

Subclonaje del gen de la taumatina de *Musa* a partir de una biblioteca genómica BIBAC

Maribel Colmenares-Esqueda^{1*}, Miguel Gómez-Lim² y Carlos Giménez-Alvarado¹

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal (BioVeLUZ), Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Apdo. 526. Maracaibo, Venezuela.

²Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV, Unidad Irapuato 629, Gto. México.

Recibido: 29-05-08 Aceptado 12-04-10

Resumen

El uso de bibliotecas genómicas BIBACs para la secuenciación de un gen completo (regiones codificantes y regulatorias), se ha convertido en una herramienta fundamental para aislar genes de interés. Adicionalmente los vectores BIBACs permiten la transferencia de estas secuencias genómicas completas mediante *Agrobacterium tumefaciens* y el estudio funcional del gen. Sin embargo el subclonaje del gen de interés, que en promedio puede tener un tamaño de 3 kb, a partir de una secuencia genómica de 150 kb, es un procedimiento complejo. En esta investigación describimos la experiencia del subclonaje del gen de la taumatina a partir de una biblioteca genómica con tamaños de inserto promedios de 150 kb y como el subclonaje dirigido con dos enzimas de restricción diferentes, facilita el clonaje de fragmentos de gran tamaño en vectores convencionales como pBluescript KS+.

Palabras clave: BIBAC, Biblioteca genómica, clonaje dirigido, gen de taumatina.

Subcloning of *Musa* thaumatin gene from a BIBAC genomic library

Abstract

The use of BIBACs genomics libraries for sequence a complete gene (coding and regulatory sequences) had been converted in a fundamental tool to isolate an interested gene. Additionally the BIBACs vector allows the transference of this complete genomic sequence using *Agrobacterium tumefaciens*, which permits the functional studies of the gene. However the cloning of the gene of interest, that in average has 3 kb, it is not an easy procedure. In this research it is described the subcloning strategy of the thaumatin gene from a genomic library with an average inserts of 150 kb and how the directional subcloning with different restriction enzymes, solve the problem of cloning a gene in conventional vectors like pBluescript KS+.

Key words: BIBAC, directional cloning, genomic library, thaumatin gene.

Introducción

El mejoramiento de plátanos y bananos en estos últimos años se ha dirigido principalmente hacia la resistencia a enfer-

medades y el mejoramiento de la calidad del fruto. Sin embargo, la colección de genes de *Musa* en las bases de datos públicas es relativamente pequeña (aproximadamente 300 accesiones en la base de datos NCBI). Un en-

* Autor para la correspondencia: mcolmenares@luz.edu.ve

foque alternativo para entender el contenido y complejidad del genoma de *Musa*, es secuenciar clones BACs seleccionados al azar de las bibliotecas genómicas, como representativos del genoma completo (1). El escrutinio de bibliotecas genómicas permite aislar y estudiar diferentes regiones del genoma (2). Además, es necesario el análisis de estos fragmentos de un tamaño promedio 100-150 kb, antes de su utilización para transformación mediante *Agrobacterium spp.*

Por otra parte, la identificación de subfragmentos de interés puede conllevar a la necesidad de subclonar segmentos de ADN de variados tamaños. La construcción *in vitro* de moléculas de ADN recombinantes es una de las técnicas más ampliamente usadas en la biología molecular moderna. Los principales experimentos involucran un paso de ligación, en el cual el fragmento de ADN y el vector linealizado son incubados con una enzima ligasa, como la T4 ligasa. Los eventos que ocurren durante este paso son complejos y poco entendidos, particularmente cuando el fragmento a clonar es de tamaño mayor a 2,5 kb y se utilizan plásmidos convencionales. El clonamiento de fragmentos grandes de ADN es importante para la investigación genómica moderna ya que se pueden desarrollar estudios funcionales de estas secuencias genéticas. Según el objetivo experimental existen diferentes vectores como: a) plásmidos –procarióticos o eucarióticos–, b) el bacteriófago lambda, c) cósmidos –híbridos entre plásmidos y fago lambda–, d) cromosomas artificiales bacterianos BACs, e) cromosomas artificiales de levaduras YACs o cromosomas artificiales de mamíferos MACs. Estos vectores tienen una capacidad de ligación de diferentes tamaños de insertos de ADN que se puede replicar en él de manera estable.

Las proteínas tipo taumatina representan una familia homogénea, investigada ampliamente en muchas especies, debido a su excepcional y potente sabor dulce (3, 4) y

a que un grupo de ellas son producidas por la planta en respuesta a diferentes tipos de estrés (5-7). La taumatina es un polipéptido de 207 aminoácidos, cerca de cien mil veces más dulce que la sacarosa en base a su molaridad (3, 4). Brandazza y col. (8), reportan por primera vez proteínas similares en animales (*C. elegans*, *Schistocerca gregaria* y *Locusta migratoria*).

En este trabajo se describe la extracción de ADN plasmídico de clones de una biblioteca genómica BIBAC de *Musa* (AA) cv. Tuu Gia; los análisis de los patrones de restricción y el subclonamiento de fragmentos de ADN de 15, 5 y 3,8 kb, identificados con una sonda de taumatina.

Materiales y Métodos

Plásmido, cepa bacteriana, clones y sonda

Para el subclonaje del gen de la taumatina de *Musa* se utilizó el plásmido pBluescript KS (+) (9), la cepa de *E. coli* DH5 α y un clon BIBAC de una biblioteca genómica de *Musa acuminata* (AA) cv. Tuu gia, identificado con una sonda de taumatina (2). Este clon BIBAC de aproximadamente 150 Kb, donde se localizan posibles secuencias análogas al gen de la taumatina se denominó T26. La sonda de taumatina se obtuvo por PCR específica (2), según la secuencia del gen de la taumatina de *Musa* (AAA) cv. Gran enano (10) (Genebank AF001528). El marcaje con [α -³²P] dCTP, hibridación y localización de la sonda fue realizado de acuerdo a metodologías previamente reportadas (2, 11).

Verificación de los clones BIBACs positivos

Los clones BIBACs identificados en las membranas fueron extraídos de la biblioteca y crecidos para aislar el ADN plasmídico. Se aplicó la metodología reportada por Birboim y Dolly (12) e Ish-Horowicz y Burke (13). Este ADN se dispuso en un arreglo de

puntos en una membrana (tipo “dot blot”) para su verificación con la sonda de taumatina marcada radiactivamente.

Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs)

El ADN plasmídico de los clones verificados por “dot blot” fue digerido separadamente con varias enzimas de restricción de corte poco frecuente en eucariota como: EcoRI, HindIII, NotI, XhoI, BamHI y PstI (Fermentas) a 37°C × 1 h, con el amortiguador correspondiente de acuerdo a lo recomendado por la casa distribuidora. Adicionalmente los fragmentos T1-T26 y T2-T26 obtenidos de digerir el clon BIBAC T26 se les ensayó digestión con las enzimas: SmaI, HindIII, BamHI, PstI y KpnI.

Electroforesis en campo pulsado

Los productos de la digestión fueron resueltos por electroforesis en campo pulsado en un sistema CHEF (Clamped Homogeneous Electric Field) con geles de agarosa 1,2%, en amortiguador TAE 1,5 X y pulsado con un ángulo de 120°, 5 V/cm, pulsos inicial de 5s y final de 15s, a 14°C, durante 15 h. Luego las bandas resueltas fueron teñidas con bromuro de etidio (4 µg/mL) y visualizadas en un transiluminador con ultravioleta a 302 nm. Los patrones de restricción obtenidos, fueron seleccionados en base al patrón que generó mayor número de bandas resueltas y tamaños mayores a 3.000 pb. Se utilizaron dos marcadores de peso molecular; a) ADN de λci857 Sam7 digerido con 5 enzimas de restricción diferentes (CHEF ADN Bio-Rad cat. num. 170-3707) tamaños entre 8-48 kb. b) ADN λ (Invitrogen) digerido con Hindi/EcoRI, tamaños entre 0,5-21,2 kb.

Ligación de los fragmentos de ADN seleccionados

Una vez obtenidos y purificados el ADN del vector y el ADN del inserto, con la misma enzima de restricción para crear extremos cohesivos se procedió a la ligación para for-

mar una nueva molécula recombinante. En el caso, de la digestión del vector con dos enzimas diferentes (EcoRI y SmaI), se digirió primero con SmaI e incubó a 28°C por 1 h y luego con EcoRI por 1 h a 37°C en un volumen de reacción de 20 µL. El ADN del vector fue desfosforilado con fosfatasa alcalina de camarón (SAP) siguiendo la instrucciones del proveedor (Fermentas). Para transformar la cantidad en peso de vector e inserto a número de moléculas o molaridad, se utilizó el término “pmoles de extremos de ADN” por microgramo de ADN lineal de doble cadena, según la fórmula:

$$(2 \times 10^6) / (660 \times n^\circ \text{ pb}) = \text{pmoles de extremos} / \mu\text{g de dsDNA}$$

Para calcular la cantidad de inserto de acuerdo a la relación molar a ensayar se utilizó la fórmula:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{tamaño del inserto (kb)}}{\text{tamaño del vector (kb)}} \times$$

$$\text{relación molar de } \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} = \text{ng de inserto}$$

Los dos fragmentos identificados por la sonda de taumatina en el patrón de restricción del clon BIBAC T26 fueron denominados: T1-T26, el fragmento de mayor peso molecular de 15 kb aproximadamente y T2-T26 el fragmento de 12 kb aproximadamente (figura 1B, carril 2). Los fragmentos identificados por la misma sonda en la digestión individual de los fragmentos T1-T26 y T2-T26, se denominaron T2-T1-T26 y T2-T2-T26. Estos fragmentos fueron extraídos y purificados del gel de agarosa. Por otra parte, se linealizó el ADN del vector pBluescriptII SK+ con EcoRI y con EcoRI y SmaI. Se estimó la concentración del ADN por espectrofotometría o en un gel de agarosa al 1% en electroforesis estándar, utilizando marcador lambda de concentración conocida. Se preparó la mezcla de reacción con T4 ADN ligasa utilizando relación molar inserto:vector de 1:1, 2:1 y 3:1, se incubó a 16°C por 16 h (11).

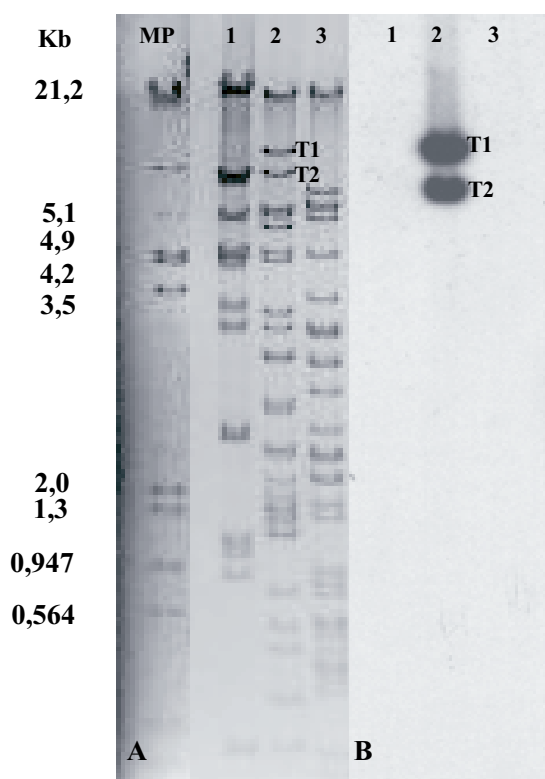


Figura 1. Análisis "Southern Blot" para tres clones BIBAC candidatos. MP, marcador de peso ADN de Lambda digerido con EcoRI y HindIII. A. "CHEF" con el perfil de los plásmidos BIBACs digeridos con EcoRI que fueron transferidos a la membrana de nylon Hybond N+ (condiciones de corrida, TAE 1.5 X, agarosa 1.2%, ángulo 120°, 5 V/cm, pulsos inicial/ final 5s/15s, 14°C, 15 h). B. Radiografía obtenida de la membrana hibridada con la sonda taumatina. Fragmentos positivos a la hibridización con la sonda de taumatina: T1, fragmento de mayor peso molecular obtenido por la digestión del clon BIBAC T26, con EcoRI, de aproximadamente 15 kb. T2, fragmento de menor peso molecular obtenido por la digestión del clon BIBAC T26, con EcoRI de, aproximadamente, 12 kb.

Transformación por electroporación en células de *E. coli*

Se transformaron 25 μ L de células de *E. coli* DH5 α electrocompetentes con 2,5 μ L de cada una de las diferentes ligaciones dializadas en una membrana Millipore de 0,025 μ m por 20 min (14). En un Cell Electroporator and Voltage Booster System (Gibco BRL, Grand Island, NY): Voltaje 400 V, capacitancia 330 μ F, Impedancia baja, velocidad de carga rápida, resistencia 4 k Ω . Las células se colocaron en 1 mL de medio SOC (20 g/L Bacto triptona, 5 g/L Bacto Extracto de levadura, NaCl 10Mm, 2,5 mM KCl, 10mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosa) y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm por 1 h. Se plaquearon las células transformadas sobre el medio de selección Luria Bertani (LB 20 g/L Bacto triptona, 5 g/L Bacto Extracto de levadura, 10 g/L NaCl) 15 g/L de agar, 100 mg/L de ampicilina, IPTG 1,4 mg/L, X-Gal 60 mg/L y se incubaron a 37°C por 24 h, posterior a la incubación se dejaron a 4°C por 12 h. Además se preparó un control negativo: la bacteria electroporada sin plásmido, plaqueada en medio con antibiótico y 2 controles positivos, 1. se plaqueó la bacteria transformada con otro plásmido (pUC19) y 2. la bacteria electroporada sin plásmido, plaqueada en medio sin antibiótico.

Análisis de los clones

Se tomaron colonias aisladas de células transformadas positivas (colonias blancas) y se crecieron en 2 mL de medio LB con 100 mg/L de ampicilina a 37°C con agitación a 250 rpm por 16 h. El ADN plasmídico se aisló utilizando el procedimiento reportado por Birboim y Dolly (12), para extracción de ADN a pequeña escala. Se digirió 0,5 μ g de la solución de ADN con EcoRI por 1 h a 37°C en un volumen de reacción de 20 μ L. En el caso del clonaje con doble digestión, se digirió con las enzimas EcoRI y SmaI como se hizo en el paso previo a la ligación (11). Todos los productos de las digestiones se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Resultados y discusión

Verificación de los clones BIBACs positivos

El rendimiento de la extracción del ADN de los clones BIBAC fue de 1 µg total, a partir de 200 mL de medio inoculado. Aunque los vectores BACs presentan muchas ventajas para la clonación de fragmentos grandes (mayores a 100 kb), sin embargo, el rendimiento del ADN clonado es bastante bajo, debido a que solo se encuentra una o dos copias del vector por bacteria (15). Esto limita el rendimiento del ADN insertado y la reproducción a gran escala de este ADN. El ADN de los clones BIBAC que resultaron positivos en el escrutinio de la biblioteca genómica, fueron confirmados mediante "dot blot".

Análisis de los patrones de restricción de los clones BIBAC Identificados

De la restricción del ADN plasmídico de los clones BIBAC, con las diferentes endonucleasas (EcoRI, HindIII, NotI, XhoI, BamHI y PstI) se obtuvo entre 5 y 30 bandas, mostrando diferentes patrones de digestión, lo que indica que los BIBACs estudiados representan diferentes regiones del genoma. Los patrones de restricción obtenidos, fueron analizados en base al tamaño, número y resolución de las bandas. Patrones de restricción con más de 15 bandas presentan poca resolución de los fragmentos entre sí, sin embargo lo importante es que el patrón de restricción presente bandas bien definidas en un rango de tamaño entre 3 a 10 kb, considerando que 3 kb es el tamaño promedio de un gen completo. Se estima que el tamaño promedio de un gen de arroz y *Arabidopsis* es de 2.200 pb (16). Por otra parte, se requiere un fragmento con un tamaño mayor a 2.200 pb que permita subclonar el gen completo incluyendo posibles regiones regulatorias, para secuenciar y lograr la caracterización del gen.

Para el análisis "southern blot" se seleccionó la endonucleasa EcoRI enzima de

corte poco frecuente en eucariota y que además corta en el sitio de clonaje múltiple del plásmido pCLD04541 (15, 17) de la biblioteca genómica. Esta enzima generó los patrones de restricción con los tamaños adecuados (≥ 3.000 pb) y una resolución apropiada (figura 1).

Ligación fragmentos de ADN de gran tamaño

De los fragmentos generados de la digestión con EcoRI del BIBAC T26 se logró clonar el fragmento T1-T26 de 15 kb (figura 2A, carril 1 y 3) con una relación molar inserto:vector 3:1. En la figura 2B, se muestra la confirmación de los fragmentos T1 y T2, con la sonda de taumatina. El fragmento T2-T26 de 12 kb no resultó con ninguna de las relaciones molares ensayadas. La ligación de fragmentos de gran tamaño es un proceso muy poco eficiente (18). Revie y col. (19), muestran una significativa disminución en la eficiencia de clonaje en fragmentos de 2,4 kb, al compararlos con fragmentos $\leq 1,8$ kb. La secuencia específica de un determinado fragmento también tiene un efecto significativo en la eficiencia de la ligación y finalmente de la clonación.

Teóricamente los mejores resultados se obtienen cuando la relación molar inserto:vector es 1 o ligeramente superior para las moléculas del inserto. Se trata entonces del número de moléculas que interactúan durante el proceso de la ligación. Adicionalmente otro factor clave es el tamaño de las moléculas del inserto y el vector. Esencialmente existen dos tipos de reacciones que afectan la ligación del inserto en un vector: la concatemerización y recircularización, las cuales son mutuamente excluyentes. La razón de los productos de concatemerización y recircularización depende de dos factores denominados i y j donde i = cantidad de extremos complementarios en la solución y j = la concentración efectiva de un extremo de una molécula de ADN en la cercanía del otro extremo de la misma molécula (19).

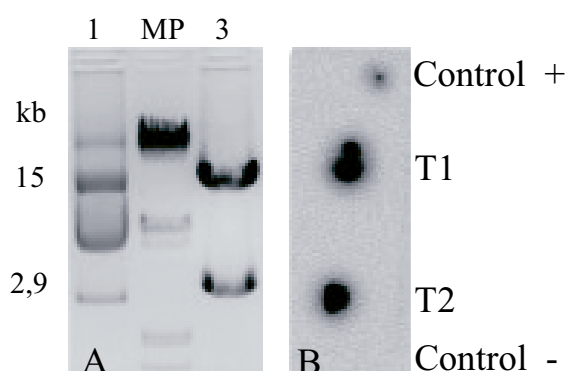


Figura 2. A) Electroforesis de los clones transformados con T1, ambos extremos EcoRI. 1. Clon sin digerir (control). MP. marcador de peso, ADN de lambda digerido EcoRI/HindII. 3. Clon mostrado en 1, digerido con EcoRI, Inserto T1 (15 kb) y pBlueScript KS+ (2,9 kb). B) "Dot blot" para comprobar subclones de T1 y T2.

En el presente trabajo tenemos fragmentos de aproximadamente 15, 12, 5 y 3,8 kb y el vector pBluescript tiene 2,9 kb, esto implica que los insertos a clonar son ~5; 4; 1,7 y 1,3 veces más grande que el vector, respectivamente. La ligación se realizó en el menor volumen de reacción, entre 10 y 20 μL , utilizando las cantidades indicadas en la tabla 1. Lo recomendado es utilizar por lo menos 8 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ADN para insertos mayo-

res de 800 pb, sin embargo no se pudo seguir esta recomendación en todos los casos, debido a la escasa cantidad de ADN del inserto. Del vector se utilizó 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, equivalente a $3,08 \times 10^{11}$ moléculas/ μg . Es importante destacar que aunque algunos autores recomiendan una concentración del inserto de 8 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (19) para las relaciones 1:1, otras autores reportan concentraciones de hasta 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (11).

En el caso de los fragmentos grandes (15 y 12 kb), obtenidos de la digestión con EcoRI del clon BIBAC T26, se presentan mayor dificultad de ligación debido a que ambos extremos están cortados con la misma enzima. Esto produce muchos eventos de recircularización del mismo fragmento o concatemerizarse en todas las orientaciones posibles, cabeza de un inserto con cabeza de otra molécula de inserto, cola de un inserto con cola de otra molécula de inserto y cabeza de una molécula de inserto con su propia cola, por lo que se recomienda defosforilar los extremos para evitar la auto ligación. En términos matemáticos, son muy pocas las probabilidades de que se encuentren los extremos del inserto con los del vector en posición adecuada. Estos resultados demuestran que la ligación de fragmentos de ADN de gran tamaño es un proceso muy ineficiente y se hace necesario el subclonaje de fragmentos más pequeños que puedan contener el gen de interés.

Tabla 1
Relación entre peso y molaridad de los diferentes insertos

	Relación Molar Inserto:Vector								
	1:1			2:1			3:1		
Tamaño del Inserto (kb)	15	12	5	15	12	5	15	12	5
ng/ μL de inserto	5	4	1,6	10	8	3,4	15	12	5
Número de moléculas X10 ¹¹ / μg	0,6	0,7	1,8	1,2	1,45	3,6	1,8	2,2	5,4
Molaridad (pmoles)	0,1	0,12	0,3	0,2	0,24	0,6	0,3	0,36	0,9
Cantidad de Inserto (μg) por 1 μg de pBluescript	5,12	4,26	1,7	10,24	8,52	3,4	15,36	12,78	5,1

Los resultados de esta investigación muestran que es posible el clonaje de fragmentos de gran tamaño en vectores pequeños como el pBluescript SK+. Esto nos da la ventaja de tener el ADN clonado en una molécula que se replica en forma rápida, proporcionando muchas copias por bacteria, lo que facilita la recuperación del ADN insertado.

Subclonaje direccional de fragmentos de un clon BIBAC

Para lograr el subclonaje direccional se ensayaron digestiones de los fragmentos T1-T26 (15 kb) y T2-T26 (12 kb), previamente cortados con EcoRI, con el objetivo de encontrar fragmentos con extremos cohesivos diferentes de un tamaño adecuado que asegure la presencia del gen completo que se quiere estudiar. Para lograr esto se examinaron los patrones con diferentes enzimas restricción (PstI, SmaI, KpnI, HindIII, BamHI). Hind III y BamHI no cortaron a T1. Pst I generó 5 bandas, tres de ellas por debajo de 3 kb, demasiado pequeñas, por tal motivo se descartaron estas enzimas. Por otra parte, KpnI generó 2 bandas (figura 3B, carril 2). La de mayor peso molecular hibridó,

pero es muy grande para seleccionarla, e híbrido otra no evidente en el gel y además de muy bajo peso molecular, por esta razón, también se descartó.

La digestión con la enzima SmaI generó 2 bandas tanto en T1-T26, como en T2-T26, indicando la presencia de un solo sitio de restricción interno con la referida enzima. En T1-T26 se observan dos fragmentos de aproximadamente 11,2 y 3,8 kb y en T2-T26 de 7 y 5 kb (figura 3A, carril 1 y 3). Además, el análisis "southern blot" revela que la sonda hibrida sólo con un fragmento, el más pequeño de los 2 generados por Sma I, el fragmento de 3,8 kb de T1 (figura 3B, carril 1, literal a) y el de 5 kb de T2 (figura 3B, carril 3, literal b). Por estas razones se seleccionó la enzima Sma I, para la segunda digestión.

El subfragmento que hibridó de aproximadamente 3,8 kb en T1-T26, se denominó T2-T1-T26 (figura 3B, carril 1, literal a), es decir, T2: por ser el 2do fragmento ó de menor tamaño (3,8 kb) de la digestión con Sma I de T1; siendo T1, el 1er fragmento ó de mayor tamaño (15 kb) de la 1era digestión con EcoRI de T26 (T26 es un clon BIBAC identificado con la sonda de taumatina en la bi-

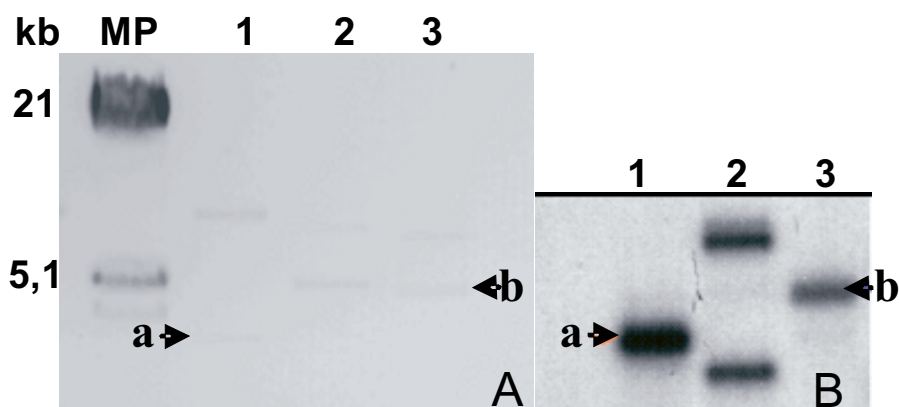


Figura 3. Patrones de restricción de los fragmentos T1 y T2, provenientes del clon BIBAC 26 (T26) identificado con la sonda de taumatina. A. MP ADN de Lambda digerido con Hind III/EcoRI, 1) Fragmento T1-T26 digerido con Sma I, 2) Fragmento T1-T26 digerido con KpnI, 3) Fragmento T2-T26 digerido con SmaI. B. "Southern blot" de A con sonda de taumatina, (a) fragmento subclonado de T1 de 3 kb (T2-T1-T26), (b) fragmento subclonado de T2 de 5 kb (T2-T2-T26).

biblioteca genómica, de aproximadamente 100 kb). El subfragmento que hibridó de aproximadamente 5 kb en T2 se denominó T2-T2-T26 (figura 3B, carril 3, literal b), es decir, T2 por ser el 2do fragmento ó de menor tamaño (5 kb) de la digestión con Sma I de T2; siendo T2, el 2do fragmento o de menor tamaño (12 kb) de la 1era digestión con EcoR I de T26.

Precisando, de las bandas de 15 kb (T1) y 12 kb (T2) que se originaron de la digestión del clon BIBAC T26 con EcoRI y que hibridaron con la sonda del gen de la taumatina (figura 1B), fueron purificadas y cortadas con la enzima SmaI para generar fragmentos de menor tamaño que contienen el gen. De esta manera se generaron dos nuevas bandas con extremos EcoRI-SmaI, una banda de 3,8 kb (T2-T1-T26) y otra de 5 kb (T2-T2-T26). Estas bandas tienen la ventaja que ofrecen la ligación por extremos cohesivos, además de que el clonaje es dirigido debido a que los extremos tienen diferentes sitios de restricción lo que evita el auto ligamiento del inserto y del vector, lo que aumenta la eficiencia de la ligación y su subsiguiente transformación en *E. coli*.

ciencia de la ligación y su subsiguiente transformación en *E. coli*.

Análisis de los clones

En la figura 4, se muestra el análisis electroforético de varias colonias de *E. coli* obtenidas luego de transformar con diferentes fragmentos del BIBAC que contienen los genes de taumatina ligados en pBluescript.

Los carriles 1 al 4 corresponden a ADN plasmídico del subfragmento T2-T1-T26 y los carriles 5 al 7 del subfragmento T2-T2-T26, todos sin digerir (figura 4). Los mismos ADN digeridos se encuentran en carriles 9 al 12 y 13-14, respectivamente. En los carriles 9 al 12 se observan 2 bandas, la de mayor peso molecular corresponde al fragmento clonado T2-T1-T26 de 3,8 kb. En el carril 13 y 14 se encuentra una banda de mayor peso molecular de aproximadamente 5 kb, correspondiente al fragmento T2-T2-T26. Además, en todas las digestiones se observa la presencia del vector pBluescript de 2,9 kb (figura 4). Los controles resultaron lo esperado; el control negativo (la bacteria electro-

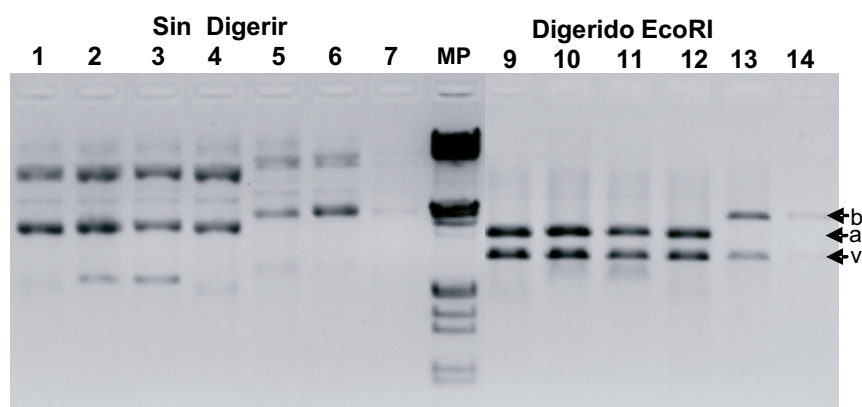


Figura 4. Análisis del ADN plasmídico extraído de clones transformados con los fragmentos de ADN de la biblioteca BIBAC identificados con la sonda de taumatina. 1 al 7) Plásmidos sin digerir (2 μ L). 1 al 4) Plásmido con T2-T1-T26 subclonado (banda 1 de taumatina); 5 al 7) Plásmido con T2-T2-T26 (banda 2 de taumatina). MP) marcador de peso molecular, ADN de Lambda digerido con EcoRI y HindIII. 9 al 12) Plásmidos con T2-T1-T26 subclonados y digeridos con EcoRI (5 μ L). 13 y 14). Plásmidos con T2-T2-T26 subclonado y digeridos con EcoRI. Fragmentos subclonados. a Fragmento subclonado de T1-Taumatina (T2-T1-T26) de 3,5 kb, b Fragmento subclonado de T2-Taumatina (T2-T2-T26) de 5 kb, v vector pBlueScript KS+ (2,9 Kb).

porada sin plásmido, plaqueada en medio con antibiótico), no creció nada y con los controles positivos, se comprobó el estado de las células bacterianas, se observaron colonias bacterianas con el fenotipo propio de esta cepa de *E. coli* DH-5 α .

Se puede concluir que para la secuenciación de un gen completo a partir de clones BIBAC de una biblioteca genómica cuyos tamaños de inserto son en promedio de 150 kb, la estrategia del subclonaje dirigido es la mejor opción para clonar fragmentos de un tamaño adecuado para la secuenciación de un gen completo.

Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (Proyecto CONDES CC-0452-06), por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación.

Referencias bibliográficas

1. FOO C.H., TOWN CH.D. **BMC Plant Biology** 7: 29. 2007. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/7/29>.
2. COLMENARES M., GIMÉNEZ C., ORTIZ E., GÓMEZ M. **Ciencia** 14(3): 271-279. 2006.
3. OGATA C.M., GORDON P.F., DE VOS A.M., KIM, S.H. **J Mol Biol** 228: 893-908. 1992.
4. KANEKO R., KITABATAKE N. **Chem Senses** 26: 167-177. 2001.
5. CORNELISSEN B.J., HOOFT VAN HUIJS-DUIJNEN R.A., BOL J.F. **Nature** 321: 531-532. 1986.
6. VAN LOON L.C., GERRITSEN Y.A., RITTER C.E. **Plant Mol Biol** 9: 593-609. 1987.
7. BREITENEDER H., EBNER C. **J Allergy Clin Immunol** 106: 27-36. 2000.
8. BRANDAZZAA A, ANGELIA S., TEGONIB M., CABBILLAUB CH, PELOSI P. **FEBS Letters** 572: 3-7. 2004.
9. ALTING-MEES M.A., SORGE J.A., SHORT J.M. **Meth Enzymol** 216: 483-495.1992.
10. CLENDENNEN S.K., MAY G.D. **Plant Physiol** 115(2):463-9. 1997.
11. SAMBROOCK J., RUSSELL D. **A laboratory manual**. 3rd edition. Cold Springs Harbor Press. New York (USA). 2002.
12. BIRNBOIM H., DOLY J. **Nucl Acids Res** 7:1513-1523. 1979.
13. ISH-HOROWICZ D., BURKE J.F. **Nucl Acids Res** 9: 2989-2898. 1981.
14. KOBORI M., Nojima H. **Nucl Acids Res** 21(11): 2782. 1993.
15. TAO Q., ZHANG H.B. **Nucl Acids Res** 26 (21): 4901-4909. 1998.
16. <http://www.ostp.gov/NSTC/html/mpgi2001/npgi2001.pdf>. Fecha de consulta: 15/03/2007
17. JONES J.G., SHUMUKOV L., CARLAND F., ENGLISH J., SCOFIELD S.R., BISHOP G.J., HARRISON K. **Transgenic Res** 1: 285-297. 1992.
18. DARDEL F. **Nucl Acids Res** 16(5): 1767-1778. 1988.
19. REVIE D., SMITH D.W., YEE T.W. **Nucl Acids Res** 16(21): 10301-10321. 1988.