



**Cinvestav**  
Unidad Irapuato

Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

Informe Técnico de Residencia Profesional

“Síntesis de Hormonas Vegetales”

Ingeniería en Bioquímica

Presenta:  
Aníbal Uriel Reyes Mérida

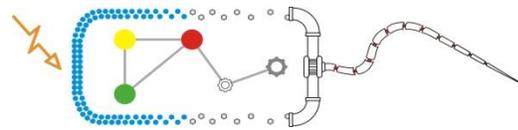
Asesor interno:  
Dra. Teresa del Rosario Ayora Talavera

Centro de Investigación y Estudios Avanzados

Asesor externo:  
Dr. Agustino Martínez Antonio

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a junio de 2013

**SEP**  
SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



LABORATORIO DE BIOLOGÍA SINTÉTICA Y BIOSISTEMAS

## CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>10</b>
<b>CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA</b> .....	<b>11</b>
<b>PROBLEMAS A RESOLVER</b> .....	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
OBJETIVO GENERAL .....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>ALCANCES Y LIMITACIONES</b> .....	<b>17</b>
ALCANCES .....	17
LIMITACIONES.....	17
<b>FUNDAMENTO TEÓRICO</b> .....	<b>18</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>23</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>33</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>34</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>36</b>
ANEXO A .....	36
ANEXO B .....	36

## Tabla de figuras

Figura 1. Coordinación hormonal del crecimiento en diferentes partes de una planta. ....	5
Figura 2. Ruta de la biosíntesis y regulación del etileno. ....	7
Figura 3. Estructura orgánica del Cinvestav Unidad Irapuato. ....	12
Figura 4. Diseño de plásmido BIOBRICK del repositorio iGEM. ....	20
Figura 5. Diseño del plásmido pCold1 ....	21
Figura 6. Diseño del plásmido pSBA. ....	22
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de pUC 57-ACCS. ....	25
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de pSBA y ACCS. ....	26
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% PCR de colonia pSBA. ....	26
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% Digestión enzimática pSBA - ACCS. ....	27
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% Digestión enzimática de pSBA. ....	28
Figura 12. . Electroforesis en gel de agarosa al 1% Digestión enzimática de pCold1 ....	28
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1% Digestión enzimática de Biobrick. ....	29
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% PCR de colonia de Biobrick-ACCS. ....	29
Figura 15. . Electroforesis en gel de agarosa al 1% Digestión enzimática de Biobrick-ACCS. ....	30
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% PCR de colonia pCold1-ACCS. ....	30
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1% Digestión enzimática de pCold1 -ACCS. ....	31
Figura 18. Gel de poliacrilamida ACC sintasa. ....	32

---

# INTRODUCCIÓN

---

El crecimiento de las plantas no solo se determina por la absorción de nutrientes a través de las raíces, por los carbohidratos sintetizados en las hojas o por la luz del sol y el agua, sino también por sustancias químicas que actúan como agentes específicos y correlacionan el crecimiento de las plantas en sus diversas partes. Tales agentes son las hormonas vegetales, que desempeñan un papel decisivo en la regulación del crecimiento.

El término hormona vegetal se refiere a sustancias orgánicas que se producen dentro de la planta y que en bajas concentraciones provoca ciertas respuestas fisiológicas como promover, inhibir o modificar cualitativamente el crecimiento.

La palabra hormona procede del griego *hormaein* que significa excitar o estimular. Sin embargo, está claro que muchas hormonas tienen efecto inhibitorios por lo que sería más acertado considerarlos reguladores del crecimiento.

Se conocen cinco grupos principales de hormonas vegetales o fitohormonas: las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el etileno y el ácido abscísico; las cuales manifiestan interacciones con las plantas como las que se muestran en la figura 1. Todas ellas actúan coordinadamente para regular el crecimiento en las diferentes partes de una planta. Otras sustancias que eventualmente pueden clasificarse como fitohormonas son: las poliaminas, los jasmonatos, el ácido salicílico, los brasinosteroides y la sistemina (Rost et al. 2006).

¿Cómo actúan las fitohormonas? Dos mecanismos generalmente aceptados:

- La hormona atraviesa **la membrana celular** de la célula diana y alcanza el citoplasma. Allí se une a una molécula adecuada (receptor) y forma un complejo hormona-receptor. A partir de aquí, el complejo puede disociarse o puede entrar en el núcleo como tal y afectar a la síntesis de los ARNm. Este efecto sobre la transducción es lo que produce la respuesta fisiológica.
- La hormona se une a un **receptor de membrana** en la célula diana. La unión hormona-receptor produce en este último un cambio conformacional que conduce a una cascada interna de reacciones citoplásmicas que pueden producir efectos muy variados: nuevas actividades enzimáticas, modificación de procesos metabólicos, inducción de síntesis de ARNm, etc.

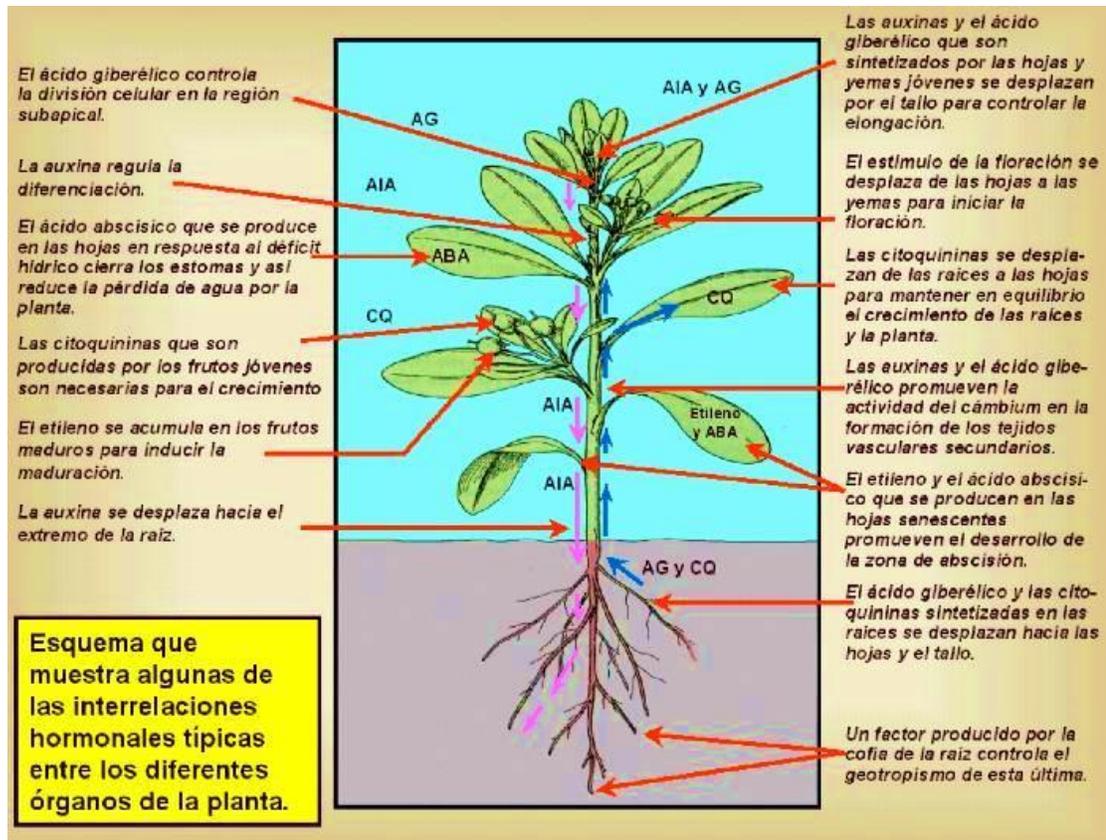


Figura 1. Coordinación hormonal del crecimiento en diferentes partes de una planta. (AIA es el ácido indolacético, una auxina; CQ, citocinina; ABA, ácido abscísico; AG, ácido giberélico). (Rost et al. 2006)

Gran parte de lo que se sabe de los reguladores de crecimiento o fitohormonas tiene una aplicación directa en la agricultura. El control de la maduración del fruto, el crecimiento de las plantas, la época de floración o hasta la producción de frutas sin semillas (Campbell et al. 2001).

Por ejemplo, las auxinas se usan para prevenir que se desprendan frutos de los naranjos y los toronjos antes de que puedan ser recolectados. La cantidad de auxina debe ser monitoreada de manera cuidadosa, debido a que un exceso puede estimular a la planta a que libere más etileno, haciendo que el fruto madure y caiga antes de tiempo.

Durante unos años, el descubrimiento de la auxina llevó, más o menos directamente, al aislamiento de la cinetina y al estudio de los efectos de las citocininas sobre el crecimiento y el desarrollo de los vegetales. Por otro lado, mucho antes de que se descubriera su relación

con las auxinas, se sabía que el etileno tenía ciertos efectos sobre las plantas; es decir mucho antes de que se considerara como una hormona vegetal (Campbell et al. 2001).

El etileno fue usado en la práctica desde el antiguo Egipto, en donde se trataban con gas los higos para estimular su maduración. En la antigua China se quemaba incienso en locales cerrados para incrementar la maduración de las peras.

En 1901, el ruso Dimitri Neljubov, un graduado del Instituto Botánico de la Universidad de San Petersburgo, fisiólogo de plantas, demostró que el etileno era el agente activo del gas de alumbrado. Neljubov demostró que la exposición de plántulas de guisante al gas provocaba un crecimiento de los tallos en dirección horizontal. Cuando se probaron individualmente los distintos componentes del gas se observó que todos eran inactivos excepto el etileno, que causaba el crecimiento a concentraciones de tan solo 0.06 partes por millón (ppm).

La primera indicación de que el etileno era un producto natural de los tejidos vegetales fue descrita por H.H. Coussin en 1910. Coussin observó que cuando se mezclaban naranjas con bananas en el mismo contenedor, las bananas maduraban prematuramente.

El etileno está involucrado en muchos aspectos del ciclo de vida de la planta, incluyendo la germinación de semillas, desarrollo de pelos radicales, la nodulación de la raíz, la senescencia de flores, abscisión y maduración del fruto (Johnson & Ecker, 1998). Se puede formar ya sea fitoquímicamente (por ejemplo, en la atmósfera y las capas oceánicas superiores) o enzimáticamente por las plantas y microorganismos. La producción de etileno en las plantas es más alta en tejidos en senescencia y maduración de la fruta ( $>1.0 \text{ nL g de tejido fresco}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) pero todos los órganos de las plantas superiores pueden sintetizarlo. El etileno es biológicamente activo a muy bajas concentraciones tan bajas como 1 parte por billón (Taiz & Zeiger, 2005).

La producción de etileno está estrechamente regulada por señales internas durante el desarrollo y en respuesta a estímulos ambientales de estrés biótico (por ejemplo, ataque de patógenos) y abióticos, tales como heridas, la hipoxia, el ozono, enfriamiento, o congelación (Wang et al. 2002).

Para entender los papeles de etileno en funciones de la planta, es importante conocer cómo se sintetiza esta hormona gaseosa, cómo se regula su producción, y cómo se transduce la señal.



La formación de S-Adenosil-Metionina (S-AdoMet) es catalizada por la S-Adenosil-Metionina Sintetasa (SAM sintetasa) de la metionina a expensas de una molécula de ATP por molécula de S-AdoMet sintetizada. S-AdoMet es el grupo donante de metilo para muchas moléculas celulares (metilado aceptadores), incluyendo ácidos nucleicos, proteínas, y lípidos. Además, S-AdoMet es el precursor de la vía de síntesis de poliaminas (espermidina / espermina ruta de biosíntesis). ACC es el precursor inmediato de etileno. El paso limitante de la velocidad de la síntesis de etileno es la conversión de S-AdoMet en Ácido 1-Aminociclopropano 1-Carboxílico (ACC) por ACC sintasa bajo la mayoría de condiciones. 5'-Metiltioadenosina (MTA) es el subproducto generado junto con la producción ACC por la ACC sintasa. El reciclaje de MTA de nuevo a metionina conserva el grupo metilto y es capaz de mantener una concentración constante de metionina celular incluso cuando etileno se sintetiza rápidamente. La malonilación de ACC a malonil-ACC (MACC) priva a la fuente de ACC y reduce la producción de etileno. La ACC oxidasa cataliza el último paso de la síntesis de etileno usando ACC como sustrato y genera dióxido de carbono y cianuro. La regulación transcripcional tanto de la ACC sintasa y ACC oxidasa se indica mediante flechas discontinuas (Wang et al. 2002).

El etileno juega un papel tan importante en la maduración de los frutos y en los ya mencionados anteriormente cambios fisiológicos. Los científicos han usado diversas técnicas de genética y biología molecular para lograr cambios fisiológicos en las plantas, una de ellas es el uso de ADN recombinante.

El término ADN recombinante hace referencia a la creación de nuevas combinaciones de segmentos o de moléculas de ADN que no se encuentran juntas de manera natural. La tecnología del ADN recombinante utiliza técnicas que provienen de la bioquímica de los ácidos nucleicos unidas a metodologías genéticas desarrolladas para la investigación de bacterias y virus. Esta tecnología es una herramienta poderosa para producir cantidades potencialmente ilimitadas de un gen. Aunque se dispone de diversos métodos, los procedimientos básicos incluyen los siguientes pasos:

1. Se purifica el ADN a clonar de células o tejidos.
2. Para generar fragmentos específicos de ADN se utilizan proteínas denominadas enzimas de restricción. Estas enzimas reconocen y cortan las moléculas de ADN por secuencias nucleotidas específicas.

3. Los fragmentos producidos mediante la digestión con enzimas de restricción se unen a otras moléculas de ADN que sirven de vectores. Un vector unido a un fragmento de ADN o Gen de interés es una **molécula de ADN recombinante**.
4. La molécula de ADN se transfiere a una célula huésped. La molécula de ADN recombinante se replica dentro de esta célula, produciendo docenas de copias idénticas, o clones de sí misma.
5. Al replicarse las células huésped, las células descendientes heredan el ADN recombinante, generándose una población de células huésped que llevan todas ellas copias de la secuencia de ADN clonada o secuencia de interés.
6. El ADN de interés puede recuperarse de las células huésped, purificarse y analizarse.
7. También se puede transcribir el ADN clonado, se puede traducir su ARNm, y el producto génico que codifica se puede aislar y vender comercialmente.

---

# JUSTIFICACIÓN

---

La biotecnología es el uso de organismos vivos para llevar a cabo procesos químicos concretos destinados a la aplicación industrial o comercial. Lo que se refieren a diversos sectores en este caso el de la agricultura donde se llevara a cabo la aplicación tecnológica.

Debido a su elevada velocidad de difusión, el etileno es difícil de aplicar en campo como gas, pero esta limitación se puede superar si se utilizan compuestos que liberan etileno. El más extendido de estos compuestos es el etefón, o ácido 2-cloroetilfosfónico, que fue descubierto en la década de 1960 y se conoce con varios nombres registrados como Ethrel (Rost et al. 2006).

El etefon es pulverizado en una disolución acuosa que es rápidamente absorbida y transportada al interior de la planta. Allí se libera etileno lentamente por una reacción química que permite a la hormona ejercer su efecto.

El etefón es un regulador del crecimiento vegetal. Su uso varía con las especies de plantas, la concentración química, y el tiempo de aplicación. Etefon regula las fases de crecimiento y desarrollo de plantas por aplicación a diversos sitios de crecimiento (Kidd & James, 1991). En la actualidad se ha registrado en los EE.UU. para su uso en las manzanas, cebada, moras, bromelias, melones, cerezas, café, algodón, pepinos, uvas, guayabas, nueces de macadamia, plantas ornamentales, pimientos, piñas, el centeno, la calabaza, caña de azúcar, tabaco, tomates , nueces, trigo, etc (Kidd & James, 1991).

La inducción de la madurez comercial puede usar etefón en dosis adecuadas para no causar la pérdida de sus propiedades.

El uso de la Biotecnología de Plantas trata de contribuir mediante el uso de diversas técnicas de Biología Molecular y Genética a la creación de un regulador de crecimiento vegetal a través de organismos genéticamente modificados sin los efectos que pueden tener los reguladores de crecimiento químicos como el etefón.

---

# CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA

---

El presente proyecto de residencia profesional fue desarrollado en el laboratorio de Biología Sintética II del Departamento de Ingeniería Genética del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (Cinvestav) Unidad Irapuato.

## Historia

La idea de desarrollar un grupo de investigación que trabajara sobre aspectos agroalimentarios con un enfoque vanguardista surgió en el Cinvestav del IPN y se debió esencialmente al Doctor Manuel Ortega y a su visionaria actitud ante el desarrollo de la ciencia en México. Su idea, en principio, fue compartida con varios investigadores de diversas instituciones, como se describe después, quienes se solidarizaron con el propósito de formar un grupo de investigación en plantas y pronto se abocaron a hacer lo pertinente. Mientras tanto, en el nivel local, la idea fue tomando fuerza con la participación del doctor Alejandro Blanco, quien fungió como coordinador del grupo inicial y luego fue nombrado director de la Unidad Irapuato.

El proyecto original fue motivo de reflexión constante, no sólo había que decidir el perfil científico del grupo de trabajo, sino que había que ser analítico al seleccionar el sitio de la provincia mexicana que más conviniera a los intereses del grupo. De todos los posibles lugares considerados para el establecimiento del “grupo de plantas” (como también se le conocía en aquel entonces), destacó el Bajío, en Guanajuato, porque la vocación del entorno era y sigue siendo fundamentalmente agrícola. La situación actual La Unidad Irapuato ha mantenido su organización académica en dos departamentos: Ingeniería Genética de Plantas y Biotecnología y Bioquímica. Ambos departamentos han reunido esfuerzos y ahora se ofrece, de manera conjunta, un solo programa de estudios, el cual se complementa con cursos optativos seleccionados en función de la orientación del propio estudiante.

De esta manera, se procura asegurar que el perfil del egresado cumpla con una serie de requerimientos académicos comunes a todos los estudiantes. Este hecho ilustra fundamentalmente la buena disposición de toda la unidad para consolidar la infraestructura humana y física disponible. Durante las diferentes fases de su desarrollo, la Unidad Irapuato ha puesto especial interés en establecer un intenso intercambio académico, tecnológico y científico no sólo con las instituciones de la región, sino también con instituciones nacionales

e internacionales, lo que ha permitido mantener una posición de vanguardia en sus áreas de trabajo.

### Misión

"Contribuir de manera destacada al desarrollo de la sociedad y la preservación del ambiente, mediante la investigación trascendente y la formación de investigadores y expertos en biología y biotecnología de plantas en su entorno"

### Visión

Ser un grupo competitivo a nivel internacional en biología, genómica y biotecnología vegetal; contribuyendo a la solución de problemas nacionales

### Estructura orgánica



Figura 3. Estructura orgánica del CINVESTAV Unidad Irapuato.

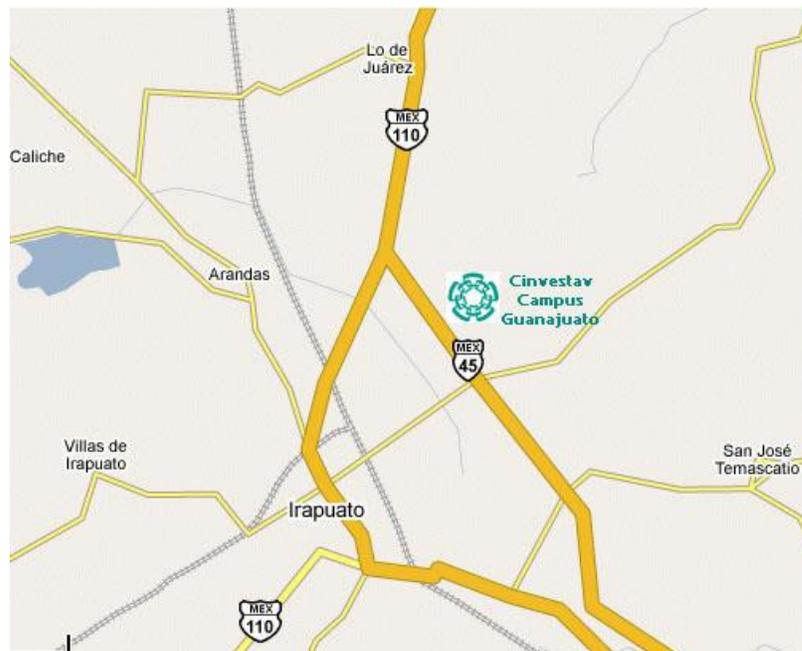
## Departamento de Ingeniería Genética

El Departamento de Ingeniería Genética comprende 19 investigadores quienes trabajan en proyectos de investigación básica y aplicada, muchos de ellos enfocados a resolver problemas específicos del sector agrícola de México. El Departamento también tiene una fuerte reputación en la formación de profesionales desde tesis de licenciatura y un programa de posgrado consolidado (maestría y doctorado), así como mediante estancias de investigación, sabáticas y posdoctorales, todos basados en el desarrollo de proyectos de investigación.

La investigación desarrollada en el Departamento es sustentada con fondos de la industria, así como de agencias estatales, federales e internacionales y abarca los siguientes tópicos: Interacción planta-microbio y planta-insecto, Genética, genómica y evolución, Fisiología, Bioquímica y metabolismo, Biotecnología.

### Ubicación

Km. 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-León 36821 Irapuato Gto. México



# Instalaciones



Laboratorio Biología Sintética II



Planta Baja

Planta Alta

---

# PROBLEMAS A RESOLVER

---

Dentro de los primeros retos del presente reporte fue el de establecer la secuencia de ADN para el gen de ACC sintasa, la cual pueda ser clonada en un vector de expresión.

Posteriormente uno de los puntos importantes a considerar fue elegir vectores de clonación con suficiente eficacia para que nuestro gen pudiera ser clonado, y lograr que los vectores elegidos puedan replicarse de manera autónoma sin que afecten a la célula huésped de manera que inhiban su crecimiento, o provoquen su muerte.

De los retos más importantes que se presentan es llevar a cabo la transformación de las células competentes con el plásmido que contiene nuestro **gen de interés**. Llevar a cabo una transformación de *E.coli*, y enseguida identificar si las colonias crecidas, a partir de nuestro plásmido de clonación, son positivas. El identificar si las colonias son positivas se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), proceso relativamente rápido; después de este procedimiento el ADN de las colonias recombinantes detectadas por PCR se confirman mediante análisis con enzimas de restricción, lo cual determinará que las clonas han sido transformadas de manera exitosa.

Sin duda, posteriormente, el reto que presentará dificultad será lograr la producción de la proteína a través de su inducción en los vectores de expresión.

---

# OBJETIVOS

---

## OBJETIVO GENERAL

---

---

- Síntesis de ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico en *Escherichia coli*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

---

- Clonar el gen de la ACC sintasa en vectores de expresión tipo Biobrick y p-Cold.
- Expresar el gen en *E. coli*.
- Extraer y detectar el producto del gen.
- Realizar bioensayos en tejido vegetal.

---

# ALCANCES Y LIMITACIONES

---

## ALCANCES

---

---

Se logró cumplir el objetivo de obtener clonas en ambos plásmidos de expresión, Biobrick y pCold para el gen de ACCS. Se logró expresar la proteína codificada por el gen de ACCS en el plásmido Biobrick que contiene un promotor constitutivo. También se logró la expresión de la proteína en el plásmido pCold que contiene un promotor inducible. La sobreexpresión de la proteína fue confirmada mediante electroforesis en geles de acrilamida.

## LIMITACIONES

---

---

Dentro de las limitaciones que tuvimos para avanzar en el proyecto, puede hacerse mención a un retraso en la clonación de nuestro gen de interés en el plásmido pCold, debido a un cambio de fase en el marco de lectura del código genético de la secuencia del gen. Una vez que esto fue corregido, se logró sobreexpresar el gen, solo faltando por realizar la detección y cuantificación del ácido aminociclopropano y los bioensayos en tejido vegetal.

---

# FUNDAMENTO TEÓRICO

---

El etileno regula una multitud de procesos, que van desde la germinación de semillas a la senescencia de órganos. De particular importancia económica el papel del etileno como un inductor de la maduración de la fruta. El etileno es sintetizado de S-adenosil-L-metionina vía ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico.

Fue Adams & Yang (1979) que identificaron el ACC como intermediario en la biosíntesis del etileno en tejido de manzana. En muchos tejidos de la planta se encontró que la tasa de producción de etileno que se correlaciona directamente con su contenido ACC endógeno.

Señales ambientales y endógenas regulan la biosíntesis de etileno principalmente a través de la expresión diferencial de genes de la ACC sintasa (Bleecker & Kende, 2000). En todas las plantas investigadas hasta el momento, la ACC sintasa es codificada por una familia de genes de tamaño medio, y la expresión de los genes de la ACC sintasa está regulada diferencialmente por diversas señales de desarrollo, ambientales, y hormonales.

La mayoría de los esfuerzos se han concentrado en la caracterización y purificación de la ACC sintasa a partir de pericarpio de tomate tejido. Convencional y filtración en gel por HPLC indicó que la ACC sintasa nativa tenía una masa molecular de 55 a 57 kD. (Kende, 1989)

En 1975 Primrose identificó la producción de etileno en dos aislados de *E. coli*, de suelos incubados anaeróbicamente. Así otros microorganismos como *Pseudomonas solanacearum* han sido identificados también como productores de etileno

Con la tecnología de ADN recombinante, es posible cortar un pequeño trozo de ADN de una especie, introducirlo en el ADN de otra especie (huésped) con la que no puede cruzar, pero en la que se expresa el ADN del donante. Las especies huésped, que ahora se llama un organismo modificado genéticamente (OMG), por lo tanto adquiere una nueva propiedad que no podría haber obtenido por reproducción convencional.

La clonación molecular se desarrolló cuando se empezaron a comprender mejor ciertos aspectos de la genética molecular. Además, en muchos casos, la aplicación biotecnológica específica no solo depende de la capacidad para identificar y clonar un gen, sino también de la manipulación que se haga de la expresión del gen para producir, identificar y purificar la proteína.

El microorganismo procarionte estudiado con mayor profundidad y uno de los mejores caracterizados desde el punto de vista genético es la bacteria *E. coli*. Se utiliza mucho en ingeniería genética, se han aislado plásmidos de esta bacteria y han sido modificados genéticamente para crear vectores efectivos para la transferencia de genes.

Una célula potencialmente capaz de absorber una molécula de ADN del medio y de ser transformada con este nuevo ADN, se dice que es competente. Para transferir ADN a las células en experimentos de ingeniería genética fue necesario encontrar un método para hacer competente a *E. coli*. Se ha encontrado que cuando *E. coli* se trata con altas concentraciones de iones de calcio y luego se mantiene en frío se convierte en transformante de baja eficiencia. *E. coli* tratada de esta manera, está preparada para tomar ADN. De esta manera, la transformación de *E. coli* por ADN plasmídico es relativamente eficiente.

Después de unirse a un vector de clonación, un segmento de ADN puede llegar a entrar a una célula huésped y replicarse o clonarse. Para servir de vector, una molécula de ADN debe tener determinadas características, como replicarse independientemente junto con el ADN que transporta. Contener sitios de corte para enzimas de restricción presentes solo una vez en el vector. Tener genes de resistencia a antibióticos que la célula huésped no tenga. Ser fácil de recuperar.

Las enzimas de restricción son producidas por las bacterias como un mecanismo de defensa contra las infecciones víricas. Las enzimas de restricción reconocen una secuencia específica de nucleótidos, denominada **secuencia de reconocimiento**. La enzima corta ambas cadenas de ADN dentro de la secuencia de reconocimiento siguiendo un patrón de corte específico. En el presente trabajo se utilizaron enzimas de restricción específicas.

Los plásmidos son un tipo de vector, moléculas de ADN de doble cadena extracromosómicas de origen natural que tiene un origen de replicación (*ori+*) y que se replican autónomamente en las células bacterianas.

La regulación de la expresión génica se ha investigado extensamente en procariontes, especialmente en *E. coli*. Se ha encontrado que han desarrollado mecanismos genéticos que activan y desactivan genes en función de las necesidades metabólicas de la célula.

Un operón se utiliza como una unidad genética funcional formada por un grupo o complejo de genes capaces de ejercer una regulación de su propia expresión por medio de los sustratos con los que interactúan las proteínas codificadas por sus genes.

El gen que codifica para la ACC sintasa será clonado en dos tipos de plásmidos el primero es un Biobrick.

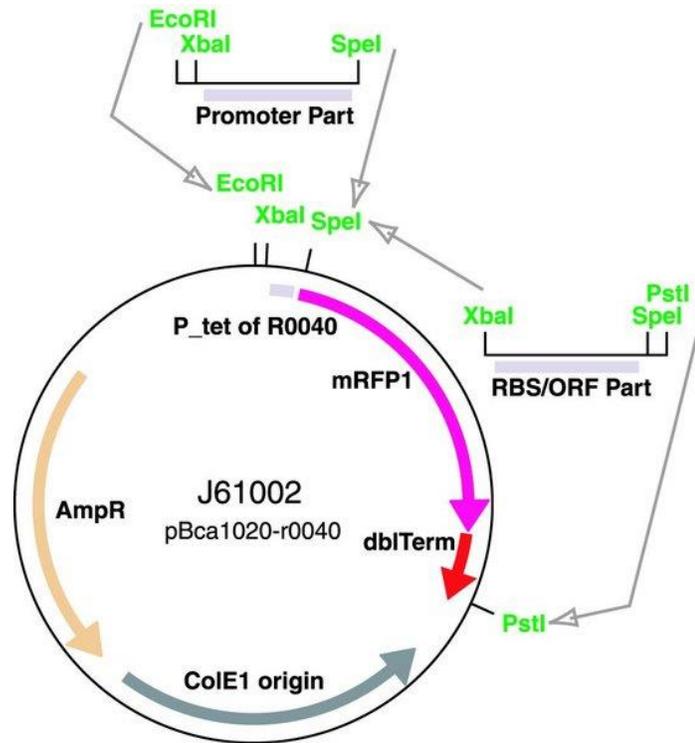


Figura 4. Diseño de plásmido BIOBRICK del repositorio iGEM

Este se encuentra en el repositorio de iGEM diseñado por el grupo de John Anderson en 2006. El plásmido cuenta con sitios para enzimas de restricción flanqueando al gen RFP por sus siglas en inglés, que será donde se inserte el gen de la ACCS.

El segundo plásmido a utilizar es pCold cuenta con el *operon Lac*, que regula la inducción, e igual cuenta con los sitios para las enzimas de restricción.

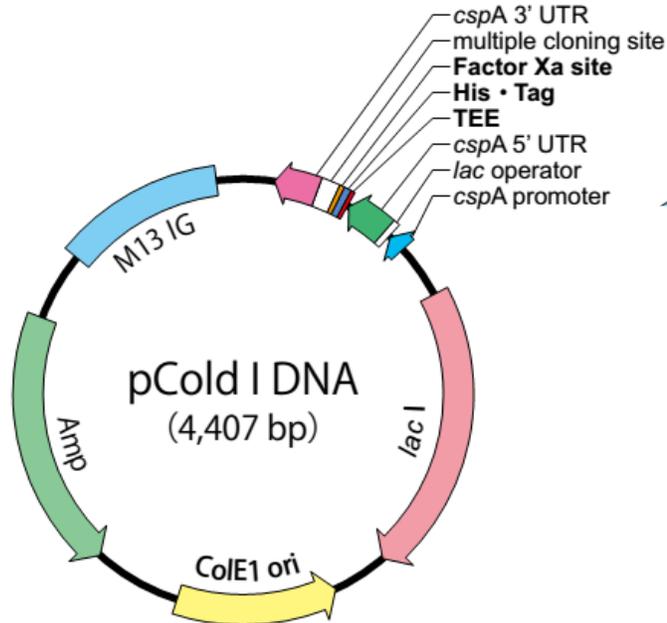


Figura 5. Diseño del plásmido pCold1

En este vector el gen de la ACC sintasa será clonado en el sitio de clonación múltiple. Cuando la temperatura del cultivo de *E. coli* se reduce suficientemente, el crecimiento se detiene temporalmente y casi la disminución de expresión de la proteína, mientras que la expresión de un grupo de proteínas que se denominan "proteínas de choque en frío" se induce específicamente. Vectores de expresión por choque de frío, pCold ADN, están diseñados para llevar a cabo la expresión eficiente de proteínas utilizando el promotor derivado del gen *cspA*.

Se usará un plásmido biobrick (pSBA) que ya contiene terminador de transcripción, para ligar el gen de la ACC sintasa.

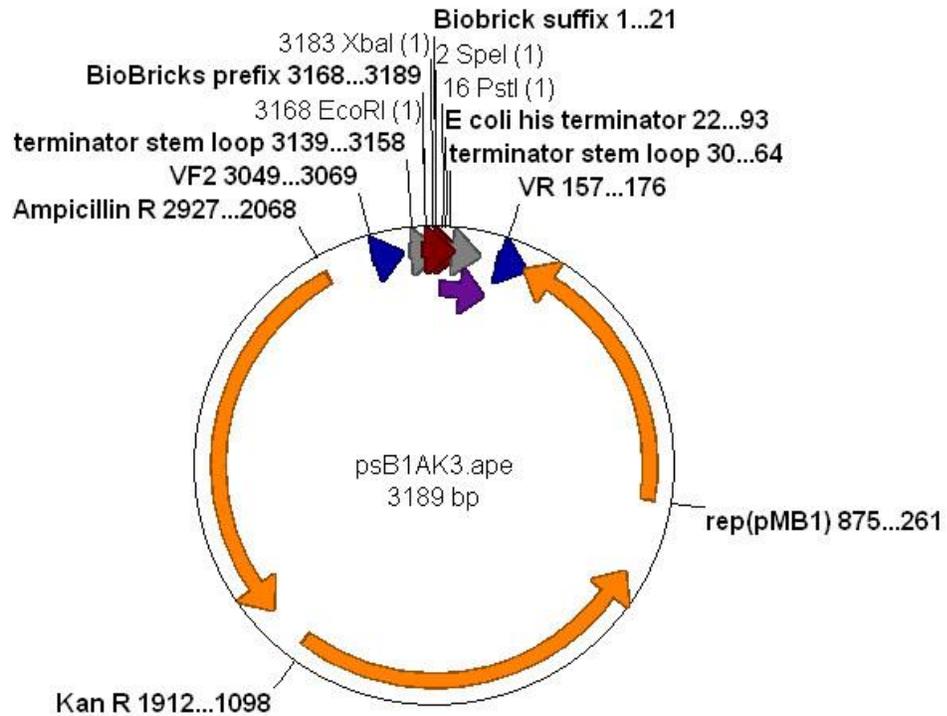


Figura 6. Diseño del plásmido pSBA.

Una vez terminadas las construcciones en ambos plásmidos se procederá a verificar la expresión de la proteína ACC sintasa en geles de poliacrilamida. Según el peso molecular, se espera la presencia de una banda de proteína ACCS de alrededor de 49 kDa por SDS-PAGE.

---

# METODOLOGÍA

---

## 1. Químicos

Las enzimas de restricción para cada digestión sencilla o doble se realizó según las indicaciones del manual, adquiridas de Thermo Scientific, así como la enzima T4 ADN ligasa. Para la clonación de las ligaciones se utilizaron células quimio-competentes TOP 10 de invitrogen. Las purificaciones de ADN plasmídico se llevaron a cabo mediante el Kit Expin Gel SV de GeneAll Biotechnology. La enzima Taq Polimerasa fue adquirida de KapaBiosystems. Los plásmidos pSBA, BIOBRICK así como los cebadores necesarios fueron otorgados por el Grupo iGEM, el plásmido pCold1 se adquirió de AddGene. Los equipos utilizados de Bio-Rad fueron las cámaras de electroforesis así como el termociclador T100 para PCR. El espectrofotómetro utilizado en la medición de concentraciones de ADN fue el NanoDrop 2000 de Thermo Scientific.

## 2. Recuperación del gen ACCS

El gen que codifica para la ACC sintasa se encontraba clonado en el plásmido pUC57. Células competentes fueron transformadas con este plásmido (ver protocolo en Anexo A), el cual posteriormente fue extraído de las células mediante el método de minipreps (ver protocolo en Anexo B) para obtener suficiente cantidad para los experimentos.

## 3. Clonación del gen Acido 1-Aminociclopropano 1-Carboxilato Sintasa (ACCS) en el plásmido pSBA.

El gen ACCS que venía contenido en el plásmido pUC57 fue liberado previamente con las enzimas de restricción E-S. El plásmido pSBA se digirió con las enzimas E-X. Tanto el gen ACCS como el plásmido pSBA se purificaron a partir de un gel de agarosa al 1%. La ligación se realizó con la T4 ADN Ligasa como indica el instructivo. La mezcla de ligación se clonó en células competentes.

## 4. Clonación del gen ACCS en el plásmido Biobrick y pCold1.

El gen ACCS contenido en el plásmido pSBA fue digerido previamente con las enzimas de restricción X-P para ligar en el plásmido Biobrick y con las enzimas E-P para ligar en el plásmido pCold. El plásmido Biobrick se digirió con las enzimas S-P y pCold se digirió con E-P. Tanto el gen ACCS como los plásmidos Biobrick y pCold se purificaron. Se realizó la

ligación entre los plásmidos y el inserto tal y como indica el instructivo. La ligación se clonó en células competentes.

5. PCR de colonia a pSBA-ACCS, pCold-ACCS y Biobrick-ACCS.

Se comprobaron las colonias crecidas para una transformación positiva mediante PCR de colonia para cada plásmido.

6. Análisis por enzimas de restricción a pSBA-ACCS, pCold-ACCS y Biobrick-ACCS.

Las colonias positivas mediante el PCR de colonia se sometieron a digestión mediante enzimas de restricción para confirmar su transformación.

7. Expresión de la proteína 1-Aminociclopropano 1-Carboxilato Sintasa (ACCS) en geles de acrilamida de pCold-ACCS y BIOBRICK-ACCS.

Plásmido Biobrick-ACCS.

Se realizó un pre-inoculo de medio liquido LB/Cb durante toda la noche con las células transformadas que contenían el plásmido BIOBRICK-ACCS (vector constitutivo). Se tomó una alícuota de pre-inoculo (5% del volumen final) la cual se pasó a medio liquido LB/Cb. El cultivo se incubó a 37 °C durante 18 h. El cultivo se centrifugó y la pastilla se lavó con tris pH 6.8 1 M. Se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Las células se lisaron con 100 uL de bufer de lisis y se centrifugó descartando el sobrenadante. Se agregaron 25 uL de agua más 25 uL de buffer de carga 2X. Se corrió un gel de poliacrilamida para observar la expresión de la proteína ACC sintasa.

Plásmido pCold-ACCS.

Para el vector inducible pCold-ACCS se siguió la metodología anterior hasta la alícuota del pre-inoculo. Posterior a eso las células se incubaron a 37 °C. El cultivo se mantuvo a 16 °C por 30 min. Pasado el tiempo se agregó IPTG toda la noche a 16 °C y se continuo con la lisis de las células hasta el gel de poliacrilamida para observar la expresión de la ACC sintasa.

# RESULTADOS

Se logró aumentar la disponibilidad del gen mediante la transformación del plásmido pUC57-ACCS en células competentes. Para comprobar se realizaron minipreps a dos colonias y se liberó el inserto con las enzimas de restricción E-P.

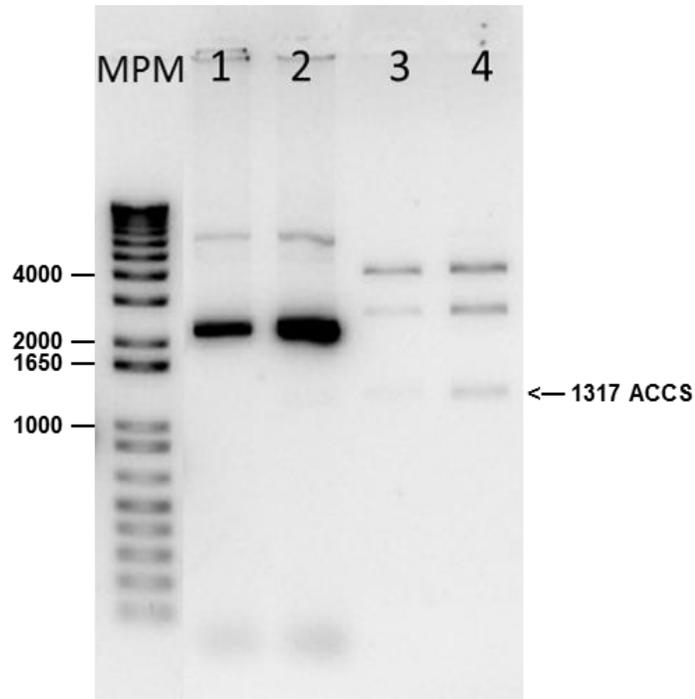


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de pUC 57-ACCS. **MPM** marcador de peso molecular 1 Kb. **1** Miniprep colonia 1 sin digerir de pUC 57-ACCS. **2** Miniprep colonia 2 sin digerir de pUC 57-ACCS. **3** Miniprep colonia 1 digerida con E-P. **4** Miniprep colonia 2 digerida con E-P.

El gen ACCS se ligó en pSBA, y después fue clonado en el vector inductivo (pCold) y en el vector constitutivo Biobrick. El gen fue digerido de pUC57-ACCS con las enzimas de restricción E-S y el plásmido pSBA fue abierto con las enzimas E-X. Ambos, vector e inserto se purifican y se ligan. A continuación se muestra un gel de ambos, con muestra no digerida y muestra purificada.

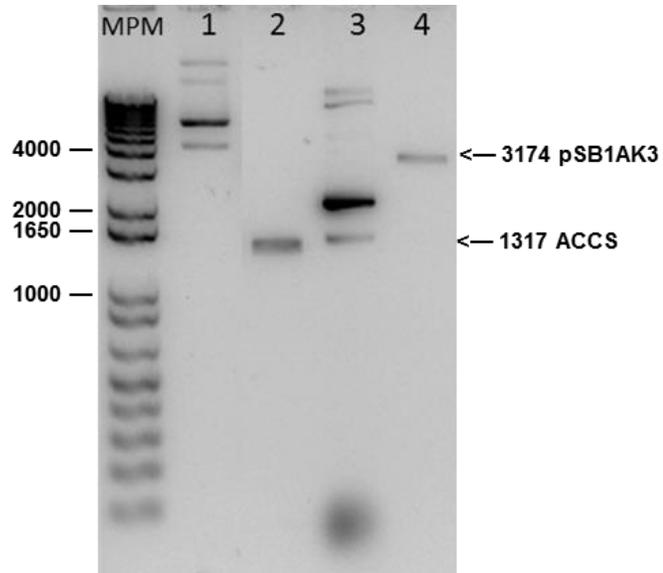


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de pSBA y ACCS. **MPM** marcador de peso 1 Kb. **1** pUC57 ACCS sin digerir de Colonia 2. **2** ACCS digerido de pUC57-ACCS con EcoRI-SpeI y purificado. **3** pSBA sin digerir de colonia 1. **4** pSBA digerido con EcoRI-XbaI y purificado.

Después de la transformación se comprobaron las colonias transformadas mediante PCR, el gel a continuación muestra 5 colonias crecidas de pSBA-ACCS. Los primers usados son los proporcionados por iGEM para Biobricks.

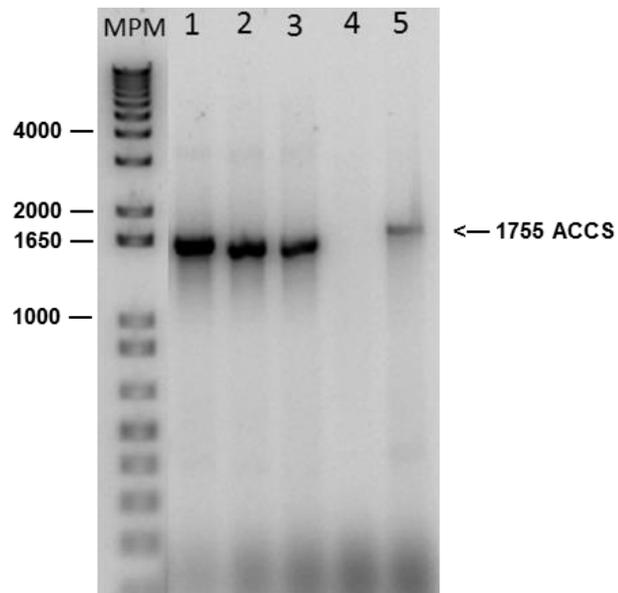


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% PCR de colonia pSBA. **MPM** marcador de peso molecular 1 Kb. **1** PCR colonia 1 pSBA-ACCS. **2** PCR colonia 2 pSBA-ACCS. **3** PCR colonia 3 pSBA-ACCS. **4** PCR colonia 4 pSBA-ACCS. **5** PCR colonia 5 pSBA ACCS.

A las colonias positivas mediante PCR se les realizó un análisis mediante enzimas de restricción, X-P, para confirmar su transformación. El gel a continuación muestra el fragmento de ACCS liberado de pSBA.

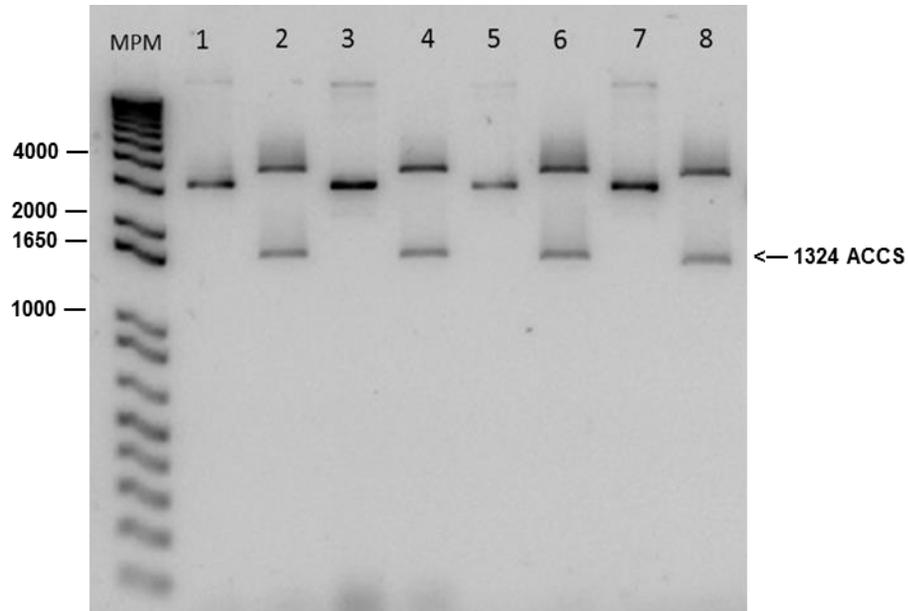


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% Digestión enzimática pSBA-ACCS. **MPM** marcador de peso molecular 1 Kb. **1** pSBA-ACCS sin digerir colonia 1. **2** pSBA-ACCS digerido con X-P colonia 1. **3** pSBA-ACCS sin digerir colonia 2. **4** pSBA-ACCS digerido con X-P colonia 2. **5** pSBA-ACCS sin digerir colonia 3. **6** pSBA-ACCS digerido con X-P colonia 3. **7** pSBA-ACCS sin digerir colonia 5. **8** pSBA-ACCS digerido con X-P colonia 5.

Una vez que se tuvo clonado el gen de ACC sintasa en pSBA se procederá a digerir para ser clonado en BIOBRICK y pCold1. Se digirió pSBA con X-P para clonar en BIOBRICK y con E-P para clonar en pCold1. El siguiente gel muestra el gen ACCS + doble terminador liberado de pSBA. El peso aproximado del gen es de 1500 pb. Las restricciones que serían para ambos vectores se purificaron y se religaron con los vectores.

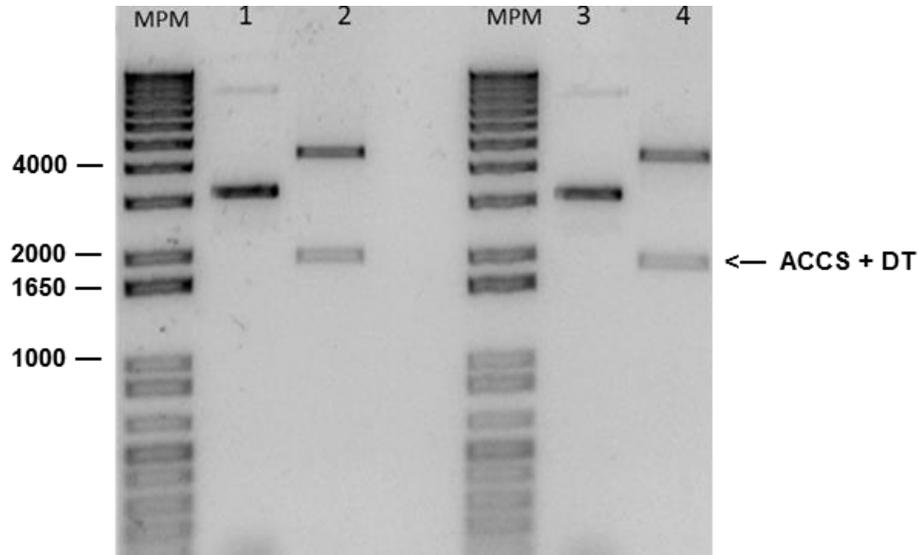


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% Digestión enzimática de pSBA. **MPM** marcador de peso 1 Kb. **1** pSBA-ACCS sin digerir. **2** pSBA-ACCS digerido con E-P. **3** pSBA-ACCS sin digerir. **4** pSBA-ACCS digerido con X-P.

Para poder clonar el gen de ACC sintasa en los vectores con promotor inducible y constitutivo, se digirieron antes los vectores con las enzimas necesarias para poder religarse a las restricciones del gen a partir de pSBA.

A continuación se muestra la digestión para pCold1 con las enzimas E y P. El gel muestra el vector linealizado correspondiente a 4389 pb.

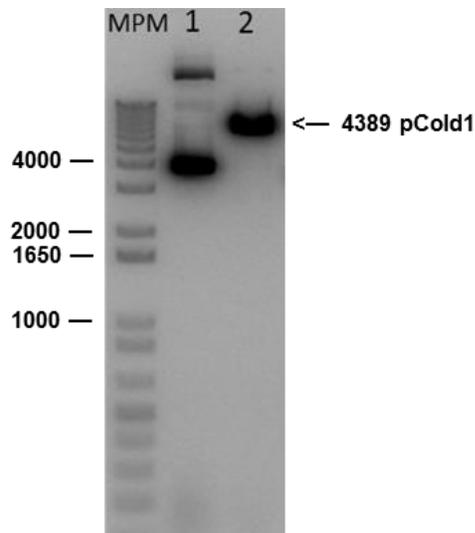


Figura 12. . Electroforesis en gel de agarosa al 1% Digestión enzimática de pCold1. **MPM** marcador de peso 1 Kb marca X. **1** pCold1 sin digerir. **2** pCold1 digerido con EcoR1-Pst1.

El plásmido BIOBRICK se digirió con las enzimas S y P lo que nos da un fragmento de 2065 pb ya que se elimina el gen RFP, siendo este sitio donde se clonaría nuestro gen ACC sintasa.

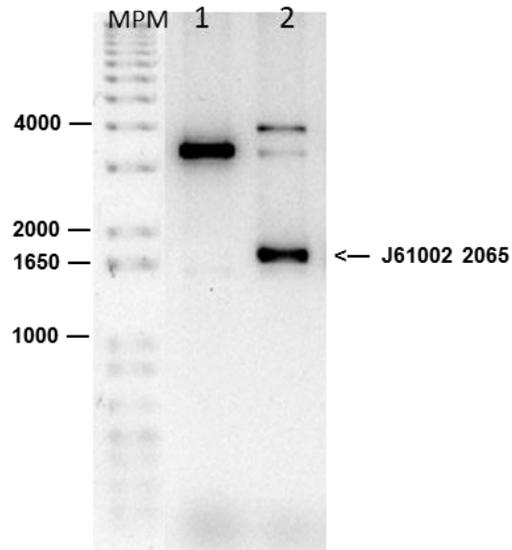


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1% Digestión enzimática de BIOBRICK. **MPM** marcador de peso 1 Kb. **1** BIOBRICK sin digerir. **2** BIOBRICK digerido con SpeI-PstI.

Una vez clonado el gen en ambos vectores se procedió a realizar PCR de colonia de ambos vectores para identificar las colonias recombinantes que contengan el vector más el inserto ligado. El siguiente gel muestra el PCR de colonia para el vector Biobrick-ACCS.

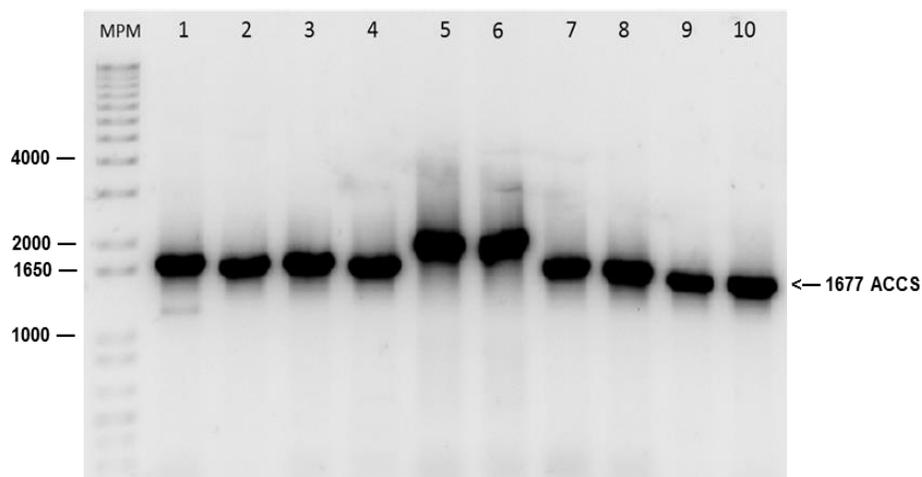


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% PCR de colonia de BIOBRICK-ACCS. **MPM** marcador de peso 1 Kb. **1-10** Del carril 1 al 10 se presentan PCR de colonias de BIOBRICK-ACCS.

Se seleccionaron dos colonias a las cuales se les hizo un análisis por enzimas de restricción para comprobar que hayan sido transformadas. Las colonias se digirieron con las enzimas E y P.

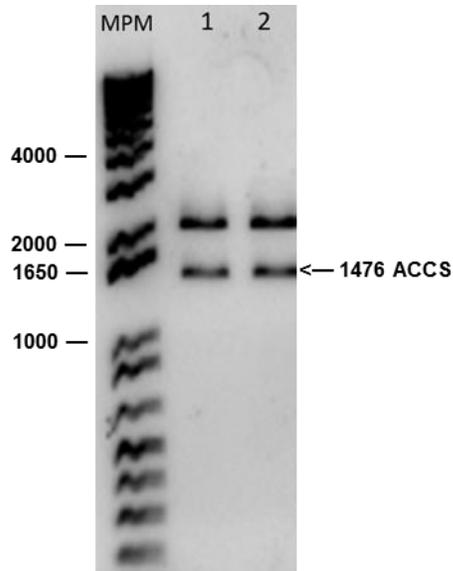


Figura 15. . Electroforesis en gel de agarosa al 1% Digestión enzimática de BIOBRICK-ACCS.

**MPM** marcador de peso 1 Kb. **1** Biobrick digerido con E-P. **2** Biobrick digerido con E-P.

La siguiente imagen muestra el PCR de colonia para el plásmido pCOLD transformado con el inserto ACCS.

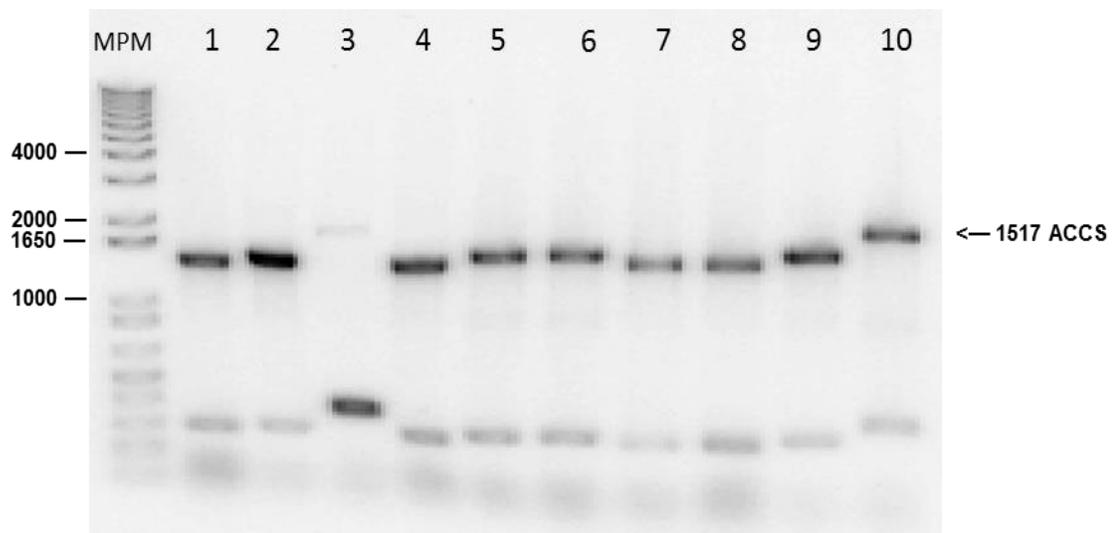


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% PCR de colonia pCold1-ACCS. **MPM** marcador de peso 1 Kb. **1-10** del carril 1 al 10 se presentan PCR de colonias de pCold1-ACCS.

Para confirmar se realizó la digestión de las colonias positivas con las enzimas de restricción E y P.

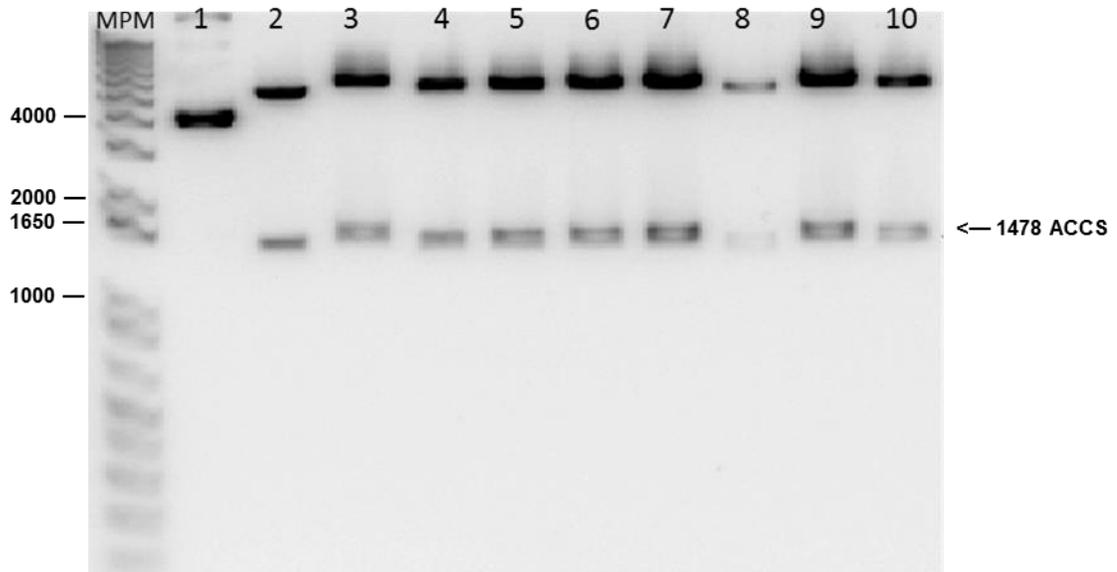


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1% Digestión enzimática de pCold1-ACCS. **MPM** marcador de peso 1 Kb. **1-10** pCold-ACCS digerido con E-P.

Una vez que se obtuvieron las dos construcciones del gen ACCS se pasó a la expresión de la proteína en geles de acrilamida. Para el vector pCold se presentó un problema en el marco de lectura ya que el gen ACC sintasa fue diseñado para ser clonado en Biobricks por lo que al expresar la proteína en pCold no se produjo nada ya que no se encontraba en fase. Para solucionar el problema de pCold se diseñó un primer que corrigiera este error, para que el marco de lectura estuviese nuevamente en fase.

En lo siguiente, solo mostraremos los resultados de la expresión de ACCS en el vector pCold.

La siguiente imagen muestra la expresión de la ACC sintasa en pCold usando como controles, células con vectores sin el inserto, así como células sin haber inducido el vector.

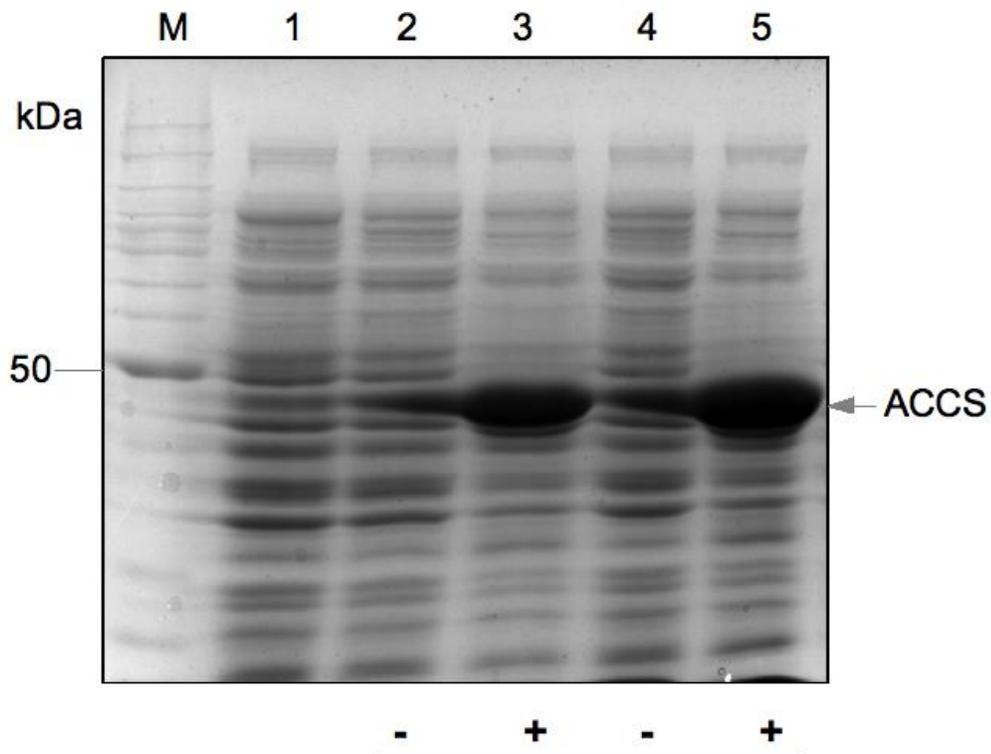


Figura 18. Gel de poliacrilamida ACC sintasa. **MP** marcador de peso de proteína. **1** pCold sin inserto. **2** pCold con inserto y sin inducir. **3** pCold con inserto e inducido. **4** pCold con inserto y sin inducir. **5** pCold con inserto e inducido. **2 y 5** representan distintas colonias recombinantes.

En el experimento se puede observar la expresión en el vector con promotor de frío. 1 El el carril 1 (carril control negativo) se puede observar que en el patrón de proteínas extraídas de las células transformadas con el vector pCold sin la secuencia del gen de ACCS, no se produce la proteína ACCS. En los carriles 2 y 4, se muestra el patrón de proteínas de células de dos colonias recombinantes distintas, transformadas con el vector pCold- ACCS, pero sin la adición del inductor IPTG. Por lo tanto, tampoco se espera la presencia de la banda correspondiente a ACCS (49 KDa), mientras que en los carriles 3 y 5, se observa de manera intensa la sobreproducción de la proteína cuando se adiciona el Inductor IPTG en el medio de cultivo.

---

# CONCLUSIONES

---

Los experimentos hechos hasta el momento presentan en el vector pCold la expresión de una proteína de 49 kDa. Este resultado es satisfactorio, pues en nuestro caso, concuerda con el tamaño esperado de la proteína. Este avance permitirá seguir con la detección y cuantificación de ACC, y así mismo con los bioensayos en los tejidos vegetales.

---

# BIBLIOGRAFÍA

---

- Adams, D. O., & Yang, S. F. (1979). Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *PNAS*, 170-174.
- Apelbaum, A., Burgoon, A. C., Anderson, J., & Solomos, T. (1981). Some characteristics of the system converting 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid to ethylene. *Plant Physiology*(67), 80-84.
- Bleecker, A., & Kende, H. (2000). Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*(16), 1-18.
- Boller, T., Herner, R. C., & Kende, H. (1979). Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Planta*(145), 293-303.
- Campbell, N. A., Mitchel, L. G., & Reece, J. B. (2001). *Biología: conceptos y aplicaciones*. (L. Zanello, & A. Hernández Rolán, Trads.) México, México: Pearson Educación.
- Fuhrer, J., & Fuhrer-Fries, C. B. (1985). Formation and transport of 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid in pea plants. *Phytochemistry*, 24(1), 19-22.
- Johnson, P. R., & Ecker, J. R. (1998). The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. *Annual Review of Genetics*(32), 227–254.
- Kende, H. (1989). Enzymes of ethylene biosynthesis. *Plant Physiology*, 1-4.
- Kidd, H., & James, D. R. (1991). *The Agrochemicals Handbook* (Tercera ed.). Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry Information Services.
- Li, N., Wiesman, Z., & Liu, D. (July de 1992). A functional tomato ACC synthase expressed in *Escherichia coli* demonstrates suicidal inactivation by its substrates S-adenosylmethionine. *Federation of European Biochemical Societies*, 306(2), 103-107.
- Lizada, C., & Yang, S. F. (1979). A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Analytical Biochemistry*(100), 140-145.
- Meister, R. T. (1994). *Farm Chemicals Handbook*. Willoughby: Meister Publishing Company.
- Primrose, S. B. (1976). Formation of ethylene by *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 159-165.

- Rost, L. T., Stocking, C. R., & Murphy, T. (2006). *Plant Biology* (Second ed.). California: Cengage Learning.
- Soberón Mainero, F. (1997). *La Ingeniería Genética y la nueva Biotecnología*. Ciudad de México: Fondo de cultura economica.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2005). *Plant Physiology* (Quinta ed.). Sinauer.
- Wang, K. L., Li, H., & Ecker, J. R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell*, 131-151.
- Yang, S. F., & Hoffman, N. E. (1989). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*(35), 155-189.

---

# ANEXOS

---

## ANEXO A

---

---

Transformación de células competentes invitrogen.

Colocar la mezcla de ligación en 40 uL de células quimio-competentes (previamente descongeladas en hielo) e incubar en hielo durante 30 minutos. Calentara 42 °C por un minuto. Colocar en hielo por 5 min. Agregar 800 uL de medio SOC e incubar a 37 °C en agitación durante 1 h. Centrifugar a 10000rpm por 1min y retirar 80% del sobrenadante. Resuspender las células y plaquear 40 uL en placa con medio LB/CB e incubar durante toda la noche.

## ANEXO B

---

---

Mini-preparaciones de ADN. (Protocolo de Maniatis modificado).

Partir de un cultivo celular de toda la noche células transformadas.

1. Centrifugar 1.5 mL de cultivo durante 1 min a 10000rpm. Descartar sobrenadante.
2. Adicionar 500 uL de solución TSE para lavar las células, resuspender el pellet en agitador vortex, centrifugar a 10000 rpm 1min y descartar sobrenadante.
3. Adicionar 150 uL de solución I, resuspender mediante agitador vortex.
4. Adicionar 300 uL de solución II, mezclar por inversión de 3 a 5 veces. Reposar 5 min en hielo.
5. Agregar 250 uL de solución III y agitar rápidamente por inversión de 5 a 7 veces. Reposar 10 min en hielo.
6. Centrifugar 10 min a temperatura ambiente a 10000 rpm. Colocar el sobrenadante en un tubo nuevo.
7. Adicionar 700 uL de fenol-cloroformo y agitar vigorosamente durante 30 s en vortex.
8. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 min y recuperar 600 uL de la fase superior en tubo eppendorf nuevo.
9. Precipitar con 1.5 volúmenes de etanol absoluto 100% y reposar 5 min a temperatura ambiente.

10. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 min, eliminar el sobrenadante y dejar secar la pastilla a temperatura ambiente.
11. Lavar la pastilla con 500 uL de etanol al 70 % y agitar en vortex durante 30 s.
12. Centrifugar a 10000 rpm durante 5 min, retirar el sobrenadante y secar la pastilla a temperatura ambiente.
13. Disolver la pastilla en agua des-ionizada con RNAsas de 20 a 50 uL dependiendo del tamaño de la pastilla.