution and cloning of cDNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Research*. 21: 3269-3275.
- 7.- Sokolov B and Prockop D. 1994. A rapid and simple method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. *Nucleic Acids Research*. 22: 4009-4015.
- 8.- Trenkle T, Welsh J and McClelland. 1999. Differential Display Probes for cDNA Arrays. *BioTechniques* 27: 554-564.
- 9.- Wan J, Sharp S, Poirier G, Wagaman P, Chambers J, Pyati J, Hom, Y, Galindo J, Huvar A, Peterson P, Jackson M and Erlander M. 1996. Cloning differentially expressed mRNAs. *Nature Biotechnology*. 14: 1685-1691.
- 10.- Zegzouti H, Marty C, Jones B, Bouquin T, Latché A, Pech J and Bouzayen M. 1997. Improved Screening of cDNA Generated by mRNA Differential Display Enables the Selection of True Positives and the Isolation of Weakly Expressed Messages. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 236-245.
- 11.- Zimmermann J and Schultz R. 1994. Analysis of gene expression in the preimplantation mouse embryo: Use of mRNA differential display. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 91: 5456-5460.

Técnica “mRNA Differential Display”



Transcriptasa reversa y amplificación por PCR

Eliminación del ADN cromosomal contaminante en las muestras de ARN total

El éxito de la técnica "mRNA Differential Display" depende de la integridad de los ARN y de que éste se encuentre libre de cualquier traza de ADN cromosomal contaminante (2).

Incube 50 µg de ARN total con 10 unidades de inhibidor de ribonucleasa de placenta humana (BRL) y 10 unidades de DNasa I (BRL) en Tris-HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM por 30 minutos a 37°C. Después de una extracción con fenol/cloroformo (3:1), adicione a la fase acuosa 0.1 volúmenes de NaOAc 0.3 M y 2 volúmenes de etanol para precipitar el ARN, el cual se resuspende en agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC).

A. Transcripción reversa de los ARNm

Realice 2 reacciones de transcripción reversa para cada muestra de ARN libre de ADN, utilizando los distintos oligonucleótidos dT₁₁XN: una con transcriptasa reversa (con RT) y un control sin transcriptasa reversa (sin RT).

En un volumen final de 20 µl:

	Con RT (µl)	Sin RT (µl)
dH ₂ O	8.0	10.0
Tampón RT 5x	4.0	4.0
dNTP (250 µM cada uno)	2.0	2.0
ARN total (0.5 µg/µl)	2.0	2.0
dT ₁₁ XN (20 µM)	2.0	2.0
Total	18.0	20.0

Incube los tubos en el termociclador programado como se indica:

65 °C por 5 min.
37 °C por 60 min.
95 °C por 5 min.
4 °C

Después de 10 minutos de alcanzados los 37 °C adicione a los tubos con RT 2 µl de transcriptasa reversa SuperScript (25 U/µl). Al finalizar la transcripción reversa se debe recolectar la condensación

realizando una breve centrifugación. Traslade los tubos al hielo para continuar con la reacción de PCR o a -20 °C hasta su utilización.

La reacción **sin RT** es un control negativo para determinar si un fragmento es de origen genómico o de ADNc. Los productos generados en la ausencia de RT son de origen genómico.

B. Fosforilación del oligo dT₁₁XN

	(μ l)
dT ₁₁ XN (20 μ M)	13.0
Tampón "Forward" 5x	4.0
Cinasa (10 U/ μ l)	0.5
γ 32P- ATP	1.0
dH ₂ O	1.5
Total	20.0

Incube a 37 °C por 60 min. Luego coloque la reacción a 65 °C por 10 min. Finalizada la reacción traslade el o los tubos al hielo para continuar con la reacción de PCR o a -20 °C hasta su utilización.

C. Amplificación por PCR

Realice la amplificación para cada una de las reacciones del paso A (con RT y sin RT).

En un volumen final de 20 μ l

	(μ l)
dH ₂ O	6.8
Tampón de PCR 10x	2.0
dNTP (250 μ M)	2.0
Decámero (4 μ M)	2.0
dT ₁₁ XN (20 mM) - γ 32P-ATP	2.0
Mezcla del paso A	5.0
<i>Taq</i> DNA Polimerasa (5 U/ μ l)	0.2
Total	20.0

Mezcle bien cada reacción de PCR.

La PCR se lleva a cabo mediante el siguiente programa:

40 ciclos	94 °C por 30 seg 40 °C por 2 min 72 °C por 30 seg
1 ciclo	72 °C por 7 min.
Etapas final	4 °C indefinidamente

D.- Separación de los productos de PCR en los geles de poliacrilamida.

Una vez concluida la reacción tome 4.5 de los 20 µl de producto de PCR y mézclelos con 3 µl de colorante de carga, incube por 5 min a 95 °C y rápidamente traslade los tubos al hielo. Cargue las muestras en un gel de secuenciación al 6% de acrilamida, 8.0 M de urea. Corra el gel en tampón TBE 0.5x (Tris base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM pH 8.0) a voltaje constante (1800 V) hasta que el colorante xilen cianol alcance el final del gel (aproximadamente en 2.5 horas).

E.- Secado del gel y exposición sobre placa rayos X

Separe el gel de los vidrios, y adhiéralo a papel filtro Whatman 3MM. Cubra el gel con Alusa Plast y séquelo al vacío. Una vez seco el gel, coloque una serie de marcas fosforescentes que le permitirán más adelante alinear el gel con la autoradiografía. Finalmente exponga el gel seco a una película de rayos-X

F.- Recuperación y reamplificación de los fragmentos diferenciales

1.- Revele la película (exposición de 48 horas aproximadamente) y alinéela con el gel con la ayuda de las marcas fosforescentes. Localice las bandas de interés y córtelas desde el gel a través de la película. (El gel seco se debe manipular con guantes).

2.- Para eluir el fragmento diferencial coloque el trozo de gel seco en un tubo Eppendorf y adicione 100 µl de H₂O desionizada. Espere 10 minutos.

3.- Hierva por 15 minutos, asegurándose que estén bien tapados los tubos

4.- Colecte la condensación mediante una breve centrifugación a 12000 rpm por 2 min. El trozo de gel y el papel filtro quedan en el fondo del tubo.

5.- Transfiera el sobrenadante a un tubo nuevo y adicione 10 µl de acetato de sodio 3 M, 2.5 µl de glicógeno (20 mg/ml) y 450 µl de etanol 100%. Deje precipitando el ADN por 30 min. a -80 °C.

6.- Centrifugue por 10 minutos a 12000 rpm, en una centrifuga refrigerada a 4 °C. Remueva el sobrenadante y lave la pastilla con 200 µl de etanol frío al 85%. Centrifugue nuevamente por 3 minutos a 12000 rpm, y elimine el etanol residual.

7.- Resuspenda el ADN precipitado en 10 µl de H₂O desionizada.

8.- Realice la reamplificación con 5 ul del ADN del paso 7F

En un volumen final de 50 µl

	(µl)
dH ₂ O	25.65
Tampón PCR 10x	5.00
dNTP (250 µM)	4.00
Decámero (4 µM)	5.00
T ₁₁ XN (20 µM)	5.00
Templado de ADNc del paso 7F	5.00
Taq DNA Polimerasa (5 U/µl)	0.35
Total	50.00

Mezcle bien cada reacción de PCR.

La PCR se lleva a cabo mediante el siguiente programa

25 ciclos	94 °C por 30 seg
	40 °C por 2 min
	72 °C por 30 seg

1 ciclo	72 °C por 7 min.
---------	------------------

Paso final	4 °C indefinidamente
------------	----------------------

Una vez finalizada la reacción, analice 5 µl de cada muestra en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Guarde el resto de la muestra a -20 °C para su posterior clonación.

Transcripción Reversa (RT) de ARNm

	Control		1SF	
	Con RT	Sin RT	Con RT	Sin RT
dH ₂ O	8	10	8	10
ARN total (0,5 µg/µl)	2	2	2	2
T ₁₁ XN (20 µM)	2	2	2	2
*Mix	6	6	6	6

SuperScript RT	2	0	2	0
**				
Volumen final (µl)	20	20	20	20

Plantas Control : Plantas mantenidas a una temperatura de 13 °C

Plantas 1SF : Plantas tratadas a una temperatura de 4 °C por una semana

*Mix: dNTP (250 µM) 2 x 5 = 10
Tampón RT 5X 4 x 5 = 20

Total : 30: 5 = 6 µl

*** Coloque la reacción a: 65 °C por 5 min
37 °C por 10 min

** Coloque la reacción a incubar a: 37 °C por 50 min
95 °C por 5 min

Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)

La reacción de PCR se realiza a partir de los producto de RT obtenido para muestras controles y muestras ISF con sus respectivos controles negativos (sin RT).

En este esquema se presenta la reacción de PCR a partir de una sola mezcla de RT utilizando dos combinaciones de oligonucleótidos.

	T ₁₁ XN/ Decámero AP ₁	T ₁₁ XN/ Decámero AP ₂
Mezcla de RT	5	5
T ₁₁ XN (20 µM)	2	2
Decámero AP ₁ (4 µM)	2	---
Decámero AP ₂ (4 µM)	---	2
*Mix	11	11
Volumen final (µl)	20	20

*Mix:	dH ₂ O	6.8 x 9 = 61.2
	Tampón PCR 10X	2.0 x 9 = 18
	dNTP (250 µM)	2.0 x 9 = 18
	Taq DNA Pol	0.2 x 9 = 1.8
Total		99 : 9 = 11 µl

Reamplificación de las sondas de cADN

Los fragmentos de interés cortados del gel se amplifican de acuerdo al siguiente procedimiento

	T ₁₁ XN/ Decámero AP ₁	T ₁₁ XN/ Decámero o AP ₂
dH ₂ O	26.65	26.65
Tampón de PCR 10X	5.0	5.0
dNTP (250 µM)	4.0	4.0
Decámero AP ₁ (4 µM)	5.0	----
Decámero AP ₂ (4 µM)	----	5.0
T ₁₁ XN (20 µM)	5.0	5.0
Templado de cDNA	5.0	5.0
Taq DNA Polimerasa	0.35	0.35
Volumen final (µl)	50	50

Análisis del "mRNA DIFFERENTIAL DISPLAY"

	T ₁₁ XN / Decámero AP ₁ diferencial constitutivo es s	T ₁₃ XN / Decámero AP ₂ diferencial constitutivo es s
Controles		
1SF		
Totales		

Reactivos

- 1.- Tampón RT 5x
- 2.- Transcriptasa Reversa Superscript™ II R.T. (25 U/μl)
- 3.- dNTP (250 μM)
- 4.- 5'-T₁₁CG- 3' (D05)
- 5.- 5'-T₁₁CA- 3' (D06)
- 6.-Decámero AP₁ 5'- CTT GAT TGC C-3' (D08)
- 7.-Decámero AP₂ 5'- CTG ATC CAT G-3' (D09)
- 8.-Decámero AP₃ 5'- GGA ACC AAT C-3' (D10)
- 9.-Decámero AP₄ 5'- GGT ACT AAG G-3' (D11)
- 10.- Decámero AP₅ 5'- TAC CTA AGC G-3' (D12)
- 11.- Decámero AP₆ 5'- TGG ATT GGT C-3' (D13)
- 12.- Taq DNA Polimerasa (5 U/μl)
- 13.- Tampón PCR 10x
- 14.- Glicógeno (20 mg/ml)
- 15.- Colorante de carga
- 16.- γ³²P-ATP
- 17.- T4 cinasa
- 18.- Tampón "Forward" 10X

cDNA-AFLP: Una nueva técnica para el estudio de expresión diferencial de genes

**Raúl Herrera
Magaly Arias
Carolina Cantillana
Ana Gutiérrez**

Introducción

El aislamiento y estudio de genes expresados diferencialmente ha sido uno de los temas prioritarios en el desarrollo de la investigación científica. La gran demanda técnica que significa el construir y analizar bibliotecas de ADNc para encontrar genes que se expresen diferencialmente ha promovido la búsqueda de estrategias experimentales alternativas que faciliten tan importante logro. La versatilidad de la "Polimerase Chain Reaction" (PCR) permite utilizar ARN como templado, lo que ha sido aprovechado en la técnica "mRNA Differential Display" descrita anteriormente, como una manera de facilitar el estudio de los transcritos expresados diferencialmente. Por otro lado, el desarrollo de la técnica "Amplified Fragment Length Polymorphisms" (AFLP) ha permitido la generación de patrones genéticos a partir de ADN, los cuales han permitido llevar a cabo estudios de diversidad genética en poblaciones (Vos y cols., 1995). Más recientemente, el uso de ARNm como sustrato inicial para efectuar AFLP (cDNA-AFLP) ha permitido la generación de patrones de transcritos con los cuales se han realizado estudios de expresión diferencial (Bachem y cols., 1996; Money y cols., 1996; Habu y cols., 1997).

El ARNm extraído es sustrato para la síntesis de un ADNc usando como partidor una secuencia oligo-dT₁₅. Los adaptadores PstI/MseI son ligados al ADNc, que luego se usan como blancos de los partidores para la amplificación de fragmentos. Los productos de amplificación son separados en geles de poliacrilamida y revelados utilizando métodos radioactivos o no radioactivos.

Bibliografía

- 1.- Bachem C., van der Hoeven, R., de Bruijn, S., Vreugdenhil, D., Zabeau, M., Visser, R. 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *The Plant J.* 9:745-753.
- 2.- Money, T., Reader, S., Qu, L., Dunford, R., Moore, G. 1996. AFLP-based mRNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 24:2616-2617.
- 3.- Habu, Y., Fukada-Tanada, S., Hisatomi, Y., Lida, S. 1997. Amplified restriction fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 234:516-521.
- 4.- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.

Procedimiento experimental

Se requiere de ARN total libre de ADN contaminante, el cual se obtendrá de la misma manera en que esta descrito en el protocolo del “mRNA Differential Display”

1. Una vez purificado el ARN, se procede a la síntesis de un ADNc.

a) Síntesis de la primera hebra

En un volumen de 20 μ l

ARN total 10 μ g	
Tris 1M pH 7.6	1.5 μ l
KCl 1M	1.5 μ l
MgCl ₂ 250 μ M	1.0 μ l
Inhibidor Rnasa 25 U/ μ l	1.0 μ l
dNTP 5 mM c/u	2.0 μ l
Oligo-dT ₁₅ (0.5 mM)	2.0 μ l
Transcriptasa Inv. (25U/ μ l)	2.0 μ l

Mezcle los 20 μ l, centrifugue e incube a 42°C por 1 hora.

b) Síntesis de la segunda hebra

Al tubo con la mezcla anterior, puesta en hielo, adicione los componentes para la síntesis de la segunda hebra.

En un volumen de 100 μ l

Mezcla primera hebra	20 μ l
MgCl ₂ 10 mM	35 μ l
Tris 2M pH 7.4	5.0 μ l
RNasa H 1000 U/ μ l	1.0 μ l
DNA Polimerasa I (1000 U/ μ l)	5.0 μ l
Agua-DEPC	34 μ l

Mezcle los 100 μ l, centrifugue e incube a 12°C por 60 minutos, 22°C por 60 minutos y 65°C por 10 minutos.

c) Síntesis de doble hebra de ADNc de extremos romos

Mezcla de ADNc	100 µl
T4 DNA Polimerasa 500 U/µl	4.0 µl

Mezcle los 104 µl, centrifugue incube a 37°C por 10 minutos.

d) Detención de la reacción

EDTA 0.2 M (pH 7.2)	10 µl
Sarkosil 10%	2.0 µl

2. Verificación de la síntesis de ADNc

La verificación de síntesis se puede realizar promoviendo la amplificación por PCR de blancos genómicos conocidos. Estos serían separados en geles de agarosa y visualizados por tinción con bromuro de etidio.

1. Mezcla de reacción

ADNc 100 ng	
Partidores (x2) 2 µM c/u	2.5 µl
Tampón (Tris-HCl 100 mM pH 8.3; KCl 500mM)	14.6 µl
Taq polimerasa (5 U/µl)	0.4µl

b) Condición de PCR

Esta dependerá del tipo de partidor, sin embargo se puede considerar condiciones pocas restrictivas, por lo que para 35 ciclos se tendría:

94°C	5'
94°C	45''
55°C	45''
72°C	1'30''
72°C	5'

3. Extracción cloroformo

Se extrae dos veces con cloroformo/Alcohol isoamílico. El sobrenadante se precipita con 2.5 volúmenes etanol 100% y 0.1 volumen acetato de sodio 3M. Centrifugar a 13.000 rpm por 10' (4°C). Lavar con etanol 70% y centrifugar nuevamente. Secar y resuspender en 10-50 µl agua desionizada autoclavada.

4. Preparación del adaptador

Prepare una mezcla equivalente con las dos hebras de adaptador a la concentración deseada. Incubela a 90°C por 10 minutos y deje caer la temperatura hasta 30°C (2-3 horas).

5. Digestión-ligación simultánea

Solución DL:	
Ligasa (6200 U/µl)	0.02 µl
Enzima <i>Pst</i> I (15 U/µl)	0.1 µl
Enzima <i>Mse</i> I (4 U/µl)	0.4 µl
Tampón 10x	2.5 µl
ATP (10 mM)	0.2 µl
Adaptador <i>Pst</i> I (5 pmol)	0.2 µl
Adaptador <i>Mse</i> I (50 pmol)	0.2 µl
Agua desionizada autoclavada	11.38 µl
Solución DL	15 µl
Matriz de DNA	10 µl
Incubar a 37°C por 3 horas	

6. PCR

a) Mezcla Taq polimerasa:	
Tampón 10x	2.0 µl
MgCl ₂ 50 mM	0.8 µl
Taq polimerasa (5 U/µl)	0.08 µl
Agua desionizada	7.12 µl
b) Mezcla de partidor	
Partidor <i>Eco</i> RI (10 µM)	0.6 µl
Partidor <i>Mse</i> I (10 µM)	0.6 µl
dNTP 5 mM	0.8 µl
Agua desionizada autoclavada	3.0 µl

c) Mezcla de reacción

Matriz (ADNc diluido 2-10 veces)	10 μ l
Mezcla Taq polimerasa	10 μ l
Mezcla de partidores	5.0 μ l

d) Condiciones de PCR

94°C	4'	
94°C	30''	
60°C	30''	x 30 ciclos
72°C	1'	
6°C	n'	

7. Gel de poliacrilamida

Se prepara un gel urea al 4%.

Previamente se lavan los vidrios con agua y etanol.

Se aplica la solución bind silano al vidrio largo (4 ml de solución en 10 μ l de bind silano). Dejar reposar por 15' y lavar con etanol absoluto. Repetir el lavado del vidrio tres veces.

La solución de bind silano contiene: 100 μ l ácido acético glacial; 2 ml etanol absoluto; 2 ml agua

Se aplica la solución Repel silano (2.5 ml). Después de 15', se lava el vidrio con etanol absoluto. Repetir 3 veces.

8. Tinción con plata

a. Una vez separado los vidrios, se fija por 30' en solución 10% ácido acético.

Durante este tiempo se preparan las soluciones reveladoras y nitrato de plata. Prepare 200 ml de 0.1 % (w/v) AgNO_3 (0.24 g en 200 ml). También prepare 0.2 g de tiosulfato de sodio en 10 ml de agua destilada. Se puede preparar al mismo tiempo la solución de revelado que consiste en 2.5% w/v NaCO_3 (200 ml).

b. Lavar con agua 4 veces por 3 minutos. Ello para remover el ácido acético pues interferirá con la reacción.

- c. Incubar en solución de plata por 30'.
- d. Lavar en agua por 5'.
- e. Desarrolle en solución carbonato que contiene formaldehído y tiosulfato de sodio. Detener cuando se observa un buen contraste.
- f. Fije el gel en ácido acético 10% por 15'.
- g. Lave en agua por 30'.
- h. Secar a temperatura ambiente por 16 horas.

Secuenciación automática de ADN

Manuel Gidekel
Marcelo Garcés.

Secuenciación por el Método del Didesoxi o de Sanger

Las ADN polimerasas copian templados de una hebra de ADN, adicionando nucleótidos a la cadena creciente (producto de extensión). La elongación de la cadena se produce en el extremo 3' del partidor, un oligonucleótido que se alinea con el templado. El desoxinucleótido agregado al producto de extensión es seleccionado por su complementariedad a las bases del templado.

El producto de extensión crece por la formación de un enlace fosfodiéster entre el grupo hidroxil-3' del extremo creciente del partidor y el fosfato-5' del desoxinucleótido entrante. El crecimiento es en la dirección 5' → 3'.

Las ADN polimerasas también pueden incorporar análogos de las bases de nucleótidos. El método de secuenciación del didesoxi, desarrollado por Sanger (1977) aprovecha esta propiedad, usando didesoxi nucleótidos -2',3' como sustratos. Cuando un didesoxinucleótido se incorpora al extremo 3' de la cadena creciente, la elongación de la cadena termina selectivamente en A, T, C o G por la falta del grupo hidroxil-3'.

En la secuenciación automática de los equipos PE Applied Biosystems, se incorporan colorantes fluorescentes a los productos de extensión, usando Partidores coloreados-5' o Didesoxinucleótidos trifosfato coloreados-3'. La elección del tipo de colorante usado depende de los objetivos de la secuenciación, características de cada método y la preferencia personal.

Los secuenciadores PE Applied Biosystems detectan la fluorescencia de cuatro diferentes colorantes, que son usados para identificar la A, C, G y T en las reacciones de extensión. Cada colorante emite luz a una longitud de onda distinta al ser excitado por un laser iónico de Argón. Los cuatro colores y por lo tanto, las cuatro bases, pueden ser detectadas y diferenciadas en un solo carril de gel, o en una inyección del capilar.

Cada uno de los cuatro terminadores didesoxi (ddNTPs) se encuentra unido a un colorante fluorescente distinto. La cadena creciente es terminada y marcada simultáneamente con el color correspondiente a cada base. Las características principales de las reacciones con terminadores coloreados son :

- Se puede utilizar un partididor sin colorante fluorescente.
- La reacción se puede realizar en un solo tubo, en cambio en las reacciones de partididor coloreado se debe usar un tubo por cada tipo de base.
- Las reacciones con los cuatro colores pueden ser cargadas en una sola inyección al capilar.

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer

El ABI PRISM 310 es un instrumento automatizado que analiza fragmentos de ADN con marcas fluorescentes usando la electroforesis capilar. Los tubos con las reacciones de secuenciación son puestos en una gradilla para 48 o 96 muestras. El equipo pone en contacto cada muestra con un electrodo catódico y un capilar de vidrio que contiene polímero de separación. El electrodo anódico se encuentra inmerso en un tampón al otro extremo del capilar.

La muestra entra al capilar cuando fluye una carga eléctrica entre el cátodo y el ánodo. Este corto período de electroforesis efectuada mientras el capilar y el cátodo se encuentran inmersos en la muestra se denomina Inyección Electrocinética. Luego el extremo del capilar cercano al cátodo se sumerge en tampón y se aplica corriente nuevamente para continuar la electroforesis.

Cuando los fragmentos de ADN marcados alcanzan la ventana del capilar, el laser excita los colorantes fluorescentes. La fluorescencia emitida por los colorantes es colectada por el dispositivo detector (camara CCD) a longitudes de onda particulares (filtros virtuales) y registrados como señales digitales en el computador Macintosh. Para el procesamiento de los datos se usa el software "Sequencing analysis" que interpreta los resultados, asignando las bases para cada intensidad de fluorescencia detectada.

Bibliografía

- ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kit Protocol, PE Applied Biosystems 1998
- ABI Prism 310 Genetic Analyzer User's Manual, PE Applied Biosystems 1998
- Automated ADN Sequencing Chemistry Guide, PE Applied Biosystems 1998

"ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit"

ADN Polimerasa Amplitaq FS.

Este kit contiene la enzima ADN Polimerasa Amplitaq FS. Esta enzima es una variante de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, con una mutación puntual en el sitio activo, que provoca una menor discriminación entre los didesoxinucleótidos. La enzima también posee una segunda mutación en el dominio amino terminal que virtualmente elimina su actividad nucleasa 5' → 3'.

Las ventajas de este protocolo sobre los métodos de secuenciación tradicionales son:

2. Menos operaciones manuales
3. No se requiere el paso de denaturación alcalina para ADN de doble hebra
4. Se usa el mismo protocolo para templados de una o dos hebras
5. Se necesita menos templado inicial
6. Resultados más reproducibles

Colorantes Fluorescentes "Big Dye"

Los nuevos colorantes fluorescentes "Big Dye" desarrollados por PE Applied Biosystems contienen 2 diclororodaminas asociadas, una actúa como aceptora de energía, transfiriéndola a la otra molécula. Esto permite una alta absorción de energía de excitación, luego, hay un mayor descenso de energía y por lo tanto, una mayor emisión. Las características de estos colorantes otorgan un aumento de 4 o 5 veces en la sensibilidad con respecto a colorantes anteriores de rodamina.

1. Las mezclas de nucleótidos/didesoxinucleótidos han sido optimizadas para dar lecturas más exactas y largas, de más de 700 pb
2. Pueden ser secuenciados templados de gran tamaño más rápidamente: una aplicación es la secuenciación de BAC ("Bacterial artificial chromosomes")
3. Se puede utilizar la mitad de la cantidad recomendada de "Ready Reaction Premix" con algunos templados, como plásmidos y productos de PCR.

"Ready Reaction Mix"

En la mezcla de reacción se incluyen:

- Terminadores coloreados:
Terminador coloreado-A con dicloro[R6G]
Terminador coloreado-C con dicloro[ROX]
Terminador coloreado-G con dicloro[R110]
Terminador coloreado-T con dicloro[TAMRA]
- Desoxinucleótidos trifosfato(dATP,dCTP,dITP,dUTP)

La mezcla de desoxinucleótidos incluye dITP en lugar de dGTP para minimizar las compresiones de bandas. También tiene dUTP en lugar de dTTP para aumentar la incorporación del Terminador T .

- ADN polimerasa Amplitaq FS, con pirofosfatasa termoestable que degrada el pirofosfato inorganico (PPi) y previene su acumulación en la reacción de secuenciación.
- Cloruro de magnesio
- Tampón Tris-HCl, pH 9.0

Prepare las reacciones de secuenciación

Paso	Acción	
	Para cada reacción , agregue los siguientes reactivos:	
	Reactivo	Cantidad
	Terminator "Ready Reaction Mix"	8,0 µl
	Templado	-
	ADN una hebra	50 – 100 ng
	ADN doble hebra	200 – 500 ng
	ADN Producto de PCR	30 – 90 ng
	Primer	4,5 pmol
	Agua desionizada	c.s.
Volumen total	20 µl	
2	Mezcle bien y centrifugue brevemente	

Secuenciación de ADN en el termociclador Gene Amp PCR System 9600

Paso	Acción
1	Ponga los tubos en el termociclador y especifique un volumen de 20 μ l
2	- Repita lo siguiente por 25 ciclos: 96 °C por 10 seg. 50 °C por 5 seg. 60 °C por 4 min.
3	Mantenga a 4 °C hasta la purificación
4	Centrifugue brevemente el contenido del tubo

Remueva los nucleótidos fluorescentes no incorporados

Paso	Acción
1	Agite suavemente la columna para llevar el gel deshidratado al fondo de la columna
2	Remueva la tapa superior de la columna y agregue 800 μ l de agua desionizada.
3	Tape nuevamente la columna y mezcle suavemente invirtiendo o con vortex para mezclar el agua y el material del gel.
4	Permita la hidratación del gel a temperatura ambiente 2 horas, sin mover.
5	Remueva cualquier burbuja agitando suavemente la columna
6	Remueva la tapa superior de la columna y luego la inferior. Permita que la columna se drene completamente por gravedad.
7	Inserte la columna en el tubo de lavado proporcionado.
8	Centrifugue la columna en una microcentrifuga a 730g (~3000 rpm) por 2 min para remover el fluido intersticial, orientando la marca de la columna al centro del rotor.
9	Remueva la columna del tubo de lavado e insertelo en un tubo de colección de muestra (tubo Eppendorf)
10	Cargue la mezcla de reacción de extensión cuidadosamente en el centro de la columna de gel.
11	Centrifugue la columna en una microcentrifuga a 730g (~3000 rpm) por 2 min, en la misma posición que en la primera centrifugación
12	Deseche la columna. La muestra se encuentra en el tubo de colección
13	Concentre la muestra en liofilizador, 10 -15 min., no seque en exceso.

Desnaturalice las muestras

Paso	Acción
1	Resuspenda cada pastilla de muestra en 20 µl de "Template Suppression Reagent"
2	Agite en Vortex y centrifugue brevemente las muestras
3	Caliente la muestras a 95 °C por 2 minutos para desnaturalizar y luego poner en hielo
4	Transfiera las muestras a tubos del secuenciador, tape.
5	Agite en Vortex y centrifugue brevemente las muestras nuevamente. Mantenga a 4°C hasta ingresarlas al equipo ABI PRISM para el análisis

Marcadores Moleculares y Diagnóstico

Análisis RAPD de ADN genómico en plantas

Hugo Campos
Javier Zúñiga
Odeth Ulloa
Cristian Ibáñez

Un marcador molecular corresponde a toda región del ADN (Acido Desoxiribo Nucleico) de un organismo que presenta polimorfismos en distintos individuos dentro de una misma especie. Dentro de los marcadores moleculares basados en PCR (Polymerase Chain Reaction), destacan aquellos basados en partidores arbitrarios, como es el caso de RAPDs, debido a las siguientes consideraciones:

- No requieren información de secuencias
- Permiten generar información con mayor velocidad que otros sistemas.

RAPDs

RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA o ADN polimórfico amplificado al azar) es un marcador molecular que permite generar información genética en ausencia de información de secuencias, y fueron desarrollados simultáneamente por Williams *et al.* (1990) y Welsh y McClelland (1990). A diferencia de las reacciones PCR (Polymerase Chain Reaction) que utilizan dos partidores que reconocen los extremos de la secuencia a amplificar, RAPDs utilizan un solo partidador de secuencia arbitraria y de este modo amplifican segmentos genómicos definidos por dos sitios de unión complementarios al partidador utilizado, los cuales se encuentran en orientación invertida y en cada una de las hebras del ADN. Los partidores utilizados en reacciones RAPD presentan un contenido mínimo de 40% G+C y carecen de secuencias palindrómicas y extremos autocomplementarios. En aquellos eventos en los cuales la distancia entre tales primers es inferior a 3-4 kb, se sintetiza un producto PCR el cual posteriormente puede ser observado como una banda en un gel de agarosa. Una cualidad importante de los RAPDs es su reducida temperatura de empalme (35-40°C), la cual al reducir la especificidad de la reacción PCR permite incrementar el número de

sitios de empalme y en consecuencia la proporción del genoma escaneado. La Figura 1 presenta el esquema general de un análisis basado en RAPDs.

El número esperado de productos amplificados es función del genoma a analizar, número de nucleótidos del partidor y el tamaño máximo amplificable. Asumiendo que la distribución de sitios de reconocimiento es aleatoria, que el partidor es de naturaleza arbitraria y un 100% de complementariedad entre el partidor y sus sitios de empalme en el ADN genómico, el número de fragmentos amplificables corresponde a b :

$$b: 2fN/16^n,$$

Donde f corresponde a la extensión máxima amplificable en pares de bases, N el tamaño genómico en pares de bases y n el número de nucleótidos de los partidores. Además, f depende de la enzima ADN polimerasa utilizada. La Tabla 1 presenta los valores esperados para algunas especies vegetales.

Especie	Tamaño Genómico Mpb	Extensión del partidor			
		8	9	10	11
<i>Arabidopsis</i>	100	93	6	>1	>1
Maíz	2500	2329	146	9	>1
Tomate	950	885	55	4	>1
Cebada	5300	4936	309	19	>1
Arroz	450	419	26	2	>1

Tabla 1: Número de fragmentos RAPD esperados en distintas especies vegetales

Entre las ventajas de los RAPDs destacan su simplicidad tecnológica, uso de partidores comercialmente disponibles y el uso de sistemas no radioactivos de detección de productos de PCR. Ellos han sido utilizados para numerosas aplicaciones de genética vegetal, tales como análisis de diversidad genética en lenteja (Sharma *et al.*, 1995), relaciones genéticas en *Ipomoea* spp. (Connolly *et al.*, 1994), análisis de poblaciones silvestres de los géneros *Hordeum* (De Bustos *et al.*, 1998), identificación clonal y otras. Además, RAPDs han sido utilizados para construir mapas genéticos en especies como *E. grandis* y *E. urophylla* (Grattapaglia y Sederoff, 1994). Del mismo modo, RAPDs han sido utilizados para estrategias de mapeo físico (Dioh *et al.*, 1997).

En términos genéticos, una desventaja de los RAPDs es su naturaleza fundamentalmente dominante (>95%), puesto que el sistema no permite discriminar la condición homocigota (AA) de la heterocigota (Aa). Sin embargo utilizando la estrategia experimental adecuada lo anterior puede ser minimizado sustancialmente.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- CONNOLLY, A.; I. GODWIN; M. COOPER y I. DELACY. 1994. Interpretation of randomly amplified polymorphic DNA marker data for fingerprinting sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 88:332-336.
- 2.- DE BUSTOS, A.; C. CASANOVA; C. SOLER y N. JOUVE. 1998. RAPD variation in wild populations of four species of the genus *Hordeum* (Poaceae). *Theor. Appl. Genet.* 96:101-111.
- 3.- DIOH, W; D. THARREAU y M-H LEBRUN. 1997. RAPD- based screening of genomic libraries for positional cloning. *Nucleic Acids Res.* 25(24):5130-5131.
- 4.- GRATTAPAGLIA, D y R. SEDEROFF. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-test cross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics.* 137:1121-1137.
- 5.- PENNER, G.; A. BUSH; R. WISE; W. KIM; L. DOMIER; K. KASHA; A. LAROCHE; G. SCOLES; S. MOLNAR y G. FEDAK. 1993. Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Meth & Appl.* 3:341-345.
- 6.- SHARMA, S.; I. DAWSON y R. WAUGH. 1995. Relationships among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 91:647-654.
- 7.- SHIERWATER, B. Y A. ENDER. 1993. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucleic Acids Res.* 21(19):4647-4648.
- 8.- WELSH, J. y M. McCLELLAND. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids. Res.* 18:7213-7218.
- 9.- WILLIAMS, J.; A. KUBELIK; K. LIVAK; J. RAFALSKI y S. TINGEY. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids. Res.* 18:6531-6535.

Materiales, Reactivos y Soluciones requeridos

Tubos Eppendorf
Set de micropipetas y puntas estériles
Centrífuga
Guantes de látex
Aceite mineral
Termociclador
Transiluminador UV
Cámara electroforética y fuente de poder

ADN genómico 50 ng/ μ l
Agua desionizada estéril
Tampón *Taq* ADN polimerasa 10X
Solución $MgCl_2$ 50 mM
dNTPs 2 mM cada uno
Partidores 2 μ M
Enzima *Taq* ADN polimerasa 5 U/ μ l

Tampón TAE 1X

Agarosa 1.5% en tampón TAE 1X
Solución de Bromuro de Etidio 0.5 μ g/ml

Tampón TAE 50 X

242 g Tris base
57.1 ml. Acido acético glacial
100 ml. EDTA 0.5 M pH 8.0
Agua, c.s.p. 1 L

Tampón de carga

25 mg azul de bromofenol
25 mg xilen cianol
4 gr sacarosa
Tampón TE pH 8.0, c.s.p. 10 ml

Tampón TE

10 mM Tris HCl pH 8.0
1 mM EDTA

Procedimiento Experimental

Debido a la sensibilidad de la reacción PCR, es importante trabajar de modo limpio y sistemático para evitar la introducción de ADN contaminante y asegurar la reproducibilidad de los resultados. Reserve una micropipeta exclusivamente para las soluciones de ADN y el resto para los demás reactivos. Se recomienda usar guantes de látex durante todo el procedimiento y mantener los reactivos en hielo. Las condiciones descritas están optimizadas para ADN extraído de la especie *Trifolium pratense* y para la utilización de Taq ADN Polimerasa GIBCO BRL y un termociclador Perkin Elmer modelo 480C.

- 1.- Añada 1 μl de las soluciones de ADN (50 ng/ μl) a cada tubo Eppendorf marcado. Tápelos y almacénelos en hielo.
- 2.- Prepare una mezcla madre con los reactivos comunes para el total de las reacciones RAPD a desarrollar, considerando un par de reacciones extra. Añada la enzima al final y mezcle suave pero completamente.

Componente	1 tubo	12 tubos
Agua desionizada estéril	15.65 μl	187.8 μl
Tampón 10X	2.50 μl	30.0 μl
MgCl ₂ (stock 50 mM)	1.75 μl	21.0 μl
dNTPs (stock 2 mM cada uno)	1.5 μl	18.0 μl
Partidor (stock 2 μM)	2.4 μl	28.8 μl
Taq ADN polimerasa (stock 5 U/ μl)	0.2 μl	2.4 μl

- 3.- Agregue 24 μl de la mezcla madre a cada tubo Eppendorf con ADN.
- 4.- Mezcle suavemente el contenido de los tubos y coléctelo en el fondo mediante una breve centrifugación.
- 5.- Remueva las burbujas de aire y agregue 50 μl de aceite mineral.
- 6.- Inicie el siguiente programa PCR:

1 ciclo	94°C por 2 min.
42 ciclos	94°C por 25 seg. 35°C por 1 min. 72°C por 1 min. 30 seg.
1 ciclo	72°C por 7 min.
Etapa final	4°C indefinidamente

- 7.- Una vez que el bloque del termociclador ha alcanzado los 94°C coloque los tubos en él y cierre la tapa del equipo.
- 8.- Mientras se desarrolla la reacción prepare un gel de agarosa al 1.5% en tampón 1X TAE (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA).
- 9.- Una vez lista la reacción RAPD, retire los tubos del termociclador y mezcle 7 µl de cada reacción con 1 µl de tampón de carga. Puede utilizar una pieza de papel Parafilm para realizar la mezcla. Mezcle bien y cargue en el gel. En los pocillos laterales cargue 2.5 µl de la solución de estándares de peso molecular que se le proporcionará.
- 10.- Cuando haya terminado la carga, conecte la cámara de electroforesis a la fuente de poder y ajústela a 80 V. La electroforesis se detiene cuando el colorante azul de bromofenol este a 2 cm. del borde del gel.
- 11.-Deconecte la fuente de poder. Usando guantes de látex, retire el gel con sumo cuidado y sumérjalo 15 min. en la solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) **(Este compuesto es carcinogénico. No toque el líquido ni el gel teñido con las manos desprotegidas).**
- 12.- Fotografíe el gel exponiéndolo a la luz UV en el sistema EDAS 120 de Kodak y analice los resultados.

Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs)

**Hugo Campos
Javier Zúñiga
Marcelo Garcés
Odeth Ulloa
Cristian Ibáñez**

La búsqueda de un marcador molecular que presente las ventajas derivadas del uso de PCR en ausencia de información de secuenciación, más robusto y que despliegue una mayor cantidad de polimorfismo que RAPDs permitió desarrollar los AFLPs, que integran restricción enzimática y una subsecuente amplificación vía PCR. El desarrollo de AFLPs comprende tres etapas: restricción del ADN y ligamiento enzimático de adaptadores; amplificación selectiva de subconjuntos de fragmentos de restricción y separación de los productos PCR mediante electroforesis (Vos *et al.*, 1995).

La primera etapa comprende la digestión simultánea del ADN con dos enzimas de restricción, una de reconocimiento frecuente y otra de reconocimiento infrecuente, por ejemplo el par *MseI* y *EcoRI*, aún cuando existen otras combinaciones. De ser *MseI* y *EcoRI* las enzimas utilizadas, aproximadamente un 90% de los fragmentos poseerán extremos *MseI-MseI* mientras que aquellos fragmentos *EcoRI-EcoRI* corresponderán a los menos frecuentes. Posteriormente, se ligan enzimáticamente adaptadores a los extremos de restricción. Un adaptador corresponde a un segmento de ADN de doble hebra con un extremo cohesivo complementario al existente en el sitio de restricción. Los adaptadores no se encuentran fosforilados y por lo tanto solamente una hebra se liga a los extremos de los sitios de restricción. Cada enzima de restricción utilizada requiere un adaptador específico.

A continuación, se desarrollan dos reacciones PCR estándar: Una amplificación preselectiva basada en partidores con un solo nucleótido selectivo que permite reducir 16 veces la complejidad de la mezcla de fragmentos disponibles; y posteriormente una amplificación selectiva que reduce en 256 veces la complejidad de la mezcla de fragmentos existente basada en partidores que presentan nucleótidos

selectivos en el extremo 3'. Por lo tanto, solamente aquellos fragmentos de restricción cuyos nucleótidos adyacentes al sitio de restricción son idénticos a los nucleótidos selectivos del partidador son amplificados. Generalmente, un solo partidador es marcado con los radioisótopos P^{32} , P^{33} o compuestos fluorescentes y por lo tanto al observar las autoradiografías o imágenes solamente se observan fragmentos marcados evitándose así bandas dobles. Las bandas dobles observadas se deben a la actividad terminal transferasa de las enzimas *Taq* ADN polimerasa comercialmente disponibles las cuales adicionan un nucleótido extra a las hebras sintetizadas de ADN. Mediante el uso de extensiones selectivas se reduce el número de fragmentos amplificados, y en función de la complejidad del genoma a analizar, una o dos rondas de amplificación PCR son necesarias con distintos números de nucleótidos selectivos. Los productos PCR así generados se separan mediante geles de poliacrilamida denaturantes de alta resolución, puesto que algunos de ellos solamente se diferencian por un pb de extensión entre sí. Alternativamente, y en caso que los partidadores sean marcados con pigmentos fluorescentes, los fragmentos se separan mediante electroforesis capilar.

Tal como RAPDs, AFLPs son de naturaleza dominante, aun cuando presentan una mayor frecuencia de codominancia y además utilizando el software apropiado en ciertos casos es factible discriminar entre individuos homocigotos y heterocigotos.

AFLPs han sido utilizados en estudios filogenéticos en trigo (Heun *et al.*, 1997); construcción de mapas en cebada y melón (Wang *et al.*, 1997; Waugh *et al.*, 1997) y análisis de genotipos isogénicos en soya (Maughan *et al.*, 1996) entre otros ejemplos.

Una importante ventaja de AFLPs sobre RAPDs se deriva de las condiciones PCR empleadas y además del mayor número de bandas generadas. AFLPs presentan un mayor valor PIC que RAPDs incrementándose así la cantidad de información obtenida por reacción. Además, las condiciones PCR utilizadas incrementan su reproducibilidad en comparación con RAPDs. Finalmente, AFLPs poseen un mayor potencial de automatización que RAPDs y RFLPs. A pesar de lo anterior, es necesario definir caso por caso el marcador molecular a utilizar, considerando parámetros como complejidad técnica y los objetivos del estudio a desarrollar.

Bibliografía

1. HEUN, M.; R. SCHAFER-PREGL; D. KLAWAN; R. CASTAGNA; M. ACCERBI; B. BORGHI y F. SALAMINI. 1997. Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science*. 278:1312-1316.
2. MAUGHAN; P.; M. SAGHAI MAROOF; G. BUSS; G. HUESTIS. 1996. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean; species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. *Theor. Appl. Genet.* 93:392-401.
3. VOS, P.; R. HOGERS; M. BLEEKER; M. R. EIJANS; T. VAN DE LEE; M. HORNES; A. FRITJERS; J. POT; J. PELEMAN; M. KUIPER y M. ZABEAU. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23(21):4407-4414.
4. WANG, y.; C. THOMAS y R. DEAN. 1997. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Theor. Appl. Genet.* 95:791-798.
5. WAUGH, R.; N. BONAR; E. BAIRD; B. THOMAS; A. GRANER; P. HAYES y W. POWELL. 1997. Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. *Mol. Gen. Genet.* 255:311-321.

Materiales a utilizar

Materiales generales como en RAPDs más:

Enzima de restricción EcoRI

Enzima de restricción MseI

Enzima T4 ADN ligasa

Kit Perkin Elmer P/N 402273 (Ligation and amplification mix)

Kit Perkin Elmer P/N 402005 (Amplification core mix)

Procedimiento

A.- Restricción y ligamiento de adaptadores (para 100 muestras)

Prepare la siguiente mezcla madre:

Componente	Vol/Cant
10X tampón enzima T4 ADN ligasa	10 µl
NaCl 0.5 M	10 µl
BSA (1 mg/ml)	5 µl
Enzima Mse I	100 unidades
Enzima EcoRI	500 unidades
Enzima T4 ADN ligasa	100 unidades
Agua desionizada estéril	Hasta 100 µl

Combine en un tubo (por cada muestra):

Componente	Vol/Cant
ADN genómico (disuelto en 5.5 µl de agua estéril)	0.5 µg
Tampón enzima T4 ADN ligasa	1 µl
NaCL 0.5M;	1 µl
BSA (1 mg/ml);	0.5 µl
Adaptador MseI;	1 µl
Adaptador EcoRI	1 µl
mix master del paso anterior	1 µl

Mezcle mediante un pulso de centrifuga e incube durante 3 horas a 37°C en el termociclador Perkin Elmer 9700.

Diluya las reacciones terminadas con 189 µl de 0.1XTE, mezcle adecuadamente y mantenga a -20°C.

B.- Amplificación preselectiva

En un tubo combine:

Componente	Vol
Producto diluido (punto anterior)	4 μ l
Partidores AFLP preselectivos	1 μ l
AFLP "core mix".	15 μ l

Utilice el siguiente programa PCR:

72°C	por 2 minutos
20 ciclos :	
94°C por	1 segundo
56°C por	30 segundos
72°C por	2 minutos
60°C por	30 minutos
4°C	indefinido

Verifique la presencia de productos de PCR en un gel de agarosa 1.5% preparado en buffer 1X TAE.

C.- Amplificación selectiva

Diluya los productos PCR preamplificados (10 μ l producto PCR + 190 μ l 0.1XTE).

Mezcle bien en un tubo

Componente	Vol
Producto PCR diluido	3 μ l
Primer <i>Mse</i> I (5 μ M)	1 μ l
Primer <i>Eco</i> RI (1 μ M)	1 μ l
AFLP core mix.	15 μ l

Los parámetros PCR a utilizar son:

Denaturación	Apareamiento	Extensión	Número de ciclos
94°C, 2m	65°C, 30s	72°C, 2m	1
94°C, 1s	64°C, 30s	72°C, 2m	1
94°C, 1s	63°C, 30s	72°C, 2m	1
94°C, 1s	62°C, 30s	72°C, 2m	1
94°C, 1s	61°C, 30s	72°C, 2m	1
94°C, 1s	60°C, 30s	72°C, 2m	1
94°C, 1s	59°C, 30s	72°C, 2m	1
94°C, 1s	58°C, 30s	72°C, 2m	1
94°C, 1s	57°C, 30s	72°C, 2m	1
94°C, 1s	56°C, 30s	72°C, 2m	23
60°C, 30m	-	-	1
4°C	Indefinido	Indefinido	Indefinido

D.- Separación y análisis de fragmentos

La separación de productos AFLP se efectúa mediante electroforesis capilar en un el secuenciador automático Perkin Elmer 310. El polímero a utilizar en los tubos capilares es POP4. Los productos serán posteriormente analizados con el software disponible en el instrumento.

Secuencias microsatélites en el estudio de diversidad genética de poblaciones

M^a Alejandra Moya-León
Raúl Herrera

Las secuencias microsatélites tienen la característica de ser segmentos de ADN que poseen unidades dinucleotídicas repetidas en su secuencia. Dichos fragmentos son muy abundantes en eucariotes y por lo mismo altamente polimórficos, de loci discreto y alelos co-dominante.

Inicialmente se usó "Restriction fragment length polymorphisms" (RFLP) para la búsqueda de estas secuencias (Jeffreys y cols., 1985), sin embargo, con el advenimiento de la técnica "Polimerase Chain Reaction" (PCR, Reacción en cadena de la enzima ADN polimerasa) se incorporó una segunda aproximación para la caracterización de dichas secuencias.

La identificación de este tipo de secuencias, se ha realizado por el clonamiento y caracterización de este tipo de secuencias, sin embargo, recientemente se han construido bibliotecas genómicas enriquecidas de estas secuencias microsatélites (Li y cols., 1996; van de Ven y McNicol, 1996; Morchen y cols., 1996). Alternativamente, se han construido partidores con secuencias microsatélites reportadas en las bases de datos, para identificarlas en las mismas u otras especies a las originalmente descritas (Bell y Ecker, 1994; Echt y cols., 1999).

Bibliografía

1. Bell, C., Ecker, J. 1994. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* 19:137-144.
2. Li, X., Liang, C., Wu, H., Zhai, W., Huang, N., Zhu, L. 1996. Isolation and identification of a non specific tandemly repeated DNA sequence in *Oryza* species. *Theor. Appl. Genet.* 92: 702-708.
3. Echt, C., Vendramin, G., Nelson, C., Marquardt, P. Microsatellite DNA as shared genetic markers among conifer species. *Can. J. For. Res.* 29: 365-371.
4. Jeffreys, A., Wilson, V., Thein, S. 1985. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.

5. Morchen, M., Cuguen, J., Michaelis, G., Hanni, C., Saumitou-Laprade, P. 1996. Abundance and length polymorphism of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L. Theor. Appl. Genet. 92: 326-333.
6. Van de Ven, W., McNicol, R. 1996. Microsatellite as DNA markers in Sitka spruce. Theor. Appl. Genet. 93: 613-617.

Detección de secuencias microsatélites usando PCR.

a) Síntesis de secuencias partidoras.

Se seleccionan secuencias partidoras desde las bases de datos, teniendo en consideración el trabajar con especies relacionadas. Ellas pueden ser clasificadas según el tipo de ADN blanco al cual hibridan (ADN cloroplástico, genómico).

b) Preparación de la mezcla de reacción por tubo

- 1 μ l dNTPs (2 mM)
- 0.5 μ l partidor 1 (20 M)
- 0.5 μ l partidor 2 (20 M)
- 1 μ l buffer PCR 10x (incluido magnesio)
- Taq DNA polimerasa (1.5-2.0 U)
- agua bidestilada hasta completar 10 μ l

c) PCR

Agregue 9 μ l de la mezcla anterior a un tubo limpio. Incorpore 15 ng de ADN al mismo tubo. Realice 25-35 ciclos bajo las condiciones adecuadas de hibridación para los partidores.

d) Visualización

Agregue 1 μ l de tampón de carga ("loading buffer") y aplique 7 μ l de la muestra en un gel de poliacrilamida 5%. El fragmento amplificado puede ser revelado mediante uso de radioisótopo o con tinción de plata. Alternativamente, los geles de poliacrilamida pueden ser teñido con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador.

e) Cuando se utiliza isótopo radioactivo, se sugiere marcar el partidor

- 0.5 pmol partidor
 - 0.5 μ l de tampón de fosforilación 10x
 - 2 U polinucleótido kinasa
 - 3 μ l γ^{32} P-ATP
- lleve a 5 μ l con agua bidestilada

Incube por 15 min a 37 °C. Incube por 5 min a 95 °C. Centrifugue a máxima velocidad. Agregue a la mezcla de reacción de PCR.

Hibridación *in situ* de ácidos nucleicos virales en plantas.

Patricio Arce-Johnson
Nicole Ehrenfeld
Claudia Stange
Leticia Barrientos

La hibridación *in situ* es una técnica que puede utilizar hojas, tallos, raíces y otros tejidos de la planta. Estos, inicialmente son permeabilizados con proteinasa K, y en el caso de las hojas, pueden ser tratadas como si fueran membranas con ARN. En ellas se puede hibridar el producto de interés con una sonda radiactiva específica y visualizarlo espacialmente en el tejido. Visualizar ácidos nucleicos en tejidos, es una herramienta valiosa en todo tipo de estudio molecular. Observar localización de la expresión dentro de un tejido, o dentro de alguna etapa del ciclo de vida de la planta, puede ser fundamental para la optimización del material vegetal, con que se va a seguir trabajando. Corroborar la expresión diferencial en distintos tejidos, de promotores diferentes, sin la necesidad de hacer uso de genes reporteros, puede disminuir trabajo y esfuerzo, en la etapa de construcción de plantas modificadas genéticamente. Así también, esta metodología de visualización de ácidos nucleicos *in situ*, puede ser de gran ayuda en el estudio de la infección por virus de una planta. La cinética de infección de un virus, puede ser un factor determinante en el rango de hospedero de éste. Con las metodologías clásicas de extracción de ácidos nucleicos o hibridación *in situ* puede ser imposible determinar el sutil detalle de infección, si el virus infecta y se mueve, o infecta y no se mueve. Pero, con la nueva metodología de hibridación en hoja, ha sido factible evaluar la importancia del movimiento del virus dentro de la planta para la determinación de su rango de hospedero.

Arabidopsis thaliana es la especie vegetal, que se ha transformado en la *Escherichia coli* de la biología molecular vegetal, por lo que implementar todas las metodologías existentes para *Nicotiana tabacum* (tabaco), es una necesidad, y encontrar modelos de estudio en *Arabidopsis* también.

TMV (virus del mosaico del tabaco), es el virus vegetal mas ampliamente estudiado, principalmente en su interacción con tabaco.

Encontrar alguna cepa de TMV que infecte crucíferas, como *Arabidopsis*, será, por tanto, una herramienta útil en el estudio de infección por virus. Una alternativa a este problema a resultado ser el subgrupo III de tobamovirus, que se ha observado infectan crucíferas. Dentro de ellos se destacan el virus del aclaramiento de la vena del nabo (TVCV), virus del mosaico del pasto (RMV) y el TMV-Cg, virus del mosaico del tabaco, adaptado para infectar ajos.

En este práctico se pretende observar la infección diferencial del TMV-Cg y el TMV-U1 (TMV clásico de tabaco), en plantas de *Arabidopsis thaliana*, mediante la metodología de hibridación en hoja.

Bibliografía

1. Bechtold, N. & Pelletier, G. (1998). "Methods in Molecular Biology, Arabidopsis Protocols" Vol.82: Capítulo 28; páginas: 259-265. Editado por: J. Martínez-Zapater & J. Salinas ©Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1998.
2. Lartey, R., Ghosroy, S., Ho, J. & Citovsky, V. (1997). Movement and subcellular localization of a tobamovirus in *Arabidopsis*. Plant Journal 12(3), 537-545.

Materiales

- Plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Po-1, infectadas desde 6 y 12 días con el virus TMV-Cg o con el TMV-U1.
- Solución de Proteinasa K: Proteinasa K 50 µg/ml, Azida de sodio 0.01% y 0.5% SDS.
- Solución de (pre)hibridación: SSPE 6X, 50% formamida, Denhardt 5X, 0.5% SDS; 20 µg/ml de AND de esperma de Salmón. Denhardt 50X contiene: 1% Ficoll, 1% polivinilpirrolidona, 1% BSA.
- SSPE 20X, que contiene: NaCl 3M, NaH₂PO₄·xH₂O 0.2M, EDTA 0.02M, a pH: 7.0.
- etanol 95%
- Película de exposición Kodak
- Baño termorregulado con agitación

Metodología

1. Colecte hojas frescas de *Arabidopsis* infectadas con TMV-Cg, TMV-U1 y sin infectar, de 0, 6 y 12 días post-infección. Coloque cada grupo en una placa petri e identifique marcando debidamente.
2. En las mismas placas petri, en las que se continuará trabajando, incube las hojas en etanol 95% a 37°C por 2-3 horas, para extraer la clorofila.
3. Lave estas hojas, ya decoloradas, con agua desionizada.
4. Luego, incube en una solución de Proteinasa K por 3 horas a 42°C.
5. Luego de este tratamiento trate las hojas como si fueran una membrana de Northern blot: prehibridala en solución de prehibridación por 3 horas a 42°C.
6. Mientras se prehibrida, marque la sonda a utilizar, o denature una sonda ya marcada, incubándola 5 min a 95°C. En este caso se utiliza como sonda un amplificado del gen de la proteína de la cápside del TMV-Cg o TMV-U1, según sea el caso, marcada con P³²-dCTP (preparada previamente).
7. Mezcle la sonda marcada, inmediatamente tras denaturar, con solución de prehibridación y agregue a las hojas.
8. Deje las hojas hibridando toda la noche a 42°C con agitación suave.

9. Al día siguiente retire la solución de hibridación y lave con SSPE 5X a 45°C por 10 min, este proceso repítalo hasta que la radioactividad de las hojas controles sea mínima (medida con un contador Geiger).

10. Lave con agua destilada, y cuidadosamente monte las hojas sobre una membrana de nitrocelulosa o papel Whatman 1, tratando de estirarlas.

11. Cubra esta membrana con un plástico y coloquela frente a una película de exposición.

12. Luego de 24 horas revele esta película (el tiempo de exposición depende de la vida media de la radioactividad) y observe las diferencias de hibridación.

El TMV-Cg infecta rápida y efectivamente toda la planta de *Arabidopsis*, en cambio TMV-U1 lo hace más lento o no se mueve sistémicamente en ciertos ecotipos de esta especie.

Genes de resistencia en plantas

Patricio Arce-Johnson
Claudia Stange
Nicole Ehrenfeld
Ana Gutiérrez

Las plantas, al igual que los animales, han desarrollado diversos mecanismos que les permiten defenderse del continuo ataque de patógenos. Uno de los mecanismos de defensa más efectivos es la reacción hipersensible, descrito en el modelo gen por gen (Flor, 1947). Este modelo se basa en que la planta puede reconocer específicamente al patógeno invasor desencadenando una reacción incompatible (Keen, 1990). Este reconocimiento depende de la expresión de un gen de resistencia (R) dominante o semidominante en la planta. El producto de este gen reconoce directa o indirectamente al elicitor (avr), que proviene de la expresión de un gen de avirulencia en el patógeno (Bent, 1996). En el modelo del gen por gen, el producto del gen R actúa como Receptor, y el producto Avr como ligando (Keen, 1990; Gabriel, 1990). En una reacción incompatible, la formación del complejo Receptor-ligando inicia una cascada de señales de transducción, las que finalmente desencadenan la respuesta de hipersensibilidad (HR). Producto de ello, se detiene la invasión en las células inicialmente infectadas (lesión local), y se evita la diseminación del patógeno en toda la planta (Hammond-Kosak and Jones, 1997).

La planta contiene cientos de genes R específicos para patógenos de origen viral, bacteriano, fúngico y para nemátodos (Bent, 1996). Utilizando técnicas de clonamiento posicional y mutagénesis mediante transposones, se han logrado clonar una serie de genes R en varias especies vegetales. Estos han sido clasificados en 5 grupos (1, 2, 3a, 3b, 4 y 5), dependiendo de su estructura y dominios funcionales que presentan. Dentro del grupo 3b se encuentra el gen N, que se expresa naturalmente en tabaco, y confiere resistencia al virus del mosaico del tabaco, TMV (Whitham y col., 1994). Como los otros miembros del grupo 3b, este gen origina dos RNAs mensajeros por "splicing" alternativo, lo que genera una proteína completa y otra troncada (Hammond-Kosak and Jones, 1997). El gen N contiene 5 exones y 4 intrones (ver figura 1). El mensajero de menor tamaño codifica para una proteína troncada de 652 aa (75,3kDa), y el transcrito mayoritario codifica para la proteína N de 1144 aa (131,4kDa). Plantas

de tabaco que portan este gen (Tabaco Xanthi NN), son resistentes a la infección por TMV-U1 y sólo generan lesiones necróticas en los sitios de infección. En cambio, las plantas que no expresan el gen N (Tabaco Xanthi NN), no reconocen al virus y desarrollan el mosaico sistémico típico de la infección.

Se determinará la presencia de algunos exones del gen N en plantas de tabaco Xanthi NN. Para ello se utilizará la metodología de reacción de amplificación en cadena (PCR), y se determinará su expresión mediante un PCR acoplado a transcripción inversa (RT-PCR). El producto de amplificación se aislará desde un gel de agarosa.

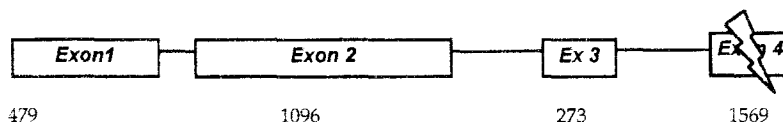


Figura 1. Esquema del gen N indicando los exones e intrones

Bibliografía.

1. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. 1994 "Current Protocols in Molecular Biology". John Wiley & sons, New York.
2. Bent, A.F. 1996 "Plant disease resistance genes: Function meets structure". The Plant Cell 8: 1757-1771.
3. Flor, H.H. 1947 "Host-parasite interactions in flax rust-Its and other implications". Phytopathology, 45: 680-685.
4. Gabriel, M.R. & Rolfe, B. 1990 " Working models of specific recognition in plant microbe interactions". Annu. Rev. Phytopathol. 28: 365-391.
5. Hammond-Kosak, K.E. & Jones, J.D.G. 1997 "Plant disease resistance genes". Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 48: 575-607.
6. Keen, N.T. 1990 "Gene- for gene complementarity in plant-pathogen interactions". Annu. Rev. Genet. 24: 447-463.
7. Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. & Baker, B. 1994 "The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: Similarity to Toll and the Interleukin-1 Receptor". Cell 78: 1101-1115.
8. Gibco BRL 1998 "Intrusion Manual: SUPERScript™ Preamplification System for First Stand cDNA Synthesis". Cat.No. 18089-011.

Materiales y Métodos

Amplificación por PCR del exón 1 del gen N.

Realice la amplificación del exón 1 del gen N utilizando DNA genómico de plantas de tabaco Xanthi NN, y como control negativo DNA de plantas de papa. Además utilice, partidores homólogos (sintetizados por Bios Chile S.A.), de secuencia:

5'Exon1: 5'-gCATCTTCTTCTTCTTCTTCTTC-3'

3'Exon1: 5'-gAgCCTTTgAgATTggCCgC-3'

Taq-polimerasa, dideoxinucleótidos, y el medio adecuado.
Se espera obtener un fragmento de 479pb.

En un tubo Eppendorf de 500µl agregue en este orden:

Componentes	Volumen (µl)	Conc. final
Agua tridestilada	18,9	
Tampón PCR 10X	2,5	1 X
MgCl ₂ 50mM	0,6	1,2mM
dNTPs 10mM	0,5	0,2mM c/u
Part. 5'Exon1 10µM	1,2	0,5µM
Part. 3'Exon1 10µM	1,2	0,5µM
ADN	0,5	250 ng
Taq-polimerasa	0,1	20 U
	25µl	

A esta mezcla de reacción agregue una gota de aceite mineral, y coloque los tubos cerrados en un termociclador, que fue programado previamente con el siguiente programa:

- Etapa 1: Denaturación: 3 min. a 94°C
- Etapa 2: Denaturación: 30 seg. a 94°C
- Etapa 3: Apareamiento: 30 seg. a 55°C
- Etapa 4: Amplificación: 45 seg. a 72°C
- Etapa 5: Se vuelve 30 veces a la etapa 2
- Etapa 6: Amplificación: 10 min. a 72°C
- Etapa 7: Fin reacción: indefinido a 4°C

Electroforesis de los productos de PCR

Corra el amplificado obtenido en un gel de agarosa al 0.8% en tampón TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, EDTA 2 mM, CH₃COONa 20 mM ajustado a

pH 8.0 con ácido acético glacial). Luego tíñalo con bromuro de etidio y obsérvelo en un transiluminador ultravioleta.

Purificación del fragmento amplificado desde el gel de agarosa

Con la finalidad de utilizar el fragmento obtenido de la amplificación del exón 1 como sonda para estudios posteriores, se procederá a purificar este fragmento desde el gel de agarosa. Para ello utilice agarosa de bajo punto de fusión, siguiendo el protocolo de Ausubel y col., 1994 y el manual técnico del kit Wizard® PCR Preps DNA Purification System de Promega Corporation. Una vez terminada la electroforesis, observe el gel en el transiluminador UV:

1. Proceda a cortar un recuadro de agarosa inmediatamente bajo la banda obtenida por amplificación.
2. El orificio que resulte de este corte rellénelo con agarosa de bajo punto de fusión.
3. Una vez que esta agarosa gelifique, vuelva a correr la electroforesis a 40V por unos 10 min., hasta que el fragmento ingrese al recuadro de agarosa de bajo punto de fusión. Una vez que esto ocurra, corte el trozo de agarosa que contenga la banda y colóquelo en un tubo Eppendorf de 1.5ml.
4. Incube a 70°C hasta que la agarosa se funda completamente.
5. Agregue 1ml de resina de purificación otorgada por el kit. Mezcle vigorosamente durante 20 seg., pero sin vortex.
6. Traslade esta mezcla a una mini-columna de filtración que previamente había conectado a una bomba de vacío.
7. Aplique vacío a la columna hasta que la resina entre en la minicolumna, y luego suspenda el vacío.
8. Lave la columna agregando 2 ml de isopropanol 80% al sistema y aplicando vacío.
9. Continúe aplicando vacío hasta no más de 30 seg. para que las resina se seque.
10. Traslade la minicolumna a un tubo Eppendorf de 1.5ml y centrifúguela a 10000 rpm por 2 min. para remover el isopropanol que pudiera quedar.

11. Transfiera la minicolumna a un nuevo tubo de 1.5ml y agregue a la minicolumna 50µl de agua desionizada o tampón TE y espere al menos 1 min.
12. Centrifugue la minicolumna por 20 seg. a 10000 rpm para eluir el fragmento de ADN. Descarte la minicolumna y guarde el ADN a 4°C o -20°C.

Análisis de la expresión del transcrito de los exones 3 y 4 del gen N mediante RT-PCR

Para la amplificación de los transcritos del gen N se utilizará la técnica de RT-PCR, que consiste básicamente en dos etapas:

1.- Obtención del ADNc de simple hebra: Este se obtiene a partir de la incubación del ARN total (1-5µg) de plantas de tabaco Xanthi NN con la enzima transcriptasa reversa (Superscript II) y oligo dT₁₂₋₁₈ (0.5µg/µl) a 50°C durante 55 min. Posteriormente el ARN restante se digiere con RNasa H, previo a la utilización del ADNc.

2.- Amplificación del ADNc por PCR: En una segunda etapa el ADNc se amplifica por PCR utilizando los partidores 5'Exon3 (secuencia: 5'-ggACCATggCAACggAA-3') y 3'Exon4 (secuencia: 5'-CTggCAAgCTTTCAA-3'), Taq-polimerasa y dNTPs. El programa utilizado será el mismo utilizado para la amplificación del Exón 1, sólo cambiando la temperatura de apareamiento a 44°C.

En el manejo de ARN es importante trabajar con guantes y con H₂O-DEPC (tratada con dietilpirocarbonato y autoclavada 2 veces).

Protocolo según GibcoBRL

1ª Etapa: obtención del ADNc:

- En un tubo Eppendorf de 500µl agregue la siguiente mezcla:

Componente	Volumen (µl)
ARN total (1-5µg)	1
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ (0.5µg/µl)	1
H ₂ O-DEPC	23

- Incube esta mezcla durante 10 min. a 70°C, tras lo cual transfírala inmediatamente a 50°C.
- Durante este tiempo prepare la siguiente reacción de mezcla y la precalienta a 50°C:

Componente	Volúmen (μl)	Vol.(μl) para 4 reacciones
H ₂ O-DEPC	2.5	11
Tampón 1ª cadena 5X	10	44
MgCl ₂ 25mM	5	22
dNTPs 10mM	2.5	11
DTT 0,1M	5	22
	25μl	

- Una vez que ambas mezclas estén a 50°C agregue 25μl de la segunda mezcla de componentes a cada tubo que contiene la mezcla oligo-dT:ARN.
- Revuelva suavemente y luego agregue 1μl (200 unidades) de la enzima transcriptasa reversa Superscript II RT.
- Incube esta mezcla de reacción durante 50 min. a 50°C.
- Termine la reacción calentando la mezcla por 15 min. a 70°C y luego colocándola en hielo.
- Para eliminar el ARN molde, centrifugue la reacción anterior ("spin") y luego agregue 1μl de RNasa H a cada tubo.
- Incube 20 min. a 37°C.

2ª Etapa: amplificación del ADNc por PCR.

1. En tubos Eppendorf de 500μl realice la misma mezcla que para la reacción de PCR del exón 1, solo cambiando:

Componentes	Volumen (μl)	Conc. final
Agua desionizada		13.7
Tampón PCR 10X	2.5	1 X
MgCl ₂ 50mM	0.8	1.5mM
dNTPs 10mM	0.5	0.2mM c/u
Part. 5'Exon3 10μM	1.2	0.5μM
Part. 3'Exon4 10μM	1.2	0.5μM
Reacción de RT	5.0	
Taq-polimerasa	0.1	20U
	25μl	

2. A esta mezcla de reacción agregue una gota de aceite mineral, y coloque los tubos cerrados en un termociclador, que fue programado previamente con el siguiente programa:

Etapa 1: Denaturación: 3 min. a 94°C
 Etapa 2: Denaturación: 30 seg. a 94°C
 Etapa 3: Apareamiento: 30 seg. a 44°C
 Etapa 4: Amplificación: 45 seg. a 72°C
 Etapa 5: Se vuelve 30 veces a la etapa 2

Etapa 6: Amplificación: 10 min. a 72°C

Etapa 7: Fin reacción: indefinido a 4°C

3. Electroforesis del producto de PCR

Corra el amplificado obtenido en un gel de agarosa al 0.8% en tampón TAE 1X. Luego tñalo con bromuro de etidio y obsérvelo en un transiluminador ultravioleta.

Se espera obtener un fragmento de amplificación de 769pb.

Transformación Genética

Transformación de plantas

Humberto Prieto
M^a Antonieta Reyes
Claudio Narváez
Isabel Valladares
Macarena Delgado

Introducción

El uso de *Agrobacterium tumefaciens* como sistema natural para producir plantas transgénicas, está basado en el hecho de que durante la interacción de la bacteria con tejido vegetal herido, un segmento del plásmido Ti, llamado ADN-T, se transfiere a la célula vegetal, integrándose en su genoma. El ADN transferido normalmente contiene un número de genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de fitohormonas y de metabolitos específicos denominados opinas. Como consecuencia de la expresión de estos genes, las células vegetales transformadas forman tumores en el caso de la infección con *Agrobacterium tumefaciens*, o raíces, en el caso de *Agrobacterium rhizogenes*, con capacidad de crecimiento autónomo y excretan las opinas, que son utilizadas por la bacteria como fuente de nitrógeno y de carbono.

Se construyeron cepas quimera, en las cuales los genes para la inducción de tumores se eliminaron, reemplazándolos por marcadores dominantes de selección, tales como la resistencia a antibióticos aminoglicosados (v. gr. kanamicina) con lo que es posible obtener plantas transgénicas completas fenotípicamente normales. En estas cepas también se han clonado genes reporteros que permiten conocer la localización de la expresión genética en un tejido dado.

En teoría cualquier tipo de explante, en el que la regeneración de plantas sea posible, ya sea a través de la embriogénesis somática o de la morfogénesis de brotes y de raíces, puede ser utilizado para la obtención de plantas transgénicas mediante *Agrobacterium*.

Se han reportado varios sistemas de transformación en plantas (Potrykus, 1991) algunos de ellos han sido bien establecidos, y se han vuelto rutinarios para ciertas aplicaciones. Los sistemas de

transformación más usados hasta la fecha son los mediados por *Agrobacterium*, aunque este sistema de transformación no funciona eficientemente para ciertas plantas, particularmente cereales y otros cultivos económicamente importantes. Por ello fue necesario desarrollar estrategias alternativas para introducir genes de interés en estas plantas. Se buscaba una tecnología de transformación que fuera altamente efectiva para un amplio rango de plantas, confiable, práctica, rápida y simple (Sanford, 1990).

Una de las mejores alternativas al sistema mediado por *Agrobacterium* es la biobalística, descrita en 1987 por Sanford y col. Este proceso involucra la introducción de sustancias, como ácidos nucleicos, en células intactas usando microproyectiles a alta velocidad. Las partículas penetran las paredes y membranas celulares, las cuales son las principales barreras para introducir ADN u otras sustancias en células vegetales de una manera no letal. Sanford *et al.* (1987) diseñó un dispositivo biobalístico que puede acelerar pequeñas partículas de tungsteno (de 1 a 4 μm de diámetro) a altas velocidades, lo que mostró ser efectivo para enviar ADN y ARN al interior de las células en una amplia variedad de especies incluyendo cebolla, tabaco, maíz y arroz (Klein *et al.*, 1987).

El propósito de este experimento es observar la expresión de genes foráneos introducidos en células vegetales, mediante *Agrobacterium tumefaciens* y el bombardeo con micropartículas de tungsteno recubiertas con ADN.

Bibliografía

1. Klein, T. M., E. D. Wolf, R. Wu, and J. C. Sanford. 1987. High- velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cell. *Nature* 327: 70-73.
2. Potrykus, I. 1989. Gene transfer to cereals: an assessment. *TIBTECH*. 7:269-273.
3. Sanford, J. C., T. M. Klein, E. D. Wolf, and N. Allen. 1987. Delivery of substances into cell and tissues using a particle bombardment process. *J. Part. Sci. And Tech.* 5: 27-37.
4. Sanford, J.C. 1990. Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum*. 79: 206-209.

1.- Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con plasmidios para plantas

La cepa LBA4404 (pAL4404) de *Agrobacterium tumefaciens* es originalmente tumorigénica y ha sido manipulada de tal forma que contiene el derivado del plasmidio Ti pAL4404, el cual sólo tiene las regiones *vir* y *ori* del plasmidio original (Hoekema, A. y cols., 1983).

Proceso de electroporación (protocolo informativo)

- 1.- Tome 40 µl de bacterias *A. tumefaciens* electrocompetentes y mezcle con las construcciones binarias a utilizar a una proporción preferida de 50 ng de DNA total por transformación en celdas de electroporación de 0.2 cm (Bio-Rad).
- 2.- Mnatenga estas celdas en hielo por 2 min para que luego aplique un campo de 12.5 kV/cm, una capacitancia de 25 µF y una resistencia de 600 Ω.
- 3.- Posteriormente, deje las bacterias por otros 2 min a 4°C, luego agregue 1 ml de medio 2xYT (NaCl 5 g/L, extracto de levadura 10 g/L, peptona 16 g/L, pH 7.0), y ponga a incubar con agitación a 220 rpm por 3 hrs a 29°C.
- 4.- De estas incubaciones, tome alícuotas de 30 y 100 µl y siembre en placas petri con 2xYT suplementadas con kanamicina (25-50 µg/ml) u otro antibiótico según la construcción a utilizar e incubelas por 3 días a 29°C.
- 5.- Los clones potencialmente transformados se puede analizarlos por PCR directo y/o mapeo de restricción de los plasmidios purificados de estos clones.

2.- Transformación de tejidos vegetales (protocolos a desarrollar en este curso)

Dos metodologías para transformar explantes vegetales son las más utilizados hoy en día: a) infección con *A. tumefaciens* y b) transformación por biobalística.

2.1. Transformación mediada por infección con *Agrobacterium tumefaciens*

2.1.1. Transformación de explantes procedentes de hojas de *Nicotiana*

- 1.- Se cortan explantes correspondientes a hojas de plántulas *in vitro* (por lo tanto crecidas en condiciones estériles) de *Nicotiana*. Para esto, se eliminan los bordes apical y peciolar de la lámina foliar (cortes

transversales) y en el resto de la hoja se generan trozos de aproximadamente 4 mm de ancho.

2.- Los explantes generados se ubican en una paca Petri con agua destilada (ambos estériles) hasta su utilización en la transformación.

2.1.2. Infección con *A. tumefaciens*.

1.- Se deja escurrir ligeramente el agua de las placas que contienen los explantes y sobre estas se adicionan 20 ml de una solución previamente preparada de *A. tumefaciens* crecida a una $OD_{600} = 0,1$ a 1,0.

2.- Se co-incuban bacterias y explantes en esta placa por 10 min.

2.1.2. Co-cultivo

1.- Se remueven los trozos de hojas de la solución que contiene el inóculo bacteriano y se siembran en medio regenerativo, a 25°C en oscuridad por 3 días. El medio usado es MS sólido suplementado con acetosiringona 20 µM, BAP 0,8 e IBA 0,1 en el caso de *N. benthamiana* y acetosiringona 20 µM, BAP 1,5 e IBA 0,15 para *N. clevelandii*.

2.1.4. Evaluación de la expresión transitoria de "GFP" (Green Fluorescent Protein)

Tras el co-cultivo, los explantes se transfieren a placas (preferentemente plásticas) que contienen el mismo medio anterior sin acetosiringona y con cefotaxime 200 mg/L. En un experimento de transformación estable se debe considerar que desde este momento se inicia el proceso de selección por lo que el medio debería entonces llevar un antibiótico de selección. se incuban a 25°C con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad hasta la evaluación de la expresión del transgén.

La expresión transitoria del gen de GFP se evalúa mediante la irradiación con luz ultravioleta en un microscopio de epifluorescencia utilizando filtro FITC.

2.2 Transformación utilizando biobalística

La segunda estrategia de uso masivo de transformación de plantas consiste en disparar partículas de oro o tungsteno recubiertas con las construcciones plasmidiales.

2.2.1. Preparación de embriones de frijol

Se aíslan embriones de semillas de frijol previamente hidratadas por toda la noche. Para esto se utiliza un bisturí y se procede a abrir la semilla desde el extremo opuesto al hilo. Cuidadosamente se extrae con una pinza el embrión completo el que se siembra en el sector central de una placa de Petri con medio de bombardeo (MS, fitagel 0,7% y BAP 44 μ M).

2.2.2. Preparación de las partículas cubiertas con ADN plasmidial

- 1.- Esterilice las partículas (Aldrich Chem., de 1,5-3,0 μ m de diámetro) en etanol 75% y agitación fuerte por 20 min. Centrifugue a máxima velocidad y lave el sedimentado de partículas tres veces con agua destilada estéril repitiendo la centrifugación por tres min y agitación fuerte por tres min cada vez. Finalmente resuspenda las partículas en glicerol 50% a una concentración de 60 mg/ml. Esta solución se puede almacenar hasta por dos meses a temperatura ambiente.
- 2.- De la solución anterior tome 50 μ l y adicione secuencialmente: 5 μ l de plasmidio (aproximadamente 5 μ g), 50 μ l de CaCl_2 (2,5 M) y 20 μ l de espermidina 0,1 M (fresca).
- 3.- Agite cada suspensión por 10 min.
- 4.- Centrifugue a 14.000 rpm 10 seg y elimine el sobrenadante.
- 5.- Lave con 150 μ l de etanol y nuevamente centrifugue. Este proceso se repite 3 veces.
- 6.- Finalmente, resuspenda el precipitado de partículas lavadas en 24 μ l de etanol, desde donde saque alícuotas de 4 μ l para posarlas sobre las membranas portadoras (Kapton, 2 mm, DuPont) y así realice los disparos utilizando un aparato de aceleración de partículas dirigido por alta presión de helio, basado esencialmente en lo descrito por Sanford, J. y cols. (1991).

2.2.3. Condiciones de bombardeo

Aunque los parámetros físicos óptimos dependen de cada variedad a transformar y del tipo de tejido blanco, usualmente y con el desarrollo de los nuevos sistemas de biobalística se dispara a una presión de 95 atmósferas de He (99,9995 % pureza) en un vacío de 550 mm de Hg. La distancia entre el generador de la onda de impacto (salida del gas He) y la membrana portadora usualmente es de 8 mm y la distancia de vuelo de esta membrana hasta su grilla de detención es de 13 mm, la distancia entre la grilla de detención de la membrana portadora y el tejido vegetal es de 80 mm, aunque para tejidos delicados (embriones u hojas) puede ser menor.

2.2.4. Evaluación por expresión transitoria de GUS

En un experimento de transformación estable, los explantes se mantienen en el mismo *Medio de Transformación* (MS + 0,7% fitagel + 44 μ M BAP) por dos días para luego trasladarlos a ese mismo medio más Km 200 mg/L ó el antibiótico de selección definido por el plasmidio transformante, desde donde se esperan los brotes que se traspasan para su selección, regeneración y crecimiento según la sección anterior y análisis por PCR, southern, northern, etc..

En nuestro caso, los embriones sometidos a disparo serán evaluados tres o cuatro días después de la sesión mediante expresión de GUS, la que básicamente consiste en sumergir dichos embriones en solución de tinción (solución amortiguadora de fosfato 0,1 M pH 6,8, X-Gluc 2 mM, EDTA 10 mM, $K_3Fe(CN)_6$ y Tween 20 o Triton X-100 0,01%) por 2-24 hrs a 37°C (siempre mantenidos en oscuridad).

Floral dip: un método fácil de transformación de *Arabidopsis thaliana*

Patricio Arce-Johnson
Nicole Ehrenfeld
Claudia Stange
Isabel Valladares

Producir plantas transgénicas se ha convertido en una tecnología indispensable para el área de la biología molecular vegetal, la que ha tenido fuerte impacto en la agricultura moderna. Sin embargo, asociada a esta tecnología, ha sido necesario desarrollar métodos de regeneración a partir de células o tejidos, que pueden ser mas o menos complejos según la especie vegetal. Además de esto tenemos la preparación cuidadosa de células o tejidos a transformar, estandarizaciones de las metodologías para introducir el ADN foráneo en el explante (*Agrobacterium tumefaciens* o biobalística), y una larga y cuidadosa etapa de selección y regeneración de las plantas seleccionadas.

La pequeña crucífera *Arabidopsis thaliana* es actualmente la especie vegetal mas utilizada en la investigación vegetal, debido a su pequeño genoma, rápido ciclo de vida y fácil manejo. Sin embargo, la transformación de *Arabidopsis*, se realizaba a partir de raíces, un trabajo especializado y que requería de largo tiempo para conseguir plantas transformadas. En 1983, Bechtold y col. desarrollaron una técnica de transformación en esta especie, a partir de una planta entera. Este protocolo acortó significativamente los tiempos de regeneración, evitó el paso de cultivo de células y callos, necesario en la metodología tradicional de transformación, y representó un gran empuje a la biología molecular vegetal. En esta técnica, se sumergen inflorescencias de *Arabidopsis* en una solución de *A. tumefaciens*, y con ayuda de vacío se logra la transformación de semilla en formación. Esta metodología fue, a su vez, simplificada y mejorada por Bent y Clough en 1998, quienes lograron transformar las semillas al colocar las inflorescencias en contacto con *A. tumefaciens* sin tener que recurrir a la complejidad de aplicar vacío. Esta última metodología será utilizada en este práctico para transformar plantas de *A. thaliana* con una construcción que porta el gen de la proteína del movimiento del

TMV (virus del mosaico del tabaco) y el gen *nptII* (neomicina fosfotransferasaII) para resistencia a kanamicina, en un plásmido binario portado por *A. tumefaciens*.

Bibliografía

1. Betchold, N., Ellis, J. & Pelletier, G. 1993 In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C.R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences, 316, 1194-1199.
2. Cloug, S.J. & Bent, A.F. 1998 Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal 16(6), 735-743.
3. Dudas sobre metodologías con *Arabidopsis thaliana*:
http://genome-www.stanford.edu/cgi-bin/biosci_arabidopsis

Materiales

- Obtención de plantas florecidas de *Arabidopsis*, vigorosas y sanas
 - Preparación de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que porta el gen de interés.
 - Co-cultivo mediante el sumergimiento de las inflorescencias en la solución con *Agrobacterium*.
 - Mantenimiento de las plantas tratadas en bolsas plásticas para mantener la humedad durante 24 h.
 - Tratar las plantas normalmente, regar moderadamente hasta que las semillas maduren.
 - Cosechar las semillas, secar y almacenar en frío (4°C) por 1 semana.
 - Esterilizar las semillas.
 - Seleccionar las transformantes en magentas con medio MS y el agente selectivo.
 - Trasplantar las posibles transformantes a tierra.
- Plantas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en macetas y que presenten inflorescencias. La tierra debe estar cubierta con una malla plástica.
 - Solución de *Agrobacterium tumefaciens* que porte el plasmidio de interés
 - Solución de sacarosa al 10% fresca, en agua autoclavada
 - Silwet L-77
 - Agua autoclavada
 - Vaso pp 400ml

Metodología

(Según Clough y Bent, 1999; <http://www.cropsci.uiuc.edu/~a-bent/protocol.html>)

1. Crezca en macetas plantas de *Arabidopsis* vigorosas y sanas, hasta que florezcan. Preocúpese que la tierra esté cubierta con una malla plástica (la malla es opcional).

2. Corte los primeros tallos (inflorescencias), para obtener varios tallos secundarios. Las plantas estarán listas entre 4-6 días después de podarlas.
3. Prepare la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que porta el gen de interés en un vector binario. Crézcala en un cultivo líquido a 28°C en medio YEP, con agitación, y con los antibióticos de selección correspondientes al vector. Se pueden utilizar células en cultivo en fase logarítmica media o en fase estacionaria.
4. Centrifugue las bacterias, y resuspenda a un $OD_{600} = 0.8$ en una solución fresca de 5% sacarosa (Si es fresca no necesita autoclave). Ud. necesita alrededor de 400-500 ml para cada 2 a 3 potes de 9cm con plantas de *Arabidopsis*.
5. Antes de sumergir, agregue Silwet L-77 a la solución a una concentración de 0.05% (500 μ l/L), y mezcle bien. Si esta concentración de L-77 resulta tóxica para sus semillas, use una concentración mas baja, hasta 0.005%.
6. Sumerja cuidadosamente el extremo de las inflorescencias en la solución de *Agrobacterium* por 2-3 segundos, cuidando de que no caiga tierra, y con agitación suave de la solución. Ud. debe ver entonces una película de líquido sobre las plantas sumergidas. Puede sumergir solo las inflorescencias o hasta las rosetas.
7. Ponga las plantas sumergidas bajo una bolsa plástica por 16 a 24 horas, para mantener la humedad (se pueden colocar de lado si es necesario). No las exponga a excesiva luz solar (el aire al interior de la bolsa se calienta).
8. Saque las bolsas y trate las plantas normalmente, dejando un papel debajo, por las posibles semillas que cayeran. Riegue moderadamente. Una vez que las semillas en las silicuas (frutos) maduren, deje de regar.
9. Coseche las semillas maduras. Déjelas secar y luego almacene en frío (4°C) por al menos una semana.
10. Esterilice las semillas tratándolas con hipoclorito de sodio al 10% por 7 min, y luego lavándolas, al menos dos veces con agua destilada estéril.

11. Seleccione las transformantes en magentas con medio MS y el marcador de selección (antibiótico o herbicida). En este caso kanamicina 50 mg/L.
12. Transplante las putativas transformantes a tierra. Crézcalas, pruébelas y úselas.

El rendimiento de transformación es alrededor del 1% (1 semilla transformada cada 100 tratadas). Para un mayor rendimiento de transformación, las plantas pueden ser sumergidas 2 o 3 veces, con un intervalo de una semana. Se sugiere una transformación dos días después de podar y luego una segunda sumergida con un intervalo de 7 días. No re-sumergir con intervalos de menos de 6 días.

Transformación por biobalística de *Trichoderma harzianum*

Alfredo Herrera-Estrella
Isela Gómez-Caballero
Ana Gutiérrez
Gloria Bastías

Las técnicas de transformación son útiles para el mejoramiento de los hongos importantes para la agricultura, así como para la industria y para una gran variedad de estudios a nivel genético. El propósito de este experimento es transformar células fúngicas usando el método de biobalística.

En la actualidad, existen diversos sistemas de transformación, por ejemplo, el tratamiento con iones metal alcali (Ilo et al, 1983) o con perlas de vidrio (Constanzo y Fox 1988). El método más común de transformación de hongos usado hasta la fecha requiere la producción de protoplastos (Fincham, 1989), sin embargo, existen algunos hongos para los cuales no está bien establecido este sistema de transformación. Por esta razón, se han utilizado otros procedimientos, entre los cuales se encuentra la transformación por biobalística, esta técnica involucra la introducción de sustancias, tales como ácidos nucleicos, en células intactas y tejidos utilizando microproyectiles lanzados a altas velocidades. Las partículas penetran en las paredes y membranas celulares, las cuales son las principales barreras para que el ADN y otras sustancias penetren en la célula de una manera no letal. Sanford, et al (1987) diseñaron un aparato el cual puede acelerar partículas pequeñas de tungsteno (1-4 mm de diámetro) a altas velocidades, y mostró ser efectivo en la penetración de células vegetales utilizando ADN y ARN (Klein et al 1989).

Desde este primer reporte, este sistema de transformación ha servido para obtener células transformadas estables de diversas plantas como tabaco, arroz, soya, trigo y maíz entre otras, utilizando diferentes versiones del aparato de bombardeo de partículas original. Además, se ha visto que una amplia variedad de tejidos pueden ser transformados por este método, incluyendo embriones inmaduros, callos embriogénicos y suspensiones celulares, meristemos y

microsporas. Con todo esto, es razonable asumir que con el desarrollo adicional de la tecnología, cualquier tejido de cualquier especie vegetal podría ser transformado por este proceso.

La transformación por biobalística ha demostrado ser útil, no sólo en plantas, sino también en una amplia variedad de organismos. Esta incluye bacterias como *Escherichia coli* (Smith et al, 1992) *Bacillus megaterium* (Shark et al, 1991), hongos tales como levaduras (Armaleo et al, 1990), algas como *Chlamydomonas*, y células animales (Johnston et al, 1991).

Al inicio, con cualquier tipo de célula, se tienen que tomar consideraciones especiales en los diversos parámetros utilizados durante el bombardeo con el fin de optimizar el proceso y estos parámetros deben ser determinados para cada tipo de célula de manera empírica. El factor más limitante para tejidos intactos tales como hojas meristemos y cotiledones es la penetración de la partícula y por lo tanto se requiere una velocidad mayor. Para células en cultivo, el daño celular es más limitante que la penetración de la partícula, en este caso son necesarios tratamientos más suaves. Una buena opción en los experimentos iniciales sería utilizar los parámetros reportados para células similares a las que se van a bombardear.

Para el aparato de alta presión de helio, algunos de estos parámetros son: presión del gas helio (dada por el grosor de las membranas de ruptura utilizada), distancia entre la membrana de ruptura y la membrana acarreadora (macroproyector), distancia entre esta última y la malla de retención, la cámara de vacío (típicamente entre 25 y 29" Hg), y la distancia al blanco (de la malla de retención a las células que se van a bombardear). También es importante el tamaño y la cantidad de los microproyectiles y el procedimiento de la precipitación de ADN en estas micropartículas. Se debe incluir un control negativo en cada experimento, para eliminar la posibilidad de una interpretación errónea debido a una actividad endógena. En algunos casos, cuando el material es muy difícil de obtener, se debe considerar la posibilidad de múltiples bombardeos, para maximizar la probabilidad de alcanzar células susceptibles de ser transformadas, pero se debe tener cuidado para evitar dañar demasiado a la célula.

El aparato de bombardeo de partículas que será utilizado en este experimento es una modificación del aparato original reportado por Sanford y col. (1987). En éste, una cámara pequeña es sellada en un extremo con una o más capas de membranas de ruptura (Kapton 2000 50 µm de grosor). La cámara se llena a alta presión con gas helio, hasta alcanzar la presión de ruptura. Cuando las membranas de

ruptura estallan, se produce una onda de gas y el macroproyectil es lanzado. Este macroproyectil se coloca 10 mm por debajo de las membranas de ruptura con los microprojectiles cubiertos con ADN y colocados en un anillo de metal. El macroproyectil es detenido por una malla de retención colocado 10 mm por debajo del punto de lanzamiento. Los microprojectiles continúan hasta penetrar las células blanco, las cuales son colectadas a cierta distancia por debajo de las mallas de retención de los macroprojectiles.

Bibliografía

1. Armaleo D, G.N. Ye, T.M. Klein, K.B. Shark, J.C. Sanford and S.A. Johnston. 1990. Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Curr. Genet.* 17: 97-103.
2. Costanzo M and Fox T. 1988. Transformation of cast by agitation with glass beads. *Genetics*. 120: 667-670.
3. Fincham J. 1989. Transformation in fungi. *Microbiology Reviews*. 53: 148-170.
4. Ito H., Fukuda K., Murata K. and Kimura A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of bacteriology*. 153: 163-168.
5. Johnston S, M. Riedy, M. J. De Vit, J.C. Sanford, S. McElligot, and R. Sanders Williams. 1991. Biolistic transformation of animal tissue. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 27: 11-14.
6. Klein, T, E.D. Wolf, R. Wu, and J.C. Sanford. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*. 327: 70-73.
7. Sanford J.C., T.M. Klein, E.D. Wolf and N. Allen. 1987. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J. Part. Sci. Tech.* 5: 27-37.
8. Shark K., F.D. Smith, P.R. Harpending, J.L. Rasmussen and J.C. Sanford. 1991. Biolistic transformation of a procaryote, *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 480-485.
9. Smith F.D., P.R. Harpending and J.C. Sanford. 1992. Biolistic transformation of prokaryotes factors that effect biolistic transformation of very small cell. *J. Gen. Microbiol.* 138: 239-248.

Preparación de microproyectiles

1. Coloque 60 mg de partículas de tungsteno (M5) en un tubo de centrifuga de 1.5 ml.
2. Agregue 2 ml de HNO_3 0.1N.
3. Sonique en hielo durante 20 min.
4. Centrifugue las partículas en una centrifuga de mesa a 3000 rpm por 10 min. hasta que el sobrenadante esté claro.
5. Con una pipeta P1000, remueva el máximo del sobrenadante y descártelo.
6. Agregue 1 ml de agua destilada estéril.
7. Sonique brevemente.
8. Centrifugue a 10000 rpm por 10 a 30 seg.
9. Elimine el agua y agregue 1 ml de etanol absoluto.
10. Sonique brevemente.
11. Centrifugue a 10000 rpm por 10 a 30 seg
12. Elimine el etanol y resuspenda las partículas en 1 ml de agua destilada estéril
13. Sonique brevemente.
14. Pipetee alícuotas de 250 μl en tubos de 1.5 ml
15. Agregue 750 μl de agua destilada estéril en cada tubo.
16. Almacene a -20°C

Precipitación de ADN

(Este protocolo es para preparar alícuotas para 12 bombardeos)

- 1.- Sonique las partículas de tungsteno

2. Coloque 50 μl de la suspensión de partículas en un tubo de centrífuga de 1.5 ml estéril y agregue los siguientes componentes.
3. Agregue ADN a una concentración final de 25 μg .
4. Después adicione 50 μl de CaCl_2 2.5 M estéril
5. Inmediatamente, agregue 20 μl de espermidina.
6. Sonique brevemente.
7. Centrifugue brevemente (10 seg a 10000 rpm), sólo para llevar las partículas al fondo del tubo.
8. Elimine el sobrenadante.
9. Agregue 250 μl de etanol absoluto
10. Sonique brevemente.
11. Centrifugue a 10000 rpm por 10 seg.
12. Agregue 60 μl de etanol absoluto.
13. Sonique (hasta que las partículas de tungsteno sea homogéneo)
14. Coloque 10 μl de la mezcla en el centro de cada membrana de Kapton y espere a que el etanol se evapore

Preparación de las células

1. Siembre 50 a 100 μl de una suspensión de conidias (crecidas por 7-10 días) en placas de PDA 0.4% sorbitol a una concentración de 8×10^7 conidas por placa.
2. Deje secar la superficie de las placas en condiciones estériles, bajo campana de flujo laminar por 4 horas

Procedimiento para el bombardeo

1. Abra la fuente de helio, y ajuste la presión 200 psi por arriba de la presión a la cual estallan las membranas de ruptura.
2. Encienda la pistola de bombardeo.

3. Coloque el número apropiado de membranas de ruptura (asegurarse de que las membranas de ruptura se mantengan húmedas en isopropanol).
4. Coloque en su lugar las mallas retenedoras, las membranas acarreadoras con los microproyectiles y la muestra que se va a bombardear.
5. Encienda la bomba de vacío, evacúe la cámara a 0.1-0.2 atm (24-27" Hg) y mantenga el vacío.
6. Presione el interruptor para disparar y manténgalo de ese modo hasta que las membranas de ruptura estallen.
7. Inmediatamente, después del estallido, suelte el interruptor de disparo.
8. Libere el vacío de la cámara, colocando el interruptor de vacío en la posición de VENT.
9. Después de liberar el vacío, abra la cámara.
10. Retire la placa Petri de la cámara.
11. Descarte la membrana acarreadora y las membranas de ruptura
12. Repita el ciclo entero
13. Al final del procedimiento de bombardeo, cierre la fuente de helio y elimine el gas restante presionando el interruptor de disparo hasta que la presión sea cero.
14. Apague la bomba de vacío.
15. Limpie la cámara y apague la pistola de bombardeo.

Selección de transformantes

1. Después del bombardeo, deje las placas incubando por 7 horas a 28°C.
2. Agregue una capa de PDB-Agarosa 1% conteniendo 200 µg/µl de hycromicina B sobre la superficie de las placas.

3. Después de 48 horas, seleccione las puntas de hifas transformadas que crecieron sobre la superficie o que fueron capaces de alcanzar la superficie de la capa de PDB-Agarosa 1%.
4. Transfiera las transformantes a medio selectivo (PDA +200 µg/µl hygromicina)y déjelas crecer hasta que esporulen.