

2ej
127



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**OPTIMACION DE LA METODOLOGIA PARA LA
CARACTERIZACION DEL PESO MOLECULAR
DEL ARN MENSAJERO DE PEPTIDOS
HIPOTALAMICOS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ROSA MARIA URIBE VILLEGAS

México, D. F.,

1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

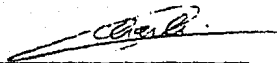
JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA:


Presidente	Prof. Victoria Valles Sánchez
Vocal	Prof. Jean Louis Charli Casalonga
Secretario	Prof. Elisa del S. Labansat Valdes
1 ^{er} Suplente	Prof. Alicia Beatriz Cervantes Peredo
2do. Suplente	Prof. Ma Estela Cevallos Ferriz

Sitio donde se desarrolló el tema: Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología/UNAM.

Asesor del tema: Dr. Jean Louis Charli Casalonga

Sustentante: Rosa Maria Uribe Villegas





INDICE.

INTRODUCCION	1
METABOLISMO DE LA NEURONA PEPTIDERGICA	5
EL HIPOTALAMO Y SU RELACION CON LA HIPOFISIS	9
LHRH. ESTRUCTURA, BIOSINTESIS Y FUNCION	13
TRH. ESTRUCTURA, BIOSINTESIS Y FUNCION	17
SOMATOSTATINA. ESTRUCTURA, BIOSINTESIS Y FUNCION	20
OBJETIVOS	22
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	23
ESQUEMATIZACION DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
MATERIALES Y METODOS	26
I).- Purificación de plásmidos. pBR322, SrfI-pBR322, TRH-pUC8	26
1).- Amplificación de plásmidos	26
2).- Lisis de las células y extracción del plásmido	27
3).- Purificación del plásmido	29
II.- Digestión de los plásmidos con enzimas de restricción	31
III.- Análisis electroforético de las digestiones de los plásmidos	32
1).- Minigeles de agarosa	32
2).- Geles de agarosa tamaño estandar	32
3).- Geles de acrilamida tamaño estandar	33
IV).- Purificación de ARN ribosomal de E. coli	34
V).- Extracción de ARN mensajero de Hipotálamo y Cerebro de rata	35
VI).- Análisis de ARN por electroforesis en condiciones desnaturalizantes	36
1).- Acrilamida 2%, Urea 8M	36
2).- Geles de Formaldehído 2.2 M	36
3).- Geles de Hidroxido de Metil Mercurio	37

VII).- Preparación de papel activado	35
1).- Preparación de papel NBH	38
2).- Preparación de papel DBH	38
VIII).- Transferencia de ácidos nucleicos a diferentes soportes	41
IX).- Marcado de plásmidos y oligonucleótidos con radioisótopos	45
1).- Plásmidos	45
2).- Oligonucleótidos	46
X).- Hibridizaciones	48
1).- Rastreo con oligonucleótidos sintéticos	48
2).- Rastreo con plásmidos	49
RESULTADOS	50
I).- Purificación, mapa de restricción y marcado de plásmidos	59
II).- Electroforesis en condiciones desnaturalizantes	59
a).- Geles de Formaldehído 2.2 M	59
b).- Geles de Hidróxido de metil mercurio	60
III).- Cuantificación de la transferencia de ARN y ADN marcado radiactivamente a diferentes soportes	66
IV).- Selección del soportes de transferencia considerando todos los pasos de un "Northern"	71
V).- Cuantificación de la cantidad mínima detectable de ARN mensajero por la técnica de "Northern"	75
VI).- Identificación de los ARNs mensajeros para Somatostatina TRH, y LHRH en el hipotálamo de la rata	77
a).- Empleando plásmidos como rastreadores	77
b).- Empleando oligonucleótidos sintéticos como rastreadores	78
DISCUSION	81
CONCLUSIONES	86
APENDICES	88
REFERENCIAS	93

INTRODUCCION.

Dentro del sistema nervioso central (SNC), algunas células transmiten su información por medio de sinápsis. Estas sinápsis pueden ser de dos tipos: Químicas o eléctricas. Las neuronas que realizan sinápsis químicas liberan sustancias solubles, a las cuales se les ha llamado neurotransmisores (NT) (1).

En los años 60 se reconocen como posibles NT algunas aminas como dopamina, noradrenalina, serotonina, o derivados de algunos aminoácidos el ácido γ aminobutírico (GABA), el ácido aspártico, el ácido Glutámico y la Glicina (2). Posteriormente, en las décadas de los 70-80 se han encontrado muchas otras sustancias de origen peptídico que podrían ser neurotransmisores (3). Dentro de ellas se encuentran los neuropéptidos que controlan el sistema endócrino: La Hormona liberadora de la Tirotrópina (TRH), La Hormona liberadora de la Hormona Luteinizante y La Hormona Foliculo estimulante (LHRH), La Hormona inhibidora de la liberación de la hormona de crecimiento (Somatostatina ó Srif), La Hormona liberadora de la Corticotropina (CRF), La Hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH), etc., (4, 5, 6, 7, 8). También se han reportado otros péptidos que no tienen efecto directo sobre la hipófisis: como es el caso de Sustancia P, y Enkefalinas (9).

A las células que sintetizan estas sustancias se les llama neuronas peptidérgicas. Estas neuronas son un modelo importante a estudiar ya que aparentemente dichas células han tenido que sufrir rearrreglos estructurales importantes a través de la evolución para poder llegar a secretar sustancias peptídicas (10).

Las neuronas peptidérgicas de animales superiores presentan similitud con algunas células peptidérgicas de animales inferiores como es el caso de los acociles y de la aplicia. Las células nerviosas de éstos organismos a similitud con las otras, tienen la capacidad de producir péptidos de relevancia fisiológica. Debido a la semejanza que existen entre los neuropéptidos presentes en organismos filogenéticamente tan separados, se puede especular que en la evolución éstas células sufrieron cambios a nivel genómico, que provocaron separación o rearrreglos de familias de genes con una función definida, por lo tanto se puede esperar que muchos de éstos péptidos neuronales provengan de un gene ancestral.

pp La neurona peptidérgica tiene la capacidad de producir sus neuropéptidos a través de la biosíntesis de sustancias peptídicas de alto peso molecular, que agrupan propiedades químicas diferentes, y que poseen la información para el procesamiento del precursor peptídico para dar lugar péptido activo. Además, tienen la capacidad de responder a señales inducidas por estímulos internos y externos al organismo.

Las neuronas peptidérgicas pueden interaccionar con otras neuronas de el SNC por medio de mecanismos sinápticos. La unión del neuropéptido a su receptor puede involucrar la apertura o el cierre de canales iónicos, ó cambios en el voltaje de membrana, ó la modificación de actividades enzimáticas membranales como la de adenilato ciclase, ó cambios metabólicos dentro de la neurona postsináptica (11). Ver figura 1. Algunos de estos mecanismos se utilizan también para regular la función endócrina de la adenohipófisis, pero en este caso las neuronas peptidérgicas

hipotalámicas hipofisiotrópicas (que son las que controlan la liberación de las hormonas de la adenohipófisis), liberan sus neurohormonas de la eminencia media del hipotálamo a la sangre del sistema portal hipotalámico hipofisiario, por el cual las neurohormonas llegan a las células blanco de la hipófisis (12).

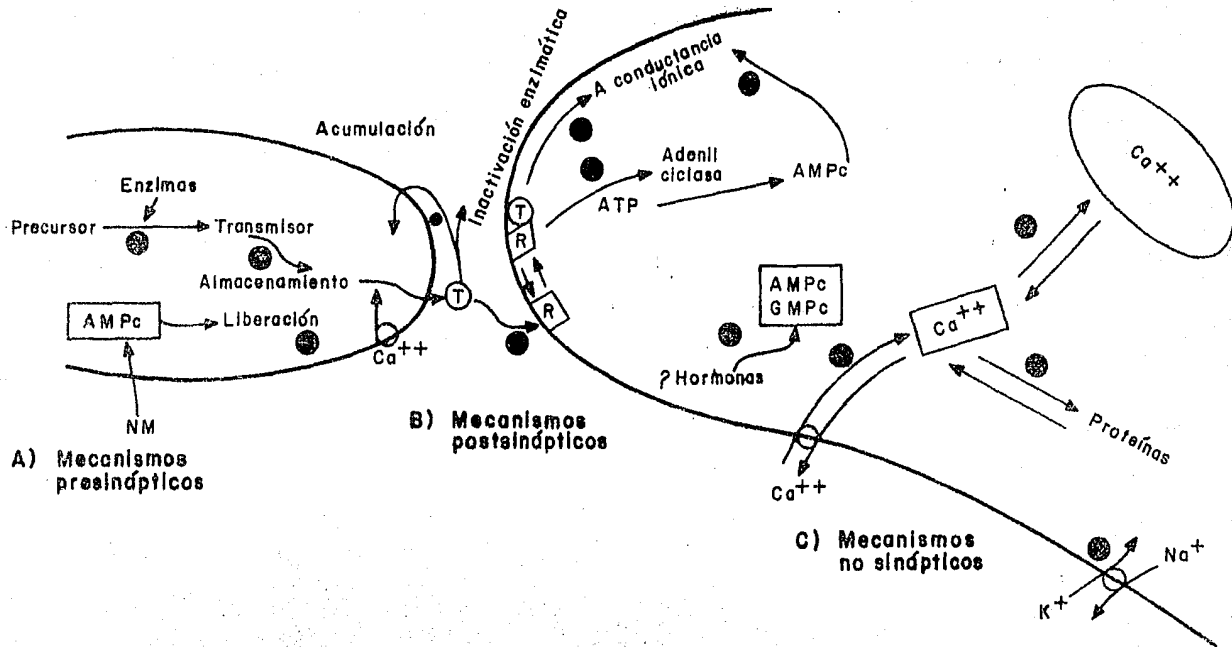


FIGURA 1.

MECANISMOS DE ACCION DE NEUROTRANSMISORES Y NEUROMODULADORES.

A: mecanismos presinápticos. Los moduladores podrían modificar los siguientes parámetros en la transmisión sináptica y nivel de la presinápsis: 1) síntesis del transmisor, 2) almacenamiento del transmisor, y 3) mecanismos de neurosecreción. Ya sea a través del control del potencial de membrana, cambios en la permeabilidad de la membrana al calcio o por modificación directa de los mecanismos de secreción.

B: mecanismos postsinápticos. Los mecanismos de acción de los neurotransmisores sobre la postsinápsis se restringen a la modificación de la conductancia de la membrana a iones-específicos (transmisores ionotrópicos) o al incremento de la actividad de la adenilciclase que lleva a la elevación de los niveles de proteínas fosforiladas (transmisores metabotrópicos). En contraste, los neuromoduladores actuarían sobre la postsinápsis modificando la accesibilidad del receptor a su transmisor por alteración del número de receptores o cambio de su localización o modificación de la afinidad del receptor por el transmisor. Un neuromodulador también podría alterar los sistemas de decodificación de la información transmitida químicamente.

C: mecanismos no sinápticos: Un neuromodulador podría desempeñar un papel importante en la regulación del estado interno de una neurona a través del control de la concentración de calcio libre en la terminal nerviosa, control de la concentración de mensajeros secundarios como los nucleótidos cíclicos o por el control de la actividad de la bomba de Na^+ y K^+ . (ver ref. 11).

METABOLISMO DE LA NEURONA PEPTIDÉRGICA.

Los conceptos actuales sobre el funcionamiento de la neurona peptidérgica provienen de lo que se sabe de algunas neuronas peptidérgicas extensivamente estudiadas (p.e. neuronas vasopresinérgicas) o de células endócrinas que secretan péptidos (p. e. insulina).

Los genes de los neuropéptidos son primeramente transcritos por la polimerasa II dentro de el núcleo de la célula, y antes de salir al citoplasma el ARN precursor es procesado a un ARN maduro. Posteriormente en el citoplasma el ARNm es traducido en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso. El precursor del neuropéptido quien en algunos casos tiene la información para más de un péptido, es transportado de manera cotraduccional dentro del retículo endoplásmico rugoso. En este proceso, una extensión de 20 a 30 aminoácidos que posee el precursor de el lado N-terminal es eliminado (péptido señal que poseen las proteínas de membrana o que van a ser excretadas), este corte ocurre en el extremo carboxilo terminal de un residuo neutro como alanina, serina, cisteína y glicina, pero no se ha caracterizado cual es la enzima que realiza este procesamiento (13). Sin embargo se sabe que es una enzima microsomal (14) que actúa cuando el pre-péptido entra en las cisternas del retículo endoplásmico. La prohormona o precursor peptídico del neuropéptido activo, es entonces llevado al aparato de Golgi en donde es probablemente modificado (glicosilación) y procesado (15). Es probable que el procesamiento ocurra también en los gránulos secretorios durante el transporte axonal.

Los neuropeptidos dentro de la prohormona en la mayoría de los casos se encuentran delimitados por un par de aminoácidos básicos Lys y/o Arg. y para realizar el procesamiento se involucran dos actividades enzimáticas parecidas a la de Tripsina y Carboxipeptidasa B (16,17). La primera corta al precursor en el extremo amino terminal del péptido y deja uno o dos aminoácidos básicos en el extremo carboxiterminal, los cuales son eliminados por la segunda enzima.

Además de la ruptura de los enlaces covalentes, el precursor del péptido sufre varias modificaciones para que el péptido sea biológicamente activo. Una de ellas se encuentra en el extremo C-terminal, donde ocurre una amidación (18). Algunos investigadores han demostrado que un residuo de glicina en el extremo carboxiterminal del péptido en el precursor sirve como donador de un grupo amino en la reacción de amidación. En esta reacción el ascorbato sirve como cofactor, y tanto el cofactor como las enzimas se han localizado dentro de los gránulos secretorios. "In vitro" se ha demostrado que las amidasas catalizan la oxidación del residuo de glicina dentro del péptido para producir el péptido amidado, glioxalato y agua. En todos los casos de péptidos amidados, en los precursores se encuentra un residuo de Glicina entre el péptido activo y el par de aminoácidos básicos localizados del lado C-terminal del péptido.

Otra modificación consiste en la ciclización de la glutamina N-terminal en una forma piroglutamil (19). No se han caracterizado la enzima que cataliza esta reacción, y parece que podría ser una reacción espontánea.

Además de la ciclización pueden ocurrir otras modificaciones N-terminales como acetilación (< MSH y endorfinas) provocadas por acetil transferasas . Dentro de el péptido pueden existir modificaciones como metilaciones, fosforilaciones, y sulfataciones (20). En la figura 2 se puede observar en forma esquemática el procesamiento que sufre un neuropéptido desde que se sintetiza en el núcleo, hasta que se almacena en la terminal nerviosa para ser liberado al espacio sináptico.

Es interesante y muy complejo el procesamiento de los precursores de los péptidos. Para que esto ocurra intervienen muchas enzimas específicas en cascada y aún no es claro cuales son los factores que regulan el procesamiento; lo complica aún más el hecho de que puede existir procesamiento diferencial dependiendo de la célula de que se éste hablando. Una vez que el péptido es incorporado en vesículas por el aparato de Golgi, es transportado al axón y almacenado en el botón sináptico. Como una respuesta a un estímulo éste péptido es liberado al espacio sináptico por exocitosis.

Fuera de la neurona los péptidos activos son inactivados por degradación o captura. Tanto en el espacio sináptico, en la membrana neuronal, así como en la sangre existen enzimas capaces de degradar a los neuropéptidos y de esta manera terminar su acción después de su interacción con la célula blanco.

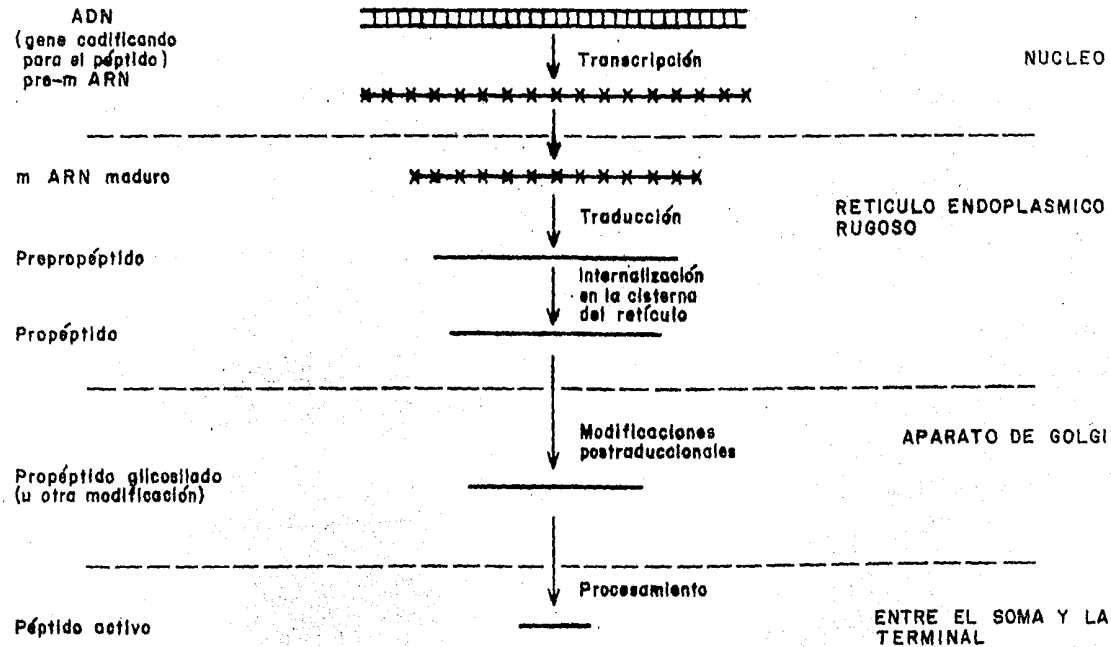


FIGURA 2.
 ESQUEMA DEL PROCESAMIENTO DE UN NEUROPEPTIDO DESDE EL INICIO DE SU
 TRANSCRIPCION HASTA SU ALMACENAMIENTO EN LA TERMINAL SINAPTICA

EL HIPOTÁLAMO Y SU RELACION CON LA HIPOFISIS

El hipotálamo está comprendido dentro del diencéfalo, y está delimitado en su región rostral por el entrecruzamiento de las vías ópticas (quiasma óptico), en su región caudal por los cuerpos mamilares y dorsalmente por el tálamo. El hipotálamo se divide en 3 regiones: anterior o supraóptica, media o tuberal, posterior o mamilar (21,22). Estas a su vez incluyen varios núcleos: paraventricular, supraóptico, ventromedial, dorsomedial, cuerpos mamilares, y núcleo posterior. Estos núcleos son sitios con mayor concentración de cuerpos neuronales.

Algunas de las sustancias producidas por el hipotálamo son liberadas en la eminencia media donde son colectadas por capilares para posteriormente ser liberadas al sistema portal y ser transportadas a la adenohipófisis.

En las figuras 3 y 4 se presenta un esquema de el hipotálamo dentro de el cerebro, y la relación anatómica hipotálamo hipófisis respectivamente.

El hipotálamo constituye una región pequeña dentro del cerebro, pero interviene en la regulación de muchas funciones del organismo como son : el balance hidrolítico, en secreciones internas, en el metabolismo de azúcares y grasas, y en la regulación de temperatura corporal. Por medio de lesiones o estímulos a ciertas regiones del hipotálamo se ha comprobado que éste interviene en la regulación de las funciones antes mencionadas, ya que al producir estas alteraciones, el funcionamiento metabólico del organismo se altera.

En los años 50's se postuló que el hipotálamo ejerce un control neurohormonal sobre la adenohipófisis o hipofisis anterior al secretar sustancias que activan o inhiben mecanismos de liberación de las hormonas de la hipófisis.

Las neuronas peptidérgicas que sintetizan y secretan las neurohormonas hipofisiotrópicas integran informaciones tanto internas como externas y modifican el funcionamiento del sistema endócrino de acuerdo a las necesidades del organismo. Sin embargo, estas neuronas no solo se encuentran en el hipotálamo, además se localizan en otras regiones del cerebro y del organismo en general, en donde regulan diferentes funciones.

Las neuronas hipofisiotrópicas son parte de una familia de neuronas peptidérgicas que regulan numerosos procesos, secretando una gran variedad de neuropéptidos (Sustancia P, Encefalinas, etc).

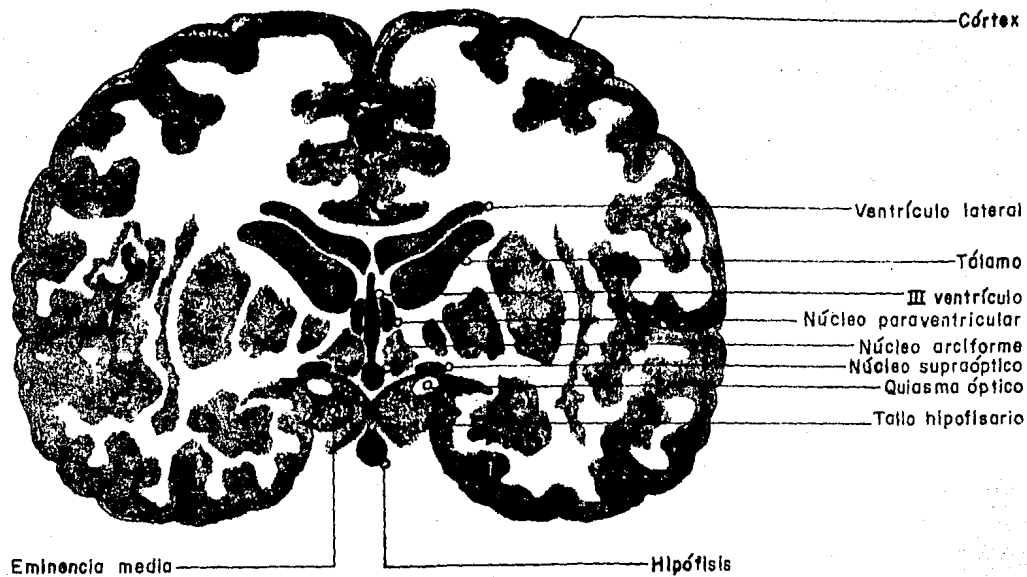


FIGURA 3. DISTRIBUCION ANATOMICA DEL HIPOTALAMO.

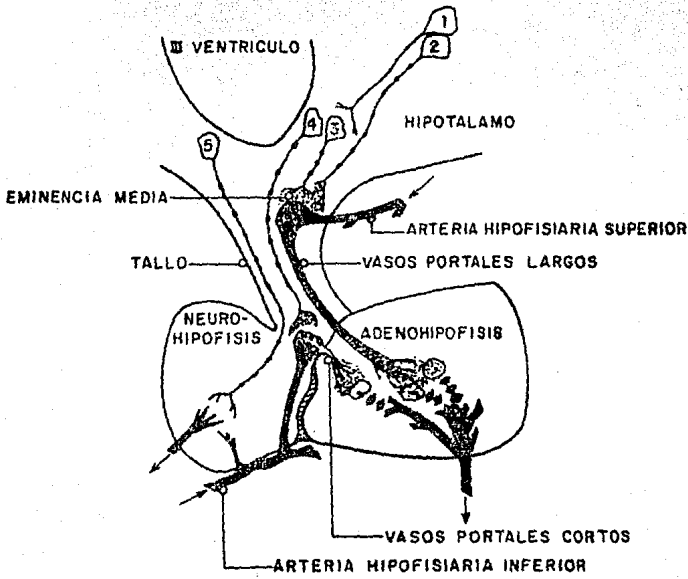


FIGURA 4.

ELEMENTOS FUNCIONALES DE LA UNIDAD DE CONTROL HIPOTALAMO-HIPOFISIS

Dos tipos de neuronas están involucradas en la regulación de la hipófisis anterior. Los números 3 y 4 representan a neuronas peptidérgicas, que liberan hormonas en los capilares del sistema portal hipofisiario. Estas neuronas secretorias combinan su función de tejido excitable, con su función secretoria. Debido a esto se les llama transductores neuroendócrinos es decir, convierten la información neural en información hormonal. El número 5 representa una neurona análoga a función neuronal clásica supraóptica hipofisiaria, estas son las responsables de secretar vasopresina.

En los números 1 y 2 se presentan neuronas que se encuentran en todo el cerebro y que liberan monoaminas. Estas pueden interactuar con las neuronas peptidérgicas ya sea en el cuerpo neuronal o en la terminal nerviosa. (Reichlin S., Basdessarini R. J., Martín J. B., *The Hypothalamus*, vol. 6, Ed. Raven Press, 1978, New York. pp. 6)

LHRH . Estructura, Biosíntesis y Función.

El descubrimiento del péptido LHRH cambió el enfoque de estudio de la neuroendocrinología de la reproducción. Este neuropéptido es un decapeptido cuya estructura fue elucidada por los grupos de Guillemin y Schally (23). Este péptido se encuentra bloqueado en sus extremos carboxi y amino terminales.



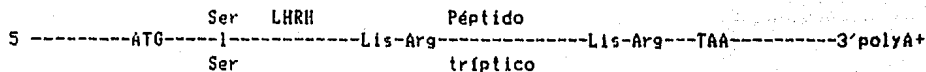
La distribución de las neuronas que sintetizan LHRH dentro del SNC se han localizado mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas, con anticuerpos dirigidos contra los extremos y parte central del LHRH. Se ha detectado LHRH en varias regiones del hipotálamo: núcleo ventromedial, núcleo paraventricular, y eminencia media donde se encuentra más concentrado. Fuera del hipotálamo se ha detectado en corteza, área preóptica, paraolfatorio, amígdala, y septum, banda medio basal de Broca (24). Muchos de los axones de las neuronas LHRHérgicas desembocan en la eminencia media. La mayor parte de los cuerpos celulares de éstas neuronas se encuentran en el área preóptica.

La hormona liberadora de la hormona luteinizante y folículo estimulante es sintetizada en el soma neuronal, vía mecanismos ribosomales. Primeramente se sintetiza un precursor de alto peso molecular que posteriormente se procesa al péptido.

Los primeros estudios sobre el precursor de LHRH fueron realizados por R.P. Millar con anticuerpos dirigidos a la parte central de LHRH (25). Por medio de radioinmunoensayo detectó fracciones inmunoreactivas en extractos de hipotálamo de carnero, las fracciones fueron separadas por una columna de filtración molecular. Empleando esta metodología caracterizó dos picos inmunoreactivos, uno correspondía a LHRH y otro mayor de 5 000 daltons (d). Al tratar la última fracción con tripsina y carboxipeptidasa B observaba que la inmunoreactividad aumentaba. Goutron empleando la misma estrategia encuentra dos picos de alto peso molecular que corresponden a 18 000 y 28 000 d (26).

Estudios posteriores de G. Fink (27) empleando traducción in vitro en sistemas libres de células e inmunoprecipitación, detecta una proteína aparentemente precursora de 26 000 d. Por otro lado en el laboratorio empleando la misma estrategia encontramos un precursor de 50 000 d, posteriormente se vió que era un artefacto, producido por inmunoprecipitación inespecífica y que probablemente era también el caso del precursor de Fink.

Recientemente Seeburg con técnicas de biología molecular aisló el cDNA que codifica para un precursor proteínico de 10 000 d en placenta humana (28). Utilizando el mismo rastreador en un banco de cDNA de hipotálamo de rata encontró un precursor igual (29). La estructura del cDNA encontrado por Seeburg presenta el siguiente arreglo.



Seeburg postuló que el péptido tríptico que se encuentra con el mensajero para LHRH podría ser el factor inhibidor de la liberación de Prolactina.

La liberación del péptido LHRH parece estar controlado por las hormonas esteroideas (30) en un proceso retroalimentador negativo o positivo. A su vez LHRH junto con las hormonas esteroides controlan la liberación de LH y FSH que son las hormonas gonadotrópicas. Con la interacción de estas hormonas se forma el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Además de estas hormonas otros neurotransmisores intervienen en la liberación de dicho péptido (Noradrenalina, Dopamina) (31). Las neuronas que sintetizan estos neurotransmisores parecen estar afectadas por los niveles de esteroides en la circulación (32). Otros estímulos externos que también afectan el metabolismo de LHRH son: luz, olores, estimulación del cervix. Se ha reportado la existencia de peptidasas en la hipófisis, que degradan al péptido después de ser liberado. La regulación de la acción de LHRH en la hipófisis esta regulada por los estrógenos, ya que a concentraciones elevadas, se desensibilizan los receptores de alta afinidad para LHRH (33).

Los efectos más estudiados para LHRH en los organismos consisten en su acción regulatoria en el ciclo estral. Este péptido controla la liberación de FSH y LH en la hipófisis y su liberación, las cuales son indispensables para que se lleve a cabo la ovulación. También se le postula como potenciador de la conducta sexual en las hembras, ya que en la lordosis de las ratas los niveles de LHRH en el núcleo ventromedial se encuentran elevados. Además se observa que los niveles de LHRH aumentan con el coito en los animales de ovulación refleja.

Un punto muy importante consiste en que el LHRH se detecta en altas concentraciones antes del nacimiento, para disminuir al nacer y aumentar nuevamente en la pubertad (34).

TRH. Estructura, Biosíntesis y Función.

En el año de 1969 se descubrió la estructura del primer factor hipotalámico que regula la función de la adenohipófisis: el TRH (36)

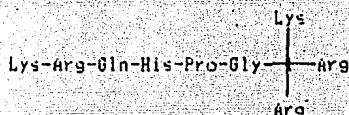
El TRH es un tripéptido que se encuentra bloqueado en sus residuos amino y carboxilo terminales. Su estructura fue dilucidada por los grupos de Guillemin y Schally en el hipotálamo de porcinos y ovinos (37).



En los mamíferos se encuentran las mas altas concentraciones de TRH en la eminencia media del hipotálamo. Se han detectado por medio de inmunohistoquímica terminales que contienen TRH en varios nucleos del hipotálamo como: paraventricular, dorsomedial, supraquiasmático, región perifornical e hipotálamo basolateral. Además del hipotálamo, el TRH se encuentra amplicamente distribuido en el cerebro, se le ha detectado en lóbulo olfatorio, nucleo acumbens, tallo cerebral, médula espinal, la glándula pineal, etc (38). Se han detectado cuerpos celulares a TRH en nucleo periventricular del hipotálamo y medula oblongata.

El entendimiento de la biosíntesis de TRH produjo una gran polémica debido a que se postulaban dos tipos de biosíntesis: vía enzimática y vía ribosomal. Por comparación con otros factores liberadores del hipotálamo se creyó que se sintetizaba en los ribosomas a partir de un precursor de alto peso molecular. Por otro, lado debido a su tamaño tan pequeño resultaba más fácil pensar que se podría sintetizar enzimáticamente. Finalmente se demostró que la biosíntesis se realizaba a través de la vía ribosomal (39).

En 1984 R. Richaler (40) reporta la secuencia parcial del precursor de TRH, encontrado en una clona de cDNA de la piel de *Xenopus laevis*. Este cDNA codifica para 123 aminoácidos y se encuentran tres copias del TRH en la secuencia.



Empleando los ocho aminoácidos mencionados más una cisteína en los extremos para formar un péptido cíclico, se obtuvieron anticuerpos que posteriormente se utilizaron para demostrar que el precursor de TRH en la rata es de 30 000 d (41). Y se ha reportado recientemente que en este precursor se encuentra repetida 5 veces la información para TRH (42).

Dentro del Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides se postula un proceso retroalimentador de las hormonas tiroideas y de la tirotrópina (TSH) para controlar la liberación de TRH del hipotálamo. Además se sabe que existen aferencias nerviosas que regulan el funcionamiento de la neurona a TRH y que los neurotransmisores que intervienen en la regulación de la liberación son entre otros dopamina, histamina y serotonina (43).

El efecto de TRH sobre la hipófisis consiste en liberar TSH (hormona liberadora de las hormonas tiroideas) y Prolactina (44).

Además se ha reportado que tiene muchos otros efectos en el SNC como: como aumentar el recambio de catecolaminas (45), liberación de dopamina del hipotálamo y núcleo acumbens (46), potencia la liberación de glutamato, aspartato y GABA inducido por un estímulo depolarizante en sinaptosomas de cerebro, en sinaptosomas y rebanadas de corteza (47).

También se ha reportado que el TRH por aplicaciones microiontoforéticas potencia la acción excitatoria de acetil colina en neuronas corticales (48). Cuando se administra el TRH "in vivo", incrementa la actividad motora espontánea (49), y reduce el tiempo de sueño e hipotermia inducida por pentobarbital (50).

De otro lado el TRH se encuentra localizado en terminales nerviosas de donde se puede liberar por estímulos depolarizantes de manera dependiente de Ca^{++} y coexisten receptores y mecanismos de inactivación específicos.

Debido a las características que presenta el TRH se la ha postulado como un neurotransmisor además de su acción hipofisiotrófica.

SOMATOSTATINA. ESTRUCTURA. BIOSÍNTESIS Y FUNCIÓN

La Somatostatina fue el primer péptido reportado como inhibidor de la liberación de hormonas de la adenohipófisis. El grupo de Schally además de caracterizar la estructura del LHRH y del TRH describió a la Somatostatina como un tetradecapeptido cíclico (51,52).

Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys



En el sistema nervioso central algunas de las neuronas sintetizadoras de Srif forman parte del sistema tuberoinfundibular que termina en la eminencia media (53). Los cuerpos neurales se encuentran localizados en el núcleo periventricular, y en el núcleo arcuato dorsal. Las terminales nerviosas desembocan en la eminencia media y hacen contacto con otras neuronas en los núcleos preópticos, núcleo arcuato, supraquiasmático, OVL, médula espinal y neurohipófisis.

En el cerebro se encuentra en el tubérculo olfatorio, la corteza y otras regiones. Fuera del SNC se encuentra localizado en células del páncreas, y del tracto gastrointestinal (54).

La biosíntesis fue estudiada en extractos de hipotálamo y de corteza, de estos estudios se reportó que además de la Srif 14, existía una Srif 28 (que tiene la secuencia de la Srif 14 extendida

Empleando sistemas de traducción "in vitro" se demostró que el precursor de la Srif tiene un peso molecular de 15 000 - 16 000 d (56). El precursor peptídico contiene dentro de su secuencia la información para Srif 28 y 14. En el laboratorio se determinó para el Hipotálamo de la rata un precursor peptídico de 15 000 d y su ARNm que está compuesto por 550 pb (57).

Empleando un cDNA de pancreas de pescado se aisló y secuenció una clona de cDNA que codifica para Srif 14 humana y ésta presenta la siguiente estructura (58).

5'-----[pre---SS-28]{ SS-14}-----poly A 3'

El procesamiento del precursor peptídico da lugar a la Srif 14 y la Srif 28. Este último es un precursor de la Srif 14, pero además es secretado intacto y posee funciones fisiológicas similares a la Srif 14.

En el hipotálamo la somatostatina es liberada en varias condiciones fisiológicas como: ayuno prolongado, y stress físico. Su liberación y aparentemente su biosíntesis está afectada por la concentración de GH (hormona de crecimiento), Somatomedinas C y hormonas tiroideas (59). Además de estas hormonas, se ha visto que algunos neurotransmisores regulan la liberación de Srif (Gaba, Peptido Vasoactivo Intestinal, Neurotensina, Melatonina, Dopamina).

Además de inhibir la liberación de la hormona de crecimiento, inhibe la liberación de TSH inducida por TRH (60).

Dentro de sus funciones endócrinas fuera del cerebro inhibe la liberación de glucagón, e insulina.

Como en el caso de TRH y LHRH, la Somatostatina es probablemente un neuromodulador en el cerebro ya que tiene numerosos efectos neuroquímicos, electrofisiológicos y sobre el comportamiento. Además existen receptores, se puede liberar de terminales nerviosas por despolarización de una manera dependiente de Ca^{++} .

OBJETIVOS.

El objetivo principal del grupo del Dr. Jean Louis Charli consiste en estudiar los eventos que ocurren en la neurona peptidérgica, desde el momento que ésta recibe un estímulo positivo o negativo (neurotransmisor, hormona, péptido, etc.) hasta que se produce la respuesta. Involucrados en esta respuesta se encuentran los mecanismos de : biosíntesis, compartimentalización, transporte en el axón, liberación , y degradación ó captura de los péptidos sintetizados en el soma neuronal.

El objetivo principal de este trabajo consiste en optimar una estrategia, que nos permita abordar el estudio de la biosíntesis de los neuropeptidos en las neuronas peptidérgicas. En especial los péptidos LHRH, Somatostatina y TRH. La técnica de "Northern" nos permite determinar el peso molecular de un ARNm específico, y realizar estudios cuantitativos de dicho ARNm. Con esta información, se puede tener una visión de los cambios que se producen en la expresión genómica del péptido a estudiar, y así determinar como la neurona peptidérgica responde a efectos extracelulares. Pretendemos por medio de esta información inferir si la respuesta activa mecanismos de la maquinaria transcripcional, traduccional, ó post-traduccional. O bien si solo se activan mecanismos de liberación del péptido que ha sido sintetizado con anterioridad.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

Dado que el objetivo de este trabajo es el de desarrollar una metodología adecuada para el aislamiento de ARNm específico (LHRH, SOMATOSTATINA, y TRH), se decidió utilizar la técnica de "Northern", la cuál nos permite identificar y caracterizar algunos parámetros moleculares de cualquier ARN mensajero.

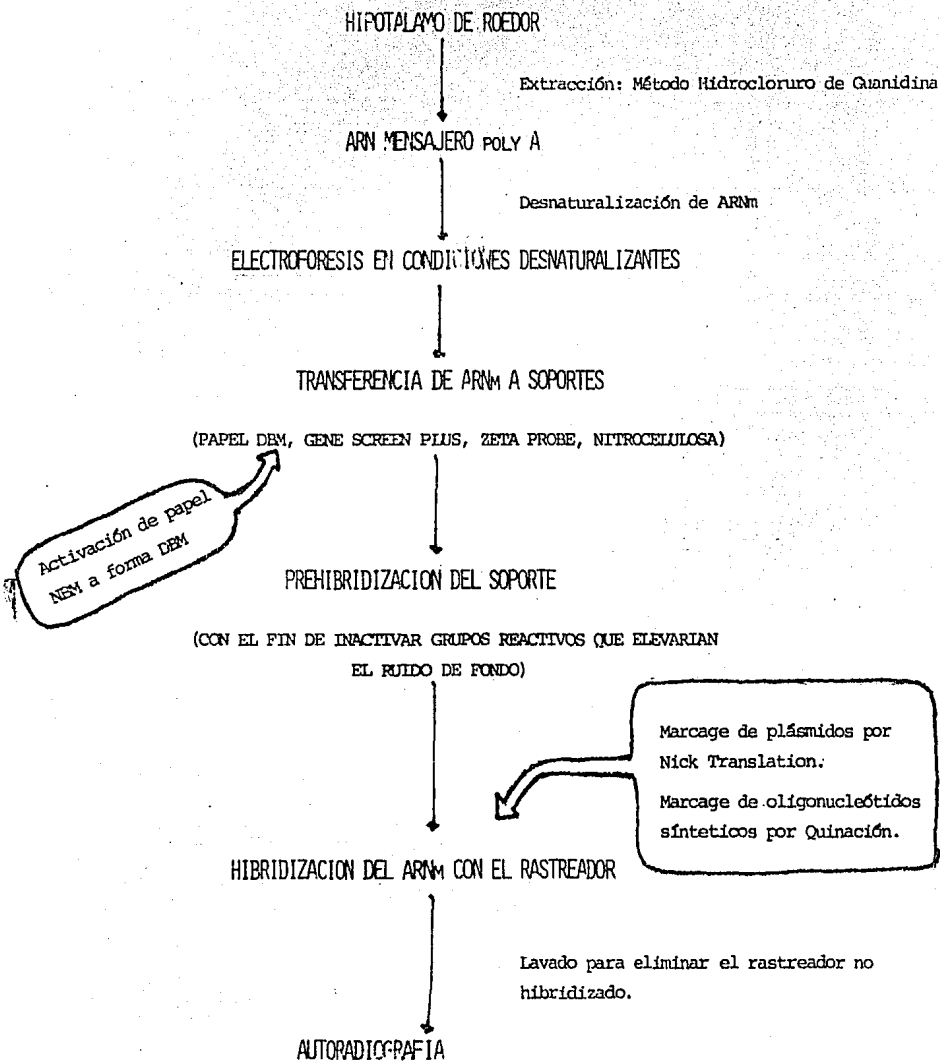
Cabe mencionar que esta técnica depende fundamentalmente de los siguientes parámetros:

- 1).- Sonda específica que permita rastrear de la población de ARN mensajeros el de nuestro interés.
- 2).- De la concentración del ARN mensajero específico.
- 3).- De las condiciones de hibridización.

La estrategia experimental que a continuación se describe tiene como objetivo el evaluar cada uno de los parámetros anteriores con el fin de obtener las condiciones óptimas para estudiar los ARNs mensajeros de LHRH, SOMATOSTATINA y TRH de la rata, la cuál es nuestro modelo experimental.

Primero se aísla ARN total de hipotálamo, y se separa la fracción poly A++ es decir el ARN mensajero. Se emplean 20 ug de ARN mensajero poly A++ para cada prueba, el cuál se desnaturaliza, y se somete a electroforesis en gel de agarosa, empleando agentes desnaturalizantes (hidróxido de metil mercurio ó formaldehído). Esto es con el fin de separar las poblaciones de ARNm en base a su peso molecular.

Posteriormente el ARNm es transferido por capilaridad a un soporte (Papel DBM o papel activado con grupos diazoto, Nitrocelulosa, Gene Screen Plus y Zeta Probe). Una vez que el ARN está fijado al soporte, es hibridizado con el rastreador específico (oligonucleótidos sintéticos ó plásmidos), el cual previamente ha sido marcado con isótopos radiactivos (^3H) y (^{32}P). El análisis de la hibridización se realiza por autoradiografía del soporte, donde se encuentra el ARNm hibridizado con el rastreador marcado. Además de el ARN problema se corre en la misma electroforesis, controles de peso molecular, y con referencia a estos podemos calcular el peso molecular del ARN mensajero que hibridizó con el rastreador específico. Estos controles de peso molecular (ARNs ribosomales de Eucariontes, ARNs ribosomales de *E. coli* y pBR322 digerido con *Hin* *fl*) no son transferidos ni hibridizados, sino teñidos con bromuro de etidio directamente en el gel y observados con luz ultravioleta. Con ellos podemos trazar una recta que relaciona al logaritmo del peso molecular con el R_{f0} al calcular el R_f de la muestra, nosotros lo podemos interpolar dentro de la gráfica para conocer el peso molecular de nuestro ARN mensajero.



MATERIALES Y METODOS.

I.- PURIFICACION DE PLASMIDOS. pBR322, Srf-pBR322, TRH-pUC8.

En la purificación de plásmidos se emplean diferentes cepas, y el mismo medio de cultivo que solo varia en los requerimientos específicos para cada cepa.

Cepas empleadas:

pBR322: E. coli GM31 (treo-, leu-, his-, Thi-, str+, lac-, gal-)
 Srf-pBR322: E. coli HP101 (pro-)
 TRH-pUC8: E. coli HP101 (pro-)

1.- Amplificación de los plásmidos (61).

Las cepas transformadas con el plásmido deseado se inoculan en medios de cultivo con antibióticos de selección, a una concentración tal que permita el aislamiento de colonias provenientes de una sola bacteria. De esta manera se evitan contaminaciones con bacterias que no contengan el plásmido. Los antibióticos de selección empleados en estas purificaciones varían de acuerdo con el plásmido. En el caso de pBR322 se empleó ampicilina 100 ug/ml y tetraciclina 7-20 ug/ml, para Srf-pBR322 y TRH-pUC8 se usó solo ampicilina 100 ug/ml.

Se hace crecer un inóculo de las bacterias transformadas, en 10 ml de medio luria (ver composición de medios de cultivo en apéndice I) más el antibiótico de selección, a 37 °C con agitación toda la noche. De este medio se toman 5 ml para inocular un litro de medio de cultivo de amplificación: medio M9 + 10% de luria, los requerimientos de la cepa y el antibiótico de selección. Se incuba a 37°C en agitación, hasta alcanzar 1 unidad de Densidad Óptica a 660nm.

En este momento se le adiciona 1 ml de casaminoácidos al 20%, 0.5 ml de glucosa al 50% y 50 ml de luria, y se deja 30' más el cultivo en incubación. Para realizar la amplificación, una vez que se termina el tiempo de crecimiento de las bacterias, se adiciona 200 mg de cloranfenicol por litro de cultivo, manteniendo el cultivo 16 horas a 37°C en agitación.

2).- Lisis de las células y extracción del plásmido (62).

Se centrifugan las células a 7 000 rpm (Beckman J2-21, rotor JA14) por 15' a 4°C; se obtiene una pastilla que se lava con NaCl 10mM; es importante disgregar completamente las células en el lavado para eliminar todos los productos de desecho de éstas. Se recolectan nuevamente las células centrifugando las células a 7000 rpm, 15' a 4°C. En este momento se procede a realizar la lisis celular, empleando los siguientes pasos: (todos los reactivos están calculados para un litro de cultivo)

-Congelar las células colocando el tubo en hielo seco/etanol por 15'.

-Resuspender totalmente la pastilla de células en 10ml de una solución de Sacarosa 25%, Tris-HCl 50 mM pH=8, EDTA 1mM. En estos pasos es muy importante disgregar completamente la pastilla, para obtener lisis completa de las células. Se mantienen los tubos con las células en hielo por 30'.

-Manteniendo los tubos en hielo se les adiciona en este orden las siguientes soluciones:

-3 ml de EDTA 0.25 M pH=8.0, 1 ml de lisozima (Sigma) 20 mg/ml disuelta en Tris-HCl 0.25 M pH=8.0, 1 ml de RNasa (Sigma) 10 mg/ml disuelta en acetato de sodio 0.1 M pH=5 EDTA 1 mM (previamente calentada por 10' a 85°C) para eliminar la DNasa.

-Se mezclan los tubos suavemente para no lisar los esferoplastos que se han formado y nuevamente se incuba 30' en hielo.

-Adicionar 3 ml de mezcla lítica que se compone de: 3 ml de Tritón X-100 al 10% (Sigma), 75 ml de EDTA 0.25 M, 15 ml de Tris-HCl 1 M pH=8.0 más 7 ml de agua.

-Suavemente se mezclan los tubos para no romper el ADN cromosomal y de esta manera es posible en los pasos siguientes obtener una preparación limpia de ADN cromosomal. Es necesario mantener los tubos en hielo 30'.

-Terminada la incubación se adiciona un volumen de agua para diluir la solución, que a causa de el ADN se encuentra sumamente densa.

-Centrifugar a 18 000 rpm (rotor JA20 Beckman) 40' a 4°C.

-Decantar el sobrenadante en probetas graduadas de plástico, es necesario que este paso se realice rápidamente pero sin mover mucho los tubos, para no resuspender los restos celulares.

-Realizar una extracción con fenol bidesilado (Es necesario saturar el fenol, dejándolo toda la noche en agitación con un volumen igual al de fenol de Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM pH=7.3) empleando un volumen igual al de la solución.

-Realiza una extracción con un volumen de cloroformo.

-En cada extracción, para separar la fase acuosa, se centrifuga a 6500 rpm, 10' a 4°C. Es importante no llevarse la película proteínica que se forma en la interfase.

-Para precipitar el ADN de la fase acuosa se le adiciona 1/30 del volumen total de NaCl 5M, y dos volúmenes de etanol a -20°C, se mezcla y se deja a -20°C por tres horas o de preferencia toda la noche.

-Para recolectar el ADN precipitado, centrifugar a 10 000 rpm por 30' a -5°C y resuspender en amortiguador TE y almacenar.

3).- Purificación del plásmido.

El ADN de plásmido está contaminado con ARN y ADN cromosomal al final de la precipitación anterior.

a).- Para eliminar el ARN se realizaron dos técnicas:

Filtración en gel (63).

La filtración en gel se realiza en una columna empacada con agarosa A 50 (Bio-rad) de dimensiones 2 x 35 cm; corrida con amortiguador Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, EDTA 1mM, azida de sodio 1mM, pH=8.0. Se colectan fracciones de 4 ml, monitoreando éstas en espectrofotómetro a 260 nm; generalmente el ADN se encuentra en las fracciones 15-20. Se recogen las fracciones del primer pico, y se les adiciona 2.5 volúmenes de etanol a -20°C y se deja toda la noche a -20°C. Se centrifuga el tubo a 10 000 rpm 30', se seca el precipitado con aire, se resuspende en 1 ml de amortiguador TE (tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH=8.0) y se cuantifica la concentración en el espectrofotómetro.

Colchón de cloruro de sodio 1M (64).

En éste método el ADN obtenido en el paso 2 se disuelve en 1 ml de buffer TE, el cuál se coloca lentamente sobre 4 ml de cloruro de sodio 1M contenido en un tubo de ultracentrifuga (Beckman L8-55). Se realiza la ultracentrifugación a 40 000 rpm (rotor SW50.1 Beckman), 6 horas a 25°C. El ADN se precipita en el tubo formando un botón, se decanta el sobrenadante al terminar la centrifugación y se resuspende en buffer TE; algunas veces es muy difícil resuspenderlo por lo que se debe tener mucho cuidado en este paso.

b).- Para eliminar el ADN cromosomal se realiza un gradiente isopícnico a equilibrio en cloruro de cesio/yoduro de propidio (65,66).

En un tubo de ultracentrífuga para el rotor SW50.1 se colocan 2.2 gr de CsCl sólido (grado técnico), el ADN disuelto en 2.1 ml de buffer TEN (tris 10 mM pH=7.5, EDTA 1mM, cloruro de sodio 0.2M), (la concentración de cada tubo no debe exceder de 500 ug de ADN), 150 ul de yoduro de propidio 2 mg/ml. Se cubre el tubo con 2.3 ml de aceite natural equilibrando directamente en las camisas del rotor. La centrifugación se realiza a 38 000 rpm 20 horas a 20°C. Después de la realización del gradiente se recoge la banda que corresponde al ADN de plásmido. Es posible separarlo de el ADN cromosomal, debido a que el ADN de plásmido esta más denso y forma una banda en la parte inferior del tubo. Para eliminar el yoduro de propidio (67), la muestra se pasa por una columna de intercambio iónico. En una columna de 0.5 X 3 cm, empacada con Dowex 50W-X8 (Bio-rad), se pasa la muestra y se eluye con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH=8.0, NaCl 1M, EDTA 1mM. El eluado se prueba ante luz ultravioleta, sino presenta fluorescencia esta limpio de yoduro de propidio y se puede continuar. Para eliminar el CsCl se dializa sa muestra a 4°C con agitación en amortiguador TE, por los menos con 5 cambios de 3 litros. Después de la diálisis se concentra el plásmido por precipitación con etanol.

II).- DIGESTION DE LOS PLASMIDOS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (68, 69).

Todas las digestiones con enzimas de restricción se realizan colocando en un tubo el ADN a digerir, buffer especial para cada enzima, las unidades de enzima necesarias para digerir la muestra de ADN y agua suficiente para diluir la enzima diez veces (esto es con el fin de diluir el glicerol en el que se almacenan las enzimas). En el apéndice 2 se muestran los buffers para las enzimas empleadas en este trabajo. Las reacciones con enzimas de restricción generalmente se incuban a 37°C, y el tiempo depende de que tan limpio este el ADN, o la actividad de la enzima. Pero generalmente 1 unidad de enzima digiere 1 ug de ADN en 1 hora.

III).- ANALISIS ELECTROFORETICO DE LAS DIGESTIONES DE LOS PLASMIDOS (70. 71).

Para determinar los fragmentos de ADN en los plásmidos se han digerido con las enzimas de restricción, se emplean varios tipos de electroforesis; estas son seleccionadas en base a la cantidad de ADN por analizar, la resolución que se desea entre los fragmentos de ADN digerido, y del tiempo disponible para examinar la digestión.

1). Minigeles de agarosa.

Son geles horizontales realizados sobre un cristal 5 X 7 cm, con cavidades en un extremo con capacidad para colocar 7ul de muestra. La concentración de agarosa es 1% disuelta en amortiguador TBE 0.5X (TBE 10X: 0.89M Tris base, 0.56 M ac. bórico, 10 mM de EDTA pH=8). El amortiguador de corrida que se emplea es TBE 0.25X; la electroforesis se corre a 100 V. Estos geles son empleados para monitorear los plásmidos en cada paso de la purificación.

2).-Geles de agarosa tamaño estándar

Son geles verticales realizados en una cámara de electroforesis Bio-rad de 12 X 14 cm, 1% agarosa disuelta en amortiguador TBE 1X; amortiguador de corrida TBE 1X. La electroforesis se realiza entre 100-150 V. Este gel se emplea para verificar la pureza de los plásmidos y las digestiones con enzimas de restricción.

3).-Geles de acrilamida tamaño estándar.

Se prepara una solución madre de acrilamida al 30%. (29% acrilamida, 1% bis-acrilamida) que se guarda en un frasco ambar a 4°C.

Para preparar 30 ml de gel se toman 8ml de la solución madre, 3 ml de amortiguador TBE 10X, 500 ul persulfato de amonio 10%, 10 ul de TEMED, y agua. La concentración final de acrilamida es 8%. Se emplea la cámara Bio-rad antes mencionada, con 1.5 mm de grosor de gel. El voltaje empleado es de 150 - 200 V.

Para seguir el progreso de la electroforesis, las muestras se mezclan vol/vol con una con una solución de: Azul de bromofenol 0.03%, Xilen cianol 0.03%, EDTA 1mM, Glicerol 50%.

IV. - PURIFICACION DE ARN RIBOSOMAL DE E. coli (72).

Se crece un inóculo de bacterias de E. coli Uracilo- (U-) en medio mínimo (enriquecido con 2% de glucosa y los requerimientos de la cepa) durante dos días. Con 1 ml del cultivo anterior se inoculan 50 ml de medio mínimo más 2% de glucosa. Se incuba el matraz por 3 horas a 37°C con agitación. Se recogen las células en un tubo corex de 50 ml centrifugando a 6 000 rpm (rotor JA20, Beckman) 10' a 4°C. Posteriormente se resuspenden en 10 ml de EDTA 5mM, 100 ul/ml de lisozima y se incuban 10' a 20°C. Después de este paso se ajusta la concentración a 1% SDS, proteinasa K 200 ug/ml, 10 mM amortiguador tris-HCl pH=7.5 20 mM NaCl y se incuban las células 30' a 37°C para lisarlas. Se agrega a la solución 1/10 del volumen de acetato de sodio 1M pH=5.0. Para eliminar las proteínas se realiza una extracción con 1 volumen de fenol saturado (se realiza una mezcla vol/vol de fenol-agua y se satura a 60°C con agitación por 2-3 min.) agitando firmemente sobre agua caliente a 60°C. Se enfría después la solución en hielo con NaCl (-8°C). Se centrifuga a 5 000 rpm, 10' a l.a. Se colecta la fase acuosa y se reextrae con una mezcla de alcohol isoamílico/cloroformo (1:24), con el fin de eliminar el fenol de la fase acuosa. Para precipitar el ARN de la fase acuosa se le adiciona acetato de sodio 100 mM concentración final y dos volúmenes de etanol, y se deja precipitar toda la noche a -20°C. Para recolectar el ARN se centrifuga a 12 000 rpm (rotor JS13 Beckman) 60' a 4°C.

V).- EXTRACCION DE ARN MENSAJERO DE HIPOTALAMO Y CEREBRO.

El ARN mensajero fue preparado por la QFB Susana Cohen Cory, quién utilizó el método de hidrocloreuro de Guanidina (73) para preparar el ARN total y cromatografía sobre oligo dT sefarosa (74) para obtener la fracción poly A+.

VI.- ANALISIS DE ARN POR ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (75).

1).- Acrilamida 8%/Urea 8M. (76)

Para preparar el gel, en un vaso de precipitado se disuelve urea y acrilamida en amortiguador TBE 1X. Generalmente se preparan 30 ml de solución agregando: 16 ml de acrilamida 30%, 14.41 gr de urea, 3 ml de amortiguador TBE 10X y se afora a 30 ml. Antes de vaciar la solución a la cámara de electroforesis, se adicionan 500 ul de persulfato de amonio al 10%, 10 ul de Temed, y se mezcla perfectamente bien. Las muestras se mezclan con 1 volumen igual de "Magic Mix" (10 M de urea, azul de bromofenol 0.0001%, glicerol 50%), se calientan S^o a 75°C y se enfrían rápidamente en hielo. La electroforesis se realiza a 100 V por 4 horas. El gel se tinte con bromuro de etidio 10 ul/l en acetato de amonio 0.1 M por 3'.

2).- Geles de Formaldehído 2.2 M. (77)

Este tipo de gel se realiza con agarosa. En un matríz se funde agarosa junto con amortiguador fosfatos 1X (0.018 M Na₂HPO₄ - 0.002M NaHPO₄); cuando esta fundida, se añade el formaldehído (concentración final de este 2.2 M) una vez que la solución se encuentra a 60°C. Inmediatamente después de mezclar el agarosa con el formaldehído, se vacía a la cámara de electroforesis. Todos estos pasos se realizan en la campana de extracción, debido a la toxicidad de el formaldehído.

Para desnaturalizar las muestras se tratan con: formamida 50% (ultrapura BRL) previamente desionizada sobre resina AG501-X8, 2.2 M formaldehído, 1x amortiguador fosfatos 1X, y se calientan a 70°C, 15' enfriando inmediatamente después en hielo. Para seguir la electroforesis se agregan 2 ul de la solución A1. La electroforesis se efectúa a 30 V por 8 horas. Para teñir el ARN, se lava primero el gel con 500 ml de amortiguador fosfatos 1X por 30', se tinte con 250 ml de bromuro de etídio 2 ul/ml en NaOH 50 mM 30', se destiñe con amortiguador fosfatos 0.5 M pH=7.0 por 30', y se y se observa con luz ultravioleta inmediatamente.

3).- Geles de Hidróxido de Metil mercurio.(78)

Todos los pasos a realizar con este tipo de gel deben realizarse en la campana de extracción, debido a que el hidróxido de metil mercurio es neurotóxico. Este gel se realiza con agarosa 1.5% disuelta en amortiguador 1X (ácido bórico 50 mM pH=8.2, borato de sodio 5 mM, sulfato de sodio 10 mM). Se funde la agarosa, y se deja enfriar a 60°C para adicionar el hidróxido de metil mercurio 5 mM concentración final, se mezcla perfectamente antes de vaciar a la cámara de electroforesis. La desnaturalización de las muestras se realiza con amortiguador 1X, 10 mM de hidróxido de metil mercurio, más 5 ul de la solución A1. La electroforesis se realiza a 30 V por un mínimo de 8 horas. El gel inmediatamente después de sacarlo de la cámara se trata con β mercaptoetanol para eliminar todo el hidróxido de metil mercurio y evitar intoxicaciones. La tinción del gel se realiza, colocandolo en una solución de bromuro de etídio 0.001% en acetato de amonio 0.1 M.

VII).- PREPARACION DE PAPEL ACTIVADO (79).

1).- Preparación de papel NBH.

Las hojas de papel Whatman 54 se ponen dentro de un refractario, que está en baño maria a 60°C. Por cada cm² se prepara una solución de 2.3 mg de NBCP (1-((m-nitrobenzyloxy)metil)pyridinium chloride) y 0.7 mg de acetato de sodio en 28.5 ml de agua. La solución se pone sobre todo el papel, se ayuda a empaparlo con las manos protegidas de guantes. Se frota con la mano hasta que el papel seque. Los papeles se secan a 60°C 10' y después se calientan a 130-135°C por 40'. Esto se realiza en horno con vacío conectado a una trampa para atrapar los vapores de piridina que se desprenden. Los papeles se sacan del horno, se colocan en agua 20', se lavan con acetona y se secan al aire. En este momento los papeles se pueden guardar por mucho tiempo a 4°C.

2).-Preparación de papel DBH.

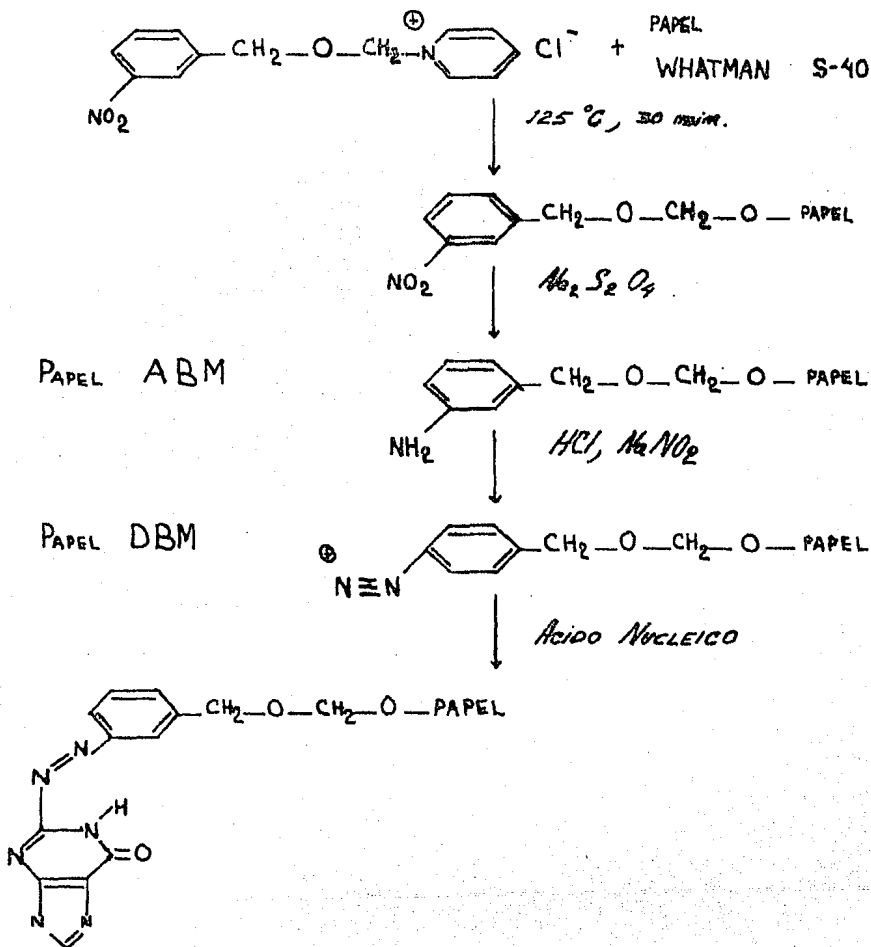
Esta operación se realiza justo antes de la transferencia. Se reduce el papel NBH incubando por 30' en baño maria a 60°C en una solución de dittonito de sodio al 20%, empleando 0.8 ml por cm² de papel por activar. Se agita ocasionalmente. Posteriormente se realizan tres lavados con agua por 5'c/u, se lava con ácido acético al 30% por 15', y nuevamente con agua una vez 5'.

La activación se realiza en hielo agregando al recipiente con el papel 0.6 ml de HCl 1.2 M por cm² y por cada 100 ml de HCl se adicionan 3 ml de nitrito de sodio en agua (10 mg/ml preparado al instante de adicionarla). La reacción se efectúa a 4°C por 30'. El papel puede permanecer más tiempo en este paso. Antes de transferir el ADN o ARN el papel se lava rápidamente con agua helada y amortiguadores de transferencia fríos. En el esquema 1 se muestran las reacciones que se efectúan en la preparación del papel activado y la forma por la cual reaccionan las bases de los ácidos nucleicos con el papel.

ESQUEMA I

Reacciones que se efectúan durante la preparación del papel activado y la reacción de este con el ácido nucleico.

CLORURO DE NITROBENCILOXIMETIL PIRIDINA



VIII).- TRANSFERENCIA DE ACIDOS NUCLEICOS A DIFERENTES SOPORTES
(80,81,82,83).

Antes de transferir los ácidos nucleicos a los soportes, es necesario que estos se activen. En el caso de papel DBM se describió en el punto VII el proceso de preparación antes de la transferencia. Además se emplearon soportes de unión no covalente con los ácidos nucleicos como: Gene Screen Plus, Zeta Probe y Nitrocelulosa. Estos deben lavarse con agua y permanecer sumergidos por 15' en el amortiguador de transferencia específico para cada uno de ellos. En el apéndice 3 y 4 se presentan las condiciones de tratamiento en los geles y membranas antes de transferir, y la composición de los amortiguadores de transferencia respectivamente.

En la transferencia de ARN se realiza una electroforesis en gel de agarosa bajo condiciones no desnaturizantes, se hidroliza el ARN en el gel con NaOH 50 mM por 30' a temperatura ambiente (para facilitar la transferencia de los ARNs de alto peso molecular) y se equilibra el gel con amortiguador de transferencia por una hora.

Con el ADN se realiza una electroforesis en gel de agarosa bajo condiciones no desnaturizantes, el ADN en el gel de agarosa se desnaturiza con 0.5 N de NaOH y 0.5 M de NaCl por 30' con agitación, y se equilibra el gel con 10X SSC por 30'. Ver anexo 3 la composición de los amortiguadores de transferencia empleados.

Para realizar la transferencia, el gel se pone sobre 3 tiras de papel Whatman que sirven como puente para el flujo del buffer de transferencia. Sobre éste se coloca la membrana que servirá de soporte a los ácidos nucleicos; posteriormente se ponen tres fragmentos de papel Whatman del tamaño del gel, por encima un bloque de servilletas que sirven como papel adsorbente, sobre las servilletas se coloca peso para que presione. En el esquema 2 se muestra como se realiza la transferencia por capilaridad. Nosotros probamos diferentes tiempos de transferencia, y creemos que se deben realizar entre 24 y 36 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo seleccionado para la transferencia, se retira el soporte y se seca ante un foco. En el caso de los papeles de Nitrocelulosa, Gene Screen y Zeta Probe, es necesario hornearlos por dos horas a 80°C (para fijar los ácidos nucleicos al soporte) antes de continuar con el experimento.

Después de haber fijado los ARN mensajeros sobre el papel, se siguieron dos estrategias para evaluar los procedimientos a seguir:

a).- Empleando ARN marcado con ^3H y ADN marcado con ^{32}P se cuantifica el pegado de los ácidos nucleicos a los papeles. Se realiza una transferencia bajo las condiciones de cada papel empleando ARN o ADN. Una vez terminada la transferencia los papeles se secan y se cortan de cm en cm y se colocan en un vial con 5 ml de líquido de centelleo (tolueno/PP0), para realizar un conteo en el contador de centelleo. (En el anexo 3 y 4 se muestran las condiciones de tratamiento y transferencia de ácidos nucleicos para cada tipo de papel).

b)- Transfiriendo ARN de E. coli transformada con el plásmido pACR 1029, preparado en el laboratorio de la Dra. Alejandra Covarrubias, se probó la eficiencia y la sensibilidad de cada papel por hibridización con un plásmido marcado el cual esta clonado en la cepa de E. coli.

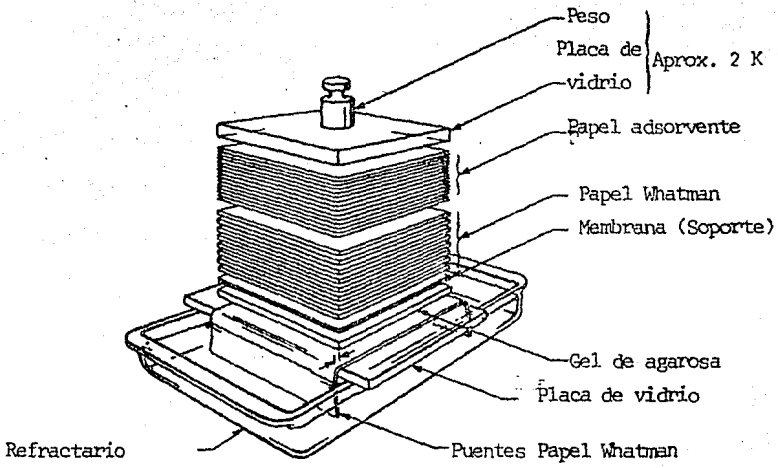


Figura 5.

REPRESENTACION DE UNA TRANSFERENCIA DE ACIDOS NUCLEICOS.

IX).- MARCADO DE PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS CON RADIOISÓTOPOS.

1).- Plásmidos.(84)

Para marcar plásmidos con alta actividad específica, se emplean dos enzimas: DNA Polimerasa I y DNAsa. Estas enzimas adicionan nucleótidos en dirección 5'--- 3' y rompen enlaces fosfodiéster respectivamente. Al procedimiento se le llama "Nick translation". Es importante titular las enzimas y realizar varios ensayos con diferentes concentraciones de éstas enzimas, hasta tener una relación que permite la mayor actividad específica incorporada al ADN. En el laboratorio se empleó un "kit" comercial para realizar esta reacción (Amersham) por lo que no tuvimos que optimizar el método.(ver anexo 4).

Para eliminar los nucleótidos radioactivos no incorporados al ADN se realiza una filtración en columna. A la mezcla de reacción se le adiciona 15 ug de tARN que sirve de acarreador. Posteriormente se pasa la muestra por una columna de Sephadex G 50 (Sigma), montada en una pipeta de 5 ml con una altura de 10 cm, es equilibrada con 20 ml de amortiguador de elución (150 mM de NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 50 mM de Tris- HCl pH= 7.5). Se colectan fracciones de 10 gotas (aprox. 250 ul). Los plásmidos son excluidos del gel y eluyen entre las fracciones 5 y 9 generalmente. En las fracciones 11 y 20 eluyen los desoxy-nucleótidos no incorporados. El plásmido una vez eluido se puede precipitar con etanol.(85)

Es importante conocer la actividad específica del plásmido marcado y para esto empleamos la unión de ácidos nucleicos a papel DE-81. De la mezcla de reacción se toma 1/10 del volumen total que se adicionan en un tubo a 50 ul de una solución precipitadora (10 mM EDTA, 0,1% SDS, 0.5 mg/ml de tARN). Se mezclan perfectamente, se colocan 25 ul en un cm² de papel DE-81 por duplicado, y se secan en un horno. Posteriormente para eliminar los desoxinucleótidos no incorporados a ADN se realiza el procedimiento siguiente:

- Realizar 6 lavados, por 5' c/u con 0.5 M de fosfato de sodio dibásico.

- Lavar 2 veces, 1' por lavado con agua.

- Lavar 2 veces, 1' por lavado con etanol 90%.

- Secar en horno.

Una vez en el papel se encuentra sólo el ADN marcado, se procede a determinar la radioactividad incorporada. Los papeles se cuentan con líquido de centelleo (ver anexo 4) en el contador Beta (Beckman LS 7800). Se determinan los cpm totales y se dividen por la cantidad de ADN puesto en la reacción, con esto conocemos la actividad específica de el plásmido.

2).- Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos sintéticos se marcan empleando una enzima, la polinucleótido cinasa del fago T4 que adiciona un fosfato radiactivo en el extremo 5' proporcionado por el ATP (86)(ver anexo 2)

Igual que con los plásmidos, los oligonucleótidos marcados deben purificarse antes de emplearse. Para lo cual se realiza una cromatografía de intercambio iónico. Se monta una minicolumna en una punta azul para pipetas Gilson de 1 ml. Con 500 μ l de DEAE-Celulosa (Sigma) previamente activada. Se equilibra la resina con amortiguador TE. Posteriormente se pone la muestra, se deja que pase todo el volumen a través de la columna para proseguir a eluir la muestra. Lavando con amortiguador TE (5ml) eluyen todas las moléculas con carga positiva o neutra. La elución de el ATP marcado no incorporado se realiza con 10 ml de una solución de NaCl 0.2M en amortiguador TE. Los oligonucleótidos se eluyen aproximadamente con 1 ml de NaCl 0.5 M en amortiguador TE. (87)

X.- HIBRIDIZACIONES.

En este trabajo se analizan "Northernns" con dos tipos de rastreadores: oligonucleótidos sintéticos y plásmidos. En los "Northernns" para caracterizar el mensajero de LHRH y globina se emplean oligonucleótidos sintéticos marcados con fósforo radiactivo. En el caso de Somatostatina se emplea el plásmido srif-pBR322, y para TRH se utiliza el plásmido TRH-pUC8 ambos marcados con desoxicitidina. (86, 89)

1).- Rastreo con oligonucleótidos sintéticos.(90)

Los ARNs mensajeros se someten a electroforesis desnaturalizante, y se transfieren al papel DBM. Antes de hibridizar el papel se coloca en una bolsa sellada y se prehibridiza con amortiguador de prehibridización con 0.1 ml por cm² por dos horas a 55°C. Posteriormente se agrega con una jeringa amortiguador de hibridización por 5 horas más el oligonucleótido marcado. Las temperaturas de hibridización varían dependiendo de el tamaño de los oligonucleótidos. Transcurrido el tiempo de hibridización el papel se saca de la bolsa y se lava con amortiguador 6X SSC a 4°C dos veces 1', 6X SSC dos veces 1' a T.A. Después de cada lavado el papel se seca con un foco y se expone en autoradiografía, para observar la señal. Se pueden realizar más lavados bajando la concentración de SSC o aumentando la temperatura. Esto se realiza con el fin de disminuir el ruido de fondo y detectar mejor la señal. Los buffer de hibridización, prehibridización y lavado se muestran en el anexo

2).- Rastreo con plásmidos.(91)

Los ARNs mensajeros se someten a electroforesis desnaturante, y se transfieren al papel. Una vez transferido el papel se seca, se coloca en una bolsa sellada. Con una jeringa se inyecta amortiguador de prehibridación y se deja mínimo 12 horas a 42°C. Posteriormente se retira el amortiguador de hibridación y se agrega amortiguador de hibridación más el rastreador que ha sido desnaturado calentando 15' a 100°C y enfriado inmediatamente en hielo. Generalmente dejamos hibridando entre 24 y 36 horas. Para el mensajero de somatostatina se emplean 42°C de temperatura de hibridación y 43% formamida; ya que el gene para somatostatina humana tiene un alto grado de homología en cambio el cDNA de *Xenopus laevis* se hibridiza a 37°C y 33% formamida por lo heterólogo del rastreador. Posterior a la hibridación, el papel se lava con 2x SSC dos veces 10' y se expone a autoradiografía. Si el ruido de fondo es alto y no permite detectar la señal se realizan otros lavados disminuyendo la concentración de sal ó aumentando la temperatura. Ver anexo 4 para composición de soluciones de hibridación.

RESULTADOS.

1.- PURIFICACION, MAPA DE RESTRICCIÓN Y MARCADO DE PLÁSMIDOS.

a).- Purificación.

Para este trabajo se amplificaron y purificaron tres plásmidos: pBR322 que se empleó como marcador de peso molecular; Srif-pBR32 que tiene insertado 2.7 kilobases del gene que codifica para Somatostatina humana entre los sitios Hind III/Eco RI; TRH-pUC8 que contiene el cDNA de 478 pares de bases que codifica para parte de el precursor de TRH de *Xenopus laevis* insertado en el sitio de Pst I del plásmido pUC8. Srif-pBR322 y TRH-pUC8 se emplearon como rastreadores de secuencias heterólogas en "Northern" de ARN poly A++ de rata. Resultaba importante obtener una elevada cantidad de ellos pero más aún, que estos estuvieran puros. Es decir libres de ARN, ADN cromosomal y de sales. Ya que de esto depende obtener digestiones rápidas con las enzimas de restricción, geles con bandas definidas, y lo más importante para el trabajo, plásmidos marcados con alta actividad específica. Esto nos permitió obtener bajo ruido de fondo en los "Northern" y así poder detectar mejor las señales específicas. La cantidad obtenida en general en todas las preparaciones de plásmidos, considerando cada paso durante el proceso de purificación se presenta en la tabla 2.

Después de la lisis celular la cantidad de ácidos nucleicos es muy elevada, pero, al considerar la contaminación por ADN cromosomal roto, ARN, y proteínas la concentración real de ADN de plásmido es mucho menor de los 20 mg que se determinan en el espectrofotómetro a 260 nm.

Se emplearon dos métodos para eliminar el ARN de las preparaciones : centrifugación a través de un colchón de sodio y filtración en gel de agarosa A 50. En mis manos funcionó mejor el colchón de sodio, ya que mis preparaciones estaban libres de ARN después de este paso. En cambio, con la columna no lograba resolver bien los dos picos esperados, el primero de ADN cromosomal y ADN de plásmido, y el segundo de ARN. Por lo tanto mis preparaciones contenían mucho ARN después de pasar por la columna. Para purificar el plásmido del ADN cromosomal, se recomienda pasar el ADN por un gradiente de cloruro de cesio, donde el ADN de plásmido es separado de los contaminantes y es depositado justo a la mitad de el tubo. El ADN cromosomal se deposita en la parte superior y el ARN en el fondo del tubo. por comodidad la recolección del ADN de plásmido, se realiza perforando el fondo del tubo, y algunas veces esto causa contaminación con ARN residual. Por esta razón es que decidí emplear el colchón de sodio para eliminar todo el ARN de mis preparaciones posteriores. En la figura 7 se pueden observar digestiones de los ADNs de los plásmidos purificados, y como se aprecia estos ADNs no están contaminados con ADN cromosomal y el plásmido no se encuentra roto, sino superenrollado que es su forma normal.

b).- Mapa de Restricción.

Es importante corroborar la identidad del plásmido purificado, lo cual se logra realizando un mapa de restricción, ya que este se considera como un patrón de identidad. Para la obtención de éstos se emplean enzimas de restricción que reconocen secuencias específicas en el ADN; a continuación se muestran las secuencias que reconocen las enzimas empleadas en este trabajo:

Hae III	GG CC
Eco RI	AAA TTT GG CC
Hind III	A TAGCTT
Pst I	CTCGA G

La muestra digerida se somete a electroforesis y el gel se tinte con bromuro de etidio para observar las bandas. Para saber si el plásmido purificado es el correcto las bandas del mapa de restricción deben corresponder con las bandas reportadas en la literatura. En la figura 7 se puede observar los patrones de restricción de los plásmidos purificados producidos con la enzima de restricción Hae III. Además se muestra la digestión de TRH-pUC8 y SrfI-pBR322 con Pst I y Hind III/Eco RI respectivamente (que nos permite liberar los insertos del plásmido vector). En la figura 6 se muestran los mapas reportados en la literatura.

Por medio de estas digestiones se aprecia que los plásmidos, son los correctos, y que son buenos sustratos para las enzimas de restricción (se generan digestiones totales). En el caso de pBR322 al cortar con Hae III solo se observan las doce primeras bandas las cuales corresponden al patrón esperado.

c).- Marcado por "Nick Translation" con desoxicitosina radiactiva.

Como se mencionó anteriormente, obtener una alta actividad específica en los plásmidos empleados implica detectar mejor una señal específica. Es necesario para lograr el objetivo de la reacción:

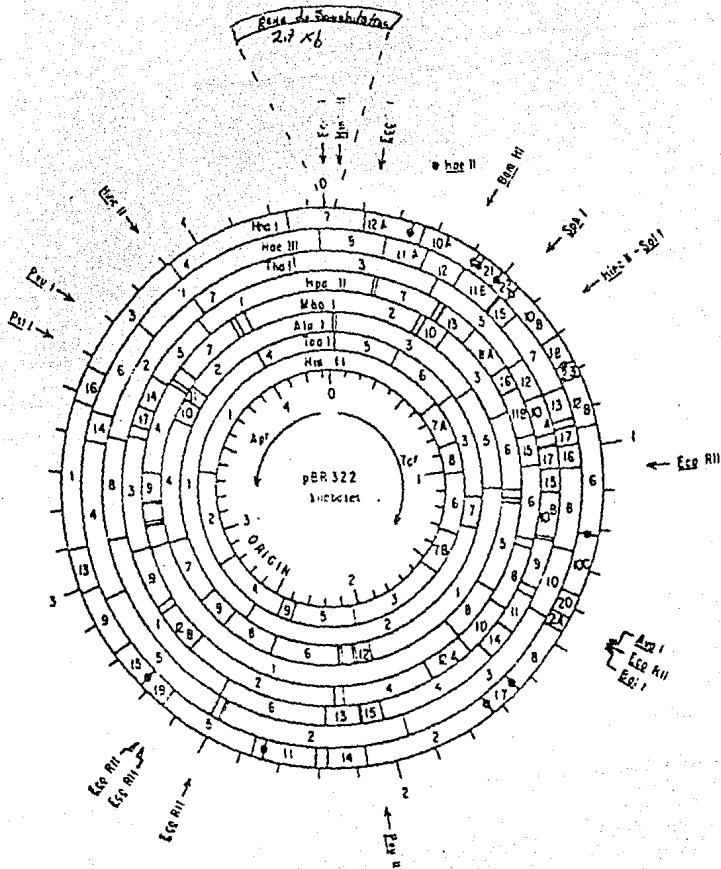
-Que el plásmido esté limpio, es decir que no contenga sustancias que inhiban la reacción.

-El nucleótido marcado que se emplee (desoxicitosina) debe ser de alta actividad específica, y lo mas nuevo posible.

-Que la relación polimerasa I / DNAsa correspondan a lo óptimo requerido, o bien emplear un "kit" comercial ya optimizado.

-Tener un método eficiente para separar los desoxinucleóticos marcados no incorporados al ADN del plásmido.

La actividad específica de los plásmidos marcados en el laboratorio depende de los puntos expuestos anteriormente. La actividad específica y el rendimiento de la columna de purificación se muestran en la tabla # 2. Como se puede apreciar la actividad específica obtenida está cerca del límite superior esperado, con respecto a los valores reportados por el "kit". Con esto se demuestra de nuevamente la pureza de los plásmidos y que pueden ser empleados en los experimentos de hibridización. Se puede notar también que en la etapa de purificación del plásmido la mayor parte de radioactividad es recuperada.



MAPA DE RESTRICCION DE pBR322 y pHSom-322.

MAPA DE RESTRICCIÓN DEL PLASMIDO
TRH pUCB.

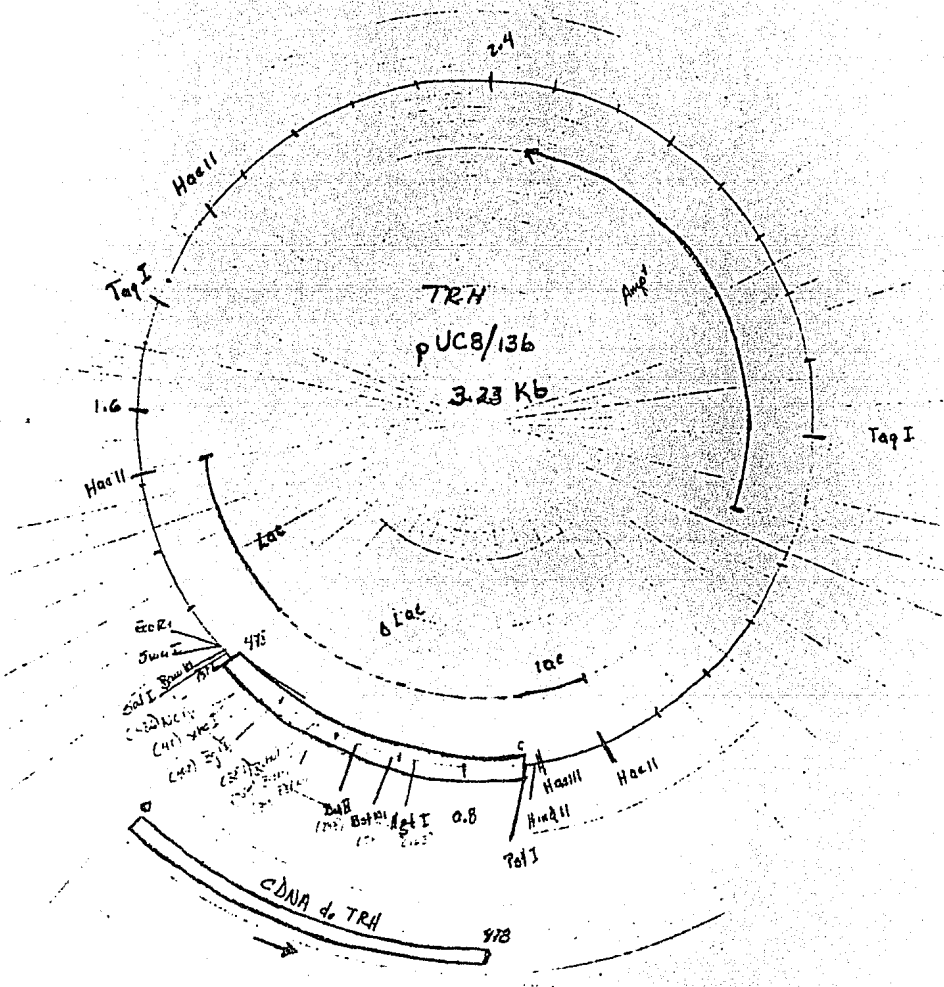


TABELA I

Cantidad de ADN obtenida por litro de cultivo, después de cada paso en la purificación. Este valor se calculó en base a la densidad óptica medida a 260 nm y considerando la relación 1 Unidad de Densidad Óptica = 50 ug/ml

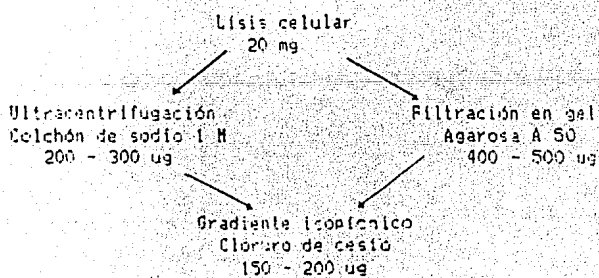


Tabla II.

PLASMIDO	ACTIVIDAD ESPECIFICA cpm/ug de ADN	CPM TOTALES	CPM DESPUES DE LA COLUMNA (fracción excluida)	RENDIMIENTO DE LA COLUMNA
TRH-pUC8	$9 - 10 \times 10^8$	$9 - 10 \times 10^7$	$7 - 8 \times 10^7$	80%
Srif-pBR322	$4 - 5 \times 10^8$	$4 - 5 \times 10^7$	$3 - 4 \times 10^7$	80%

Valores de actividad específica obtenida con los plásmidos marcado con (^{32}P). Cantidad de cpm obtenidos de la fracción eluida de la columna, y rendimiento de la columna de Sefedex. Los cpm son los incorporados a ADN y fueron determinados por unión de ADN a papel DE81.

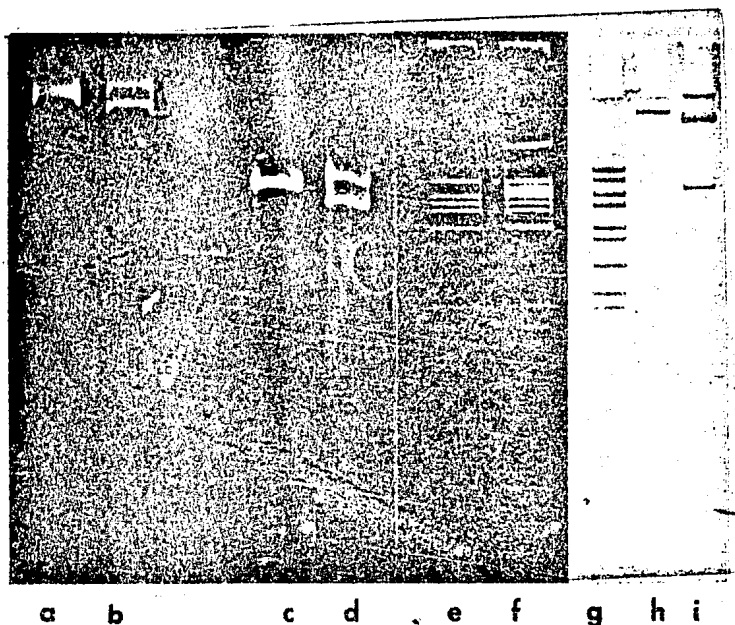


Figura 7

Patrones de restricción de los plásmidos purificados.
Fotografías de geles de Agarosa 1%, amortiguador TBE,
teñidos con bromuro de etidio.

- a).- pBR322 Superenrollado
- b).- SrfI-pBR322 Superenrollado
- c).- Pr322 digerido con Eco RI
- d).- SrfI-pBR322 digerido con Eco RI/Hind III
- e).- pBR322 digerido con Hae III
- f).- SrfI-pBR322 digerido con Hae III
- g).- TRH-pUC8 digerido con Hae III
- h).- TRH-pUC8 Superenrollado
- i).- TRH-pUC8 digerido con Pst I

II.- ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES.

En los "Northern" es importante tener el ARNm desnaturalizado, para que la migración de éste en la electroforesis dependa únicamente de su peso molecular. La desnaturalización ayuda posteriormente a una buena hibridización con el rastreador. Para lograr una buena desnaturalización, se emplea generalmente Glioxal/Dimetilsulfoxido ó Formaldehído 2.2 M ó Hidróxido de metil mercurio 4 mM. Es importante que en estas electroforesis los reactivos y el material se encuentren libres de Ribonucleasas, ya que de otro modo, se corre el riesgo de degradar el ARN. Nosotros probamos los 3 métodos antes mencionados, pero solo obtuvimos resultados aceptables con los geles de formaldehído e hidróxido de metil mercurio. Las electroforesis en gel de agarosa en presencia de urea no se utiliza para los northern, solo se emplea para probar la integridad de las preparaciones de ARN ya que se había reportado que en estas condiciones la migración de los ARNs no es proporcional al peso molecular. (75)

a).- Geles de Formaldehído 2.2 M.

Después de realizar muchas pruebas, variando tiempo y voltaje, en la electroforesis logramos obtener buena resolución con los ARNs ribosomales de Eucariontes y de E. coli. Con los cuatro marcadores antes mencionados, se puede trazar una recta entre el logaritmo de el peso molecular contra la migración, ver gráfica 1.

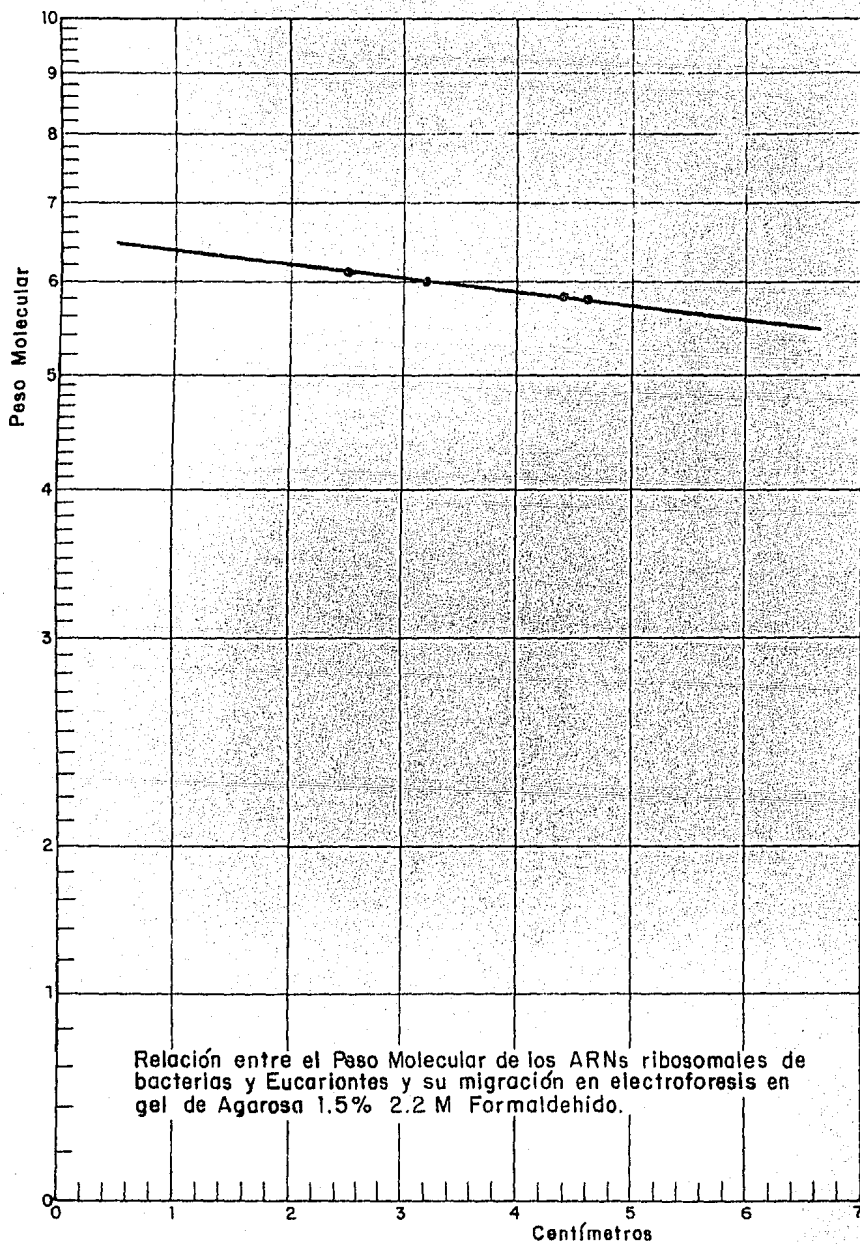
Esto es indicativo de que las muestras están desnaturalizadas totalmente. En la figura 8 se observa la resolución de las bandas de ARN ribosomal de *E. coli* (preparado en el laboratorio) en un gel de formaldehído teñido con bromuro de etidio.

En la tinción de los gels de formaldehído tuvimos muchos problemas porque el formaldehído provoca una baja en la sensibilidad de la tinción, probablemente impide que el bromuro de etidio (interaccione entre las bases. Logramos detectar entre 5 y 10 ug por carril en un gel de formaldehído que al comparar con la cantidad que se puede teñir en un gel de acrilamida/urea (1.5 ug por carril), nos damos cuenta de la interferencia que existe, implicando el emplear cantidades muy elevadas concentraciones de ARN.

b).-Gels de Hidróxido de metil mercurio.

El hidróxido de metil mercurio es un reactivo muy tóxico, y un desnaturalizante muy enérgico. Bajo estas condiciones tanto el ARN como el ADN son completamente desnaturalizados a su estructura primaria. En la figura 9 se observa el pBR322 digerido con Hinf I y marcado con fósforo radioactivo, sometido a electroforesis con hidróxido de metil mercurio. Realizando la gráfica logaritmo de el peso molecular contra la migración se observa que las bandas se alinean en una recta. (ver gráfica 2) La tinción de este gel es muy fácil, no se cuantifico lo cantidad mínima de ARN que se resuelve con ésta tinción.

Debido a la menor toxicidad del formaldehído comparado al hidróxido de metil mercurio y a los buenos resultados obtenidos con el primo desnaturalizante se siguieron los experimentos descritos a continuación con electroforesis presencia de formaldehído.



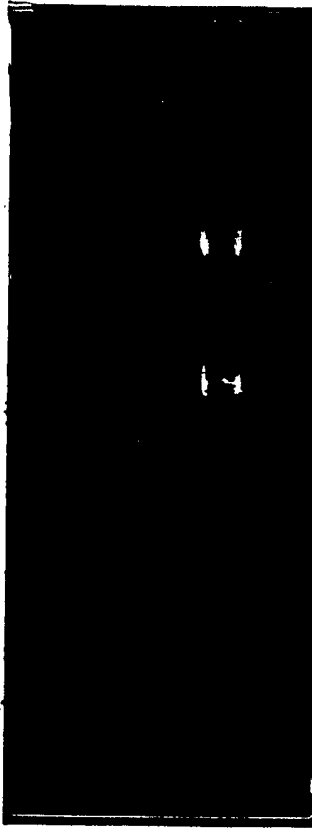


Figura 8.

Desnaturalización y electroforesis de ARN ribosomal de procariontes en gel de agarosa y formaldehído 2.2 M.

Fotografía de un gel de agarosa 1.5%, formaldehído 2.2M y amortiguador de fosfatos 1X. Teñido con bromuro de etidio. La muestra es desnaturalizada antes de someterla a electroforesis. 10 µg de ARN ribosomal de procariontes se tratan con 50% formamida, 2.2 M formaldehído, 1X amortiguador de fosfatos y se calientan 15' a 60°C. La banda superior corresponde al ribosomal 23s y la banda inferior corresponde al ribosomal 16s.

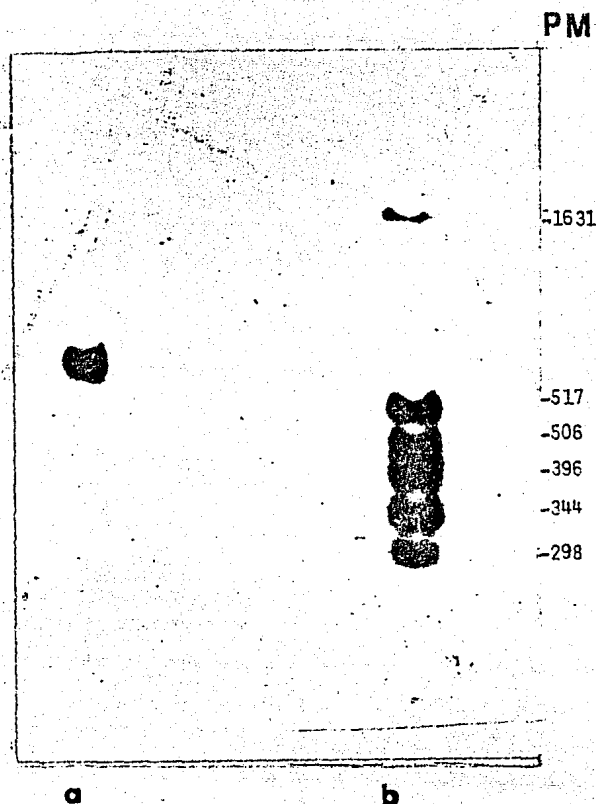
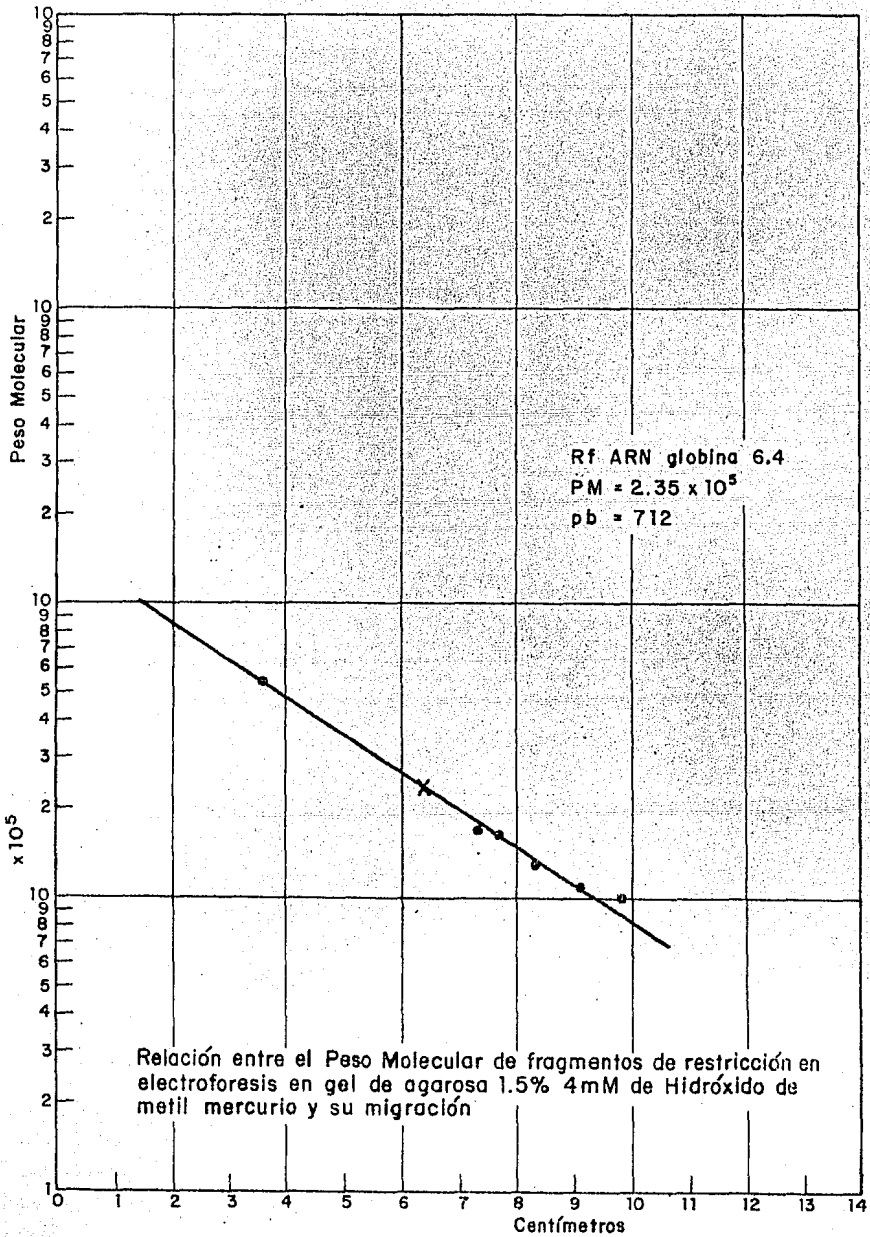


Figura 9.

Desnaturalización y electroforesis en gel de fragmentos de restricción del ADN del pBR322 empleando agarosa e hidróxido de metil mercurio, y caracterización del mensajero de globina empleando oligonucleótidos sintéticos.

a).- Autoradiografía de la hibridación de ARN de reticulocito de conejo, hibridado contra su oligonucleótido específico marcado con (32P). El ARN fue sometido a electroforesis en gel de agarosa 1.5%, hidróxido de metil mercurio 5 mM, amortiguador boratos 1X, las muestras se desnaturalizan con 10 mM de hidróxido de metil mercurio. El ARN es transferido a papel DBM y se hibridizó por 5 horas a 30°C, con 6X SET, 5% Denhart's, 1% SDS, y el oligonucleótido marcado. Posterior a la hibridación, el papel se lavó con 6X SSC dos veces 1' a T. A.

b).- Autoradiografía de pBR322 digerido con Hinf I y marcado con (32P) (ver apéndice 3). Los fragmentos de restricción se desnaturalizaron con 10 mM de hidróxido de metil mercurio y se sometieron a electroforesis desnaturalizante (igual que a), después fueron transferidos a papel DBM.



III.- CUANTIFICACION DE LA TRANSFERENCIA DE ARN Y ADN MARCADO RADIOACTIVAMENTE A DIFERENTES SOPORTES.

En este trabajo se pretende estandarizar una técnica que nos permita caracterizar el peso molecular y cantidad de ARN mensajero de péptidos hipotalámicos (Somatostatina, LHRH y TRH) que se encuentran en muy baja concentración. Es muy importante entonces lograr transferir la mayor parte del ARN que se emplea en la electroforesis desnaturalizante. Para determinar cual es el soporte que tiene la mayor capacidad, se hicieron los siguientes experimentos. Se marco un plásmido con fosforo radiactivo mediante "nick translation", y se usó ARN ribosomal de *E. coli* marcado "in vivo" con tritio. Se sometieron a electroforesis y se transfirieron a tres diferentes soportes: Papel DBM, Zeta Probe y Gene Screen Plus. En la tabla III se presentan los valores obtenidos en las transferencias de ARN (3H) y ADN (32 P). Además se compara la electroforesis en condiciones desnaturalizantes con una electroforesis en condiciones normales para el caso del ADN (32 P).

En la figura 10 se aprecia la autoradiografía de los papeles transferidos, se puede ver que la eficiencia de la transferencia es baja en todos los papeles que probamos, y pensamos que parte del problema puede deberse al formaldehído, el cual impide la interacción de los ácidos nucléicos con el papel.

En la figura 11 se compara las autoradiografías de los geles con ADN (32 P) no transferidos a los soportes y de geles con ADN (32 P) transferidos a los distintos soportes.

Estos datos no correlacionan con los presentados en la Tabla III, ya que por autoradiografía la eficiencia de transferencia resulta mayor que los datos obtenidos con el contador B.

Debido a que las pruebas hechas no permitieron determinar de manera inequívoca que soporte es mejor para los experimentos de transferencia de ARN mensajero de hipotálamo, se realizaron más pruebas con estos papeles y también con nitrocelulosa.

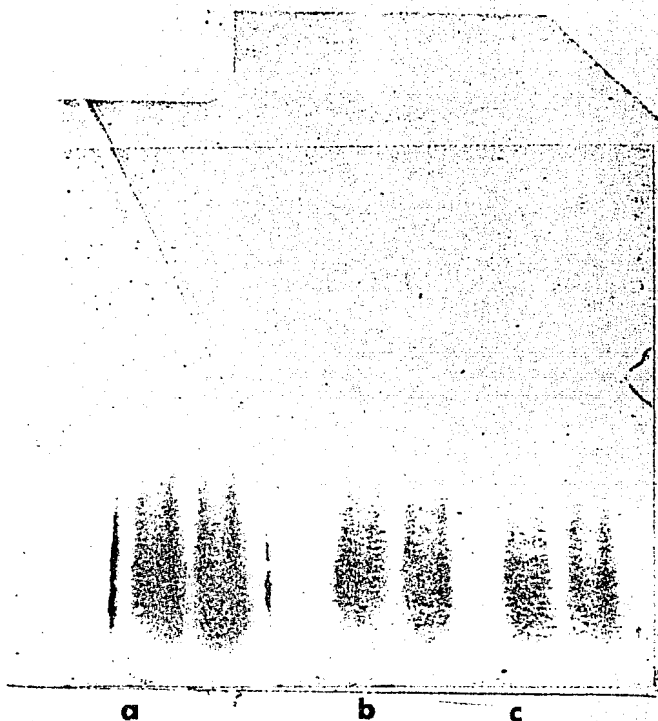


Figura 10.

Cuantificación de transferencia de ácidos nucleicos a diferentes soportes.

Autoradiografía de los papeles a los que se transfirió ac. nucleicos. Cada carril contiene 379 090 cpm incorporados a ADN, la muestra fué sometida a electroforesis en gel de agarosa 1.5%, amortiguador TBE 1X. EL ADN se transfirió por 24 horas a los diferentes soportes para cuantificar la eficiencia de transferencia.

- a).- Zeta Probe
- b).- Papel DBM
- c).- Gene Screen Plus

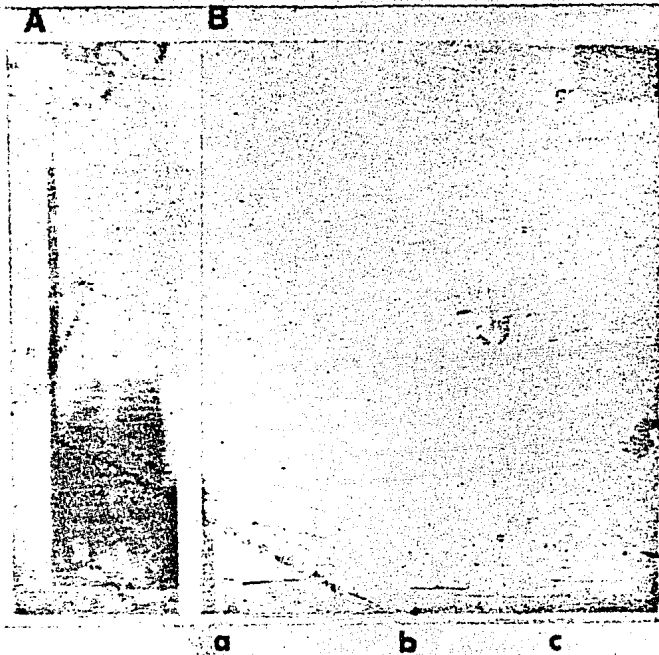


Figura II.

Determinación por autoradiografía de Ac. nucléicos que permanecen en el gel después de la transferencia.

A).- Autoradiografía de 2 carriles con ADN (^{32}P) sometido a electroforesis de agarosa 1.5% en amortiguador TBE 1X, que no fueron transferidos a los soportes. Estos fragmentos de gel se guardan congelados y se exponen junto con los fragmentos de geles que sí fueron transferidos.

B).- Autoradiografía de fragmentos de geles que contienen ADN (^{32}P) (la misma cantidad de cuentas por minuto que en A) que fueron transferidos a los diferentes soportes por 24 horas.

- a).- Zeta probe
- b).- Papel DBM
- c).- Gene Screen Plus.

Tanto A como B fueron expuestos a autoradiografía por 24 horas.

TABLA III.

EFICIENCIA DE TRANSFERENCIA DE ACIDOS NUCLEICOS RADIATIVOS A LOS DIFERENTES SOPORTES PROBADOS.

Muestra y condiciones de electroforesis.	CPM iniciales	Soportes					
		Papel DBM		Zeta Probe		Gene Sreen Plus	
		$\overline{\text{CPM}}$	%ET	$\overline{\text{CPM}}$	%ET	$\overline{\text{CPM}}$	%ET
ADN (^{32}P) Electroforesis condiciones normales. Agarosa 1.5% amortiguador TBE 1X	379 090	95 288	25	95 863	25	93 980	25
ARN (^3H) Electroforesis condiciones desnaturalizantes. Agarosa 1.5% 2.2 M formaldehído, amortiguador de fosfatos 1X.	13 200	1 303	10	753	6	1 564	12
ADN (^{32}P) Electroforesis condiciones desnaturalizantes. Agarosa 1.5% 2.2 formaldehído, amortiguador de fosfatos 1X.	300 000	2 631	0.9	3 924	1.3	3 703	1.2

En la tabla se muestran los CPM promedios ($\overline{\text{CPM}}$) detectados por el contador de centelleo, en los fragmentos que componen el carril en cada papel. Los CPM que corresponden a los diferentes soportes fueron corregidos para tener en cuenta la interferencia de cada papel en el conteo de centelleo ("quenching").
%ET= Eficiencia de la transferencia en portentaje.

IV.- SELECCION DEL SOPORTE DE TRANSFERENCIA CONSIDERANDO TODOS LOS PASOS DE UN NORTHERN

Al cuantificar la transferencia a diferentes soportes, se observó que no había diferencias muy grandes en la eficiencia de transferencia (Ver Tabla III y Fig. 11). En vista de esto se procedió a seleccionar el soporte adecuado desarrollando la técnica completa, es decir transferir ARN desnaturalizado a diferentes soportes (DBM, Gene Screen Plus, Zeta Probe, y Nitrocelulosa), e hibridizar con su rastreador específico. En este experimento se utilizó ARN de una cepa de *E. coli* que contiene el plásmido pACR1029 y el plásmido pACR1029 (proporcionado por la Dra. Alejandra Covarrubias). Todos los papeles y los geles se prepararon bajo las condiciones reportadas, y se unificó las condiciones de hibridización, la cantidad de cpm por ml de amortiguador de hibridización y los lavados: (Tem. = 42°C, lavados con 2XSSC 2 veces 10', dos millones de cpm/ml de amortiguador de hibridización). En la figura 12 se puede apreciar la autoradiografía de los papeles hibridizados y lavados. La banda superior corresponde aproximadamente a 2 000 pb y el barrido que se observa se debe a productos de degradación del ARN. En este experimento se observa claramente que la nitrocelulosa y papel DBM dan los mejores resultados, siendo más intensa la señal en el caso de papel DBM. De éste mismo experimento se analizó la posibilidad de reutilizar los soportes, ya que el reutilizar los papeles nos permite analizar varios rastreadores sobre la misma muestra, y así ahorrar ARNm y tiempo. Los papeles, se lavaron hasta que no se detectó señal en autoradiografía durante exposición de 48 horas. Se prehibridizaron e hibridizaron en las condiciones empleadas anteriormente, y se utilizó el mismo rastreador.

La conclusión de este experimento es que tanto el papel de Nitrocelulosa como el DBM pueden reutilizarse. Sin embargo, la eficiencia disminuye en un 25% probablemente debido a la pérdida de mRNA que estaba unido al soporte, durante el lavado (datos no mostrados).



Figura 12.

Selección de Soportes desarrollando la técnica de Northern.

Autoradiografía de los diferentes papeles que se emplearon como soportes de la hibridación de ARN extraído de una cepa de *E. coli* transformada con el plásmido pACR1029. La hibridación se efectuó a 42°C por 36 h con agitación. El plásmido rastreador pACR1029 fue marcado con actividad específica de 1×10^8 cpm/ μ g. Se emplearon 3×10^8 cpm por ml de buffer de hibridación. Después de la hibridación se lavaron los papeles con 2X SSC, 2 veces $10'$ y se expusieron a autoradiografía por 48 h.

- a).- Zeta Probe
- b).- Nitrocelulosa
- c).- Gene Screen Plus
- d).- Papel DBM*

*Debido al ruido de fondo en este papel fue necesario antes de exponer lavar con 0.1X SSC a 60°C $10'$.

V.- CUANTIFICACION DE LA CANTIDAD MINIMA DETECTABLE DE ARN MENSAJERO POR LA TECNICA DE "NORTHERN".

Debido a que la concentración intracelular del ARN mensajero para los péptidos hipotalámicos es menor al 0.1% de la cantidad total de mensajero, fué necesario desarrollar las condiciones experimentales adecuadas para identificarlo mediante la técnica de "Northern".

Los experimentos realizados en este sentido, consistieron en evaluar la eficiencia de hibridización a concentraciones de ARNm menores a 0.1% , así como el ensayar la eficiencia de hibridización al utilizar como soporte papel nitrocelulosa y papel DBM.

Las concentraciones de ARNm utilizadas fueron 0.5%, 0.1%, 0.02%, 0.004%. El ARNm utilizado proviene del plásmido pACR1029 el cual se encuentra a una concentración intracelular del 1% en una cepa de E. coli (A. Covarrubias, comunicación personal) y a partir de éste, se hicieron las diluciones convenientes.

Como se muestra en la figura 13, cuando se utiliza como soporte el papel DBM, la técnica es capaz de detectar el ARNm a una concentración del 0.004%, mientras que con el papel de Nitrocelulosa solo se detecta 0.02%.

Debido a lo anterior, todas las hibridizaciones aquí reportadas se llevaron a cabo utilizando papel DBM.

B

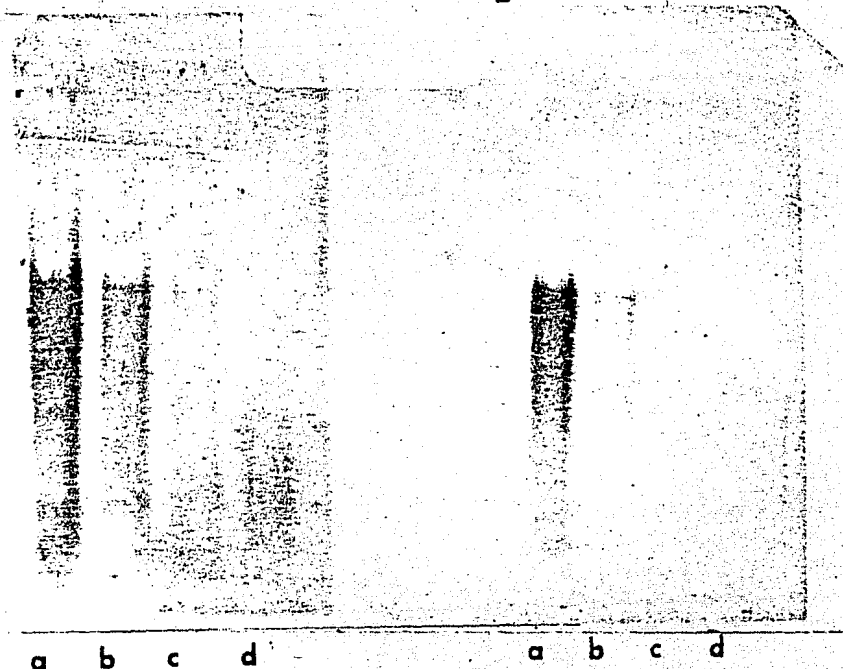


Figura 12

Quantificación de la cantidad de ARN mínima detectable por Northern.

Autoradiografía de la hibridación realizada con diferentes cantidades de ARN de la Cepa de E. coli transformada con el plásmido pACR1029 y el mismo plásmido marcado con (32P). Actividad específica del plásmido 2.9×10^6 cpm /ug. Se hibridizó con 2×10^6 cpm/ml de amortiguador de hibridización a 42°C por 36 horas y posteriormente se lavaron los papeles con 2X SSC por 10' 2 veces. Se expuso a autoradiografía por 7 días.

- A).- Papel DM
- B).- Nitrocelulosa

% del ARN detectado por el rastreador en la muestra.
 a).- 0.5 b).- 0.1 c).- 0.02 d).- 0.004

VI.- IDENTIFICACION DE LOS ARNs MENSAJEROS PARA SOMATOSTATINA, TRH Y LHRH EN EL HIPOTALAMO DE LA RATA.

a).- Empleando plásmidos como rastreadores.

En la figura 14 se aprecia la hibridización de ARN poly A++ de hipotálamo de rata con el plásmido Srif-pBR322 marcado con (32P). En este experimento se sometieron a electroforesis y transferencia tres muestras: ARN poly A++ de hipotálamo, ARN poly A++ de cerebro extrahipotálámico, y ARN de E. coli (como control negativo). En esta fotografía se observa una banda ancha de hibridización que corresponde al carril que contiene el ARNm de hipotálamo de rata. La intensidad de la banda no disminuyó al realizar un lavado drástico con 0.1% SSC, 0.1% SDS dos veces por 10' a temperatura ambiente. Esto nos sugirió que la hibridización se hizo con un ARN de secuencia muy similar a la del inserto, este dato como el hecho de no detectar señal en el carril que contiene ARNm de cerebro extrahipotálámico (en donde la concentración de cuerpos celulares a Somatostatina es mucho menor que en hipotálamo) demuestra que el rastreador hibridizó con el ARNm para Somatostatina.

En el rastreo con el plásmido TRH-pUC8, se emplearon condiciones relajadas, esto se debe a que la clona contiene secuencias provenientes de mensajero para la piel de *Xenopus laevis* y probablemente no existe mucha homología entre el ARNm de rata con el de sapo. Hasta el momento no hemos podido detectar una señal positiva.

b).- Empleando oligonucleótidos sintéticos como rastreadores.

Para rastrear el ARNm del precursor de LHRH, empleamos oligonucleótidos sintéticos marcados con (32P) como rastreadores. Los oligonucleótidos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis de Macromoléculas (103,104). Se sintetizaron oligonucleótidos de varios tamaños:

1.- Cuatro mezclas de 8 y 16 oligonucleótidos de 15 nucleótidos, que codifican para los 5 aminoácidos de la parte amino terminal del LHRH, que abarcan todas las posibles secuencias tomando en cuenta la redundancia del código genético.

2.- Una mezcla de 2 oligos con 33 nucleótidos que codifican para los diez aminoácidos de LHRH, más tres nucleótidos que codifican para una glicina en la parte carboxilo terminal, de donde se piensa proviene la amidación del péptido. Las secuencias de estos oligonucleótidos se diseñaron escogiendo los codones más empleados en mamíferos y en caso de varias posibilidades se eligieron los que produce pares de bases del tipo dG-U o G-dT ya que estos no alteran de manera significativa el híbrido ADN-ARN.

3.- Se fabricó un oligonucleótido de 15 nucleótidos que codifica para 5 aminoácidos del ARNm de globina de conejo. Este sistema se emplea como control positivo de la hibridización.

Se realizaron varios "Northern", transfiriendo ARN de Reticulocitos y ARNm de hipotálamo y cerebro extrahipotalámico, los que se hibridizaron con las mezclas de oligonucleótidos mencionadas. Para los ensayos con la mezcla 2 se empleó 42°C de temperatura de hibridización y para las mezclas 1 y 3 se utilizó 30°C.

En estos experimentos solo logramos obtener una señal con el ARNm de reticulocitos de conejo, hibridizado con el oligonucleótido específico (ver figura 9). Como se puede apreciar, la banda de hibridización corresponde a un peso molecular de 712 pb. Este valor es similar al reportado en la literatura para el mensajero de globina de reticulocitos de conejo (92). Con los ARNs de cerebro e hipotálamo no obtuvimos ninguna señal al hibridizar con las mezclas 1 y 2.



a b c

Figura 14

Caracterización del mensajero de Somatostatina.

Autoradiografía del Northern. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.5%, formaldehído 2.2 M, amortiguador fosfatos IX, gel de 3 mm de grosor. En este experimento se emplearon tres muestras:

- a).- 20 ug de ARN poly A++ de hipotálamo de rata
- b).- 20 ug de ARN poly A++ de cerebro extrahipotalámico
- c).- 10 ug de ARN de E. coli

Se transfirieron las muestras a papel DBM, empujando amortiguador fosfatos 25 mM pH= 5.5. La hibridización se realizó a 42°C por 36 horas, se empleó 43% formamida deionizada, 5X SSC, 200 ug/ml de ADN de timo de ternera sonificado y desnaturalizado, 5X Denhardt's, 50 mM fosfatos pH=6.5 y 0.1% SDS. Después de la hibridización el papel DBM se lavó con 2X SSC por 10' dos veces, el papel se expuso por 24 horas.

Figura 15.

Esquema de los oligonucleótidos sintetizados para LHRH.

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH

Gly

DISCUSION.

Las neuronas peptidérgicas hipotalámicas que regulan el funcionamiento de la hipófisis, son el blanco de numerosas informaciones internas y externas al organismo. La manera por la cual se lleva a cabo la integración de estas informaciones es poco conocida. Sin embargo, es probable que estas informaciones modifiquen el funcionamiento de la neurona peptidérgica a varios niveles (transcripción, traducción, modificaciones post-traduccionales, transporte, liberación e inactivación) y por analogía con otros sistemas, su respuesta debe estar sometida a un sistema de regulación muy complejo.

El nivel de regulación que intentamos explorar en nuestro grupo de investigación es a nivel de la transcripción, para la cual, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un método que permita cuantificar y caracterizar el peso molecular de los ARN mensajeros para Somatostatina, I.HRH y TRH del hipotálamo de la rata.

Desde hace mucho tiempo se ha estudiado el ARN y existen muchas técnicas que permiten caracterizarlo. Entre estas técnicas se encuentran: La Traducción "In Vitro" (93), "Northern" (94), y la obtención y secuencia de ADN complementario (cDNA).

Todas las técnicas mencionadas presentan ventajas y desventajas. En el caso de traducción "in vitro" se debe contar con: un buen sistema de traducción estandarizado para el mensajero a estudiar; un anticuerpo específico que reconozca a la proteína precursora del

peptido activo; condiciones optimas de inmunoprecipitación (95), y un sistema de análisis optimizado (electroforesis desnaturalizante para proteínas 96). Si todos estos pasos no estan optimizados, se puede llegar a detectar proteínas que resulten falsos positivos. Puede suceder que el sistema de traducción presente ruido de fondo alto y enmascare la proteína buscada, o que el anticuerpo no reconozca a la proteína precursora del péptido activo. Por otro lado, puede ocurrir que no exista proporcionalidad entre la cantidad del ARN y de la proteína inmunoprecipitada y por lo tanto esto invalida la cuantificación. Para el caso de los péptidos hipotalámicos el problema principal es que estos son sintetizados en bajas concentraciones.

La obtención de cDNA y su clonación es un punto muy importante para determinar la estructura primaria de un ARN mensajero. En el laboratorio estamos tratando de obtener los cDNAs para los péptidos hipotalámicos antes mencionados con el objetivo de utilizarlos como mejores rastreadores en los "Northern". No es fácil obtener el cDNA; es necesario copiar los ARNs con transcriptasa reversa para obtener copias de ADN, clonarias en un vector (fagos ó plásmidos) y posteriormente rastrear en el banco creado la clona que contiene la información para el mensajero deseado (97,98,99). Finalmente se determina la secuencia de la clona seleccionada, para confirmar que el cDNA codifica para el péptido que se busca. Como se puede observar son muchos los pasos necesarios para obtener el cDNA; la baja concentración de los mensajeros a estudiar hace necesario obtener un banco de clonas que tenga alrededor de 1 a 10 millones de clonas para tener posibilidad de localizar la clona específica.

La técnica de "Northern" (100) nos permite cuantificar la cantidad de ARNs mensajeros bajo diferentes condiciones, y esta técnica puede volverse más sensible que la Traducción "in vitro", además, podemos estudiar la respuesta inducida a nivel transcripcional al medir la concentración del mensajero deseado. Por otro lado, contamos con los rastreadores para la hibridización en los northern. Esta técnica presenta muchos puntos que deben controlarse y optimizarse. Para obtener la mayor sensibilidad y especificidad posible, nosotros tratamos de cuidar los siguientes parámetros: Electroforesis del ARNm en condiciones desnaturalizantes; transferencia de ARNm del gel al soporte; hibridización del ARNm con el rastreador específico.

Existen varios métodos que permiten separar al ARNm por medio de electroforesis en condiciones desnaturalizantes (75). Nosotros probamos tres tipos de electroforesis en geles de agarosa con agentes desnaturalizantes: Glixal/DMSO; Formaldehído; e Hidróxido de metil mercurio. El primero no funcionó. Esto ha sido observado repetidamente en el laboratorio y al parecer depende del lote de glixal. Los geles de agarosa con hidróxido de metil mercurio son muy tóxicos pero funcionaron muy bien ya que el hidróxido de metil mercurio es un agente desnaturalizante muy energético que reacciona con los átomos de nitrógeno de las bases de los ácidos nucleicos (101). Es importante en la transferencia eliminar el hidróxido de metil mercurio dejando libres los ácidos nucleicos para que puedan interaccionar con el soporte, el método que se utilizó para remover el hidróxido de metil mercurio es eficiente ya que se obtuvieron buenos resultados al transferir el ARN de reticulocitos e hibridizar con oligonucleótidos para globina.

Los geles de agarosa y formaldehído, no tienen la resolución de las electroforesis con hidróxido de metil mercurio ya que las bandas de los ácidos nucleicos que se observan son más anchas. El formaldehído reacciona también con los átomos de nitrógeno de los ácidos nucleicos. Igual que con el hidróxido de metil mercurio, es necesario remover el formaldehído para obtener una buena transferencia. Para esto, empleamos condiciones menos drásticas en la eliminación del formaldehído (consiste en hidrólisis básica). Tanto para el hidróxido de metil mercurio como para el formaldehído no es posible saber si se ha eliminado totalmente el agente desnaturizante; solo se puede asegurar mediante la pérdida del olor y solo en el caso de emplear formaldehído. Tomando como referencia la tinción de los ácidos nucleicos se observó que el hidróxido de metil mercurio se eliminaba mejor. La dificultad para tñir los ácidos nucleicos en los geles de formaldehído pudiera deberse a residuos de formaldehído pegados al ARN que impiden la interacción del bromuro de etidio con el ARN. Otra evidencia de que el formaldehído no se quita completamente, es la baja eficiencia de la transferencia del ADN que observamos cuando se transfirió de un gel de formaldehído comparado a cuando se transfiere de un gel no desnaturizante (tabla III). A pesar de los problemas con los geles de formaldehído, logramos obtener buenos resultados y por ser menos tóxico decidimos seguir empleándolo. Con ambas condiciones obtuvimos que la distancia migrada por el ARNm es directamente proporcional al logaritmo del peso molecular. Comprobando con esto lo reportado en la literatura, es decir se obtenía una buena desnaturización del ARNm. Como ya se mencionó es importante eliminar lo mejor posible los agentes desnaturizantes para obtener una buena interacción entre el soporte (Nitrocelulosa, Papel activado, Gene Screen Plus y Zeta Probe) y los ácidos nucleicos.

Además de la temperatura, la concentración de agentes desnaturalizantes (formamida) determina lo estricto de las condiciones. Es muy importante considerar la homología entre el ARNm y el rastreador; a mayor homología se pueden emplear temperaturas más altas y/o mayores concentraciones de formamida. Los lavados después de la hibridización se pueden hacer con una menor concentración de sal y/o aumentar la temperatura. En el caso contrario si el rastreador no es homogéneo, las condiciones deben relajarse, esto se consigue bajando la temperatura y disminuyendo la concentración de formamida para lograr la hibridización y detectar la señal. Si no se toman en cuenta todas estas consideraciones puede ser que nunca se logre observar una señal.

CONCLUSIONES.

En base en a los resultados obtenidos se puede concluir:

Que de los cuatro tipos de soportes empleados considerando la sensibilidad, solo el papel activado dió buenos resultados, ya que con el pudimos; detectar 0.004% de los mensajeros totales. Cabe mencionar que estos resultados no son definitivos y que es posible que con otros lotes de los papeles probados o bajo otras condiciones experimentales se pueda lograr mejores resultados con los otros soportes: Zeta Probe, Gene Screen Plus, y Nitrocelulosa. Sin embargo los resultados con el papel activado han sido reproducibles y por lo tanto se puede confiar en este método.

Con respecto a la detección de los RNA mensajeros de los neuropéptidos, solo logramos detectar el mensajero para somatostatina. Debido a problemas técnicos, en este experimento no se pudo calcular el peso molecular del ARNm. Estos resultados confirman que se puede detectar un ARNm que corresponde a 0.01% del ARNm total (concentración del ARNm para Somatostatina en el hipotálamo) empleando un plásmido como rastreador.

En el caso de TRH (el cual se encuentra en una concentración aproximadamente igual a Srif en el hipotálamo de la rata) no logramos detectar una señal debido a su baja homología con el rastreador. Actualmente estamos optimizando aún más las condiciones de hibridización. Para el caso del mensajero de LHRH, no se detectó una señal debido a su baja concentración de éste dentro de el hipotálamo de rata. El Dr. Seeburg nos comunicó que con sus estudios calcula una concentración menor a 0.0001% de los mensajeros

total: porcentaje muy inferior al límite de sensibilidad de detección de un RNAm con oligonucleótidos. Pero sin embargo sí logramos detectar un ARNm para globina de reticulocito de conejo empleando oligonucleótidos sintéticos, y obtuvimos un valor para el peso molecular del mensajero detectado igual al reportado en la literatura.

Debido a la baja concentración en que se encuentran los mensajeros para los péptidos hipotalámicos que deseamos estudiar, necesitamos optimizar aún más la sensibilidad del método, ya que hasta el momento solo somos capaces de detectar el ARNm de Somatostatina y probablemente TRH.

A continuación se proponen algunas consideraciones con el fin de aumentar la sensibilidad del método que utilizamos:

- Emplear una fracción de ARNm que haya sido pasada por una columna de oligo dT celulosa dos veces, y si es posible tres veces.

- Aumentar la cantidad de ARNm en los geles de agarosa (así como grosor de estos).

- Utilizar rastreadores con una alta actividad específica aún mayor a la generalmente obtenida o sea alrededor 500-1000 millones cpm/ug, y que no estén contaminados con nucleótidos marcados no incorporados.

- Emplear rastreadores homólogos, para poder jugar más con las condiciones de hibridización y lavado y así detectar mejor la señal.

- Emplear RNAm marcado como rastreador, este se puede sintetizar al clonar el fragmento de ADN rastreador en el plásmido Gemp4, por medio de polimerasa se sintetiza el ARN complementario empleando ribonucleótidos marcados radioactivamente con alta actividad específica (104).

- En el caso de las hibridizaciones con oligonucleótidos, se recomienda emplear oligonucleótidos más largos.

- Cambiar la solución de Denhart's que se emplea en la hibridización por heparina, o bien emplear agentes intensificadores de hibridización como es el dextrán sulfato.

APENDICE 1.

COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVO.

MEDIO M9 (1 litro).

Sales 10X.....	100 ml
Medio Luria	100 ml
MgSO ₄ 0.1 M	10 ml
CaCl ₂ 0.001 M	10 ml
Glucosa 50 %	5 ml
Vitamina B ₁ 0.002%	0.2 ml
Casaminoácidos 20%	20 ml

SALES 10X

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.5 M
KH ₂ PO ₄	0.22 M
NaCl	0.09 M
NH ₄ Cl	0.019 M

Se esteriliza antes de agregar al medio y se ajusta el pH=7.4

MEDIO LURIA (1 litro).

Bacto triptona	10 gr
NaCl	10 gr
Bacto Extracto de Levadura..	5 gr
Ajustar el pH=7.5 con NaOH	

MEDIO MINIMO (1 litro).

Glucosa 20%	10 ml
KH ₂ PO ₄	13.6 gr
K ₂ SO ₄	2.61 gr
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0005 gr
CaCl ₂ 0.01 M	10 ml
MgSO ₄ 0.1 M	10 ml
NH ₄ Cl 8%	10 ml
Ajustar el pH=7.5 con KOH	

APENDICE 2.

AMORTIGUADORES 10X DE LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN .

1).- Polimerasa Klenow.

0.5 M Tris-Cl (pH=7.2)

0.1 M MgSO₄

1 mM Ditiotreititol

500 ug/ml Albúmina Sérica Bovina (libre de RNAsa)

2).-

	Eco RI	Pst I	Hind III	Hinf I
NaCl	100 mM	50 mM	50 mM	50 mM
Tris.Cl pH=7.5	50 mM	10 mM	10 mM	10 mM
MgCl ₂	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
Ditiotreititol	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM

3).- T₄ Polinucleótido Cinas

0.33 M Tris Acetato (pH=7.9)

0.66 M Acetato de potasio

0.10 M Acetato de Magnesio

0.005 M Ditiotreititol

1 mg/ml de Albúmina Sérica Bovina (libre de DNAsa)

Composición de las reacciones

Enzimas de Restricción (2)

1 ug de ADN

2 ul de amortiguador 10X apropiado para la enzima

2 ul de Enzima de restricción

Se ajusta el volumen a 20 ul

Se incuba 2 horas o toda la noche a 37°C

Continuación de apendice 2

Polimerasa Klenow.

1 ug ADN digerido con una enzima de restricción.
2 ul amortiguador 10X
2 nM de cada nucleótido (dCTP, dGTP, dTTP)
2 pM del nucleótido radiactivo (^{32}P)dATP
1 unidad de Polimerasa Klenow
Ajustar el volumen a 25 ul
Se incuba a T. A. por 30' después se adiciona EDTA a 250 mM

 T_4 Polinucleótido Cinasa.

1-50 pM de ADN desfosforilado del extremo 5'
10 ul de amortiguador 10X
50 pM de (^{32}P) ATP (A. E. = 3000 Ci/mmol)
10-20 Unidades de T_4 polinucleótido Cinasa
Ajustar el volumen a 50 ul
Se incuba por 30' a 37°C.

APENDICE 3.

TRATAMIENTO DE GELES DE AGAROSA Y SOPORTES ANTES DE TRANSFERIR.

ARN	Papel Activado	Gene Screen Plus	Zeta Probe	Nitrocelulosa
Tratamiento del gel	El gel se coloca por 30' en NaOH 50 mM			-----
Neutralización del gel	Los geles se lavan por 10' c/vez 1 vez amortiguador fosfatos 250mM pH=6,5 1 vez amortiguador fosfatos 25 mM pH=6,5	2 veces 10X SSC	2 veces con amortiguador TAE	-----
Tratamiento del Soporte	Activación del papel Ver texto.	Lavar la membrana con agua. Saturar 15' con 10XSSC	Saturar 5' con amortiguador TAE	Saturar 15' con 20X SSC
ADN	Papel activado	Gene Screen Plus	Zeta Probe	
Tratamiento del gel	Los geles se colocan en la solución desnaturalizante			
	15' en 1,5 M NaCl 0,5 M NaOH	30' en 0,6 M NaCl 0,4 M NaOH	30' en 0,5 Na Cl 0,2 M NaOH	
Neutralización del gel	Los geles se lavan por 10' c/vez			
	2 veces con amortiguador fosfatos 500 mM pH=5,5 1 vez con amortiguador fosfatos 50 mM pH=5,5	3 veces con 10X SSC	3 veces con amortiguador TAE	
Tratamiento del Soporte	Se realizan las mismas condiciones que para el ARN			

APENDICE 4.

COMPOSICION DE AMORTIGUADORES DE TRANSFERENCIA Y SOLUCIONES DE PRE E HIBRIDIZACION.

Amortiguador de transferencia.

Gene Screen Plus y Nitrocelulosa

Papel Activado

10X SSC

Amortiguador de fosfatos de sodio

1.5 M Cloruro de Sodio

0.025 M pH=5.5

0.15 M Citrato trisódico

Zeta probe

Amortiguador TAF

40 mM Tris-base

20 mM Acetato de Sodio

1 mM EDTA

Ajustar el pH=7.4 con

acido acético

Soluciones de Hibridización.*

Denhart's 50X

2% polivinil pirrolidona (PM. 40 000)

2% Albúmina Sérica Bovina

2% Ficoll (PM 400 000)

DNA de timo de Ternera

Se prepara una solución de DNA 10 ug/ul , se sonica 2 veces por 2'. Antes de emplearlo se calienta a 100°C por 15'.

Amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM para nitrocelulosa se emplea amortiguador fosfato de sodio y potasio 50 mM.

5 % SDS (Dodecil sulfato de sodio)

Formamida deionizada con resina AG 501-X8(D)

20X SSC

* Todas las soluciones empleadas son esterilizadas.

REFERENCES

1. - ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, 1983, GARLAND PUBLISHING, INC. NEW YORK & LONDON, C.13;718-728, C.18; 1013-1018.
2. - GUILLEMIN ROGER, HYPOTHALAMIC HORMONES: RELEASING AND INHIBITING FACTORS, KRIEGER D.T. AND HUGHES J.C., 1980, NEUROENDOCRINOLOGY, EDISS. ASSOCIATES, INC. PUBLISHESSE BOHNERLAND, MASSACHUSSETTS.
3. - HOKFELT T., JAHANSSON O., LJUNDBAL A., LUNDBERG M.J., SCHULTZBERG M., 1980, PEPTIDERGIC NEURONS, NATURE 284;515-521.
4. - BURGUS R., DUNN T.F., DESIDERIO D., WARD D.N., VALE W., GUILLEMIN R., 1970, NATURE, 226, 321-329.
5. - MATSUO H., BABA Y., NOIR R.M., ARIMURA A., SCHALY A., 1971, STRUCTURE OF THE PORCINE LH AND FSH RELEASING HORMONE. PARTE 1: THE PROPOSED AMINOACID SEQUENCE. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 43, 1334-1339.
6. - BRAZEAU P., VALE W., BURGUS R., AND GUILLEMIN R., 1974, ISOLATION OF SOMATOSTATIN A SOMATOTROPIN RELEASE INHIBITING FACTOR OF OVINE HYPOTHALAMIC ORIGIN. CAN. J. BIOCHEM., 52, 1067.
7. - VALE W., SPIESS J., RIVIER C., AND RIVIER J., 1981, SCIENCE, 213, 1324.
8. - RIVIER J., SPIESS J., THORNER M., AND VALE W., 1982, NATURE, 300, 275-278.
9. - KRIEGER D. T., BROWNSTEIN M.J., MARTIN J. B., BRAIN PEPTIDES, WILEY-INTERSCIENCE PUBLICATIONS. JOHN WILEY & SONS. 1983. NEW YORK.
10. - HUGH D. NIALL, 1982, THE EVOLUTION OF PEPTIDES HORMONES, ANN. REV. PHYSIOL., 44, 615-624.
11. - PASANTES H. M., ARECHIGA H. AMINOACIDOS Y PEPTIDOS EN LA INTEGRACION DE FUNCIONES NERVIOSAS, 1983, UNAM.
12. - GUILLEMIN R., HYPOTHALAMIC HORMONES: RELEASING AND INHIBITING FACTORS. NEUROENDOCRINOLOGY, KIEGER D.T., AND HUGHES J.C., EDS. MASSACHUSETTS. 33-44
13. - DOCHERTY K., AND STEINER D.S.T., 1985. ANN. REV. PHYSIOL., 44, 625-638.
14. - BORNE M., ASHE L., MUM B., FORD R.A., AND ALBERTS A.W., 1979, PROC. NALT. ACAD. SCI., 76.
15. - GUMBIERNER B., AND KELLY R. B., PROC. NALT. ACAD. SCI., 78, 318-322.
16. - TANAKA T., McRAE B.J., CHO K., FRANK J.E., JOHNSON D.A., AND POWERS J.C., 1982, J. BIOL. CHEM., 258, 13552-13557.
17. - HOOK W., FIDEN L. E., AND BROWNSTEIN M., 1982 NATURE 297, 241-243.
18. - BRADBURY A. F., FINNIE M.D., AND SMYTH D.G., 1982, NATURE, 298, 686-688
19. - TURNER A. J., 1984, NEUROPEPTIDE PROCESSING ENZYMES, TINS, JULIO, 260.

20. - O'DONOHUE, T.U., 1981. J. BIOL. CHEM., 256: 2163-2167.
21. - TRUEX R.C. AND CARPENTER M.B., 1989. HUMAN NEUROANATOMY. THE WILLIAMS AND WILLIAMS CO. BALTIMORE. 39-41. 498-499.
22. - DUFY-BARBE L., 1985. LAS HORMONAS DEL HIPOTALAMO. MUNDO CIENTIFICO. 5:43,5.
23. - AMOSS M., BURGOS R., BLACKWEL R., VALE W., FELLOWS D., DUILLEMIN R., 1971, BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 44, 205.
24. - KING J. C., ANTHONY E., FITZGERALD M., STOPA E., (1995), LUTEINIZING HORMONE-RELEASING HORMONE NEURONS IN HUMAN PREOPTIC/HYPOTHALAMUS: DIFERENTIAL INTRANEURONAL LOCALIZATION OF IMMUNOREACTIVE FORMS, ENDOCRINOLOGY AN METABOLISM, 130: 1-10.
25. - MILLAR R.P., WEGENER I. AND SCHALLY A. V., (1981), PUTATIVE PROHORMONAL LUTEINIZING HORMONE RELEASING HORMONE , 12. IN: NEUROPEPTIDES. BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL STUDIES. ED. R.P. MILLAR. CHURCHILL LIVINGSTONE EDINBURG.
26. - GAUTRON J.P., PATOU E., AND KORDON C., 1977. NEW DATA ON SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF LHRH IN VARIOUS STRUCTURES OF THE HYPOTHALAMUS., MOL. AND CELL ENDOCRINOLOGY. 8,31-92.
27. - CURTIS A. AND FINK G., A HIGH MOLECULAR WEIGHT PRECURSOR OF LUTEINIZING HORMONE RELEASING HORMONE FROM RAT HYPOTHALAMUS, ENDOCRINOLOGY, 112:1,390.
28. - SEEBURG P.H., ADELMAN J.P., 1984. CHARACTERIZATION OF cDNA FOR PRECURSOR OF HUMAN LUTEINIZING HORMONE RELEASING HORMONE, NATURE, 311:18, 666.
29. - NICOLICS K, MASON A.J., SZONYI E, RAMACHANDRAM J, SEEBURG P., 1985, A PROLACTIN-INHIBITING FACTOR WITHIN THE PRECURSOR FOR HUMAN GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE. NATURE, 316:9,511.
30. - CURBIER P., 1985. SEXUAL DIFFERENTIATION OF POSITIVE FEEDBACK: EFFECT OF CASTRATION AT BIRTH ON ESTRADIOL-INDUCED LUTEINIZING HORMONE SECRETION IN IMMATURE MALE RATS, ENDOCRINOLOGY, 116:1, 142.
31. - GODDARD E. A., MILLAR R. P., AND BERMAN M.C., 1981. FACTORS AFFECTING LUTEINIZING HORMONE RELEASING HORMONE AN SOMATOSTATINA RELEASE FROM RAT HYPOTHALAMI IN VITRO. IN NEUROPEPTIDES BIOCHEMICAL AN PHYSIOLOGICAL MEDICS., R.P. MILLAR.
32. - YEN S.S., REGULATION OF THE MENSTRUAL CYCLE. NEUROENDOCRINOLOGY. KRIEGER D.T. AND HUGHES J.C., EDS. MASSACHUSETTS. 259-272.
34. - GRUMBACH M.M., THE NEUROENDOCRINOLOGY OF PUBERTY, NEUROENDOCRINOLOGY, KRIEGER D.T. AND HUGHES J.C., EDS. MASSACHUSETTS, 249-258.
36. - JACKSON E. M. FEICHLIN S. BARPEU J.R. PUCHARME J.G.. ROCHEFORT, EDS. CENTRAL NERVOUS SYSTEM EFFECTS OF HYPOTHALAMIC HORMONES AND PEPTIDES. RAVEN PRES. NEW YORK. 1979.
37. - NAIR R. M., 1970. STRUCTURE OF PORCINE THYROTROPIN RELEASING HORMONE, BIOCHEMISTRY, 9, 1103-1106.

- 38.- BROWSTFEN M. J., PALKOVITS M., SAAVEDRA J. R., PASSEI R. M., AND UTIGER R. D., 1974, THYROTROPIN RELEASING HORMONE IN SPECIFIC NUCLEI OF RAT BRAIN, SCIENCE, 175, 267-269.
- 39.- RUPNOW J. H., HINKLE P. M., AND DIXON J. F., 1979, A MACROMOLECULE WHICH GIVES RISE TO THYROTROPIN RELEASING HORMONE, BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 89, 721-728.
- 40.- RICHTER K., 1984, J. EMBO, 3, 61
- 41.- JACKSON I. M., WU PING, LECHAN M., 1985, SCIENCE, 229, 1097.
- 42.- LECHAN M., WU PING, JACKSON I. M., HUGH W., COOPERMAN S., MANDEL G., GOODMAN R., 1986, THYROTROPIN RELEASING HORMONE PRECURSOR; CHARACTERIZATION IN RAT BRAIN. SCIENCE, 231, 159.
- 43.- JOSEPH-BRAVO P., CHARLI J.L., PALACIOS J.M., KORDON C., 1979, NEUROTRANSMITTERS ON THE IN VITRO RELEASE OF IMMUNOREACTIVE THYROTROPIN RELEASING HORMONE FROM RAT MEdIOBASAL HYPOTHALAMUS, ENDOCRINOLOGY, 104, 801-806.
- 44.- FINK G., KOCH Y., AND BEN N.A., 1983, TRH IN HYPOPHYSIAL PORTAL BLOOD: CHARACTERISTICS OF RELEASE AND RELATIONSHIP TO THYROTROPIN-RELEASING HORMONE. E.C., GRIFFITHS AND G. W. BENNETT, ED. RAVEN PREESS, NEW YORK, 127-143.
- 45.- KERVIN R.W., AN PYCOCK J., 1973, THYROTROPIN RELEASING HORMONE STIMULATES RELEASE OF C H-DOPAMINS FROM SLICES OF RATS NUCLEUS ACUMBENS IN VITRO, BR. J. PHARMACOL., 67, 323-325.
- 46.- SHARP T., BENNETT G. W., AND MARSDEN C.A., 1982, THYROTROPIN RELEASING HORMONE ANALOGUES INCREASE DOPAMINE RELEASE FROM SLICES OF RAT BRAIN, J. NEUROCHEM., 39, 1763-1764.
- 47.- BIGGINS J.A., DAS S., DODD P.R., EDWODRSON J. A., HURDY J. A., McDERMOSTT J.R., AN SMITH A.I., 1983, STUDIES ON THE RELEASE, DEGRADATION AND PRESINAPTIC ACTIONS OF THYROTROPIN-RELEASING HORMONE. IN THYROTROPIN RELEASING HORMONE, E.C. GRIFFITHS AND G.DW. BENNETT, EDS. RAVEN PRESS. NEW YORK, 241-250.
- 48.- YARBROUGH G.G., 1976, TRH POTENTIATES EXCITATORY ACTIONS OF ACETYLCHOLINA ON CEPEBRAL CORTICAL NEURONES, NATURE, 260, 523-524.
- 49.- SHARP T., BENNET G. W., AND MORSDEN C.A., (1982), THYROTROPIN-RELEASING HORMONE ANALOGUES INCREASE DOPAMINE RELEASE FROM SLICES OF RAT BRAIN, J. NEUROCHEM., 39, 1763-1766.
- 50.- SHARP T., TULLOCH I.F., BENNETT G.W., MORSDEN G., METCALF AND DEITMAR P.W., 1984, ANALEPTIC EFFECTS OF CENTRALLY INJECTED TRH AND ANALOGUES OF TRH IN THE PENTOBARBITONE-ANAESTHETIZED RAT, NEUROPHARMACOLOGY, 23, 339-343.
- 51.- BRATEAU P., VALE W., BURGUS R., BUTCHER L.N., RIVIER M., GUILLEMIN R. J., 1973, SCIENCE, 179, 77-79.
- 52.- CRITCHLOW V., RICE R.W., AND VALE W., (1978), ENDOCRINOLOGY, 101, 1495.

- 53.- BRAIN PEPTIDES , WILEY-INTERSCIENCE PUBLICATIONS. JOHN WILEY & SONS. 1983. NEW YORK.
- 54.- VALE W., RIVIER J., LING N., BROWN M., 1978. BIOLOGIC AND IMMUNOLOGIC ACTIVITIES AND APLICATIONS OF SOMATOSTATIN ANALOGS, METABOLISM, 27;9, 519.
- 55.- RICHTER D., VELL R., 1984, CEL-FREE SYNTHETIZED PRECURSOR TO SOMATOSTATI-28 FROM THE RAT HYPOTHALAMUS, BRAIN RESEARCH, 292, 93-98.
- 56.- FEDTERFREUHD, R. A., VALE W., 1982, HIGH MOLECULAR WEIGHT SOMATOSTATIN SECRETIONS BY CULTURED RAT BRAIN CELLS, BRAIN RESEARCH, 239, 463-477.
- 57.- JOSEPH-BRAVO P., CHARLI J.L., SHERMAN T., BOYER H., BOLIVAR F., AND McKELVY J. F., 1980, IDENTIFICATION OF A PUTATIVE HYPOTHALAMIC mRNA CODING FOR SOMATOSTATINA AND OF ITS PRODUCDTS IN CELL-FREE TRANSLATION, BIOCHEM. BIOPHYS.RES. COMMUN., 94, 1004-1012.
- 58.- SHEN LU-PING, PICKET R. L., RUTHER J. W., 1984, HUMAN SOMATOSTATIN I: SEQUENCE OF THE cDNA, PROC. NATL. ACAD. SCI., 76, 4575-4579.
- 59).- KRIEGER D., BROWNSTEIN M.J., MARTIN J.S., (1983), BRAIN PEPTIDES , PUBLICATIONS JOHN WILEY & SONS, NEW YORK.
- 61.- CLEWELL D. B., 1972, NATURE OF COL E1 PLASMID REPLICATION IN ESCHERICHIA coli IN THE PRESENCE OF CLORAMPHENICOL, J. BACTERIOL., 110, 667-676.
- 62.- CLEWELL D.B., AND HELINSKI D. R., 1972, EFFECT OF GROWTH CONDITIONS ON THE FORMATION OF THE RELAXATION COMPLEX OF SUPERCOILED COL E1 DEOXIRIBONUCLEIC ACID AND PROTEIN IN ESCHERICHIA coli, J. BACTERIOL, 110,1135.
- 63.- SCHELEIF R. T., AND WENSICK P.C., (1981) PRACTICAL METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, SPRINGER VERLAY, NEW YORK, INC. NEW YORK, 107.
- 64.- MANIATIS T., MOLECULAR CLONING. 1982 COLD SPRING HARBOR LABORATORY, ISOLATION OF BACTERIOPHAGUE AND DNA PLASMID, NEW YORK.
- 65.- RADLOFF R., BAVER W., AND VINOGRAD J., 1967, ADYEBOUYANT DENSITY METHOD FOR THE DETECTION AN ISOLATION OF CLOSED CIRCULAR DUPLEX DNA; THE CLOSED CIRCULAR DNA IN HELA CELLS, PROC. NATL. ACAD. SCI., 57, 1514-1521.
- 66.- CLEWELL D. B., AND HELINSKI D. R., 1969. SUPERCOILED CIRCULAR DNA-PROTEIN COMPLEX IN ESCHERICHIA coli PURIFICATION AND INDUCED CORVERSION TO AN OPEN CIRCULAR DNA FORM, PROC. NATL. ACAD. SCI., 62, 1159-1166.
- 67.- MANIATIS T., MOLECULAR CLONING, 1982 COLD SPRING HARBOR LABORATORY, ISOLATION OF BACTERIOPHAGUE AND DNA PLASMID, NEW YORK, 95.
- 68.- ROBERTS R., 1982, RESTRICTION AN MODIFICATIONS ENZYMES AND THEIR RECOGNITION SEQUENCES, NUCLEIC ACIDS RES, 10;R117.
- 69.- MANIATIS T., 1982, ENZYMES USED IN MOLECULAR CLONING, COLD SPRING HARBOR LABORATORY, 98-149.

- 70.- SHARP P. A., SUGRAN B., AND BROOK J. S., 1973, DETECTION OF TWO RESTRICTION ENDONUCLEASE ACTIVITIES IN HAEMOPHYLUS PARAINFLUENZAE USING ANALYTICAL AGAROSE, BIOCHEMISTRY, 12, 3053.
- 71.- MANTATIS T., GEL ELECTROPHORESIS, 1932, COLD SPRING HARBOR LABORATORY, 169.
- 72.- ROSALES R. R., TESIS DE LICENCIATURA EN BIOLOGIA, APORTE A LA PURIFICACION DE GENES TRANSCRIPCIONALES DE VIRUS DE SIMIO 40 (SV40). 1984, FAC. DE CIENCIAS/ IZTACALA UNAM.
- 73.- DELEY R. G., GORDON J. I., BURNS A. T., MULLIVIX K. P., STEIN M. B., AND GOLDBERGER R. I., 1977. PRIMARY ACTIVATION OF THE VILLOGENIN GENE IN THE ROOSTER. JOURN. BIOL. CHEM., 252, 8310-8319.
- 74.- LEDER A. H., 1972, PURIFICATION OF BIOLOGICAL ACTIVE GLOBIN MENSSENGER RNA BY CHROMATOGRAPHY ON OLIGOTHYMIDILIC ACID CELLULOSE, PROC. NATL. ACAD. SCI., 69, 1408.
- 75.- LEHRACH H., DIAMOND D., WOZNEY D., BOEDTKER H., 1977. SDRNA MOLECULAR WEIGHT DETERMINATIONS BY GEL ELECTROPHORESIS UNDER DENATURING CONDITIONS, A CRITICAL REEXAMINATIONS, BIOCHEMISTRY, 16;21, 4743-4751.
- 76.- DE WACHTER R., AND FIERIS W., 1971, METHODS ENZIMOL., 21, 167-187.
- 77.- GOLDBERG D. A., 1980, ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE DROSOPHYLA ALCOHOL DESHIDROGENASE GENE, PROC. NATL. ACAD. SCI, 77, 5794.
- 78.- METHOD IN ENZIMOLGY DETECTION OF RNAs SPECIFIC FRAGMENTS OF DNA FRACTINATION IN GELS OF AGAROSE. VOL. 68.
- 79.- STARK G.R., WAHL G. M., 1977, METHODS FOR DETECTIONS OF SPECIFICS RNAs IN AGAROSE GEL BY TRANSFER TO DIAZOBENZYLXIMETHYL-PAPER AND HIBRIDIZATION WITH DNA PROBES, PROC. NATL. ACAD. SCI., 784, 5350.
- 80.- GOLDBERG M.L., LEFTON R. F., LEFTON R. P., STARK G. R., AND WILLIAMS J.G., 1979, ISOLATION OF SPECIFIC RNAs USING DNA COVALENTLY LINKED TO DIAZOBENZYLXISMETHYL CELLULOSE ON PAPER, METHODS ENZYMOL, 62, 206.
- 81.- METODOLOGIA PROPORCIONADA POR NEW ENGLAND NUCLEAR, GENE SCREEN PLUS, HIBRIDIZATION TRANSFER MEMBRANE.
- 82.- METODOLOGIA PROPORCIONADA POR SCHLEICHER & SCHUELL METHODS FOR THE TRANSFER OF DNA, RNA AND PROTEIN TO NITROCELLULOSE AND DIAZOTIZED PAPER SOLID SUPPORTS.
- 83.- BOLLETTIN 1110, ZETA PROBE (TM) BLOTTING MEMBRANES., BIO-RAD.
- 84.- RIOBY P. W., DIECKMAUN M., RHODES C., AND BORG P., 1977. LABELING DEOXYRIBONUCLEIC ACID TO HIGH SPECIFIC ACTIVITY IN VITRO BY NICK TRANSLATION WITHS DNA POLYMERASA I, J. MOL. BIOL., 113, 237.
- 85.- METODOLOGIA PROVEIDA POR LA CASA COMERCIAL AMERSHAM INTERNATIONAL PLC. AMERSHAM'S NICK TRANSLATION KITS. (MANTATIS T., APENDIX BIOCHEMICAL TECHNIQUES PP. 464).
- 86.- MAXAM A. AND GILBERT W., 1980, SEQUENCING END LABELED DNA WITH BASE-SPECIFIC CHEMICAL CLEAVAGES, METHODS ENZYMOL., 65, 499

- 87.- O'FARRELL F. H., KUTTER E., AND MALCANISHI M., 1980, A RESTRICTION MAP OF THE BACTERIOPHAGE T4 GENOME, *MOLEC. GEN. GENET.*, 174, 121.
- 88.- SHEN LU-FING, RUTHER J.W., 1984, SEQUENCE OF THE HUMAN SOMATOSTATIN GENE, *SCIENCE*, 124, 198.
- 89.- RICHTER K., KANASHIMA E., EDGER E., KREIL G., 1984, BIOSYNTHESIS OF THYROTROPIN RELEASING HORMONE IN THE SKIN OF XENOPUS LAEVIS: PARTIAL SEQUENCE DEDUCED FROM CLONED cDNA.
- 90.- ARAFAL K. DRUNSTEDT J., AND NOYES E., 1981, A GENERAL METHOD FOR DETECTION AND CHARACTERIZATION OF AN mRNA USING AN OLIGONUCLEOTIDE PROBE, *J. BIOL. CHEM.*, 256:2, 1023-1028.
- 91.- SOUTHERN E., DETECTION OF SPECIFIC SEQUENCES AMONG DNA FRAGMENTS SEPARATED BY GEL ELECTROPHORESIS, *J. MOL. BIOL.*, 98, 503-517.
- 92.- EFSTRATIADIS A., KAFATATOS F. C., AND MANIATIS T., 1977, THE PRIMARY STRUCTURE OF RABBIT B GLOBIN mRNA AS DETERMINED FROM CLONED DNA, *CELL*, 10, 571,585.
- 93.- FELHAM R. B., AND JACKSON R. J., 1976, AN EFFICIENT mRNA DEPENDENT TRANSLATIONS SYSTEM FOR RETICULOCTE LYSATES. *JOURN. BIOCHEM.*, 67,247-256.
- 94.- THOMAS P., HYBRIDIZATION OF DENATURED RNA AND SMALL DNA FRAGMENTS TRANSFERRED TO NITROCELLULOSE, *PROC. NATL. ACAD. SCI.*, 77, 5201-5205.
- 95.- LIN C., JOSEPH-BRAVO, SHERMAN T., CHAM L., McKELVY J. F., 1974, CELL-FREE SYNTHESIS OF PUTATIVE NEUROPHYSIN PRECURSOR FROM RAT AND MOUSE HYPHOTALAMIC. *BIOCHEM. BIOPHYS., DRES. COMMUN.*, 89, 943-950.
- 96.- HAMES B. D. AND RICKWOOD D., 1981, GEL ELECTROPHORESIS OF PROTEINS: A PRACTICAL APPROACH. IR PRES LIMITED. LONDON.
- 97.- LAEMMLI S., COHEN M., DAVID I., WIELSEN A., DAVIS A., MARK M., ISOLATION OF cDNA CLONES ENCODING T CELL- SPECIFIC MEMBRANE-ASSOCIATED PROTEINS, *NATURE* 308, 149-158.
- 98.- YOUNG R. A., AND DAVIS R. W., 1983, *SCIENCE*, 222, 778-782.
- 99.- BENTON W. A., AND DAVIS R. W., 1977, SCREENING OF RECOMBINANT CLONES BY HYBRIDIZATION TO SINGLE PLAQUE IN SITU, *SCIENCE*, 196,180.
- 100.- GUILLESPIE D., SPIELGELMAN S., 1965, *J. MOL. BIOL.*, 12, 82D9-842.
- 102.- NYGAARD A. P., & HALL B. D., 1963, *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* 12, 98-104.
- 103.- MEINKOTH AND GEOFFREY WAHL. 1984, HIBRIDIZATION OF NUCLEIC ACIDS IMMOBILIZED ON SOLID SUPPORTS *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 138, 267-284.
- 104.- MELTON D.A. *NUCL. ACIDS. RES.*, 12,7035-7056.