

UCH-FC  
Biotecnología  
W411  
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

**“Construcción de vectores de expresión y obtención de anticuerpos policlonales para los genes *zds1* y *lcyb1* de *Daucus carota* (zanahoria)”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por

**Guillermo Andrés Wegener Klenner**

2011

Santiago, Chile

Directora del Seminario de Título: **Dra. Claudia Stange Klein**





## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

### “CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN Y OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES PARA LOS GENES ZDS1 Y LCYB1 DE DAUCUS CAROTA (ZANAHORIA)”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

### **GUILLERMO ANDRÉS WEGENER KLENNER**

*Dra. Claudia Stange K.*  
**Directora Seminario de Título**

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

*Dr. Michael Handford*  
**Co-Director**

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

**Comisión Evaluadora**  
*Dr. Marcelo Baeza*  
**Presidente Comisión**

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

*Dra. Lorena Norambuena*  
**Evaluador**

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.



Santiago de Chile, Diciembre de 2011

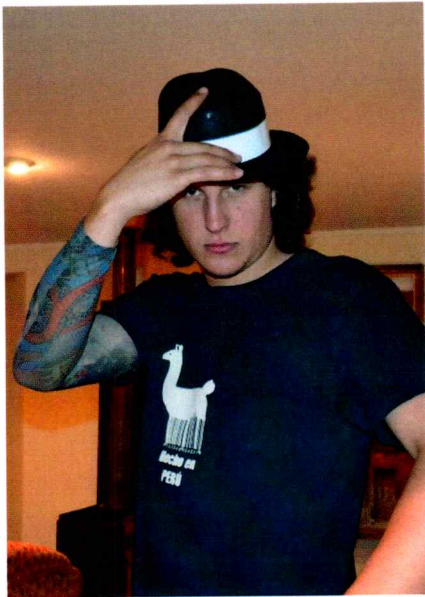
“El error consistió  
en creer que la tierra era nuestra  
cuando la realidad de las cosas  
es que nosotros somos  
de  
la  
tierra”

Nicanor Parra



A mis padres y hermanos...





Nací el 01 de Noviembre de 1984 en la ciudad de Santiago. Soy el del medio de 5 hermanos, el más bullicioso y desordenado. De nombre Guillermo en honor a mi abuelo paterno, del cual siempre fui su “gringo”, y al cual recordaré siempre por sus ganas de vivir la vida y sus incontables historias y moralejas.

Mis primeros años de vida los pasé en La Reina, en un pasaje rodeado de muchos amigos y de un nogal, que para aquellos tiempos era inmensamente gigante, refugio de la primera casa club de mi vida. A mis 5 años nos mudamos a Providencia, al parque Carlos Antúnez, el cual me vio crecer y dio vida a mis infinitas historias de guerra. Mi educación básica y media la realicé en el Instituto Nacional, en donde conocí a muy buenos amigos y excelentes profesores. El colegio dejó una gran marca en mi corazón y guió mis pasos hacia la Universidad de Chile.

Entré a la universidad a estudiar Biotecnología sin estar muy seguro de mi elección, pero prontamente supe que mi decisión había sido la correcta y junto con el básquetbol, la ciencia pasó a formar parte de mi vida. Pasaron hartos años hasta que por fin termina esta etapa, quedando en mí la enseñanza de grandes profesores y la recompensa de haber conocido a muy buenos amigos y de haber vivido increíbles historias junto a ellos.



## AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a mi tutora de este seminario de título, la Dra. Claudia Stange que con mucho cariño, paciencia y dedicación me guió durante todo este proceso, cumpliendo diferentes roles y apoyándome en todo momento. A mis compañeros de *team* y a toda la gente del lab, que hace de ese lugar un ambiente grato, lleno de buena onda y compañerismo.

Quisiera agradecer también a los compañeros del laboratorio de Genética de la Universidad de Chile, y particularmente a Salvador Barahona el cual siempre estuvo con una excelente disposición a responder mis dudas y dispuesto a ayudarme en todo momento.

Gracias Pauli por creer en mí, tu ayuda y cariño fue fundamental para poder sacar esta carrera adelante. A mis amigos de la U y de la vida, Fabián, Pato, Lelo, Seba, Dani, Nacho, Andy, Kraemer, Leo, Gabriela, Vale, Cani, enano, compañeros de infinitas historias y que hacían que todos los días fueran especiales, gracias por los viernes violentos, por los fines y por todos los días.

A mis compañeros de equipo de la U, en especial al Lucho. A mi entrenador Nestor Gutierrez, por todo su cariño, sus enseñanzas, por hacer del equipo una familia y por hacernos mejores deportistas y personas.

A mis amigos del alma, Pablito, Migue y Jose, por su apoyo incondicional, sus enseñanzas, su cariño, por permitirme entrar a sus vidas y convertirse en mis hermanos. Gracias Migue por todo lo que me entregaste en tu vida, por tu manera singular de ver las cosas y por enseñarme a verlas de otro modo, del mismo modo y del contrario. Te extrañaré y recordaré siempre.

A mi amor, mi compañera, mi amiga y mi apoyo incondicional, Franchi, por no abandonar nunca la difícil tarea de hacer que entregara mi tesis, por tu preocupación y dedicación hacia mí y hacia mi familia, nada sería igual sin ti. Eres todo para mí. Gracias a mi nueva mamá, Nolly, por abrir un espacio en tu corazón y quererme como a un hijo más.

Finalmente quiero agradecer a mi familia, mis hermanos, que siempre estuvieron dispuestos a solucionar cualquier problema que tuviese, por poner en práctica en nuestras vidas el dicho "la unión hace la fuerza", y por supuesto a mi madre y mi padre cuyo amor y dedicación incondicional me acompañó a todas partes, gracias por todo el cariño y la formación que me entregaron, que me permitió desenvolverse como una persona. Mi trabajo es para ustedes, que dieron sus vidas por mí.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1 INTRODUCCION .....	1
1.1 Carotenoides .....	1
1.2 Ruta de síntesis de carotenoides. ....	3
1.3 Daucus carota como modelo de estudio.....	5
1.4 Expresión de genes carotenogénicos.....	6
1.5 Importancia de los genes zds 1, zds 2 y lcyB.....	8
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.1 Materiales .....	15
2.1.1 Material biológico .....	15
2.1.2 Cepas Bacterianas .....	15
2.1.3 Medios de Cultivo. ....	15
2.1.4 Reactivos .....	15
2.1.5 Vectores de clonamiento y expresión.....	16
2.2 Métodos .....	20
• Clonamiento de los genes zds1 y lcyb1.....	20
2.2.1 Extracción de RNA desde tejido vegetal. ....	20
2.2.2 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	21
2.2.3 Reacción de Transcriptasa Reversa (síntesis de cDNA).....	21
2.2.4 RT- PCR .....	22
2.2.5 PCR colonias de <i>E.coli</i> .....	22
2.2.6 Reacción de adenilación.....	23
2.2.7 Ligación al vector de clonamiento pCR®8/GW/TOPO® (pCR8).....	24
2.2.8 Ligación a los vectores de expresión pET28a y pMAL-c2E.....	25
2.2.9 Digestiones enzimáticas.....	25
2.2.10 Purificación de DNA desde geles de agarosa .....	25
2.2.11 Cultivo de <i>E.coli</i> cepa DH5α y BL21(DE3) .....	25

2.2.12	Células <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ y BL21 (DE3) electrocompetentes.....	26
2.2.13	Transformación de células <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ y BL21 (DE3) electrocompetentes.....	26
•	Inducción de la síntesis de proteínas recombinantes en células <i>E.coli</i> BL21(DE3).....	27
2.2.14	Inducción de la síntesis de proteínas recombinantes mediante el sistema de expresión pMAL c-2E/BL21(DE3) .....	27
2.2.15	Purificación mediante columna de afinidad a amilosa.....	28
2.2.16	Inducción de la síntesis de proteínas recombinantes mediante el sistema de expresión pET28a/BL21(DE3).....	29
2.2.17	Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).....	29
•	Obtención de anticuerpos policlonales anti-ZDS1.....	30
2.2.18	Inmunización de ratones.....	30
2.2.19	Western blot .....	30
3	RESULTADOS .....	32
3.1	Clonamiento de los genes <i>zds1</i> y <i>lcyb1</i> de <i>Daucus carota</i> .....	32
3.2	Obtención de los vectores de clonamiento pCR8- <i>zds1</i> y pCR8- <i>lcyb1</i> .....	33
3.3	Obtención de los vectores de expresión pET28a- <i>z1</i> , pET28a- <i>lcyb1</i> , pMAL- <i>z1</i> y pMAL- <i>lcyb1</i> .....	35
3.4	Secuenciación de los genes <i>zds1</i> y <i>lcyb1</i> . .....	38
3.5	Expresión del gen <i>zds1</i> a partir del vector de expresión pMAL. ....	39
3.6	Determinación de la presencia de anticuerpos policlonales anti-ZDS1 en el suero de ratones inmunizados.....	42
4	DISCUSIÓN .....	46
4.1	Amplificación de los genes <i>zds1</i> y <i>lcyb1</i> y obtención de los vectores de clonamiento pCR8- <i>zds1</i> y pCR8- <i>lcyb1</i> .....	46
4.2	Obtención de los vectores de expresión pMAL- <i>zds1</i> , pMAL- <i>lcyb1</i> , pET28a- <i>zds1</i> y pET28a- <i>lcyb1</i> .....	47
4.3	Expresión de las proteínas recombinantes a partir de los vectores pMAL- <i>zds1</i> y pMAL- <i>lcyb1</i> y purificación de la proteína ZDS1-MBP.....	49
4.4	Expresión de la proteína recombinante ZDS1-HIS a partir del vector pET28a- <i>zds1</i> ...	51
4.5	Western blot anti His y anti-ZDS1.....	53
5	LOGROS .....	56
6	PROYECCIONES.....	57
7	BIBLIOGRAFÍA.....	58
8	ANEXO .....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ruta de síntesis de carotenoides en plantas.....	5
<b>Figura 2:</b> Niveles de RNAm de los genes <i>psy1</i> , <i>psy2</i> , <i>pds</i> , <i>zds1</i> , <i>zds2</i> y <i>lcyb</i> durante el desarrollo en la oscuridad de la raíz modificada de <i>Daucus carota</i> .....	9
<b>Figura 3:</b> Niveles de los carotenoides durante el desarrollo de <i>D. carota</i> . .....	10
<b>Figura 4:</b> Niveles de carotenoides en tejido fotosintético (hojas) de las líneas AS, ASD, S de <i>D. carota</i> . .....	12
<b>Figura 5:</b> Vector de clonamiento pCR8.....	17
<b>Figura 6:</b> Vector de expresión pMAL-c2E. ....	18
<b>Figura 7:</b> Vector de expresión pET28a.....	19
<b>Figura 8:</b> Amplificación por RT-PCR de los genes <i>zds1</i> y <i>lcyb1</i> . ....	32
<b>Figura 9:</b> Digestión de las construcciones pCR8- <i>zds1</i> y pCR8- <i>lcyb1</i> con la enzima de restricción <i>EcoRI</i> .....	34
<b>Figura 10:</b> Determinación de la orientación del gen <i>zds1</i> en las construcciones pET28a- <i>zds1</i> y pMAL- <i>zds1</i> mediante digestión con la enzima de restricción <i>BamHI</i> . ....	36
<b>Figura 11:</b> Determinación de la orientación del gen <i>lcyb1</i> en las construcciones pET28a- <i>lcyb1</i> y pMAL- <i>lcyb1</i> mediante digestión con la enzima de restricción <i>HindIII</i> . ....	37
<b>Figura 12:</b> Expresión de la proteína ZDS1-MBP en <i>E.coli</i> y purificación mediante cromatografía de afinidad a maltosa. ....	41
<b>Figura 13:</b> Inducción de dos colonias bacterianas que expresan la proteína ZDS1-His.....	43
<b>Figura 14:</b> Comprobación de la presencia y expresión de la proteína ZDS1-His. ....	44
<b>Figura 15:</b> Western blot anti-ZDS1 utilizando el suero de ratones inmunizados. ....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I:</b> Cepas bacterianas utilizadas durante el seminario de título. ....	15
<b>Tabla II:</b> Partidores utilizados durante el seminario de título. ....	23
<b>Tabla III:</b> Programas utilizados para la amplificación por RT-PCR (A) y PCR (B) .....	24

## LISTA DE ABREVIATURAS

1Kb	Marcador de peso molecular 1Kb
DNA	Ácido desoxi ribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
Amp	Ampicilina
BSA	Seroalbúmina de bovino
dNTPs	Deoxiribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Etilendiaminotetraacetato ácido
$\bar{g}$	Fuerza de gravedad
g	Gramo
Ori	Origen de Replicación
IPTG	Isopropil tio- $\beta$ -D-galactósido
kDa	Kilodalton
LB	Medio Luria-Bertani
M	Molar
MBP	Proteína de unión a Maltosa
MCS	Sitio Múltiple de Clonamiento
min	Minutos
mL	Mililitros
ORF	Marco de lectura abierto
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
$\mu$ F	Microfaradios
V	Voltio
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
$^{\circ}$ C	grados Celsius

## RESUMEN

Los carotenoides son compuestos isoprenoides sintetizados por plantas, algas, bacterias y hongos. En plantas son sintetizados en plastidios y cumplen funciones de vital importancia ya que son componentes esenciales de las membranas. Están involucrados en procesos como la fotosíntesis, la fotoprotección y la disipación térmica y además en la síntesis de la hormona vegetal ácido abscísico y estringolactonas. La ruta de síntesis de carotenoides ha sido ampliamente estudiada y las enzimas que participan han sido descritas en una serie de especies vegetales. Muchos de estos estudios se centran en las enzimas ZDS1, que cataliza la formación de dobles enlaces a partir de  $\zeta$ -caroteno para formar licopeno, y LCYB que cicla los extremos del licopeno para formar  $\beta$ -caroteno.

En resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, determinamos que durante el desarrollo de *Daucus carota* no existe una correlación entre la expresión de algunos genes de la ruta carotenogénica, como *zds1* y *lcyb1*, y la acumulación de carotenoides, especialmente en hojas. Estos resultados evidencian la necesidad de contar con anticuerpos que reconozcan las proteínas de la ruta para cuantificar sus niveles y determinar posibles regulaciones o modificaciones post-traduccionales.

En este trabajo se clonaron y se obtuvieron vectores de expresión para los genes *zds1* y *lcyb1*, cuyos vectores fueron diseñados para la obtención de anticuerpos policlonales y la detección de dichos anticuerpos presentes en el suero de ratones inmunizados mediante *Western blot*. Los genes se clonaron en los vectores de expresión pET28a y pMALc-2E, los que generan proteínas de fusión a una repetición de aminoácidos de Histidina y a la proteína de unión a maltosa respectivamente, obteniéndose finalmente los vectores de expresión pET28a-*zds1*,

pMAL-zds1, pET28a-lcyb y pMAL-lcyb. Mediante la utilización del sistema de expresión *E.Coli* BL21 (DE3)/pMAL-zds1 se logró expresar de manera soluble la proteína de fusión ZDS1-MBP y utilizando una columna de afinidad a maltosa se obtuvo una fracción enriquecida de la proteína de fusión, la cual se utilizó para inyectar ratones para obtener anticuerpos policlonales anti-ZDS1.

Para determinar la presencia de anticuerpos policlonales anti-ZDS1 en el suero de ratones inmunizados, se hibridó con el extracto de *E.coli* BL21(DE3)/pET28a-zds1 con el que se obtuvo la proteína recombinante ZDS1-His en la fracción insoluble de las células inducidas, lo cual fue corroborado mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo comercial anti-His. Los sueros obtenidos de ratones inmunizados con ZDS1-MBP reaccionaron con la banda esperada de 63 KDa correspondiente a ZDS1, con lo que concluimos que durante este trabajo se obtuvieron los anticuerpos policlonales anti-ZDS.



## ABSTRACT

Carotenoids are isoprenoid compounds synthesized by plants, algae, bacteria and fungi. In plants, they are synthesized in plastids and play important roles as essential components of membranes. They are involved in processes such as photosynthesis, photoprotection and thermal dissipation. In addition, they are precursors of abscisic acid and stringolactones. The carotenoid biosynthetic pathway has been extensively studied and the enzymes involved have been described in many plant species.

In previous research done in our group, determined that during *Daucus carota* development, the expression of some carotenogenic genes do not correlate with the accumulation of carotenoids, specially in leaves. This fact establishes the need for antibodies, which can recognize proteins involved in the carotenoid route in order to quantify their levels and identify possible regulation or post-translational modifications.

In this work, expression vectors for *zds1* and *lcyb1* genes were cloned and obtained. These vectors were design to produce polyclonal antibodies, and to detect said antibodies present in the serum of immunized mice using Western blot. As expression vectors, pET28a and pMALc-2E were used, generating a fusion protein to a repeat sequence of histidine amino acids and to maltose binding protein, respectively. Vectors pET28a-*zds1*, pMAL-*zds1*, pET28a-*lcyb* y pMAL-*lcyb* were obtained. Using the expression vector system *E. coli* BL21(DE3)/pMAL-*zds1*, a soluble fusion protein ZDS1-MBP was obtained. In addition, we used a maltose affinity column to purify an enriched fraction, and this was injected into mice to obtain polyclonal anti-ZDS.

Finally, to determine the presence of anti-ZDS1 polyclonal antibodies in the serum of immunized mice, we used the expression system *E. coli* BL21 (DE3) / pET28a-*zds1*, obtaining

the recombinant protein ZDS1-His in the insoluble fraction of induced cells, confirmed by Western blot using a commercial anti-His antibody. The sera obtained from immunized mice were analyzed, and the expected 63 kDa band for ZDS1 was detected, confirming that we obtained a useful anti ZDS antibody.

## 1 INTRODUCCION

### 1.1 Carotenoides

Los carotenoides son compuestos lipídicos isoprenoides sintetizados por una gran diversidad de organismos tales como plantas, algas, bacterias y hongos. Poseen una larga cadena liposoluble de 40 carbonos, la que puede tener 15 enlaces conjugados (Armstrong y Hearst, 1996; Giorio y col., 2007; Taylor y Ramsay, 2005). La cantidad de enlaces conjugados presentes en las moléculas de carotenoides determina la coloración que éste poseerá, así a mayor cantidad de dobles enlaces conjugados los carotenoides absorben fotones de mayor longitud de onda (y por ende de menor energía), otorgándoles coloraciones amarillas, naranjas e incluso rojas. Por ejemplo, el  $\beta$ -caroteno que presenta 11 enlaces conjugados posee una coloración naranja intensa.

Además, debido a la estructura de sus dobles enlaces, los carotenoides son capaces de hacer resonar electrones en su esqueleto carbonado, permitiendo la absorción de electrones desapareados de radicales libres (Britton, 1995; Nelson y col., 2003), lo que les otorga su importante función antioxidante.

Los carotenoides cumplen funciones de vital importancia tanto para plantas como para animales. En plantas son componentes esenciales de las membranas y participan en una serie de procesos fisiológicos como la fotosíntesis, la fotoprotección y la disipación térmica. En la fotosíntesis forman parte de los sistemas cosechadores de luz, ampliando las longitudes de onda (entre 400 a 500 nm) captadas por la clorofila (Britton, 1995; Schmid, 2008; Young y col., 1993).

También protegen a la planta del daño oxidativo producido por especies reactivas del oxígeno (singlete del oxígeno y radical superóxido) y por el triplete excitado de la clorofila generado durante el proceso de fotosíntesis (Armstrong y Hearst, 1996; Cunningham y Gantt, 1998; Giorio y col., 2007; Takano y col., 2005; Telfer, 2005). Son también precursores de la hormona vegetal ácido abscísico (ABA) y estringolactonas, las que cumplen importantes roles en el desarrollo y crecimiento de las plantas, en la dormancia de semillas y en la respuesta a diferentes tipos de estrés (Chen y col., 2008; Milborrow, 2001).

Debido a que son compuestos coloreados, los carotenoides se evidencian en hojas senescentes, en las raíces de reserva y en flores y frutos donde son de suma importancia para los procesos de polinización y atracción de agentes dispersadores de semillas (Armstrong y Hearst, 1996; Grotewold, 2006).

En animales, algunos carotenoides, como el  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -caroteno, son precursores de la vitamina A, la cual es esencial para el desarrollo de una serie de tejidos como dientes, piel y algunas mucosas, además de cumplir numerosas funciones de señalización durante el desarrollo (Fraser y Bramley, 2004; Garattini y col., 2007; Tafti y Ghyselinck, 2007). Como los animales no pueden sintetizar los carotenoides, éstos deben ser incorporados en la dieta. Los carotenoides también ejercen actividad antioxidante, permitiendo retardar el envejecimiento, prevenir y retardar el daño celular y disminuir la probabilidad de desarrollar algunos tipos de cáncer (Breimer, 1990; Esterbauer y col., 1992; Garattini y col., 2007; Mayne, 1996; Rao y Rao, 2007; Snodderly, 1995).

## 1.2 Ruta de síntesis de carotenoides.

Dada la relevancia de los carotenoides en plantas y animales es que la biosíntesis de carotenoides se ha estudiado desde hace más de 30 años y ya se han identificado la mayoría de los genes involucrados en la síntesis de carotenoides en numerosas especies vegetales, así como en bacterias y levaduras (Cunningham y Gantt, 1998; Cunningham y col., 2002; Howitt y Pogson, 2006).

La síntesis de carotenoides en plantas ocurre en los plastidios de las células vegetales, como son los cloroplastos en hojas (tejido fotosintético) y los cromoplastos en flores, frutos y raíces modificadas. Esta biosíntesis comienza con la formación del isoprenoide isopentenil pirofosfato (IPP), el cual puede ser sintetizado por dos rutas, una citoplasmática que corresponde a la ruta del ácido mevalónico (MVA) en la que el IPP sintetizado se utiliza principalmente para la síntesis de esteroides y ubiquinonas (Disch y col., 1998), y otra plasmidial llamada MEP (2C-metil D-eritritol 4-fosfato) en la que el IPP sintetizado se utiliza para la síntesis de clorofila, tocoferoles y carotenoides (Lichtenthaler y col., 1997; Schwender y col., 1997). El IPP en los plastidios se isomeriza a dimetilalil pirofosfato (DMAPP) por la enzima IPP isomerasa (IPI), para luego condensarse con tres moléculas de IPP mediante la acción de la enzima geranylgeranyl pirofosfato sintasa (GGPS) formándose una molécula de 20 carbonos denominada geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). Luego, dos moléculas de GGPP se unen cola-cola mediante la enzima fitoeno sintasa (PSY) para dar origen al primer carotenoide de la ruta, el fitoeno.

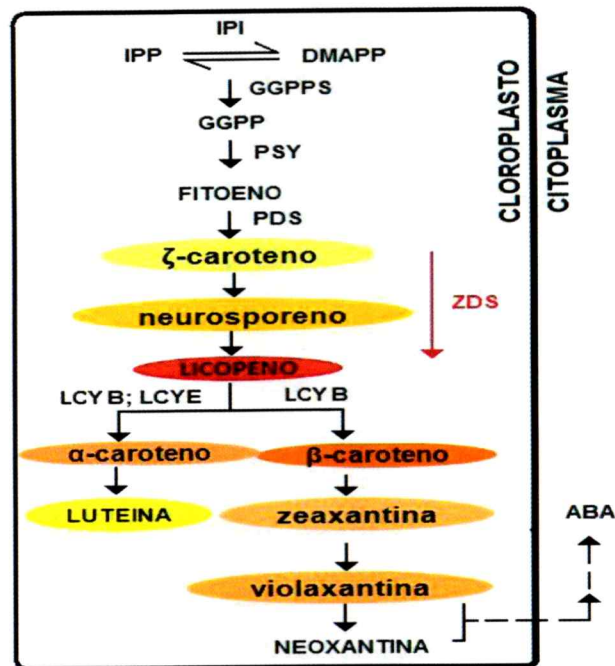
El fitoeno sufre dos desaturaciones mediadas por la enzima fitoeno desaturasa (PDS) originando los carotenoides fitoflueno y  $\zeta$ -caroteno. Posteriormente, la enzima  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS) utiliza estos carotenoides para dar origen a neurosporeno y licopeno (Figura

1). En esta etapa se generan los primeros carotenoides coloreados que van desde un amarillo pálido en el  $\zeta$ -caroteno hasta un color rojo en el licopeno.

En este punto la ruta de síntesis de carotenoides sufre una importante bifurcación, en la cual el licopeno puede ser ciclado en sus dos extremos por la enzima licopeno  $\beta$ -ciclase (LCYB) originando  $\beta$ -caroteno, o ciclado en uno de sus extremos por la enzima licopeno  $\epsilon$ -ciclase (LCYE) y en el otro por la enzima licopeno  $\beta$ -ciclase, para originar  $\alpha$ -caroteno (Figura 1).

Hasta este punto de la ruta los compuestos se llaman carotenoides, mientras que las reacciones posteriores involucran la adición de grupos hidroxilos a los carotenoides, generando las xantófilas. El  $\alpha$ -caroteno puede ser hidroxilado por la acción de las enzimas  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (C $\beta$ Hx) y  $\epsilon$ -caroteno hidroxilasa (CeHx), produciendo luteína, mientras que el  $\beta$ -caroteno puede ser hidroxilado por la C $\beta$ Hx generando zeaxantina.

En esta última rama, la zeaxantina puede ser epoxidada por la acción de la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP) formando violaxantina, sobre la cual actúa la enzima neoxantina sintasa (NXS) para generar neoxantina. Estos compuestos (violaxantina y neoxantina) son los precursores plastidiales de la hormona vegetal ácido abscísico (ABA) (Nambara y Marion-Poll, 2005).



Modificado de Dong et al, 2007

**Figura 1: Ruta de síntesis de carotenoides en plantas.** Diagrama simplificado de la ruta de síntesis de carotenoides con las principales enzimas y productos. IPI, isopentenil isomerasa; IPP, isopentenil pirofosfato; DMAPP, dimetilalil pirofosfato; GGPPS, geranylgeranyl pirofosfato sintasa; GGPP, geranylgeranyl pirofosfato; PSY, fitoeno sintasa; PDS, fitoeno desaturasa; ZDS, ζ-caroteno desaturasa; LYCB, licopeno β-cilcasa; LCYE, licopeno ε-cilcasa; ABA, ácido abscísico. (Dong y col., 2007)

### 1.3 *Daucus carota* como modelo de estudio

*Daucus carota*, zanahoria, es una planta bienal, dicotiledónea de la familia de las Apiáceas, que se caracteriza por tener una raíz modificada o de reserva que acumula grandes cantidades de β-caroteno (8,59 mg/g de peso fresco, (Fraser y Bramley, 2004)), por lo que constituye una gran fuente de vitamina A. La zanahoria también sintetiza carotenoides en hojas, las que se encuentran expuestas a la luz, por lo que los genes carotenogénicos podrían estar activados por luz al igual como se ha descrito en otros modelos vegetales tales como *A.thaliana*, *Lycopersicon esculentum* (tomate) y *Sinapsis alba* (mostaza) (Hirschberg, 2001; von Lintig y

col., 1997), entre otros. Sin embargo, la raíz modificada se encuentra en oscuridad, por lo que la luz no sería un efector de la síntesis de carotenoides en este órgano. Esto plantea a la zanahoria como un interesante modelo de estudio que permita definir los mecanismos moleculares involucrados en la síntesis de carotenoides bajo condiciones de oscuridad.

En otros modelos vegetales que sintetizan carotenoides se ha descrito más de un gen que codifica para una enzima con la misma actividad enzimática. En tomate, por ejemplo, se han descrito dos genes que codifican para la enzima PSY y LCYB, uno de ellos, los genes *psy2* y *lcyb1*, con expresión predominante en tejido fotosintético es decir asociados a cloroplasto y los genes *psy 1* y *lcyb2 (cycb)* asociados a cromoplasto y que se expresan durante la maduración del fruto (Fraser y col., 1994; Fraser y col., 1999; Ronen y col., 2000). En zanahoria también se han identificado más de un gen que podría estar asociado a la misma actividad enzimática, como es el caso de los genes *psy1* (código de acceso DQ192186) y *psy2* (código de acceso DQ192187), *zds1* (código de acceso DQ222430) y *zds2* (código de acceso DQ192189), *lcyb1* (código de acceso DQ192190) y *lcyb2* (código de acceso DQ 192191), secuencias descritas por Just y col (Just y col., 2007). Es importante destacar que *Daucus carota* corresponde al único modelo vegetal en el cual se han descrito dos genes con posible actividad  $\zeta$ -caroteno desaturasa, los genes *zds 1* y *2*.

#### **1.4 Expresión de genes carotenogénicos**

La mayoría de los estudios de expresión de la ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas, se centran en la cuantificación de RNAs mensajeros de genes de la ruta, en diferentes condiciones y tejidos (Clotault y col., 2008; Guo y col., 2009; Tao y col., 2007; Yamamizo y col.), encontrándose en algunos de estos estudios una correlación entre la acumulación de



carotenoides y los niveles de expresión de algunos genes. Sin embargo, dicha correlación no se observa para todos los genes, evidenciando la existencia de modificaciones post-traduccionales, las cuales incrementan la complejidad y aumentan la dinámica de las proteínas, coordinando la compleja regulación de este proceso biológico (Cunningham y col., 2002; Kwon y col., 2006). Un ejemplo claro de esto se aprecia en la variedad de zanahoria blanca, la cual no acumula pigmentos, pero en la que sí se observa la expresión de los genes carotenogénicos (Clotault y col., 2008).

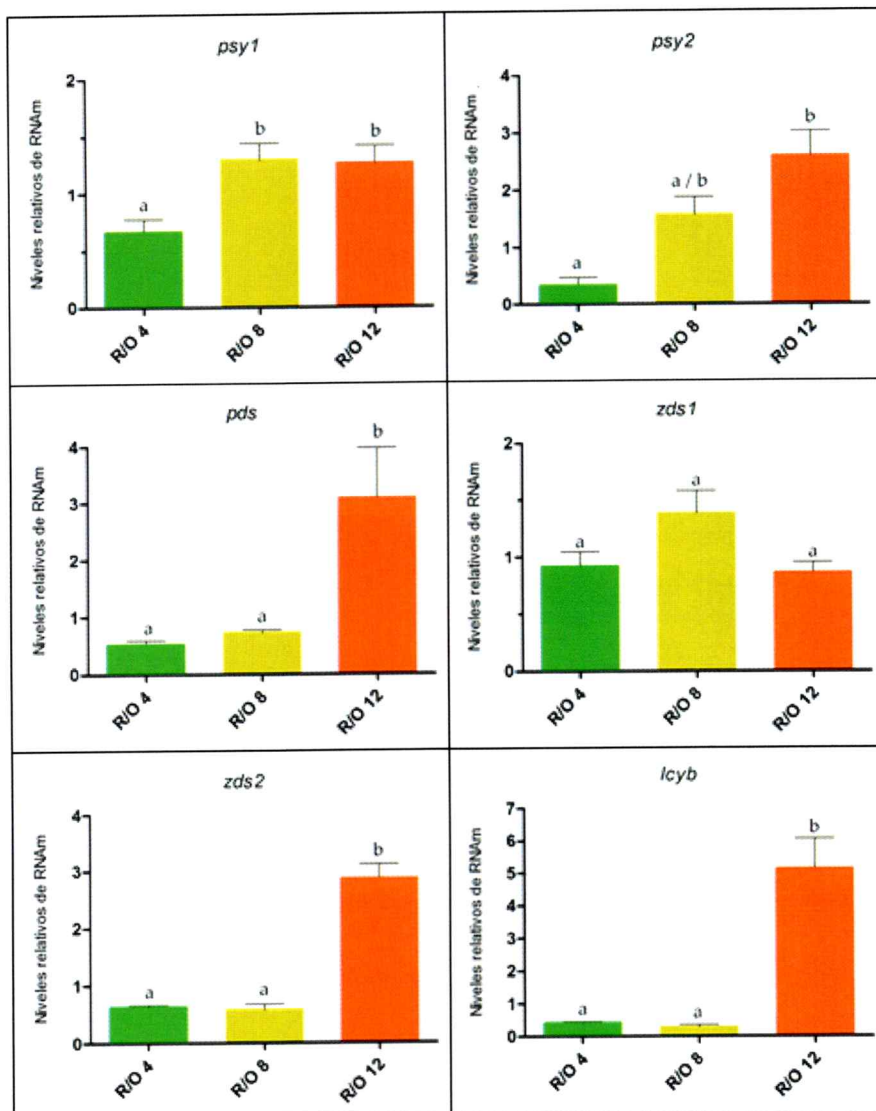
También existen estudios sobre la expresión de genes carotenogénicos en otros modelos vegetales pero muy pocos hacen análisis acabados de la cuantificación de los niveles de alguna proteína carotenogénica (Dogbo y col., 1988; Maass y col., 2009; Simkin y col., 2003). Una de las razones de la falta de estos estudios, es la carencia de anticuerpos específicos que reconozcan proteínas de la ruta y que permitan detectar y cuantificar los niveles de éstas para poder determinar relaciones entre los niveles de carotenoides, cantidad de las enzimas presentes en un tejido determinado y la expresión del gen que codifica dicha enzima carotenogénica. En Maas et al., (2009) desarrollaron un anticuerpo anti- PSY (fitoeno sintasa) de *Arabidopsis thaliana*, el cual utilizaron para corroborar que al sobre expresar el gen *psy* de *A. thaliana* también se elevó el nivel de la proteína en las plantas transgénicas, correlacionando con la cantidad y tipo de carotenoides presentes en las plantas. En nuestro laboratorio, hemos sobre-expresado los genes *psy1*, *zds2*, *lcyb1* en la planta modelo *Nicotiana tabacum* (tabaco) observando un aumento en los niveles de carotenoides. Sin embargo, no siempre existe una correlación directa de la tasa de expresión con el aumento en la cantidad de los pigmentos como luteína,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno en las hojas de las plantas transgénicas.

### **1.5 Importancia de los genes zds 1, zds 2 y lcyB.**

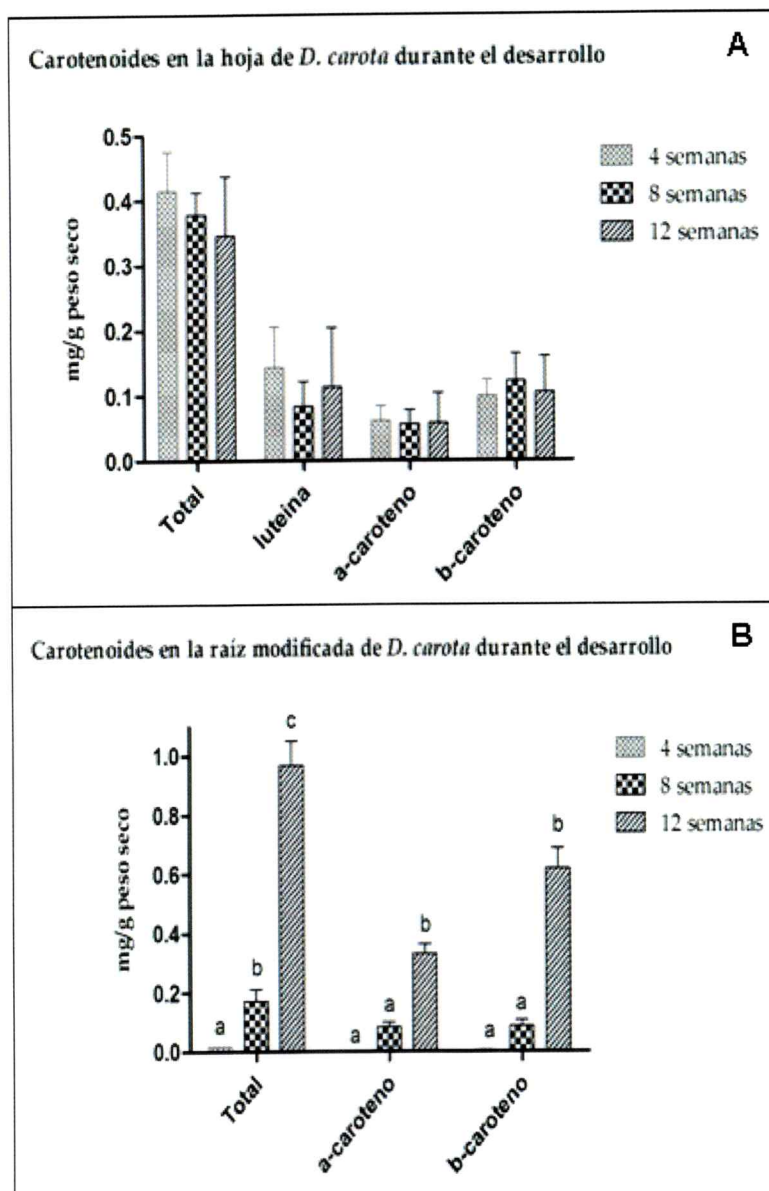
En nuestro laboratorio se determinó mediante PCR en tiempo real los niveles de los RNAm de los genes de la ruta de síntesis de carotenoides en diferentes tejidos (hojas y raíz modificada) y en diferentes estados de desarrollo (Figura 2), encontrándose que los genes que presentaron un mayor aumento al avanzar el estado de desarrollo, fueron los genes lcyb1 y zds2.

El gen lcyb1 presentó un aumento de 16 veces y el gen zds2 de 4 veces, comparando los valores obtenidos para la raíz modificada de 4 semanas de desarrollo (planta joven) con la de 12 semanas de desarrollo (planta madura). Sin embargo, esta tendencia de aumento de expresión a medida que avanza el estado de desarrollo no se observó para todos los genes de la ruta. Por el contrario, la expresión del gen psy2 disminuye en hojas (datos no mostrados) y el gen zds1 se mantiene constante durante el desarrollo de la planta (figura 2) (Fuentes, 2009).

También en nuestro laboratorio, se determinó mediante HPLC la cantidad de carotenoides presentes en la raíz modificada y en hojas en los diferentes estados de desarrollo antes descritos (Figura 3), observándose un aumento en la acumulación de carotenoides en la raíz de reserva a medida que avanza el estado de desarrollo, en cambio en hojas la cantidad de carotenoides se mantuvo constante en los diferentes estados de desarrollo.



**Figura 2:** Niveles de RNAm de los genes *psy1*, *psy2*, *pds*, *zds1*, *zds2* y *lcyb* durante el desarrollo en la oscuridad de la raíz modificada de *Daucus carota*. El calibrador utilizado en cada gráfico corresponde al promedio de las réplicas obtenidas en los tres estados de desarrollo. R/O: Raíz en oscuridad a diferentes semanas de desarrollo. Distintas letras indican diferencias significativas determinadas por el test de Kruskal Wallis y post-test de Dunn ( $p < 0,05$ ) (Fuentes, 2009).

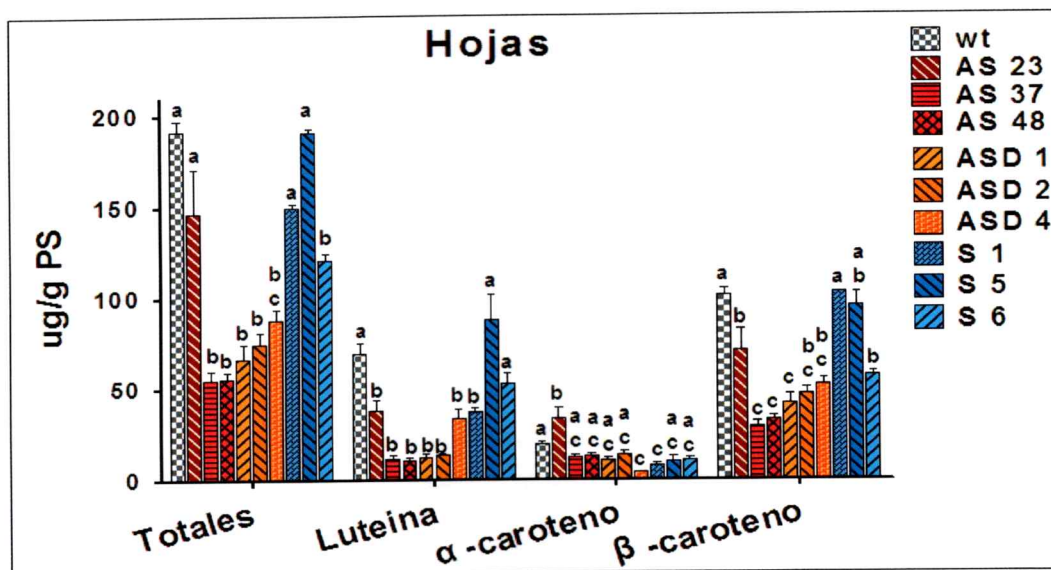


**Figura 3: Niveles de los carotenoides durante el desarrollo de *D. carota*.** (A) Niveles de los carotenoides en las hojas de *D. carota*; (B) Niveles de los carotenoides en la raíz modificada de *D. carota*. Las mediciones fueron realizadas mediante HPLC. Letras distintas indican diferencias significativas tras los análisis de ANOVA de dos vías ( $P < 0,05$ ) y post-test de Bonferroni. (Resultados no publicados)

Por lo tanto, no se observó una correlación entre el aumento en los niveles de los transcritos de todos los genes carotenogénicos con el desarrollo de la planta y la acumulación de carotenoides en los diferentes tejidos. Este fenómeno se evidencia aún más en las hojas, donde se mantiene constante la cantidad de carotenoides pero se ve un aumento en los niveles de los transcritos (menos el gen *zds1*) con el desarrollo de la planta (datos no mostrados).

Además en nuestro laboratorio se desarrollaron líneas transgénicas de *Daucus carota* silenciadas para los genes *zds2* y *lcyb1* y aunque el gen *zds2* presenta uno de los mayores aumentos en los niveles de transcritos, las plantas silenciadas para este gen no presentaron una disminución en la cantidad total de carotenoides ni en la acumulación de  $\beta$ -caroteno, tanto en la raíz modificada como en las hojas (Flores, 2011). Estos resultados estarían sugiriendo que el gen *zds2* no es esencial, que da origen a una proteína no funcional y/o que no hay traducción o acumulación de esta proteína, lo cual no es posible de determinar debido a la carencia de anticuerpos anti-ZDS.

A diferencia del gen *zds2*, el gen *lcyb* aumenta su tasa de transcrito durante el desarrollo, lo que en la raíz modificada se correlaciona con la composición de carotenoides. Además, en plantas silenciadas para el gen *lcyb* se observó entre un 40% y 60% de disminución en los carotenoides totales en raíz de reserva y hojas, respectivamente, y un porcentaje similar para el  $\beta$ -caroteno tanto en la raíz como en las hojas, observando además una disminución en la acumulación de otros carotenoides tales como luteína y  $\alpha$ -caroteno (Figura 4) (Pizarro, 2008).



**Figura 4: Niveles de carotenoides en tejido fotosintético (hojas) de las líneas AS, ASD, S de *D. carota*.** Mediante espectrofotometría y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se determinaron la concentración de carotenoides (ug/g de peso seco) en las líneas transformadas AS23, AS37, AS48, ASD1, ASD2, ASD4, S1, S5, S6 (que corresponden a líneas con diferentes grados de silenciamiento para el gen *lcyb1*) y plantas silvestres (wt). Concentración de carotenoides totales (Totales), luteína,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno. Este experimento se realizó por triplicado en plantas transformadas y silvestres de 3 meses de edad y los resultados fueron analizados mediante ANOVA de una vía ( $p < 0,05$ ) y posterior análisis de Tukey ( $p < 0,05$ ). Con \* se indican los resultados con diferencia significativa respecto a la planta silvestre. (Pizarro, 2008)

Los antecedentes descritos evidencian el complejo sistema de regulación presente en la ruta de síntesis de carotenoides en *D. carota*, en donde se observa que si bien existe una importante regulación a nivel transcripcional o post-transcripcional (como se observa en los estudios descritos de PCR en tiempo real y silenciamiento génico), éstas no dan cuenta por sí solas de las diferencias observadas en la acumulación de carotenoides. Estos antecedentes evidencian la necesidad de cuantificar los niveles de las proteínas carotenogénicas y de la carencia de información a nivel traduccional y post-traduccional en *Daucus carota*, ya que no existen estudios sobre la acumulación de las proteínas carotenogénicas ni sobre algún tipo de

regulación traduccional, así como tampoco sobre posibles modificaciones post-traduccionales de dichas proteínas.

Es por ello que en este seminario de título se propuso la construcción de vectores de expresión para las proteínas ZDS 1 y LCYB 1 para la posterior obtención de anticuerpos policlonales contra estas proteínas y así poder cuantificar y comparar los niveles de dichas proteínas en las hojas y la raíz modificada de plantas silvestres durante el desarrollo y en las plantas transgénicas que sobreexpresan o tienen silenciado los genes y generar así el nexo entre transcripción de genes carotenogénicos, producción de enzimas carotenogénicas y síntesis de carotenoides en la planta de zanahoria.

## **OBJETIVO GENERAL**

Construir vectores de expresión para los genes *zds1* y *lcyb1* para la obtención de anticuerpos policlonales y desarrollar un sistema de detección para éstos utilizando la técnica de *Western blot*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Construir los vectores de clonamiento PCR8-*zds1* y PCR8-*lcyb1*
- Construir los vectores de expresión pMAL-*zds1*, pET28a-*zds1*, pMAL-*lcyb1* y pET28a-*lcyb1*
- Expresar de manera soluble la proteína de fusión ZDS1-MBP y obtener una fracción enriquecida en dicha proteína para la inyección de ratones con el fin de obtener anticuerpos policlonales anti-ZDS1.
- Obtener la proteína ZDS1-His y corroborar su presencia en las fracciones de células inducidas mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo comercial anti-His.
- Desarrollar un sistema de detección de los anticuerpos policlonales anti-ZDS1 presentes en el suero de ratones inmunizados, en el cual no esté presente la proteína MBP.
- Utilizar el sistema de detección desarrollado para identificar aquellos sueros de ratones inmunizados que presenten anticuerpos policlonales anti-ZDS1.



## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales

#### 2.1.1 Material biológico

*Daucus carota* Lineus, subespecie *sylvestris*, variedad Nantes.

#### 2.1.2 Cepas Bacterianas

Tabla I: Cepas bacterianas utilizadas durante el seminario de título.

TIPO DE BACTERIA	GENOTIPO
<i>E. coli</i> cepa DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80d <i>lac</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lac</i> <i>aya-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR178r<sub>k</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>k</sub><sup>+</sup></i> ) <i>phoA supE44 <math>\lambda</math><sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1</i> .
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>+</sup>) gal dcm</i> (DE3).

#### 2.1.3 Medios de Cultivo.

**Medio Luria-Bertani (LB)** :, 10 gr/L de Triptona, 5 gr/L de extracto de levadura y 10 gr/L de NaCl. Se agregó agua destilada hasta completar 1 L y se llevó a pH,7. Se esterilizó mediante autoclave y se almacenó a temperatura ambiente.

**Medio LB sólido:** Medio LB suplementado con 1,5 % agar-agar .

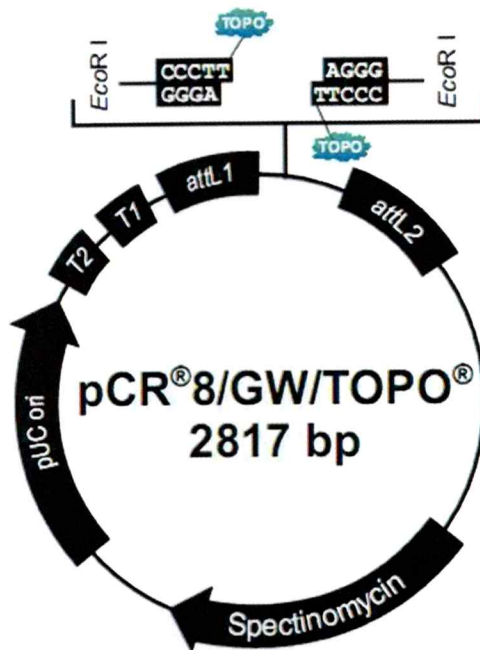
#### 2.1.4 Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad adecuada para análisis y para las técnicas de Biología Molecular. Algunas de las marcas fueron : Axygen, Fermentas, Invitrogen, Merck, New England Biolabs, Omega Bio-tek, Promega, Phyto Technology Laboratories y Sigma-Aldrich .

### 2.1.5 Vectores de clonamiento y expresión

- **Vector de clonamiento pCR®8/GW/TOPO® (pCR8)**

Los genes amplificados por PCR se clonaron en el vector pCR8. Este vector posee una timina desapareada en cada extremo 5' del sitio múltiple de clonamiento (MCS), en donde se encuentra unida, mediante un enlace fosfodiéster la Topoisomerasa (TOPO), la cual cataliza la unión del amplificado de PCR al vector. De esta manera la topoisomerasa es liberada y el vector circularizado. El vector posee el origen de replicación pUC lo que le confiere un alto número de copias para la replicación en *E.coli* y confiere resistencia al antibiótico espectinomicina para su selección. Además, este vector posee los sitios attL1 y attL2 flanqueando el MCS necesarios para la recombinación mediante el sistema Gateway (Nakagawa y col., 2007).

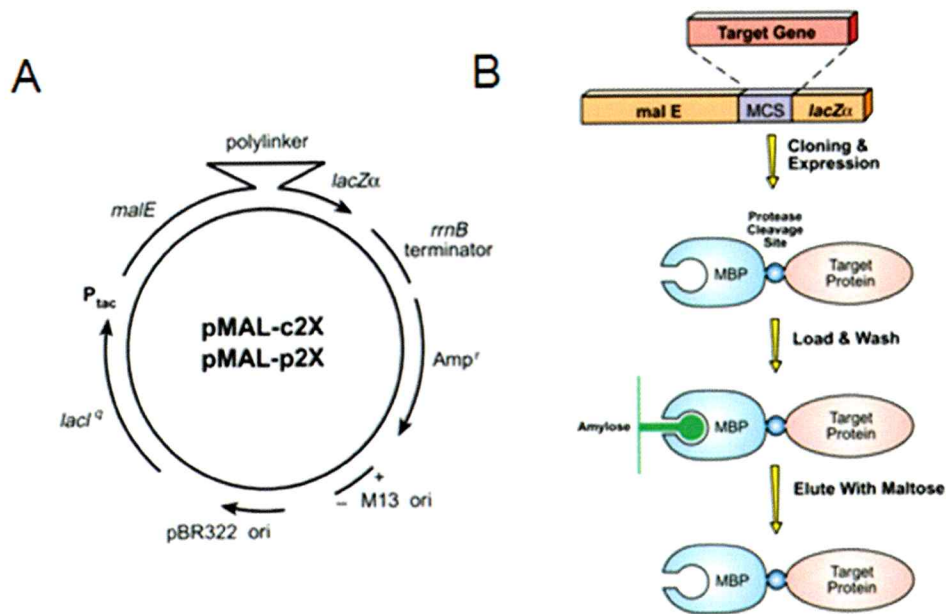


**Figura 5: Vector de clonamiento pCR8.** TOPO: topoisomerasa, attL1 y attL2: sitios de recombinación para el sistema Gateway, pUC ori: origen de replicación pUC, Spectinomycin: gen que otorga resistencia al antibiótico espectinomycin.

- **Vector de expresión pMAL-c2E**

Para la expresión de la proteína ZDS1 en *E.coli* y la obtención de una fracción enriquecida de dicha proteína se utilizó el vector pMAL-c2E, el cual genera una proteína de fusión a MBP (proteína de unión a maltosa), lo que permite la purificación en un solo paso de la proteína de interés utilizando una columna de afinidad a maltosa. El vector pMAL-c2E posee una escisión en el péptido señal de la proteína MBP, que normalmente se localiza en el periplasma de la bacteria, lo que resulta en la expresión citoplasmática y soluble de la proteína de fusión. Este vector posee el promotor "TAC" (promotor fuerte híbrido que posee la región -35 del promotor *trp* y la región -10 del promotor lacUV5) (de Boer y col., 1983) inducible por IPTG y la

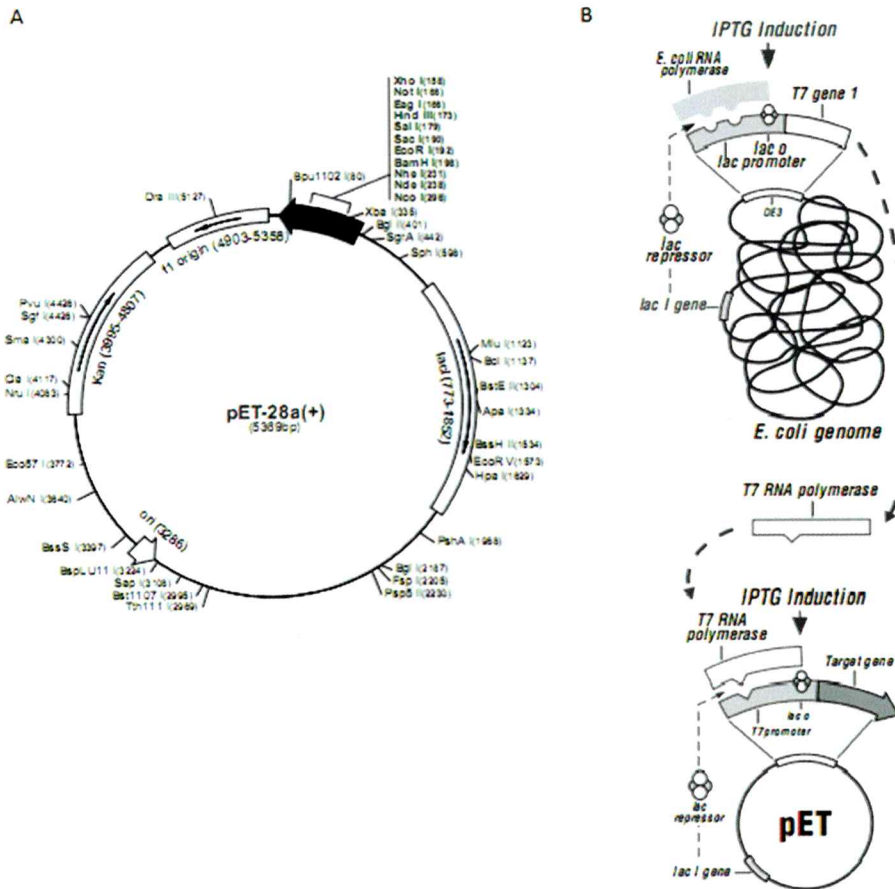
secuencia de inicio de la traducción *malE* (figura 6), lo que genera un alto nivel de expresión de las secuencias clonadas.



**Figura 6: Vector de expresión pMAL-c2E.** (A) Mapa del vector pMAL-c2E. (B) Esquema del clonamiento, expresión y purificación de la proteína de fusión. **MCS:** sitio de múltiple clonamiento, **mal E:** secuencia codificante para la proteína MBP, **Amylose:** Resina de amilosa presente en la columna de purificación.

- **Vector de expresión pET28a**

El vector de expresión pET28a se utilizó para expresar la proteína ZDS1 fusionada a una cola His para la detección de los anticuerpos policlonales presentes en el suero de ratones inmunizados. El sistema de expresión pET es uno de los sistemas más poderosos para clonar y expresar proteínas recombinantes en *E.coli*. El vector pET28a posee el promotor fuerte T7 derivado del bacteriófago T7. Este promotor es reconocido de manera específica por la T7 RNA polimerasa, la cual es proporcionada por la célula hospedera (cepas con genotipo DE3 de *E.coli*) al agregar IPTG al cultivo (Figura 7).



**Figura 7: Vector de expresión pET28a. (A) Mapa del vector. (B) Esquema de la inducción de proteínas recombinantes en células *E.coli* (DE3) mediante la adición de IPTG al cultivo.**

Este vector genera una proteína de fusión N-terminal (amino terminal) a una cola His (repetición de 6 aminoácidos de histidina), lo que permite la purificación de la proteína de fusión mediante una cromatografía de afinidad a ión metálico inmovilizado (IMAC) utilizando una columna de afinidad a Níquel.

## 2.2 Métodos

- Clonamiento de los genes *zds1* y *lcyb1*

### 2.2.1 Extracción de RNA desde tejido vegetal.

Para la extracción de RNA desde hojas de *Daucus carota* se utilizó el reactivo RNA-Solv® Reagent (Omega Bio-tek), según indicaciones del fabricante. Se utilizaron aproximadamente 100 mg de tejido vegetal (hojas) las cuales fueron homogenizadas en un mortero estéril con 1mL de RNA-solv® en presencia de nitrógeno líquido. Se traspasó el homogenizado a un tubo de microcentrifuga de 1,5mL y se agregó 200 µL de cloroformo, se agitó durante 15 segundos en un vortex y se incubó en hielo durante 10 minutos. Luego, se centrifugó a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C. La fase superior (acuosa) fue traspasada a un tubo nuevo y se agregó 500 µL de isopropanol enfriado a -20°C para precipitar el RNA, se agitó por vortex durante 15 segundos y se mantuvo a -20°C durante 20 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con 1 mL de etanol 70% en agua libre de RNAsa y se centrifugó durante 3 minutos a 12.000 x g a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se suspendió el RNA en 40 µL de agua tratada con di-etil piro-carbonato (DEPC) libre de RNAsa. Todo el procedimiento se realizó en hielo para evitar la desnaturalización del RNA. Luego, la calidad del RNA fue evaluada mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. La concentración del RNA se determinó mediante espectrofotometría (Sambrook y Russell, 2001).

### **2.2.2 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa**

La visualización de los ácidos nucleicos se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en el tampón de corrida TAE 1X (Tris-base 40 mM, Ácido acético glacial 19 mM, EDTA 1 mM) con bromuro de etidio (Bret) a 20 mg/L. Las electroforesis se realizaron bajo voltaje constante de 90V. La imagen fue fotografiada mediante el equipo Dark Room Multigenius y un transiluminador Syngene, mediante el programa Gene Snap y la fluorescencia emitida fue cuantificada por el programa Gene Tools, ambos de Syngene.

### **2.2.3 Reacción de Transcriptasa Reversa (síntesis de cDNA)**

Se tomó una alícuota de 2 µg del RNA obtenido previamente (sección 2.2.1) y se trató con DNAsa I por 20 minutos a 37°C (1µL DNAsa I (1 u/µL, Fermentas), 1 µL de Tampón 10x de DNAsa I con MgCl<sub>2</sub> (Fermentas) y agua libre de RNAsa para completar 10 µL). Luego se agregó 1 µL de EDTA-DEPC 25mM para detener la reacción.

Para la reacción de síntesis de la hebra complementaria de RNAm (síntesis de cDNA) se tomó 1 µg de RNA (correspondiente a la mitad del volumen anterior, 5,5µL) y 1µL de oligo AP 10 µM (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTAGCTTCG-3'). Esta mezcla se incubó durante 5 minutos a 70°C en el termociclador. Luego se puso en hielo durante 5 minutos y se agregó 12,5 µL de la mezcla de reacción de la transcripción, que contenía 4µL de amortiguador 5X ImpromII, 1,7 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µL de dNTPs DEPC, 0,5 µL de inhibidor de RNAsa y 5,3 µL de agua DEPC. Finalmente, se agregó 1µL de la enzima Transcriptasa Reversa Impron II (Promega), exceptuando al control negativo. La mezcla se incubó a 42°C durante 60 minutos y posteriormente se detuvo la reacción a 70°C durante 15 minutos.

#### 2.2.4 RT- PCR

Para la amplificación de los genes *zds1* (Nº de acceso: DQ222430) y *lcyb1* (Nº de acceso: DQ192190) se utilizaron partidores específicos para cada gen (tabla II) diseñados a partir del sitio de inicio de la traducción (ATG) y como molde el cDNA obtenido según lo descrito en la sección 2.2.3

Se utilizó la enzima Pfu (fermentas) ya que comete menos errores que la *Taq* polimerasa debido a que posee una actividad 3'-5' correctora. La mezcla de reacción contenía: 2 µL de cDNA, 1X de amortiguador Pfu con MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µL de dNTPs 10mM, 0,5 µL de cada partidor (sentido y antisentido) a 10 µM, 0,2 µL de la enzima Pfu (1U) y agua para completar 25 µL. Para la amplificación se utilizó el protocolo de RT-PCR denominado "*Pfu ORFs*". (tabla III A)

#### 2.2.5 PCR colonias de *E.coli*

El PCR colonia corresponde a una variante del PCR tradicional en el cual el DNA molde agregado a la reacción corresponde directamente a bacterias y no a DNA plasmidial purificado. Esta técnica permite el rápido análisis de una gran cantidad de colonias bacterianas, por lo que se analizaron de esta forma los transformantes obtenidos para los plasmidios pET28a-*zds1*, pET28a-*lcyb1*, pMAL-*zds1* y pMAL-*lcyb1*. Para la amplificación se utilizó la enzima PAQ 5000 de Stratagene, según indicaciones del fabricante, partidores específicos para cada gen y el protocolo denominado "*PCR colonia*" (tabla III B). Como control negativo se utilizó agua nanopura en vez de bacterias y como control positivo se utilizaron las construcciones pCR8-*zds1* o pCR8-*lcyb1*, dependiendo del gen a analizar.



**Tabla II: Partidores utilizados durante el seminario de título.**

Nombre	Secuencia	Tm(°C)	Descripción
Z1ATG F	5'-atggccgccgcttcttcgtctttg-3'	76	Usados para amplificar el gen completo zds1 (1933pb) y para los análisis de PCR colonia
Z1-Ter	5'-gaattcaaccaagtaaagctatccc-3'	70	
Z1 int F	5'-cgtttcccagttggagcacc-3'	64	Usados para secuenciar el gen zds1
Z1 int R	5'-ctgcttgccctcagttgccttg-3'	66	
LcybATG F	5'-atgaaagtgatggatactctac-3'	60	Usados para amplificar el gen Lcyb completo sin el codón de término (1527pb), para los análisis de PCR colonia y para secuenciar el gen lcyb1.
LcybS/T R	5'- ctattctctatctttgatcagattg-3'	66	

### 2.2.6 Reacción de adenilación

La reacción de adenilación consiste en agregar una adenina en el extremo 3' de los amplificados por PCR, mediante la actividad adenil-transferasa que posee la enzima Taq DNA polimerasa. Para lo cual se tomaron 200 ng de DNA purificado (sección 2.2.10), 0,5 uL de dATP 10 mM, 1X de amortiguador Taq, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> y agua nanopura hasta completar 20 uL. La mezcla se incubó durante 10 minutos a 72°C. Posteriormente, fue separada mediante una electroforesis en geles de agarosa al 1% y purificada desde el gel. Los fragmentos de DNA obtenidos fueron ligados al vector de clonamiento pCR®8/GW/TOPO®.

Tabla III: Programas utilizados para la amplificación por RT-PCR (A) y PCR (B)

A. Pfu ORFs

Etapa	Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación	1	94	3min	1
Síntesis	1	94	40 s	35
	2	55	50 s	
	3	72	4 min	
Elongación final	1	72	10 min	1

B. PCR colonia

Etapa	Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación	1	94	4min	1
Síntesis	1	94	40 s	35
	2	55	40 s	
	3	72	1 min	
Elongación final	1	72	10 min	1

**2.2.7 Ligación al vector de clonamiento pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> (pCR8)**

Se tomaron 100 ng de los fragmentos de DNA purificados luego de la reacción de adenilación (sección 2.2.6), y se mezclaron con el vector pCR8 siguiendo las instrucciones del fabricante. La

ligación se mantuvo por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se dializaron las muestras durante 20 minutos utilizando una membrana de diálisis Millipore y posteriormente se electroporaron células *E.coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes (sección 2.2.13).

### **2.2.8 Ligación a los vectores de expresión pET28a y pMAL-c2E**

Para la obtención de los vectores de expresión se ligaron 60 ng de vector (pET28a o pMAL-c2E) con 300 ng de inserto (zds1 o lcyb1) y se agregó 1 uL de T4 DNA ligasa fermentas, 1X de amortiguador de ligasa y agua hasta completar 10uL. Las ligaciones se incubaron 16 horas a 22°C y luego se dializaron 20 minutos en agua destilada utilizando una membrana de diálisis Millipore. Posteriormente, se transformaron células *E.coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes mediante electroporación (sección 2.2.13).

### **2.2.9 Digestiones enzimáticas**

Todas las digestiones enzimáticas se realizaron según las indicaciones del fabricante.

### **2.2.10 Purificación de DNA desde geles de agarosa**

Para la purificación de DNA desde geles de agarosa o directamente desde la solución se siguieron las indicaciones del fabricante del kit de purificación de DNA Wizard® (Promega).

### **2.2.11 Cultivo de *E.coli* cepa DH5 $\alpha$ y BL21(DE3)**

Las bacterias *E.coli* de las cepas DH5 $\alpha$  y BL21(D3E) se crecieron en medio LB a 37°C, con agitación orbital de 200 rpm, durante 16 horas y suplementado con el antibiótico correspondiente a la resistencia otorgada por el vector de clonamiento o expresión.

### **2.2.12 Células *E.coli* DH5α y BL21 (DE3) electrocompetentes.**

Para la obtención de células *E.coli* DH5α y BL21 (DE3) electrocompetentes se creció un inóculo de 50 µL de cada una de las cepas en 25mL de medio LB con agitación durante 16 horas (sección 2.2.11). Luego, se tomaron 20mL de este cultivo y se traspasaron a 980mL de medio LB (dilución 1:50) y se creció durante 2 horas aproximadamente hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm ( $DO_{600}$ ) entre 0,5-0,8. Posteriormente, se centrifugó a 1600 x g durante 20 minutos a 4°C en tubos estériles para recolectar las bacterias. Se eliminó el sobrenadante y se suspendió cuidadosamente el precipitado en 1 volumen de agua destilada estéril y fría. Posteriormente, se centrifugó a 1600 x g durante 20 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante, se repitió el paso de lavado con agua destilada estéril fría y el centrifugado. Luego, se suspendió el precipitado en 10mL de glicerol 10% estéril y frío y se centrifugó a 1600 x g durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, se suspendió el precipitado en 400 uL de glicerol 10% estéril y se guardaron alícuotas de 40 uL a -80°C para su posterior uso.

### **2.2.13 Transformación de células *E.coli* DH5α y BL21 (DE3) electrocompetentes**

Para la transformación de células electrocompetentes *E. coli* DH5α y *E.coli* BL21(DE3) se agregó 3 µL de mezcla de ligación a una alícuota de 40 µL de células las cuales se traspasaron a una cubeta de electroporación de 2 mm y se aplicó un pulso bajo condiciones estándares de electroporación (2,5 KV, 200µF, 200Ω) (Bio-Rad Gene Pulse X-Cell). Las células transformadas se mezclaron con 1 mL de medio LB y se incubaron a 37°C durante 1 hora con agitación orbital de 200 rpm. Luego se centrifugó a 3300 x g durante 3 min y se descartaron 900 µL del sobrenadante. El precipitado se suspendió en el sobrenadante remanente y se plaqueó sobre

placas LB agar estériles que contenían el antibiótico de selección. Las placas de transformación se incubaron a 37°C durante 16 horas. Para su mantención se conservaron a 4°C.

- **Inducción de la síntesis de proteínas recombinantes en células *E.coli* BL21(DE3).**

#### **2.2.14 Inducción de la síntesis de proteínas recombinantes mediante el sistema de expresión pMAL c-2E/BL21(DE3)**

La inducción de la expresión de los genes *zds1* y *lcyb1* fusionados al gen *mal E* (que codifica para la proteína MBP) se realizó según lo recomendado en el manual “pMAL™ proteína de fusión y sistema de purificación” con algunas modificaciones. Se creció un inóculo de 5mL con agitación durante 16 horas a 37°C para cada una de las colonias de *E.coli* BL21 (DE3) que portaba la construcción de expresión de interés, ya sea pMAL-*zds1* o pMAL-*lcyb1*. Luego, se tomaron 100uL de este cultivo y se traspasaron a 5mL de medio LB y se creció durante 2 horas aproximadamente hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm ( $DO_{600}$ ) entre 0,5-0,8. Se separó el cultivo en dos fracciones iguales (2,5 mL cada una), a una se le agregó IPTG a una concentración final de 0,5 mM y se incubó durante 16 horas a 18 °C con agitación, esta fracción corresponde a las “células inducidas”, la otra fracción correspondiente a las “células sin inducir” se mantuvo a 4°C durante todo el período de inducción. Posteriormente, se centrifugaron ambas fracciones a 12000 x g durante 5 minutos y se resuspendieron en 20 uL de solución amortiguadora de carga SDS-PAGE 5X y agua para completar 100 uL. Para obtener gran cantidad de cultivo para purificar la proteína de fusión ZDS1-MBP se procedió a realizar la inducción de proteínas recombinantes en 200 mL de medio de cultivo utilizando las mismas condiciones descritas previamente.

### **2.2.15 Purificación mediante columna de afinidad a amilosa.**

Las células inducidas previamente (sección 2.2.14) se recolectaron mediante centrifugación a 8000 x g a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el precipitado se suspendió en 30 mL de solución amortiguadora de columna (Tris/HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM). Las células se congelaron a -20°C durante 16h. Luego, se descongelaron en agua fría y se lisaron utilizando un sonicador Misonix® Microson xl2000 Ultrasonic Cell Disruptor a 30 Watts rms. Se aplicaron 10 pulsos de 30 s en intervalos de 1 minuto en donde las células se mantuvieron en hielo. Cuando la suspensión celular se observó clarificada se centrifugó a 13.000 x g a 4°C durante 20 min (Centrífuga Sorvall RC-28S y rotor GS-3 Sorvall®, DuPont, CT, USA). El precipitado correspondió al material insoluble (membranas celulares, proteínas formando cuerpos de inclusión, etc.). Del sobrenadante (material soluble) se tomaron 5 uL y se agregaron 3 uL de amortiguador de carga 4X con SDS y agua para completar un volumen total de 12uL, la muestra se guardó a -20°C y posteriormente fue cargada en un gel de poliacrilamida.

Con el objetivo de purificar la proteína de fusión ZDS1-MBP, se cargó el sobrenadante en una columna PD10 (Bio-Rad Laboratories, CA-USA) empacada con 2 mL de resina de amilosa. Primero se lavó dos veces la columna con 5 mL de solución amortiguadora de columna y luego se cargó con el sobrenadante (aproximadamente 30 mL). La columna fue lavada tres veces con 5 mL cada una de amortiguador de columna y posteriormente se eluyó la proteína con 4 mL de solución amortiguadora de columna más 10 mM de maltosa. La columna de amilosa se regeneró con la siguiente secuencia de lavados: 6 mL de agua destilada, 6 mL de SDS 0,1% p/v,

2 mL de agua destilada y 6 mL de solución amortiguadora de columna. La columna se guardó en etanol 20% v/v a 4 °C.

### **2.2.16 Inducción de la síntesis de proteínas recombinantes mediante el sistema de expresión pET28a/BL21(DE3).**

La inducción de la expresión del gen *zds1* fusionado a la cola His se realizó según lo recomendado en el *"manual del sistema de expresión pET"* con algunas modificaciones. Se creció un inóculo de 5mL con agitación durante 16 horas a 37°C para cada una de las colonias de *E.coli* BL21 (DE3) que portaba la construcción de expresión pET28a-*zds1*. Luego, se tomaron 100uL de este cultivo y se traspasaron a 5mL de medio LB y se creció durante 2 horas aproximadamente hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm ( $DO_{600}$ ) entre 0,5-0,8. Se separó el cultivo en dos fracciones iguales (2,5 mL cada una), a la fracción llamada *"células inducidas"*, se le agregó IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó durante 4 horas a 37 °C con agitación. La otra fracción correspondiente a las *"células sin inducir"* se mantuvo a 4°C durante todo el período de inducción. Posteriormente, se centrifugaron ambas fracciones a 12000 x g durante 5 minutos y se suspendieron en 20 uL de solución amortiguadora de carga SDS-PAGE 5X y agua para completar 100 uL.

### **2.2.17 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)**

Las separaciones electroforéticas en condiciones desnaturalantes se realizaron en una cámara vertical MiniProtean II (Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA), bajo voltaje constante de 110 V (fuente de poder Power Pac 1000 de Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA). Como solución amortiguadora de corrida se utilizó Tris-glicina-SDS (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1%

p/v) (Bollag y col., 1996). Las muestras se mezclaron en proporción 4:1 con solución tampón de carga 5X (Tris/HCl 60 mM, glicerol 25% v/v, SDS 2% p/v, 2- mercaptoetanol 14,4 mM y azul de bromofenol 0,1% p/v pH 6,8), se desnaturaron durante 15 min a 95 °C y posteriormente se centrifugaron 1 minuto a 12000 x g. Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10%. La electroforesis se realizó con un voltaje constante entre 100 y 120 volts hasta que el frente de corrida cayó del gel, aproximadamente 2 horas. Como referencia se utilizó un estándar de proteínas de Fermentas (#SM0671) que incluye tamaños de proteína de 170 KDa hasta 10 KDa. Posteriormente, se tiñó el gel mediante tinción de Coomasie (ácido acético glacial 10% v/v, metanol 45% v/v, azul de Coomasie 0,25% p/v) durante 1 hora con agitación y se destiñó en la misma solución sin colorante. Los geles fueron fotografiados mediante una cámara digital y secados entre papel celofán.

- **Obtención de anticuerpos policlonales anti-ZDS1**

### **2.2.18 Inmunización de ratones**

La inmunización de los ratones se realizó en el laboratorio de Inmunología (Dra. María Rosa Bono) de la Universidad de Chile siguiendo protocolos estándares y según las indicaciones de dicho laboratorio.

### **2.2.19 Western blot**

#### **Western blot anti-His y anti-ZDS1**

Las muestras de proteínas obtenidas en la sección 2.2.16 se sometieron a una electroforesis en condiciones desnaturantes (sección 2.2.17) y luego se electrotransfirieron en semi-seco a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm durante 4 minutos a 12V utilizando el aparato de



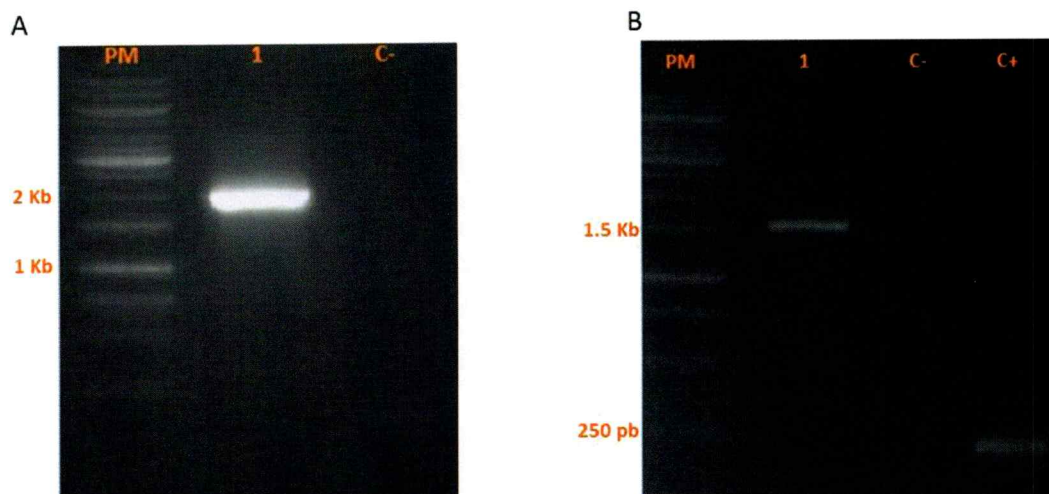
transferencia *transblot SD semi-dry transfer cell* de BIO-RAD. La membrana se bloqueó con BSA 3% en TBS-T (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 140mM, Tween-20 0,1%) durante 16 horas. Luego, se lavó 3 veces con TBS-T y se incubó con el anticuerpo primario diluido 1:10000 para el caso del anticuerpo monoclonal comercial *Monoclonal anti poly histidine, clone His-1* de Sigma y 1:500 en el caso de utilizar el suero policlonal anti-ZDS1. Los anticuerpos fueron diluidos en TBS-T 3%BSA para el caso del anticuerpo monoclonal y TBS-T 0,5%BSA para el policlonal y se incubó durante 1,5 horas con agitación a temperatura ambiente. Luego, se lavó 3 veces durante 5-10 minutos cada una con TBS-T con agitación. A continuación se incubó con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) conjugado a fosfatasa alcalina en una dilución 1:10000 en TBS-T 3%BSA por una hora a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente, se lavó 3 veces durante 5-10 minutos cada una con TBS-T con agitación.

Para el revelado se incubó la membrana con amortiguador de revelado (Tris-HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM) durante 15 minutos. Luego, se reveló utilizando amortiguador de revelado adicionado con los sustratos NBT 0,33 mg/mL (nitrobluetetrazolium) y BCIP 0,17 mg/mL (5-bromo-4-cloro-3-indolidil fosfato) hasta que aparecieron las bandas de interés. La reacción se detuvo agregando una solución de EDTA 20mM pH 8. Las membranas se lavaron posteriormente con agua destilada.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Clonamiento de los genes *zds1* y *lcyb1* de *Daucus carota*.

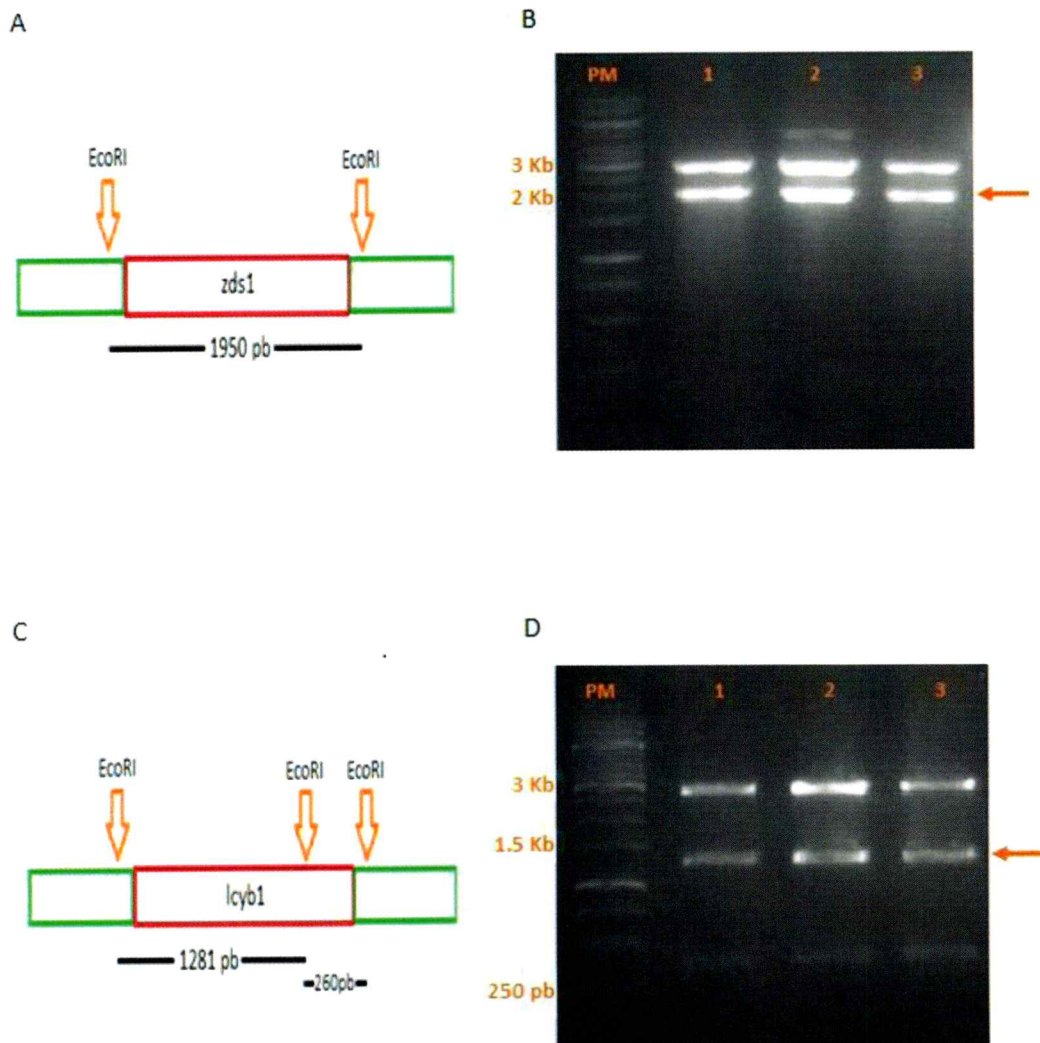
El gen *zds1* fue clonado desde el sitio de inicio de la traducción hasta la región 3' no traducida, inclusive. El gen *lcyb1*, por su parte, se clonó desde el sitio de inicio de la traducción hasta el codón de término de la traducción, sin incluirlo, lo que permite la generación de proteínas de fusión. En la figura 8 se muestra la amplificación de los fragmentos de 1933 pb para el gen *zds1* y de 1524 pb para el gen *lcyb1*, amplificados a partir de cDNA de *D. carota* usando los partidores descritos en la tabla II.



**Figura 8: Amplificación por RT-PCR de los genes *zds1* y *lcyb1*.** (A) Amplificación del cDNA de *zds1*. Carril 1: Fragmento de 1933 pb correspondiente al cDNA de *zds1*. C-: control negativo de la reacción de RT-PCR. (B) Amplificación del gen *lcyb1*. Carril 1: Fragmento de 1524 pb que corresponde al cDNA de *lcyb1* sin el codón de término. C-: Control negativo de la reacción de RT-PCR. C+: Control positivo de la reacción de RT-PCR (amplificación de un fragmento de 180 pb del gen de ubiquitina de *Daucus carota*). Electroforesis en gel de poliacrilamida al 1% teñido con Bret. Carril PM: Estándar de peso molecular 1Kb de Fermentas.

### **3.2 Obtención de los vectores de clonamiento pCR8-zds1 y pCR8-lcyb1.**

Los fragmentos amplificados mediante RT-PCR de cada gen se purificaron desde geles de agarosa (sección 2.2.10) y posteriormente ligados al vector PCR8, con lo cual se transformaron células DH5 $\alpha$  y las colonias fueron seleccionadas en medio LB-agar suplementado con el antibiótico spectinomomicina. Las colonias fueron analizadas mediante PCR de colonia (sección 2.2.5) y a los clones positivos se les extrajo DNA mediante una preparación de DNA plasmidial. Posteriormente, para verificar la liberación de los fragmentos de interés, los DNAs plasmidiales obtenidos fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoRI*, la cual posee dos sitios de corte en el vector, cada uno flanqueando el sitio de clonamiento, produciendo la liberación del inserto. La enzima *EcoRI* no corta el cDNA de *zds1*, por lo que se produce la liberación de una banda de 1950 pb (inserto 1933 pb + 17 pb vector pCR8) y una banda de 2800 pb correspondiente al vector (Figura 9 A y B). En cambio, dicha enzima corta 1 vez en el gen *lcyb1*, lo que genera la liberación de dos bandas, una de ellas de 1281 pb y la otra de 260 pb además de la banda de 2800 pb correspondiente al vector (Figura 9 C y D). De esta manera se comprobó la presencia de los amplificadores correspondientes a los genes *zds1* y *lcyb1* en tres clones, logrando generar las construcciones pCR8-zds1 y pCR8-lcyb1 respectivamente.

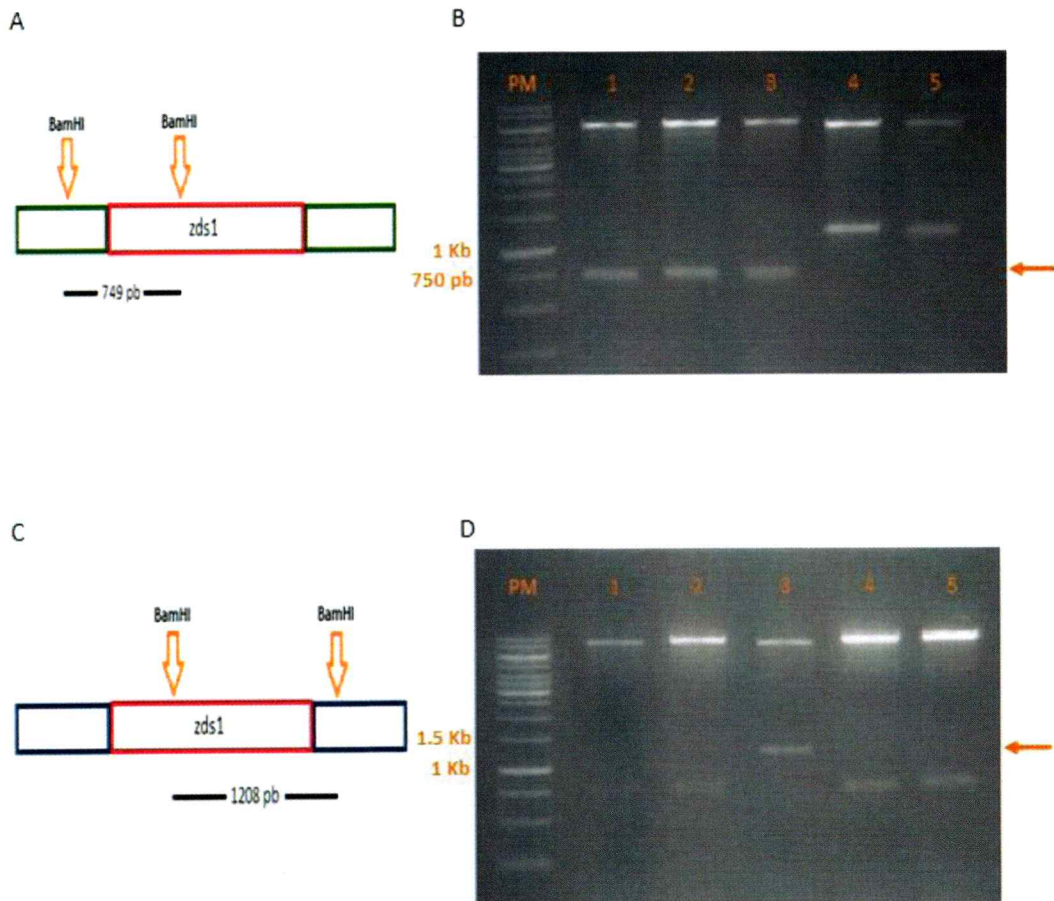


**Figura 9: Digestión de las construcciones pCR8-zds1 y pCR8-lcyb1 con la enzima de restricción *EcoRI*.** **A y C:** Esquema de los sitios de corte de la enzima de restricción *EcoRI* en las construcciones pCR8-zds1 (A) y pCR8-lcyb1 (C). Las flechas indican los sitios de corte de la enzima, los genes zds1 y lcyb1 están indicados con un rectángulo rojo, los rectángulos verdes corresponden al vector de clonamiento pCR8. **B y D:** Digestión de las construcciones pCR8-zds1 (B) y pCR8-lcyb1 (D) con la enzima de restricción *EcoRI*, las flechas indican la banda de interés. B: Carriles 1,2 y 3: Digestión de DNA plasmidial de las colonias 1, 9 y 11 respectivamente con la enzima de restricción *EcoRI*. D: Carril PM: estándar de peso molecular 1Kb (Fermentas). Carriles 1,2 y 3: Digestión de DNA plasmidial de las colonias 4, 6 y 7 respectivamente con la enzima de restricción *EcoRI*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril PM: Estándar de peso molecular de 1Kb (Fermentas).

### 3.3 Obtención de los vectores de expresión *pET28a-z1*, *pET28a-lcyb1*, *pMAL-z1* y

#### *pMAL-lcyb1*

Los insertos correspondientes a los genes *zds1* y *lcyb1* para la obtención de los vectores de expresión fueron obtenidos al digerir con la enzima de restricción *EcoRI* los respectivos vectores de clonamiento, aprovechando las características de este vector antes descritas. El gen *zds1* no posee ningún sitio de corte para la enzima *EcoRI*, por lo que se obtiene la liberación completa del gen (Figura 9, B), en cambio el gen *lcyb1* posee un sitio de corte hacia el extremo 3' lo que produce la división del gen en dos fragmentos, uno de 1281 pb y otro de 260 pb (Figura 9, D). Se tomó el fragmento de mayor tamaño para la construcción de los vectores de expresión, considerando que el anticuerpo que se generaría contra esta LCYB1 parcial también reconocería a la proteína completa. Los fragmentos de ambos genes fueron purificados desde geles de agarosa y posteriormente ligados a los vectores *pET28a* y *pMAL* linearizados con la misma enzima de restricción. Los análisis para determinar la direccionalidad de los genes respecto al promotor inducible, se realizaron con las enzimas de restricción *BamHI*, para las construcciones *pET28a-zds1* y *pMAL-zds1*, y con *HindIII* para las construcciones *pET28a-lcyb1* y *pMAL-lcyb1*. Para el gen *zds1* orientado en dirección sentido en el vector *pET28a* se obtuvieron las bandas esperadas de 749 pb y 6570 pb en los clones 1 al 3 (figura 10, A). Para la construcción con el vector *pMAL*, se obtuvieron las bandas esperadas de 1208 pb y 7378 pb en el clon 3 (figura 10, C). Para el gen *lcyb1* orientado en dirección sentido en el vector *pET28a* se obtuvieron las bandas esperadas de 1252 pb y 5398 pb en los clones 3 y 5 (figura 11, A), mientras que para la construcción *pMAL-lcyb1* se obtuvieron las bandas esperadas de 1265 pb y 6662 pb en los clones 1 al 3 (figura 11, C).



**Figura 10: Determinación de la orientación del gen *zds1* en las construcciones pET28a-zds1 y pMAL-zds1 mediante digestión con la enzima de restricción *Bam*HI. A y C:** Esquema de los sitios de corte de la enzima de restricción *Bam*HI en las construcciones pET28a-zds1 (A) y pMAL-zds1 (C), las flechas indican los sitios de corte de la enzima, el gen *zds1* está indicado con un rectángulo rojo, los rectángulos verdes y azules corresponden a los vectores de expresión pET28a y pMAL respectivamente. Con una barra negra y en pares de bases (pb) está indicado el tamaño esperado para cada vector si la inserción del gen *zds1* ocurrió en dirección sentido. **B y D:** Carriles 1-5: Digestión con *Bam*HI del DNA plasmidal extraído de colonias de *E.coli* DH5 $\alpha$  transformadas con los vectores de expresión pET28a-zds1 (B) y pMAL-zds1 (D) digeridas, las flechas indican la banda de interés. Geles de agarosa al 1% teñidos con Bret. Carril PM: Estándar de peso Molecular 1Kb (Fermentas).

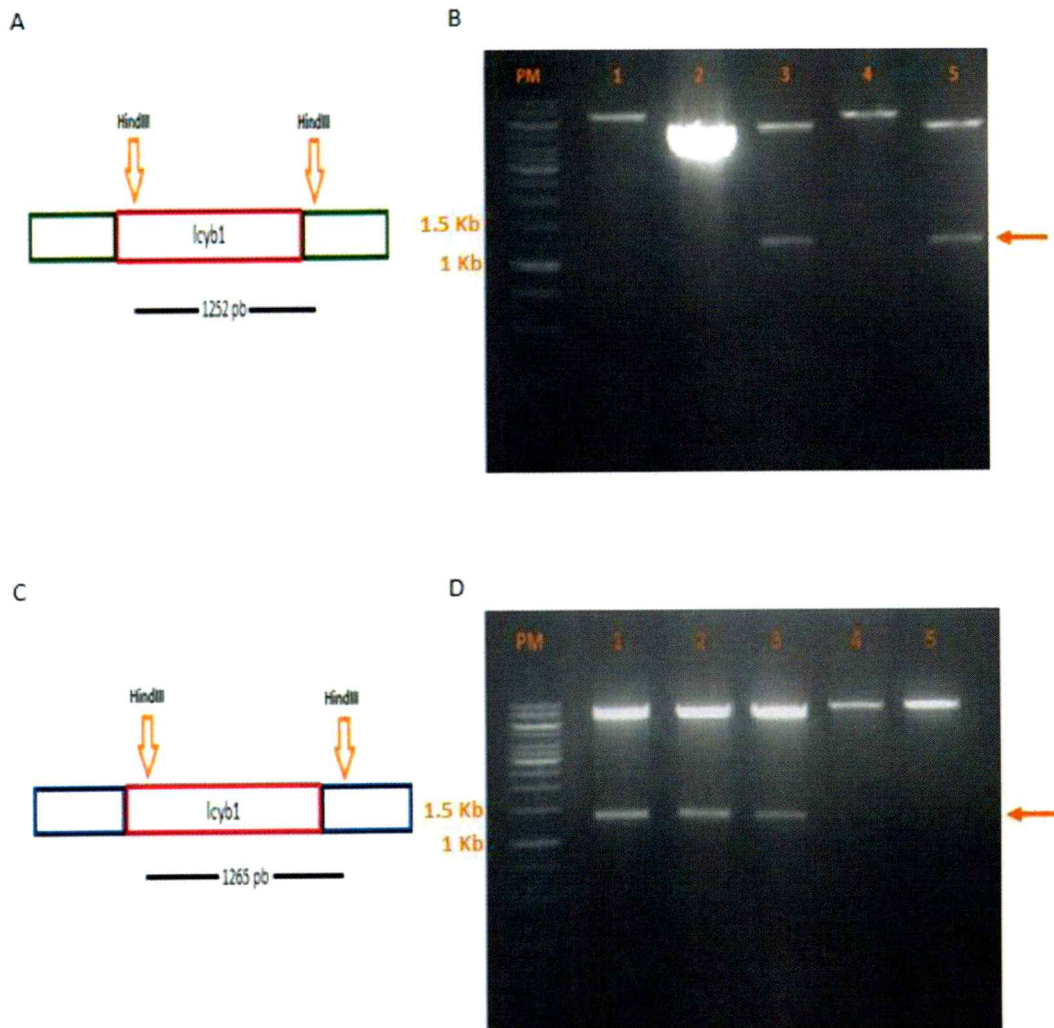
De esta manera se obtuvieron las construcciones pET28a-z1, pET28a-lcyb1, pMAL-z1 y pMAL-lcyb1 en dirección sentido con respecto a los promotores inducibles, lo que permitió la expresión de dichos genes y la posterior obtención de una fracción enriquecida con dichas proteínas.

### **3.4 *Secuenciación de los genes zds1 y lcyb1.***

Ambos genes se secuenciaron a partir de las construcciones pCR8-zds1 y pCR8-lcyb1. Se secuenciaron 3 diferentes clones para cada gen utilizando los partidores universales M13F y M13R además de partidores específicos para cada gen, obteniendo la secuencia completa para cada uno. Las secuencias obtenidas fueron idénticas a las descritas en la base de datos para dichos genes (zds1: DQ222430, lcyb1: DQ192190), excepto en la secuencia obtenida para el gen zds1 (ver anexo) que presentó una diferencia de una base con la secuencia descrita en la base de datos, la cual genera un cambio en el aminoácido número 129, de cisteína a arginina (C 129R).

Además, se secuenció cada uno de los vectores de expresión obtenidos en este seminario de título para confirmar la orientación y verificar que los genes hayan quedado en el marco de lectura correcto debido a que en ambos casos se trata de vectores que poseen el inicio de la traducción antes del sitio de inicio presente en el gen de interés, debido a las fusiones que genera cada uno de los vectores (sección 2.1.5).





**Figura 11: Determinación de la orientación del gen *lcyb1* en las construcciones pET28a-*lcyb1* y pMAL-*lcyb1* mediante digestión con la enzima de restricción *Hind*III. A y C:** Esquema de los sitios de corte de *Hind* III en las construcciones pET28a-*lcyb1* (A) y pMAL-*lcyb1* (C), las flechas indican los sitios de corte de la enzima, el gen *lcyb1* está indicado con un rectángulo rojo, los rectángulos verdes y azules corresponden a los vectores de expresión pET28a y pMAL respectivamente. Con una barra negra y en pares de bases (pb) está indicado el tamaño esperado para cada vector si la inserción del gen *lcyb1* ocurrió en dirección sentido. **B y D:** Carriles 1-5: Digestión con *Hind*III del DNA plasmidial de colonias de *E.coli* DH5 $\alpha$  transformadas con los vectores de expresión pET28a-*lcyb1* (B) y pMAL-*lcyb1* (D), las flechas indican la banda de interés. Geles de agarosa al 1% teñidos con Bret. Carril PM: Estándar de peso Molecular 1Kb (Fermentas).



### 3.5 *Expresión del gen zds1 a partir del vector de expresión pMAL.*

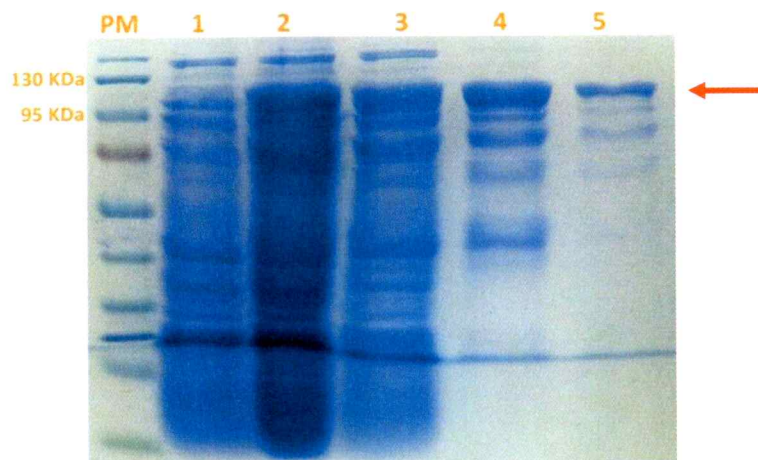
Una vez obtenidos los clones que presentaron las construcciones de expresión (pET28a-z1, pET28a-lcyb1, pMAL-z1 y pMAL-lcyb1), se les extrajo DNA mediante minipreparación plasmidial y se transformaron células *E.coli* BL21(DE3), las cuales presentan integrado en su genoma el gen codificante para la T7 RNA polimerasa bajo la regulación del promotor Lac ( $\beta$ -galactosidasa), el cual es inducible por IPTG. De esta forma al agregar IPTG al medio de cultivo se induce la transcripción del gen de interés y la posterior síntesis de la proteína.

Como primera aproximación se realizó la expresión de proteínas recombinantes, según lo descrito en Materiales y Métodos sección 2.2.14, de varios clones para determinar cuál de ellos presentaba una alta expresión de la proteína de interés.

Para la expresión de la proteína ZDS1 fusionada a la MBP desde el vector pMAL-zds1, se cultivaron e indujeron con IPTG, 8 colonias bacterianas que resultaron positivas para los análisis de PCR de colonia para la presencia del gen zds1, por lo que se les evaluó en una SDS-PAGE con tinción de Coomassie. Las colonias inducidas fueron comparadas con su equivalente sin inducir. Del análisis de proteínas en el gel SDS-PAGE, se seleccionó la colonia que presentó mayor intensidad en la banda del tamaño esperado (103 KDa) y con ella se realizó una inducción con mayor cantidad de cultivo (sección 2.2.14), con el objetivo de purificar la proteína recombinante ZDS1-MBP mediante cromatografía de afinidad a maltosa.

Del cultivo a mayor escala, se separó una fracción de células antes de agregar el inductor (IPTG), la cual correspondía al control de células sin inducir (muestra 1). Luego del período de inducción, se separó una fracción del mismo volumen (1,5 mL) que la anterior y que corresponde a las células inducidas (muestra 2). El resto del cultivo fue sonicado para realizar la

lisis celular y posteriormente centrifugado para separar dos fracciones; la fracción soluble (muestra 3: sobrenadante del sonicado) y la fracción insoluble o pella del sonicado, la cual fue descartada ya que no presentaba la proteína de interés (resultados no mostrados). La fracción soluble fue purificada mediante una cromatografía de afinidad a maltosa. La columna de afinidad está compuesta por una resina de amilosa, la cual es un polímero formado por repeticiones de  $\alpha$ -maltosa unidas mediante enlaces glucosídicos  $\alpha$  1-4. Se pasó por la columna la fracción soluble (sobrenadante del sonicado), quedando retenida la proteína de fusión ZDS1-MBP debido a la interacción entre la proteína MBP y las moléculas de maltosa presentes en la resina, permitiendo la separación de la proteína de fusión de las otras proteínas presentes en el extracto. La elusión de la proteína de fusión de la columna de afinidad se logró mediante una competencia por el sitio de unión a maltosa presente en la proteína MBP entre las moléculas de maltosa de la resina y las moléculas de maltosa presentes en el amortiguador de elusión, logrando liberar la proteína de fusión de la resina y obteniéndola en una fracción enriquecida. Todas las muestras antes descritas fueron cargadas en un gel de poliacrilamida para determinar la presencia y expresión de la proteína de fusión ZDS1-MBP (figura 12), obteniéndose bandas del tamaño esperado en los extractos crudos inducidos (células inducidas), en la fracción soluble y en las fracciones purificadas (Figura 12, carriles 2, 3, 4 y 5 respectivamente). La banda de tamaño esperado se observó como una gran banda de 100 KDa aproximadamente, lo que es consistente con el tamaño de la proteína ZDS1 de 60KDa más la proteína MBP de 43KDa, la cual no se observó en el control de células sin inducir.



**Figura 12: Expresión de la proteína ZDS1-MBP en *E.coli* y purificación mediante cromatografía de afinidad a maltosa.** Carril 1: células sin inducir. Carril 2: células inducidas. Carril 3: Fracción soluble (sobrenadante del sonicado). Carriles 4 y 5: Fracciones purificadas mediante cromatografía de afinidad a maltosa. Carril PM: Estándar pre-teñido de proteínas #SM0671 (Fermentas). Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE) y posterior tinción con Coomassie.

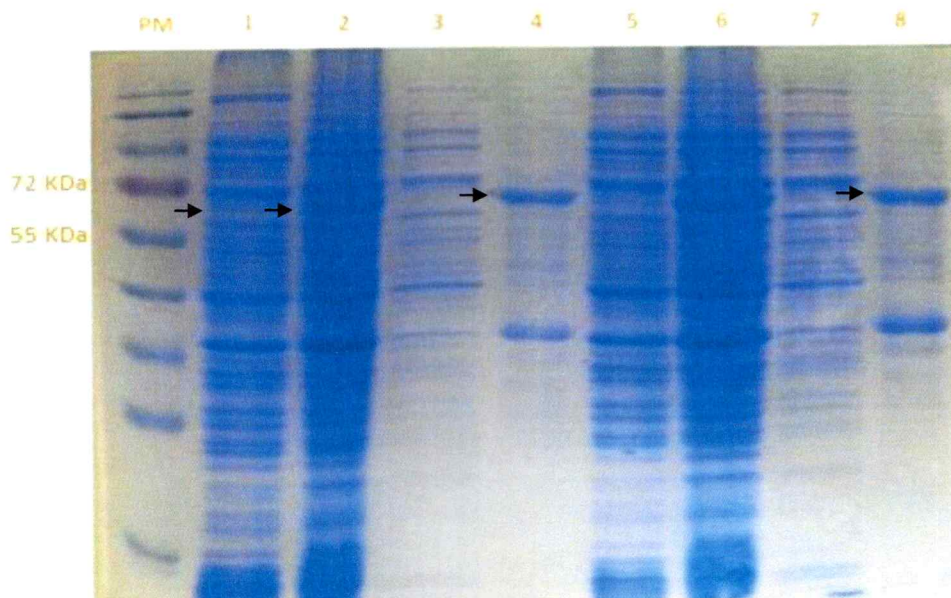
De esta forma se logró obtener una fracción enriquecida de la proteína de fusión ZDS1-MBP, la cual se utilizó para inyectar ratones con la finalidad de obtener anticuerpos policlonales para la proteína ZDS1.

Para el caso del gen *lcyb1*, no se logró obtener una alta expresión de LCYB1 en 8 clones pMAL-*lcyb1* analizados. Debido a que el vector pET28a-*lcyb1* fue construido con la finalidad de analizar los sueros de los ratones inmunizados con la proteína LCYB1-MBP, también se dejó pendiente su expresión y se procedió a seguir trabajando con los vectores pET28a-*zds1* y pMAL-*zds1*, el cual presentó una alta expresión de la proteína ZDS1 (Figura 12).

### **3.6 Determinación de la presencia de anticuerpos policlonales anti-ZDS1 en el suero de ratones inmunizados**

Luego de tres meses, se obtuvo el suero de tres ratones que fueron inmunizados (sección 2.2.18) con el extracto de la fracción 5 (Figura 12, carril 5) que presentó la proteína ZDS1-MBP con mayor grado de pureza. Para la detección de los anticuerpos policlonales que reconocieran la proteína ZDS1 fue necesario idear un sistema de detección en el cual no estuviera presente la proteína de unión a maltosa, para poder discriminar los anticuerpos policlonales anti ZDS1 de los anti-MBP, ya que los ratones fueron inmunizados con la proteína de fusión ZDS1-MBP, por lo que es probable que también hubiesen generado anticuerpos contra epítopes presentes en la proteína MBP. Para obtener la proteína ZDS1 sin la MBP se utilizó la construcción desarrollada en este seminario de título pET28a-ZDS1, la cual genera una proteína de fusión con una repetición de aminoácidos de Histidina (cola His).

Para la obtención de la proteína ZDS1-His se analizaron 8 clones de *E.coli* BL21 transformadas con el plasmidio pET28a-zds1, las cuales resultaron positivas para el análisis de PCR de colonia para el gen de interés y posteriormente cultivadas e inducidas a pequeña escala (sección 2.2.16). De estos análisis se tomaron dos colonias (las colonias número 15 y 16) que presentaron mayor intensidad de la banda de tamaño esperado de 63 kDa en los experimentos de SDS-PAGE y se realizó una inducción de mayor volumen de cultivo para dichas colonias, tal como se procedió para pMAL-zds1. Luego, los cultivos inducidos y sin inducir fueron lisados utilizando un sonicador y centrifugados para separar la fracción soluble de la insoluble. De esta manera se obtuvieron 4 muestras para cada clon; células sin inducir, células inducidas, fracción soluble (o sobrenadante del sonicado) y por último la fracción insoluble (o pella del sonicado).

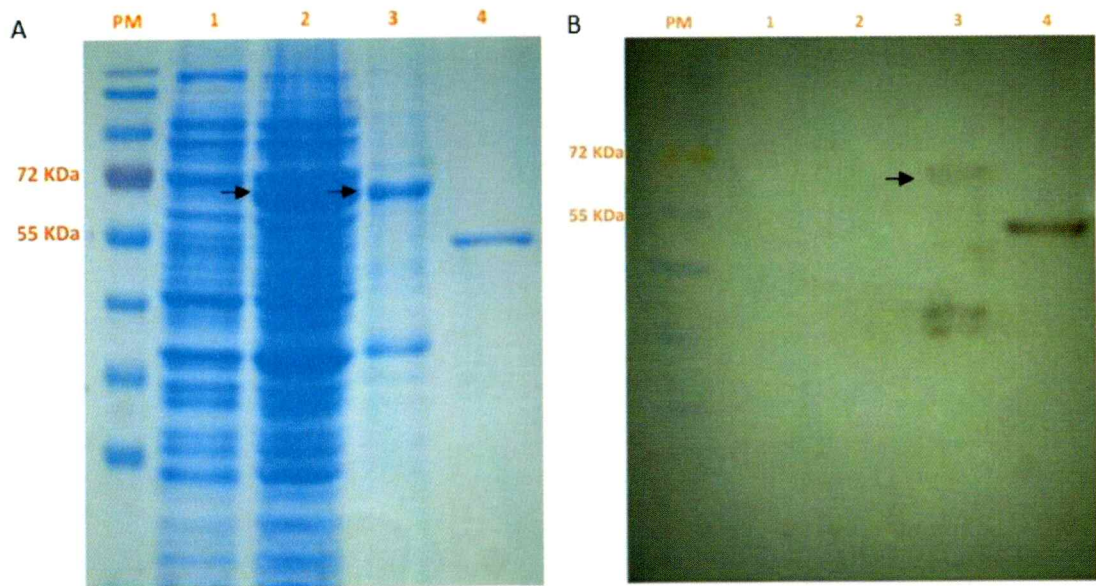


**Figura 13: Inducción de dos colonias bacterianas que expresan la proteína ZDS1-His.** SDS-PAGE de las 4 muestras obtenidas para cada una de las colonias. Los carriles del 1-4 corresponden a la colonia 15 y los 5-8 a la colonia 16. Carril 1 y 5: células sin inducir. Carril 2 y 6: células inducidas. Carril 3 y 7: fracción soluble. Carril 4 y 8: fracción insoluble. Carril PM: Estándar pre-teñido de proteínas #SM0671 (Fermentas). Las flechas negras indican la banda esperada para la proteína ZDS1-His de 63KDa.

Las proteínas presentes en cada muestra fueron separadas mediante SDS-PAGE y visualizadas mediante tinción de Coomassie (Figura 13). En ambos clones se obtuvo, en la fracción insoluble, una gran cantidad de la proteína recombinante ZDS1-His (Figura 13, carriles 4 y 8).

Para corroborar la presencia y expresión de la proteína ZDS1-His en el cultivo celular, se realizó un Western blot anti-His de las muestras antes descritas para cada clon (figura 14 A, se muestra el resultado para la colonia 15), obteniéndose bandas del tamaño esperado en las muestras de células inducidas y en la fracción insoluble y no en la muestra de células sin inducir (Figura 14 B).



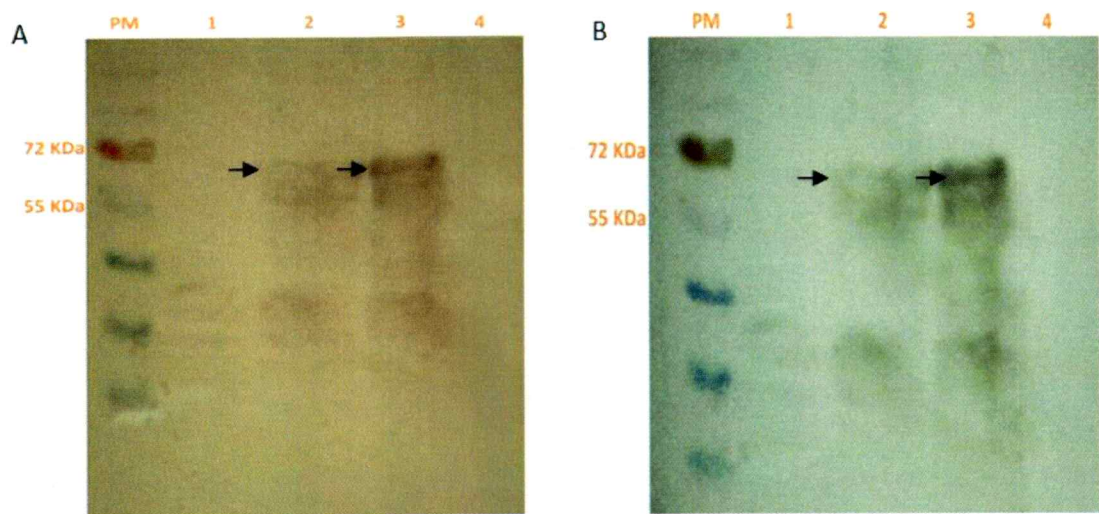


**Figura 14: Comprobación de la presencia y expresión de la proteína ZDS1-His.** A: SDS-PAGE y posterior tinción con Coomassie. B: Western blot utilizando Anticuerpo anti-His y la fosfatasa alcalina unida al anticuerpo secundario anti-mouse como método de revelado. Carril 1: muestra de células sin inducir. Carril 2: muestra de células inducidas. Carril 3: fracción insoluble (*pellet* del sonicado). Carril 4: control positivo, proteína purificada de 53 KDa que presenta una fusión His y facilitada por el laboratorio de Bioquímica de la Universidad de Chile. Carril PM: Estándar pre-teñido de proteínas #SM0671 (Fermentas). La flecha negra indica la banda correspondiente a ZDS1-His de 63 KDa.

Estos resultados son de suma importancia ya que confirman la presencia de la proteína ZDS1 en las fracciones analizadas, lo que permitirá descartar aquellos sueros obtenidos de los ratones inmunizados que no presenten algún anticuerpo anti-ZDS1.

Al corroborar la expresión y presencia de la proteína ZDS1-His, se procedió a realizar los análisis de Western blot para verificar la presencia de anticuerpos policlonales anti ZDS1 en el suero de ratones inmunizados con ZDS1-MBP. Para ello, en vez de hacer el Western blot usando el anticuerpo anti His, se utilizó aquel suero proveniente de los tres ratones que fueron inmunizados con ZDS1-MBP. Como se observa en la figura 15, se obtuvieron bandas del tamaño esperado de 63 KDa en los carriles de muestras inducidas (células inducidas y fracción

insoluble) y la ausencia de ellas en las muestras sin inducir y en el control negativo (proteína de 53 KDa con fusión His, facilitada por el laboratorio de Bioquímica de la Universidad de Chile), lo cual nos confirma la presencia de anticuerpos anti-ZDS1 en el suero de dos ratones inmunizados (figura 15).



**Figura 15: Western blot anti-ZDS1 utilizando el suero de ratones inmunizados. A y B:** Western blot utilizando el suero de dos ratones inmunizados con la proteína ZDS1-MBP (A: ratón 1, B: ratón 2) y la fosfatasa alcalina unida al anticuerpo secundario anti-mouse como método de revelado. Carril 1: células sin inducir. Carril 2: células inducidas. Carril 3: fracción insoluble (*pellet* del sonicado). Carril 4: Control negativo, proteína purificada de 53 KDa que presenta una fusión His y facilitada por el laboratorio de Bioquímica de la Universidad de Chile. Carril PM Estándar pre-teñido de proteínas #SM0671 (Fermentas). Las flechas negras indican la presencia de la proteína ZDS de 63 kDa.

## 4 DISCUSIÓN

### 4.1 *Amplificación de los genes zds1 y lcyb1 y obtención de los vectores de clonamiento pCR8-zds1 y pCR8-lcyb1.*

La secuencia del cDNA de lcyb1 (1524pb) amplificada a partir de hojas de zanahoria y clonada en el vector pCR8 presentó un 100% de identidad con la descrita en la base de datos de NCBI, en cambio la secuencia obtenida para el cDNA de zds1 (1933pb) presentó un cambio en una base nitrogenada con respecto a la secuencia descrita en la base de datos (ver anexo). Esta diferencia se mantuvo a nivel aminoacídico y ocasiona un cambio en el aminoácido 129 de cisteína a arginina (C 129 R). Para descartar que este cambio hubiese sido efecto de un error en la etapa de amplificación del gen cometido por la enzima pFU se secuenciaron otros dos clones en los cuales se observó el mismo cambio. Además, para descartar algún error en la secuenciación se obtuvieron 3 secuencias para cada uno de los clones, para así aumentar el número de muestras y disminuir los errores del proceso. Por ello, la diferencia observada podría deberse a polimorfismos a nivel de nucleótidos (SNP) presentes en las diferentes variedades de zanahorias, ya que se trabajó con la subespecie sylvestris variedad Nantes, mientras que la descrita en la base de datos solo indica que es sylvestris.

El clonamiento del gen lcyb1 en el vector pCR8 se realizó con una secuencia que no incluyó el codón de término de la traducción ya que permite la utilización del sistema de recombinación Gateway para la obtención de futuros vectores con fusión a proteínas reporteras o "tags" (Nakagawa y col., 2007) como GFP, o HIS. Por ejemplo, la recombinación con el vector pGWB5 permitiría la obtención de una fusión a GFP, con la cual se podría determinar la localización subcelular de la proteína LCYB. La clonación en el vector pGWB8 permitiría detectar la proteína



recombinante con anticuerpos universales anti HIS para analizar la expresión de las proteínas en plantas transgénicas que sobre-expresan el gen *lcyb1-his*.

#### **4.2 Obtención de los vectores de expresión *pMAL-zds1*, *pMAL-lcyb1*, *pET28a-zds1* y *pET28a-lcyb1*.**

Los vectores desarrollados en este seminario de título si bien se utilizaron para la obtención de anticuerpos policlonales también se podrían utilizar para realizar una serie de estudios proteicos. Con los vectores que presentan el gen *zds1* se podría, entre otras cosas, obtener la proteína pura a partir de extractos bacterianos y así obtener la actividad específica de la proteína, como también su  $K_m$  y otros parámetros cinéticos que se desconocen para esta enzima, y compararlo con los valores descritos para las ZDS de otras especies vegetales (Breitenbach y col., 1998). También se podrían realizar ensayos de complementación heteróloga en bacterias que poseen genes para la síntesis de carotenoides, para verificar la actividad de las proteínas.

En pCR8 se clonó un fragmento del cDNA de *lcyb1* de 1524 pb, que comprende desde el sitio de inicio de la traducción hasta el codón de término, sin incluirlo. Sin embargo debido a la presencia del sitio de corte para la enzima de restricción *EcoRI* en la secuencia del gen *lcyb1*, se clonó en los vectores de expresión *pET28a* y *pMAL* un fragmento que corresponde a las primeras 1281 pb. Es así como se eliminaron 257 nucleótidos correspondientes a 86 aminoácidos de la región C-terminal de la proteína. Pero consideramos que esta estrategia no debería afectar la expresión y posterior obtención de anticuerpos policlonales que reconozcan la proteína LCYB1 (Fig 9), ya que los anticuerpos reconocen secuencias o estructuras formadas por 8 aminoácidos, por lo cual se esperaba que haya más de una región inmunogénica que

pueda ser reconocida para obtener los anticuerpos policlonales. Incluso diversas empresas prestan servicios de obtención de anticuerpos sólo con péptidos (inmunogénicos) de entre 15 a 25 aminoácidos, asegurando la obtención de anticuerpos que reconozcan dicha secuencia de manera específica.

En la secuencia eliminada no está presente el motivo característico de las proteínas LCYBs (Cunningham y col., 2002) lo que indica que podría seguir manteniendo su actividad enzimática, por lo que este vector podría utilizarse para realizar estudios de complementación en bacterias y así determinar sitios o cajas reguladoras como también aminoácidos y/o regiones claves para la actividad de ésta proteína y comparar estos resultados con los obtenidos en nuestro laboratorio por Moreno (Moreno, 2010) para verificar si la región eliminada afecta la actividad de la proteína.

El vector de expresión pMAL-c2E usado para expresar *zds1* y *lcyb1* posee el sitio de múltiple de clonamiento río abajo del gen *malE*, gen que codifica para la proteína de unión a maltosa (MBP), lo que genera la expresión de una proteína de fusión a MBP. La fusión MBP tiene una serie de ventajas tales como facilitar la purificación, proteger de la degradación proteolítica y promover el plegamiento correcto de las proteínas de fusión (Baneyx, 1999), pero la característica más importante por la cual se escogió este plasmidio, es la notable capacidad para mejorar la solubilidad de la proteína fusionada (Kapust y Waugh, 1999).

El gen *malE* presenta una escisión en la secuencia señal de la proteína MBP, lo que resulta en la expresión citoplasmática de la proteína de fusión. Esta fusión permitió la obtención de la proteína de forma soluble, lo cual no fue posible obtener al utilizar el vector pET28a como

vector de expresión. Además, se logró una rápida y fácil purificación de la proteína fusionada (Figura 12) mediante la utilización de una columna de afinidad a maltosa.

El vector de expresión pET28a posee el sitio de múltiple clonamiento río abajo de una repetición de aminoácidos de Histidina lo que genera una fusión His en el extremo N-terminal de la proteína de interés. Esta fusión permitió la identificación de la proteína de interés en un western blot mediante la utilización de un anticuerpo comercial anti-His (Figura 14) y además permitirá en trabajos futuros la purificación de la proteína de fusión mediante una columna de afinidad a níquel.

#### **4.3 *Expresión de las proteínas recombinantes a partir de los vectores pMAL-zds1 y pMAL-lcyb1 y purificación de la proteína ZDS1-MBP.***

La proteína de fusión LCYB1-MBP, no se pudo obtener a partir de extractos bacterianos inducidos. Esto pudo deberse a una serie de factores tales como concentración del inductor, temperatura a la cual se efectuó la inducción, tiempo de inducción, densidad óptica del cultivo al momento de agregar el inductor, entre otras. Por lo que se espera que al cambiar alguna de estas condiciones o incluso variando el medio de cultivo se pueda obtener alguna colonia que exprese la proteína de interés.

Por el contrario, se obtuvo una gran cantidad de la proteína ZDS1-MBP purificada mediante la utilización de una columna de afinidad a maltosa (Figura 12, carriles 4 y 5). La proteína de fusión ZDS1-MBP, presente en la fracción enriquecida, tuvo suficiente pureza para la obtención de anticuerpos policlonales en ratones y no fue necesaria la obtención de la proteína pura. Ello se debe a que para aumentar la respuesta inmune de los ratones la proteína se inyecta junto

con un adyuvante, el cual hace más efectiva y potencia la respuesta inmune del ratón y permite la obtención de mayores cantidades de anticuerpos específicos (Azuma, 1992).

Los ratones fueron inmunizados con la proteína sin presencia de agente desnaturante, por lo que en el suero de los ratones inmunizados se encontrarán anticuerpos que reconozcan tanto una secuencia aminoacídica correlativa (por ejemplo, los aminoácidos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8) como anticuerpos que reconozcan una estructura de aminoácidos que no necesariamente se encuentran correlativos presente en la conformación nativa de la proteína. Sin embargo, la detección de los anticuerpos policlonales se realizó en condiciones desnaturalantes por lo que se detectarán sólo aquellos anticuerpos que reconozcan una secuencia de aminoácidos correlativos y no una estructura presente en la conformación nativa de la proteína. Debido a esto, no es necesario comprobar que las proteínas se encuentren activas o en su conformación nativa ya sea para la inmunización de ratones como para realizar la detección de los anticuerpos policlonales.

Es importante recalcar que en el suero de los ratones inmunizados también se encontrarán anticuerpos policlonales que reconozcan estructuras presentes en la conformación nativa de la proteína, lo que permitirá el reconocimiento de la proteína en geles en condiciones nativas.

#### **4.4 Expresión de la proteína recombinante ZDS1-HIS a partir del vector pET28a-zds1**

Los ratones fueron inyectados con la proteína de fusión ZDS1-MBP y por ello pudiesen haber generado anticuerpos contra epítopes presentes tanto en la proteína ZDS1 como en la MBP. Para realizar la detección de los anticuerpos policlonales para ZDS1 fue necesario idear un sistema de detección en el cual no esté presente la proteína MBP para así poder discriminar los anticuerpos anti-ZDS1 de los anti-MBP presentes en el suero de los ratones inmunizados.

Es crucial realizar una correcta detección de los anticuerpos presentes en el suero de los ratones inmunizados, ya que se pueden obtener resultados de falsos positivos generados por la detección de anticuerpos anti-MBP lo que llevaría a conclusiones erróneas o al fracaso de futuros experimentos, tales como no poder detectar la proteína ZDS1 en extractos de hojas o raíz de *Daucus carota*.

Es por esta razón que se utilizó el vector de expresión pET28a-zds1 para obtener la proteína ZDS1 sin la fusión MBP y poder realizar la detección de los anticuerpos policlonales anti-ZDS1. La expresión de la proteína ZDS1-His se realizó en el sistema *E.coli* BL21(DE3)/pET28a-zds1, el cual permite la obtención de grandes cantidades de proteína. Las células *E.coli* BL21(DE3) presentan integrado en su genoma el gen codificante para la enzima T7RNAPolimerasa bajo la regulación del promotor LacUV5, el cual es inducible por IPTG. Al agregar IPTG al medio de cultivo, éste actúa en dos niveles; (a) al unirse al promotor LacUV5 activándolo y permitiendo la expresión de la enzima T7 RNA polimerasa y (b) al unirse al promotor del represor LacI presente en el vector pET28a inhibiendo la producción de la proteína represora LAC I. Esto permite el reconocimiento del promotor T7 presente en el vector de expresión pET28a por

parte de la T7 RNA polimerasa generando la traducción del gen río abajo del promotor y la posterior expresión de la proteína de fusión ZDS1-His. La T7 RNA polimerasa posee una gran afinidad y una muy alta especificidad por el promotor T7, por lo que se une muy fuertemente al promotor generando grandes cantidades de proteína recombinante.

El problema es que este sistema es muy sensible a la presencia del inductor y pequeñas concentraciones de éste generan grandes cantidades de proteína y no permite una regulación muy fina en los niveles de inducción. Esto ocasiona que en la mayoría de los casos la proteína se encuentre formando agregados insolubles de proteínas, llamados cuerpos de inclusión. Este fue el caso de la proteína ZDS1-His, la cual se encontró en la fracción insoluble (*"pellet"* del sonificado) (Figura 13). Estos agregados proteicos se forman cuando se someten a las bacterias a un estrés celular, tal como el que se da cuando las forzamos a producir grandes cantidades de una proteína de interés. Como consecuencia de este estrés las proteínas que se van produciendo se acumulan en estos agregados insolubles y generalmente se encuentran de forma inactiva, lo que no permite su inmediata utilización siendo necesario realizar la solubilización de los agregados proteicos utilizando agentes desnaturalantes tales como urea o cloruro de guanidinio y la posterior diálisis del medio para disminuir gradualmente la concentración de los agentes desnaturalantes, esperando que la proteína adquiriera su conformación nativa y activa (O'Callaghan y col., 1998)

Debido a que ZDS1-His formó cuerpos de inclusión, no fue factible de usarla para generar anticuerpos en los ratones pero se utilizó para realizar geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE) para la detección de los anticuerpos policlonales (generados con

ZDS1-MBP) mediante Western blot, para lo cual tampoco fue necesario que la proteína se encontrará en su forma nativa o activa.

#### **4.5 Western blot anti His y anti-ZDS1.**

El Western blot anti-His se realizó para corroborar la expresión de la proteína recombinante ZDS1-His en la fracción insoluble de las células inducidas (Figura 14, carril 3), lo que permitió utilizar dicha fracción para seleccionar los sueros de ratones inmunizados que presentaron anticuerpos anti-ZDS1 y descartar aquellos que no presentaron anticuerpos de interés.

Luego de confirmar la expresión y presencia de la proteína ZDS1 en las fracciones de células inducidas (pET28a ZDS1-His), se realizó el Western blot anti-ZDS1 en el cual se detectó la presencia de anticuerpos policlonales anti-ZDS1 en el suero de ratones inmunizados, obteniéndose bandas del tamaño esperado de 63 KDa aproximadamente para las fracciones de células inducidas y para la fracción insoluble (Figura 15, carriles 2 y 3). En estas muestras se observaron bandas de menor peso molecular (<63 KDa) las cuales pueden deberse al reconocimiento de fragmentos de la proteína ZDS1 generados por la degradación o rompimiento de la proteína en alguna etapa, debido a los fuertes tratamientos a los cuales fueron sometidas las muestras (sonicación, desnaturalación por temperatura y centrifugaciones). También puede deberse a la unión de anticuerpos presentes en el suero de los ratones inmunizados que reconocen epítopes bacterianos. No se observó ninguna banda en el control negativo lo que indica que los anticuerpos policlonales son específicos para la proteína ZDS1.

*Daucus carota* es la única especie vegetal en la cual se han descrito dos genes *zds* (Just y col., 2007). Los genes *zds1* y *zds2* presentan un 87,9% de identidad nucleotídica y un 91% de identidad aminoacídica, encontrándose regiones de hasta 70 aminoácidos con 100% de

identidad. Debido a esta gran similitud entre ambos genes es que se espera que los anticuerpos policlonales obtenidos en este seminario de título reconozcan tanto a la proteína ZDS1 como a la proteína ZDS2. También esperamos que los anticuerpos policlonales obtenidos sean específicos para las ZDS de zanahoria y no reconozcan eficientemente las ZDS de otras especies vegetales, esto debido a que en nuestro laboratorio se probaron mediante Western blot anticuerpos anti-PDS de tomate (*lycopersicon esculentum*) (facilitados por el Dr. Marcel Kuntz del laboratorio de Genética Molecular de plantas de la Universidad J.Fourier, Francia) en extractos de proteínas totales de hojas y frutos de tomate y en hojas y raíz modificada de *Daucus carota* y sólo se obtuvieron bandas del tamaño esperado en las extracciones correspondientes a tomate (resultados no mostrados). Cabe señalar que las enzimas PDS de tomate y zanahoria comparten una identidad aminoacídica de 79% y aun con esta gran similitud no se obtuvieron bandas del tamaño esperado.

Los anticuerpos policlonales anti-ZDS1 obtenidos en este seminario de título fueron probados mediante Western blot utilizando extracciones de proteínas totales a partir de hojas y raíz modificada de plantas silvestres de *Daucus carota*, en donde se observó la banda de interés de 63KDa correspondientes a las proteínas ZDS de zanahoria en todas las etapas de desarrollo (Flores, 2011). No fue posible realizar los western blots a partir de extracciones de proteínas de las plantas silenciadas para el gen *zds2* ya que no se contaba con el material biológico suficiente para realizar las extracciones de dichas líneas transgénicas.

Además se realizaron Western blots anti-ZDS1 utilizando las extracciones de proteínas de hojas de tabacos transgénicos los cuales sobreexpresan la enzima ZDS1 de zanahoria, en donde se observó la banda de interés en plantas transgénicas y su ausencia en las extracciones de



proteínas de plantas silvestres de tabaco (Flores, 2011). Estos resultados nos indican que los anticuerpos policlonales obtenidos en este seminario de título son específicos para las ZDS de zanahoria y no reconocen eficientemente las ZDS de otras especies vegetales.

En este seminario de título se obtuvieron 4 vectores de expresión, correspondientes a los vectores pET28a-zds1, pMAL-zds1, pET28a-lcyb y pMAL-lcyb. Para estos dos últimos no se obtuvo expresión de las proteínas recombinantes en *E.coli*, por lo que se espera que analizando nuevas colonias y/o cambiando las condiciones de inducción se logre obtener la expresión de la proteína LCYB-MBP de manera soluble y su posterior purificación mediante una columna de afinidad a maltosa para la inyección de ratones con el fin de obtener anticuerpos policlonales anti-LCYB. Con el vector de expresión pET28a-lcyb se pretende obtener la proteína de fusión LCYB-His, con la cual se detectarán los sueros obtenidos a partir de los ratones inmunizados con la proteína recombinante LCYB-MBP.

## 5 LOGROS

- Se logró amplificar los genes *zds1* y *lcyb1* a partir de cDNA de hojas de *Daucus carota* y clonarlos en el vector pCR8, obteniendo las construcciones pCR8-*zds1* y pCR8-*lcyb1*.
- Se obtuvieron exitosamente las construcciones de expresión pET28a-*zds1*, pMAL-*zds1*, pET28a-*lcyb1* y pMAL-*lcyb1*, logrando la primera parte del objetivo principal de este seminario de título.
- Se logró expresar de manera soluble la proteína de fusión ZDS1-MBP utilizando el sistema de expresión *E.coli* BL21(dE3)/pMAL-*zds1*, la cual fue inyectada a ratones con el fin de producir anticuerpos policlonales anti-ZDS1.
- Se logró expresar la proteína de fusión ZDS1-His utilizando el sistema de expresión *E.coli* BL21(dE3)/pET28a-ZDS1, en el cual se obtuvo la proteína ZDS1-His formando cuerpos de inclusión.
- Se desarrolló exitosamente un sistema de detección para los anticuerpos policlonales anti-ZDS1 presentes en el suero de ratones inmunizados, utilizando la fracción insoluble que contenía la proteína ZDS1-His, mediante la técnica de Western blot.
- Se logró obtener anticuerpos policlonales anti-ZDS1 de dos sueros de ratones inmunizados, logrando así completar exitosamente el objetivo principal de este seminario de título.

## 6 PROYECCIONES

Este seminario de título se enmarca en un proyecto de investigación de la ruta de síntesis de carotenoides en *Daucus carota*, en el cual se han determinado mediante PCR en tiempo real los niveles de los diferentes mRNAs de los genes involucrados en esta ruta de síntesis. Se han obtenido plantas transgénicas silenciadas para diferentes genes, entre ellos para los genes *zds2* y *lcyb1*. Además, se desarrollaron plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan el gen *zds1* de *Daucus carota*, ya que no fue posible la obtención de plantas de zanahoria silenciadas para dicho gen. Todas estas investigaciones se han realizado para determinar la importancia e incidencia de la expresión de un determinado gen en la ruta de síntesis y para identificar los mecanismos regulatorios de la ruta, con el fin de realizar alguna correlación entre los niveles de transcritos, niveles de las enzimas involucradas y la acumulación de carotenoides en diferentes tejidos.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

- Armstrong, G. A., y Hearst, J. E. 1996. Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.* 10:228-237.
- Azuma, I. 1992. Synthetic immunoadjuvants: application to non-specific host stimulation and potentiation of vaccine immunogenicity. *Vaccine.* 10:1000-1006.
- Baneyx, F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol.* 10:411-421.
- Breimer, L. H. 1990. Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Mol Carcinog.* 3:188-197.
- Breitenbach, J., Fernandez-Gonzalez, B., Vioque, A., y Sandmann, G. 1998. A higher-plant type zeta-carotene desaturase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Plant Mol Biol.* 36:725-732.
- Britton, G. 1995. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J Exp Bot.* 53:2107-2113.
- Clotault, J., Peltier, D., Berruyer, R., Thomas, M., Briard, M., y Geoffriau, E. 2008. Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *J Exp Bot.* 59:3563-3573.
- Cunningham, F. X., y Gantt, E. 1998. Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 49:557-583.
- Cunningham, J. T., Bruno, S. B., Grindstaff, R. R., Grindstaff, R. J., Higgs, K. H., Mazzella, D., y Sullivan, M. J. 2002. Cardiovascular regulation of supraoptic vasopressin neurons. *Prog Brain Res.* 139:257-273.
- Chen, H., Zhang, J., Neff, M. M., Hong, S. W., Zhang, H., Deng, X. W., y Xiong, L. 2008. Integration of light and abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:4495-4500.
- de Boer, H. A., Comstock, L. J., y Vasser, M. 1983. The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:21-25.
- Disch, A., Hemmerlin, A., Bach, T. J., y Rohmer, M. 1998. Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side chain in tobacco BY-2 cells. *Biochem J.* 331 ( Pt 2):615-621.
- Dogbo, O., Laferriere, A., D'Harlingue, A., y Camara, B. 1988. Carotenoid biosynthesis: Isolation and characterization of a bifunctional enzyme catalyzing the synthesis of phytoene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:7054-7058.
- Dong, H., Deng, Y., Mu, J., Lu, Q., Wang, Y., Xu, Y., Chu, C., Chong, K., Lu, C., y Zuo, J. 2007. The *Arabidopsis* Spontaneous Cell Death1 gene, encoding a zeta-carotene desaturase essential for carotenoid biosynthesis, is involved in chloroplast development, photoprotection and retrograde signalling. *Cell Res.* 17:458-470.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., y Jurgens, G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med.* 13:341-390.
- Flores, C. 2011. Estudio de la función de los genes z-caroteno desaturasa 1 (*zds1*) y z-caroteno desaturasa 2 (*zds2*) de *Daucus carota* (zanahoria). Tesis de Magíster en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile. Santiago.

- Fraser, P. D., Truesdale, M. R., Bird, C. R., Schuch, W., y Bramley, P. M. 1994. Carotenoid Biosynthesis during Tomato Fruit Development (Evidence for Tissue-Specific Gene Expression). *Plant Physiol.* 105:405-413.
- Fraser, P. D., Kiano, J. W., Truesdale, M. R., Schuch, W., y Bramley, P. M. 1999. Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. *Plant Mol Biol.* 40:687-698.
- Fraser, P. D., y Bramley, P. M. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res.* 43:228-265.
- Fuentes, P. 2009. Efecto del desarrollo y la luz en los niveles de RNA mensajero de seis genes de la ruta carotenogénica en *Daucus carota L.* zanahoria. Seminario de título para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile. Santiago.
- Garattini, E., Gianni, M., y Terao, M. 2007. Cytodifferentiation by retinoids, a novel therapeutic option in oncology: rational combinations with other therapeutic agents. *Vitam Horm.* 75:301-354.
- Giorio, G., Stigliani, A. L., y D'Ambrosio, C. 2007. Agronomic performance and transcriptional analysis of carotenoid biosynthesis in fruits of transgenic HighCaro and control tomato lines under field conditions. *Transgenic Res.* 16:15-28.
- Grotewold, E. 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol.* 57:761-780.
- Guo, X., Yang, L., y Hu, H. 2009. Cloning and expression analysis of carotenogenic genes during ripening of autumn olive fruit (*Elaeagnus umbellata*). *J Agric Food Chem.* 57:5334-5339.
- Hirschberg, J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol.* 4:210-218.
- Howitt, C. A., y Pogson, B. J. 2006. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ.* 29:435-445.
- Just, B. J., Santos, C. A., Fonseca, M. E., Boiteux, L. S., Oloizia, B. B., y Simon, P. W. 2007. Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theor Appl Genet.* 114:693-704.
- Kapust, R. B., y Waugh, D. S. 1999. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* 8:1668-1674.
- Kwon, S. J., Choi, E. Y., Choi, Y. J., Ahn, J. H., y Park, O. K. 2006. Proteomics studies of post-translational modifications in plants. *J Exp Bot.* 57:1547-1551.
- Lichtenthaler, H. K., Schwender, J., Disch, A., y Rohmer, M. 1997. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* 400:271-274.
- Maass, D., Arango, J., Wust, F., Beyer, P., y Welsch, R. 2009. Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PLoS One.* 4:e6373.
- Mayne, S. T. 1996. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB J.* 10:690-701.
- Milborrow, B. V. 2001. The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *J Exp Bot.* 52:1145-1164.

- Moreno, J. 2010. Evaluación del gen licopeno B-ciclase de *Daucus carota* (zanahoria) mediante complementación heteróloga. Universidad de Chile Santiago.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., y Kimura, T. 2007. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng.* 104:34-41.
- Nambara, E., y Marion-Poll, A. 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol.* 56:165-185.
- Nelson, J. L., Bernstein, P. S., Schmidt, M. C., Von Tress, M. S., y Askew, E. W. 2003. Dietary modification and moderate antioxidant supplementation differentially affect serum carotenoids, antioxidant levels and markers of oxidative stress in older humans. *J Nutr.* 133:3117-3123.
- O'Callaghan, C. A., Tormo, J., Willcox, B. E., Blundell, C. D., Jakobsen, B. K., Stuart, D. I., McMichael, A. J., Bell, J. I., y Jones, E. Y. 1998. Production, crystallization, and preliminary X-ray analysis of the human MHC class Ib molecule HLA-E. *Protein Sci.* 7:1264-1266.
- Pizarro, L. 2008. Estudio de la función del gen licopeno  $\beta$  ciclase (*lcyb*) en la biosíntesis de carotenoides en *Daucus carota*. Tesis de Magíster en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile. Santiago.
- Rao, A. V., y Rao, L. G. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacol Res.* 55:207-216.
- Ronen, G., Carmel-Goren, L., Zamir, D., y Hirschberg, J. 2000. An alternative pathway to beta - carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:11102-11107.
- Sambrook, J., y Russell, D. 2001. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schmid, V. H. 2008. Light-harvesting complexes of vascular plants. *Cell Mol Life Sci.* 65:3619-3639.
- Schwender, J., Zeidler, J., Groner, R., Muller, C., Focke, M., Braun, S., Lichtenthaler, F. W., y Lichtenthaler, H. K. 1997. Incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into isoprene and phytyl by higher plants and algae. *FEBS Lett.* 414:129-134.
- Simkin, A. J., Laboure, A. M., Kuntz, M., y Sandmann, G. 2003. Comparison of carotenoid content, gene expression and enzyme levels in tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves. *Z Naturforsch C.* 58:371-380.
- Snodderly, D. M. 1995. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am J Clin Nutr.* 62:1448S-1461S.
- Tafti, M., y Ghyselinck, N. B. 2007. Functional implication of the vitamin A signaling pathway in the brain. *Arch Neurol.* 64:1706-1711.
- Takano, H., Obitsu, S., Beppu, T., y Ueda, K. 2005. Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. *J Bacteriol.* 187:1825-1832.
- Tao, N., Hu, Z., Liu, Q., Xu, J., Cheng, Y., Guo, L., Guo, W., y Deng, X. 2007. Expression of phytoene synthase gene (*Psy*) is enhanced during fruit ripening of Cara Cara navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant Cell Rep.* 26:837-843.

- Taylor, M., y Ramsay, G. 2005. Carotenoid biosynthesis in plant storage organs: recent advances and prospects for improving plant food quality. *Physiologia Plantarum* 124:143-151.
- Telfer, A. 2005. Too much light? How beta-carotene protects the photosystem II reaction centre. *Photochem Photobiol Sci.* 4:950-956.
- von Lintig, J., Welsch, R., Bonk, M., Giuliano, G., Batschauer, A., y Kleinig, H. 1997. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J.* 12:625-634.
- Yamamizo, C., Kishimoto, S., y Ohmiya, A. Carotenoid composition and carotenogenic gene expression during *Ipomoea* petal development. *J Exp Bot.* 61:709-719.
- Young, M. S., Li, Y. C., y Lin, M. T. 1993. A modularized infrared light matrix system with high resolution for measuring animal behaviors. *Physiol Behav.* 53:545-551.

## 8 ANEXO

1 atggccgccgcttcttctgtctttgtatthttccggccactttcacc  
M A A A S S S L Y F P A T F T  
46 gctgattctccctctttctcgttctccgctcggcgaccctttaag  
A D S P S F S F S A R R P F K  
91 cccaagaggatgatgttgcttgctcggctccgatttgatcaaaat  
P K R M M L L V R S D L D Q N  
136 gtttccgacatgagctcaaatgctccgaaagggttatttccgccc  
V S D M S S N A P K G L F P P  
181 gaacctcagctttatcgtggaccgaagctaaaagtggctattata  
E P Q L Y R G P K L K V A I I  
226 ggagctgggcttgccggaatgtctaccgctgttgagcttctagat  
G A G L A G M S T A V E L L D  
271 cagggcacgaggtggatataatgaatcaaggccttttattggt  
Q G H E V D I Y E S R P F I G  
316 ggaaaagtgggttctttcactgataaacgcggaatcatatagaa  
G K V G S F T D K R G N H I E  
361 atgggacttcatgtattctttggctcgtacaataatcttttccgt  
M G L H V F F G R Y N N L F R  
406 ctctgaaaaagggtggggctgataaaaatcttctcgtgaaggag  
L L K K V G A D K N L L V K E  
451 catactcacacttttgtaaacaaaggggtgaaattgggtgagctt  
H T H T F V N K G G E I G E L  
496 gatthttcgtttcccagttggagcaccattacacggcataaatgca  
D F R F P V G A P L H G I N A  
541 tttctgactaccaatcagctcaagacttatgataaagcaagaaat  
F L T T N Q L K T Y D K A R N  
586 gctgtagcccttgcccttagtccagttgtgcgggcacttgttgat  
A V A L A L S P V V R A L V D  
631 ccagatggcgcaatgaaggacatacgaatctggataatataagc  
P D G A M K D I R N L D N I S  
676 ttttctgaatgggtcttctgtctaaaggggaacgcaaagagtatt  
F S E W F L S K G G T R K S I  
721 cagagaatgtgggatcctgttgcttatgctctcgggtttattgac  
Q R M W D P V A Y A L G F I D  
766 tgtgataacatgagtgctcgttgatgctcacgattttctcattg  
C D N M S A R C M L T I F S L  
811 ttgccaactaaaacagaagcatcccttttgccatgcttaaggt  
F A T K T E A S L L R M L K G  
856 tctccagatacttatttaagtgggccattcagagactacattaca  
S P D T Y L S G P I R D Y I T  
901 cagaagggggcaggttccatctcaggtggggatgccgagaaatt  
Q K G G R F H L R W G C R E I  
946 ctttatgaaaaatctagtgatggacagacatacatttcaggcatt  
L Y E K S S D G Q T Y I S G I  
991 gccatgtccaaggcaactcaaaagaaaatcgtaaaagcagatgcc  
A M S K A T Q K K I V K A D A  
1036 tacgtcgcagcatgcatgctccctggaatcaaaagattattacc  
Y V A A C D V P G I K R L L P  
1081 tcacagtggagagagtgggagttcttcgacaatatctacaaacta  
S Q W R E W E F F D N I Y K L  
1126 gttgggtgttctgttgctcacagtacaacttagatacaatggctgg  
V G V P V V T V Q L R Y N G W  
1171 gttacagagatgcaagatctagaaaagtcaaggcaactgaggcaa



V T E M Q D L E K S R Q L R Q

```
1216 gcagcaggattggataaatctcctttataccccagatgcagatttc
    A A G L D N L L Y T P D A D F
1261 tcttgttttgctgacttagctcttgcacatccagaagattactat
    S C F A D L A L A S P E D Y Y
1306 cttgagggtcaaggctcgttactccaatgtgtgctcaccacaggc
    L E G Q G S L L Q C V L T P G
1351 gatccctacatgcctctaccaaagatcaaatacatagagagagtt
    D P Y M P L P N D Q I I E R V
1396 accaagcagggttttgactttgttcccatcctctcaaggcctggaa
    T K Q V L T L F P S S Q G L E
1441 gttacatggtcatcagttgtgaagattgctgcagtcattataccgt
    V T W S S V V K I A Q S L Y R
1486 gaggggctggtaaagatccttttagacctgatcagaagaccct
    E G P G K D P F R P D Q K T P
1531 gtgggaaactttttccttgctggctcatatacgaagcaggattat
    V G N F F L A G S Y T K Q D Y
1576 atagacagtatggaaggtgcaactctttcaggtaggcaagcttct
    I D S M E G A T L S G R Q A S
1621 gcctacatttgatgctggagaagaattaacgaccttgcgaaaa
    A Y I C D A G E E L T T L R K
1666 acaattgcttcaatcgactccaacacacctacagaagctgagtta
    T I A S I D S N T P T E A E L
1711 acccttgctctga 1722
    T L V *
```

**Anexo 1: Secuencia obtenida para el gen *zds1* de *Daucus carota* y traducción in-silico.** Se resalta el **codón de inicio (atg)** y el **codón de término (tga)** de la traducción. También se resalta el **codón(cgc)** que origina un cambio en el aminoácido C 129 R, en relación a la secuencia descrita en la base de datos. Esta secuencia se obtuvo mediante la secuenciación de tres clones diferentes que portaban el vector pCR8-zds1 y se obtuvieron dos secuencias para cada uno de los clones. Las seis secuencias obtenidas presentaron la misma mutación antes descrita.