Biotecnología Aplicada, Vol. 7, No. 2, 142-152 (1990)

Síntesis químico-enzimática del gen de la proinsulina humana

V. JIMÉNEZ, R. GÜIMIL, R. UBIETA, M. OCHAGAVIA, A. SILVA, G. VILLEGAS y L. HERRERA

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Apartado 6162, La Habana 6, Cuba.

Recibido en diciembre de 1989
Aprobado en enero de 1990

RESUMEN

En el presente trabajo se reporta la síntesis químico-enzimática del gen que codifica para la proinsulina humana, hormona proteica de 86 aminoácidos. Para realizar la síntesis del gen de 270/266 pares de bases, fueron preparados 24 oligodesoxinucleótidos en fase sólida por el método del ß-cianoetilfosforamidito. El gen sintético, que contiene los codones más frecuentes de *E. coli* y levadura, fue insertado en el plasmidio pUC18 y secuenciado por el método de Sanger.

SUMMARY

A gene coding for human proinsulin, a protein of 86 amino acid residues, consisting of 270 and 266 base pairs was synthesized by chemical and enzymatic methods. The synthesis involved preparation of 24 oligonucleotides by solid phase procedures and ß-cyanoethylphosphoramidite chemistry, with frequently occurring amino acid codons of *E. coli* and yeast. The synthetic gene was cloned in the plasmid pUC18 and sequenced by the Sanger method.

INTRODUCCION

El regulador fundamental de la concentración de glucosa en la sangre es la insulina, hormona proteica formada por dos cadenas peptídicas de 21 aminoácidos (cadena A) con un puente disulfuro interno y de 30 aminoácidos (cadena B) unidas mediante dos puentes disulfuro (Sanger, 1959).

El precursor biosintético de esta hormona es la proinsulina, formada por las cadenas A y B, las que están unidas a un péptido de conexión denominado péptido C, que contiene 35 aminoácidos (figura 1). Asimismo se conoce que el producto primario de la proinsulina es la preproinsulina, la que contiene un péptido señal N-terminal o prepéptido de 24 aminoácidos unido a la proinsulina (Chan *et al.*, 1976).

La preproinsulina se sintetiza en las células ß de los islotes de Langerhans del páncreas, la que experimenta una rápida ruptura en el retículo endoplasmático para producir proinsulina de una conformación estereoquímicamente correcta, la cual es transportada al aparato de Golgi para su almacenamiento y transformación a insulina (Steiner *et al.*, 1985).

Cuando existe una insuficiencia absoluta o relativa de insulina, aparece un trastorno en el metabolismo de los carbohidratos denominado *diabetes mellitus*. Esta enfermedad se encuentra muy extendida en todos los países, su curso es extremadamente variable y la recuperación auténtica de la enfermedad, rara vez o nunca se observa (Berkow, 1982).

Copyright © 1990, Sociedad Iberolatinoamericana para Investigaciones sobre Interferón y Biotecnología en Salud. Publicado por el Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba

GAVILONDO, J.; A.M. VAZQUEZ; S. FONG; E. RENGIFO; A. FERNANDEZ; C.A. GARCIA; A. VELANDIA; A. PAVLENKO; S. HERNANDEZ; N. RUISANCHEZ; V. SUNDIN Y M. FAXAS (1987). *Anticuerpos monoclonales contra el antígeno carcinoembrionario en ensayos inmunohistoquímicos e inmunoquímicos.* Interferón y Biotecnología **4**: 143-156.

GOEDDAL, D.V.; D.W. LEUNG; T.J. DULL; M. GROSS; R.M. LAWN; R.McCAUDLISS; P.H. SEEBURG; A. ULLRICH; E. YELVERTON Y P.W. GRAY (1981). *The structure of eight distinct cloned human leukocyte interferon cDNAs.* Nature **290**:20.

GOSH, S. Y A.M. CAMPBELL (1986). *Multispecific monoclonal antibodies.* Immunology Today **7**: 217-221.

LAEMMLI, N.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly by bacteriophage T4.* Nature **227**: 680-685.

LOWRY, O.H.; N.J. RESEMBROUGH; A.L. FARR Y R.K. RANDALL (1951). *Protein measurement with the folin phenol reagent.* J. Biol. Chem. **193**: 265-269.

LYDON, N.B.; C. FAVRE; S. BOVE; O. NEYRET; S. BENUREAU; A.M. LEVINE; G.F. SEELING; T.L. NAGABHUSHAN Y P.P. TROTTA (1985). *Immunochemical mapping of α−2 interferon.* Biochemistry **24**: 4121.

MAEDA, S.; R. MCCANDLISS; M. GROSS; A. SLOMA; P.C. FAMILLETI; J.M. TABOR; M. EVINGER; W.P. LEVY Y S. PESTKA (1980). *Construction & identification of bacterial plasmids containing nucleotide sequence for human leukocyte interferon.* Proc. Natl. Acad, Sci. USA **78**: 4648.

MEURS, E.; C. ROUGEOT; J. SVAB; A.C. LAURENT; A. HOVANESSIAN; N. ROBERT; J. GRUEST; L. MONTAGNIER Y F. DRAY (1982). *Use of an anti-human leucocyte interferon monoclonal antibody for the purification and RIA of human alpha interferon.* Infect. Immun. **37**: 919-925.

MOREHEAD, H.; P.D. JOHNSTON Y R. WETZEL (1984). *Roles of the 29-138 disulfide bond of subtype A of human alpha interferon in its antiviral activity and conformational stability.* Biochemisty **23**: 2500-2507.

NAGATA, S.; N. MANTEI Y C. WEISSMANN (1980). *The structure of one of the eight more distinct chromosomal genes for human interferon alpha.* Nature **287**: 401-408.

NAKANE, P.A. Y A. KAWAOI (1974). *Peroxidase labelled antibody. A new method of conjugation.* J. Histochem. Cytochem. **22**: 1084-1091.

OUCHTERLONY, O. Y L.A. NIELSSON (1978). "Immunodiffusion and immunoelectrophoresis". In: *Handbook of Experimental Immunology.* Ed. D.M. Weir, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edimburg, Melbourne, p. 196.

PESTKA, S.; B. KELDER; J.A. LANGER Y T. STAEHELIN (1983). *Monoclonal antibodies can discriminate between some active and inactive forms of leukocyte interferon.* Arch. Biochem. Biphys. **224**: 111-116.

PESTKA, S.; H. KUNG; B. DURRER; J. SCHMIDT Y T. STAEHELIN (1984). *Monoclonal antibodies to the interferon: their use in assay and purification.* Interferon, Vol. **2**: "Interferon and the Immune System", Chapter 14, pp.249-264.

SCOTT, G.M.; R.J. PHILLPOTTS; J. WALLACE; C.L. GAUCI; J. GREINER Y D.A.J. TYRRELL (1982). *Prevention of rhinovirus colds by human interferon alpha-2 from* Escherichia coli. Lancet **2**:186.

SILVA, A.; J. DE LA FUENTE; G. PEREZ; Y. QUIÑONES; V. JIMENEZ; L. NOVOA Y L. HERRERA (1988). *Altos niveles de expresión del IFNα2 humano bajo el control del promotor derecho del fago lambda en* E. coli. Interferón y Biotecnología **5**: 40-46.

STAEHELIN. T.; C. STHALY; S. HOBBS y S. PETSKA (1981). "A rapid quantitative assay of high sensitivity for human leukocyte interferon with monoclonal antibodies". In: *Methods of Enzymology*, **79**, S. Petska ed. Ac. Press, New York, pp.589.595.

STEWART, W.E. (1989). *Characterization of human interferon types and subtypes: physicochemical and pharmacological distinction between interferon types. I and II Interferons: properties and clinical uses.* Part I, pp.111-119.

TROWN, P.W.; R.J. WILLS Y J.J. KAMM (1986). *The preclinical development of Roferon-A.* Cancer. **57**: 1648-1656.

WETZEL, R.; P.D. JOHNSTON; Y C.W. CZARNICKI (1983). "Role of the disulfide bonds in a human alpha interferon". In: *The biology of the interferon system.* E. De Maeyer and H. Schellekens, eds. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p.101.

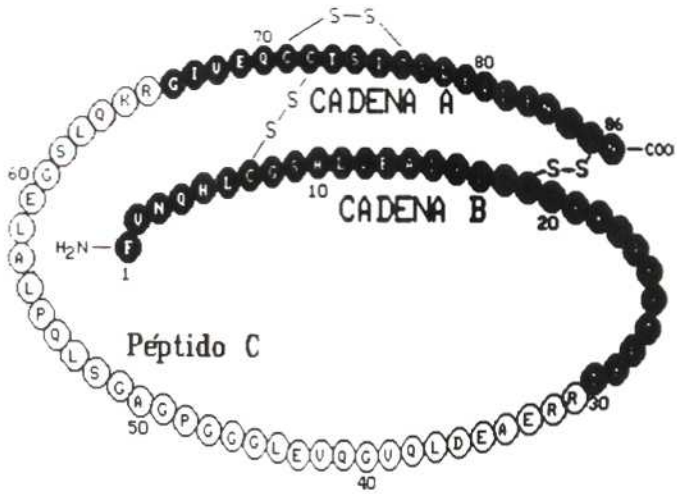

FIG. 1. Estructura de la proinsulina humana.

Existen diversos medicamentos para los enfermos de diabetes mellitus, como los compuestos relacionados químicamente con las sulfonamidas y algunos derivados de la guanidina, de cuyos mecanismos de acción poco se conoce y se utilizan sólo en los casos de diabetes leves. Fisiológicamente estas drogas no sustituyen a la insulina y si bien permiten reducir las necesidades diarias de insulina en algunos diabéticos o eliminar las dosis pequeñas en otros, no son eficaces en el tratamiento de la acidosis diabética ni en situaciones de *stress* (Berkow, 1982; Orland y Saltman, 1986).

Actualmente los pacientes que requieren insulina utilizan fundamentalmente la porcina o la bovina, que se extrae del páncreas de estos animales. Estos tipos de insulina difieren en algunos aminoácidos de la humana (Nolan *et al.*, 1971; Bruce *et al.*, 1984), por lo que algunos pacientes desarrollan paulatinamente anticuerpos anti-insulina (Orland y Saltman, 1986) siendo la única solución la administración de insulina humana, que presenta importantes ventajas en cuanto a una inducción baja de anticuerpos, menores reacciones secundarias y una mejor absorción del medicamento.

Como parte del proyecto que desarrolla nuestro Centro para la producción de insulina humana mediante el uso de las técnicas del ADN recombinante, en el presente trabajo se reporta una de las etapas realizadas y que constituye la síntesis químico-enzimática del gen que codifica para la proinsulina humana.

La síntesis químico-enzimática de genes permite seleccionar los codones más frecuentes del organismo donde se efectuará su expresión y la introducción de sitios de restricción, que facilitan su manipulación.

Actualmente se dispone de un gran número de secuencias de ADN del genoma humano y de otros organismos vivos y en igual medida de las secuencias de aminoácidos de numerosas proteínas. El cambio de algunos aminoácidos de una proteína (mediante mutagénesis dirigida o síntesis químico-enzimática del gen) puede

determinar cambios sustanciales en su actividad biológica, lo que constituye un campo (ingeniería de proteínas) que apenas se ha iniciado.

Nuevas proteínas no encontradas en la naturaleza podrán ser diseñadas, en la medida en que avance el conocimiento de la estructura y su relación con la actividad biológica, y en este campo la síntesis químico-enzimática de genes y la técnica novedosa y potente de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1985, 1988; Scharf *et al.*, 1986; Jayaraman *et al.*, 1989) tendrán una aplicación notable.

Un trabajo publicado en 1986 del grupo dirigido por el profesor Narang (Sung *et al.*, 1986), reporta el aumento de producción de proinsulina con la introducción de secuencias cortas que codifican para seis aminoácidos, la cual usamos en una de las variantes, pero que no mostramos en el presente trabajo.

La secuencia nucleotídica, la estrategia general de síntesis y el diseño total de las variantes mostradas en el presente trabajo, difieren de las reportadas por otros grupos de trabajo (Crea *et al.*, 1978; Wetzel *et al.*, 1981; Brousseau *et al.*, 1982; Ovchinnikov *et al.*, 1984).

Teniendo en cuenta la secuencia nucleotídica de la preproinsulina humana (Bell *et al.*, 1979), realizamos un diseño para la síntesis del gen de la proinsulina humana (figura 2), que permitiera posibilidades de cambio en el péptido C para su posterior eliminación de la proinsulina mediante tratamiento enzimático. El diseño incluye las señales de terminación y sitios de restricción en el extremo 3'; tres variantes de oligonucleótidos con sitios de restricción para adicionar al extremo 5', así como el uso de codones más frecuentes en bacterias y levaduras (Gratham *et al.*, 1981; Bennetzen y Hall, 1982; Maruyama *et al.*, 1986).

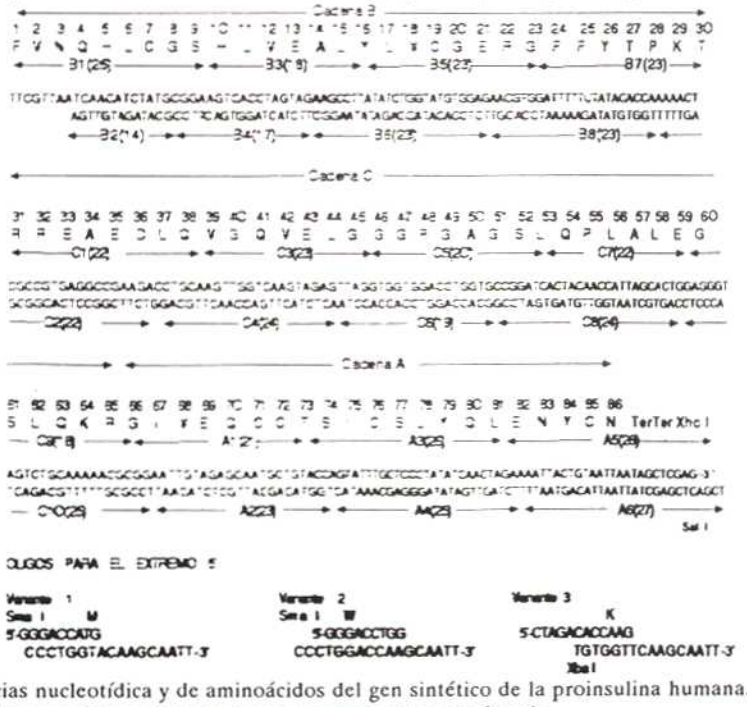

FIG. 2. Secuencias nucleotídica y de aminoácidos del gen sintético de la proinsulina humana. Se señalan entre flechas los 24 oligonucleótidos sintetizados y su tamaño entre paréntesis.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos y enzimas

Los reactivos utilizados para la síntesis de los oligonucleótidos fueron, en lo fundamental, de calidad analítica. El acetonitrilo ((Merck) fue refluído, destilado dos veces sobre P_2O_5 y conservado sobre tamiz molecular de 0,3 nm, el 1H-tetrazol (Aldrich) fue purificado por sublimación. El [γ-^{32}P]ATP (>500 Ci/mmol; 1 Ci=37 GBq) fue suministrado por la casa Amersham.

Los nucleósidos 5'-O-dimetoxitritil-N-acilados fueron preparados según lo descrito en un trabajo anterior (Jiménez *et al.*, 1984).

La síntesis de los N,N-diisopropil-ß-cianoetilfosforamiditos se realizó de acuerdo con lo descrito (Sinha *et al.*, 1984) excepto que los fosforamiditos fueron purificados mediante cromatografía en columna de SiO_2, utilizando n-hexano en gradiente creciente de acetato de etilo, ambos anhidros, y precipitación en n-hexano a -70°C.

El vidrio de poro controlado con cadena aquilaminada de 500 Å (Pierce), fue funcionalizado con el nucleósido tritilado vía enlace 3'-O-succinamido, lográndose una carga de 25-30 μmoles de desoxinucleósido por gramo de soporte, siguiendo en lo fundamental el método descrito (Chow *et al.*, 1981).

La T4 polinucleótido quinasa (PNK) utilizada procedía de la casa BioLabs y la T4 ADN ligasa fue suministrada por BioLabs y ENZIBIOT, CIGB, Apdo. 6162, La Habana, Cuba.

Síntesis de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por el método del triéster fosfito (ß-cianoetilfosforamidito) utilizando el sintetizador Gene Assembler (Pharmacia) en la escala de 1,3 μmoles y con una eficiencia de acoplamiento por ciclo superior al 98%. Los DMT-oligonucleótidos fueron desprotegidos y separados del soporte polimérico, mediante reacción con NH_3 al 33% a 55°C durante 10 horas.

Purificación de los oligonucleótidos

Cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE)

Se utilizó un equipo modular LKB con dos bombas, espectrofotómetro LKB 2151, y columna Zorbax C-8, 8x250 mm (DuPont). Se siguió el procedimiento descrito en un trabajo anterior (Rodés *et al.*, 1987) para la purificación en dos etapas de los derivados 5'-O-dimetoxitritilados.

Electroforesis

Algunos oligonucleótidos fueron purificados en geles preparativos de poliacrilamida al 20% 7M urea (0,3x20x40 cm). Las bandas se visualizaron mediante luz UV, 254 nm, se electroeluyeron y se precipitaron con etanol.

Fosforilación

Fosforilación independiente

Para la fosforilación fueron utilizados: 0,5 nmoles de oligonucleótido en buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,6; 10 mM $MgCl_2$; 5 mM DTT; 0,1 M espermidina; 0,02 mM EDTA (Valenzuela y Méndez, 1982), 1 nmol de ATP, 2 μCi[-^{32}P]ATP y 2 unidades de T4 polinucleótido quinasa en un volumen total de 15 μl, se incuba a 37°C durante 30 minutos. Después de inactivar la enzima calentando a 90-95°C durante 3 minutos, se utiliza sin purificación posterior.

Fosforilación conjunta

Se usó una mezcla de 3 a 6 oligonucleótidos (0,5 nmoles de cada uno), 1 nmol de ATP/0,5 nmoles de oligonucleótido, 1 μCi [γ-^{32}P]ATP/0,5 nmoles de oligonucleótido y 1 unidad de PNK/0,5 nmoles de oligonucleótido, en igual buffer (véase epígrafe precedente) y en un volumen total de 30 μl, se incuba a 37°C durante 30 minutos. Después de inactivar la enzima, se utiliza la mezcla de oligonucleótidos fosforilados sin purificar.

Síntesis enzimática

El esquema seguido para la síntesis total del gen se muestra en la figura 4. Los fragmentos B1B6, B7C4, C5C10 Y A1A6 fueron sintetizados de la manera siguiente:

Las soluciones de los oligos fosforilados individual o conjuntamente (no fueron fosforilados los oligos de los extremos 5', B1 y A6), se ajustan a una solución 50 mM Tris-HCl, pH 7,6; 10 mM $MgCl_2$, se calientan a 100°C durante un minuto y se deja enfriar lentamente (≈ 0,1°C/min). Se adiciona DTT (10 mM), ATP (3 mM) y 100 U/ml de T4 ADN ligasa. La mezcla se incuba 3 horas a temperatura ambiente. Se precipita con 2,5 volúmenes de etanol y se purifica en electroforesis de geles preparativos de poliacrilamida al 10% en condiciones no desnaturalizantes. Los fragmentos de doble cadena se detectan mediante autorradiografía, se cortan las bandas que contienen los fragmentos apropiados, se electroeluyen en papeles de DEAE celulosa, se extraen con NaCl 1M a 46°C y se precipitan en etanol.

Para obtener los fragmentos B1C4 y C5A6, se mezclan los subfragmentos (B1B6 y B7C4) y (C5C10 y A1A6) en cantidades equimoleculares y se efectúa el mismo proceso descrito anteriormente. En el caso del fragmento B1C4 se efectuó también la hibridación

a 46°C con enfriamiento lento a la temperatura ambiente (ver figura 6).

El gen de la proinsulina humana (B1A6) se obtuvo mediante la reacción de ligazón de los dos fragmentos anteriores en cantidades equimoleculares (6 pmoles) calentando a 46°C en iguales condiciones a las descritas anteriormente (ver figura 8).

RESULTADOS Y DISCUSION

Síntesis de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos con longitudes de 9-27 bases fueron sintetizados por el método del fosfito triéster en fase sólida de vidrio de poro controlado (VPC), en máquina sintetizadora automática y utilizando ß-cianoetilfosforamiditos, preparados en lo fundamental por el método descrito por Köster (Sinha *et al.*, 1984).

Los oligonucleótidos fueron purificados mediante cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) y electroforesis en geles de poliacrilamida.

Diseño del gen sintético

El gen fue diseñado teniendo en cuenta la secuencia nucleotídica reportada para el gen de la preproinsulina humana (Bell *et al.*, 1979) e inicialmente fueron escogidos los codones más frecuentes de la bacteria *E. coli* y de levadura (Gratham *et al.*, 1981; Bennetzen y Hall, 1982; Maruyama *et al.*, 1986) los que contribuirían a una alta expresión de la proteína en esos hospederos (tabla 1).

Utilizando un paquete de programas de computación*, fueron detectadas y eliminadas las secuencias repetidas y repetidas inversas mayores de cuatro bases, lo cual disminuye las uniones inespecíficas durante la síntesis enzimática. En la figura 3 pueden observarse las diferencias de secuencia del gen diseñado y el natural de la proinsulina humana en la que fueron realizados 67 cambios de nucleótidos.

Tabla 1
FRECUENCIA DE USO DE CODONES DEL GEN SINTETICO Y (NATURAL) DE LA PROINSULINA HUMANA

	U	C	A	G	
U	F 1(1), 2(2) L 3(0), 0(1)	S 0(0), 1(2), 1(1), 0(0)	Y 3(0), 1(4) Ter — Ter —	C 3(1), 3(5) Ter — W 0	U C A G
C	L 0(0), 0(2), 5(1), 4(8)	P 1(1), 0(2), 2(0), 0(0)	H 1(0), 1(2) Q 7(2), 0(5)	R 2(1), 2(1), 0(1), 0(1)	U C A G
A	I 2(1), 0(1), 0(0) M 0	T 1(0), 1(2), 1(1), 0(0)	N 3(0), 0(3) K 2(0), 0(2)	S 0(0), 2(2) R 0(0), 0(0)	U C A G
G	V 2(0), 0(0), 4(0), 0(6)	A 0(1), 3(1), 1(2), 0(0)	D 0(0), 1(1) E 4(3), 4(5)	G 5(1), 0(6), 6(0), 0(4)	U C A G

* M. E. Ochagavía, resultados no publicados.

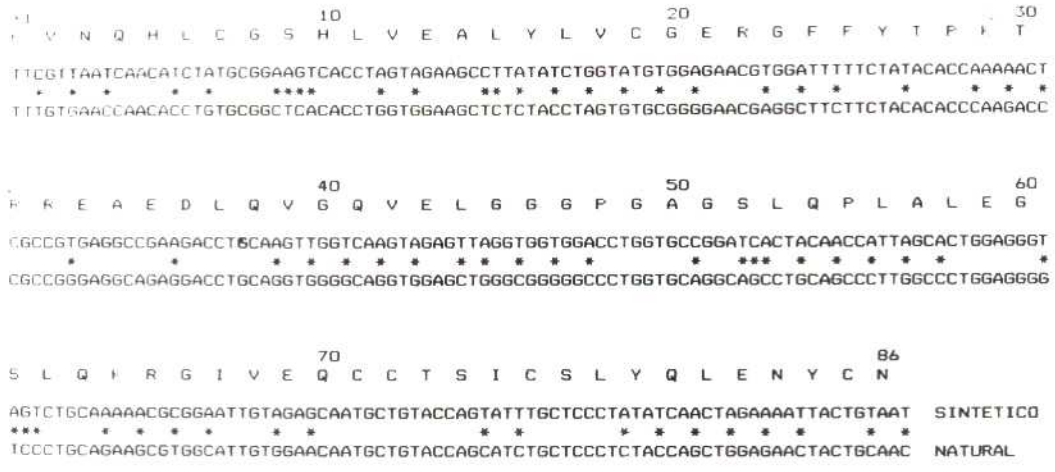

FIG. 3. Diferencias en la secuencia nucleotídica del gen sintético y natural de la proinsulina humana.

Se incluyeron los codones de terminación TAA y TAG y los sitios de restricción Xho I y Sal I en la región 3' del gen (figura 2), para facilitar su inserción en un vector adecuado. Adicionalmente se diseñaron tres fragmentos para el extremo 5', con sitios de restricción Sma I (variantes 1 y 2) y Xba I (variante 3) y que codifican para metionina (variante 1), triptófano (variante 2) y lisina (variante 3). Estos aminoácidos permiten diversas opciones en el procesamiento ulterior de la proinsulina a insulina.

La secuencia del gen sintético fue analizada mediante un paquete de programas de computación denominado CIBSOFT (Bringas y Pérez, 1986) comprobándose la secuencia de aminoácidos, sitios de terminación y de restricción, uso de codones y estructura secundaria del ARN.

Para la división del gen de la proinsulina humana en 24 oligonucleótidos (ver figura 2), se tuvo en cuenta la secuencia de la región que codifica para el péptido C, de manera tal que permitiera variar las zonas de unión a las regiones A y B (para el procesamiento químico, enzimático o ambos, de la proinsulina) mediante la síntesis del menor número de oligonucleótidos adicionales. El solapamiento de cuatro bases para los extremos cohesivos resultó suficiente en la síntesis enzimática.

Estrategia de ligazón

Los oligonucleótidos fosforilados (excepto los terminales 5', B1 y A6) de forma independiente o conjunta en cantidades equimoleculares, mediante T4 polinucleótido kinasa, ATP y cantidades pequeñas de [γ-^{32}P]ATP, fueron ligados mediante T4 DNA ligasa para producir cuatro subfragmentos (B1B6, B7C4, C5C10 y A1A6), como se muestra en el esquema general de síntesis (figura 4), los que posteriormente se ligan para producir los fragmentos B1C4 y C5A6. Por último, estos dos fragmentos se ligan para producir el gen que codifica para la proinsulina humana, B1A6, de 270-266 pares de bases (pb), (figura 4).

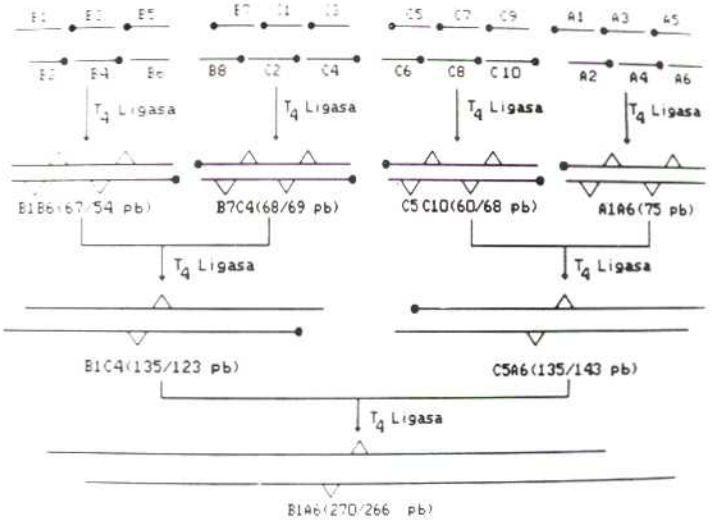

FIG. 4. Estrategia de ligazón. Los puntos gruesos en los extremos de los oligonucleótidos representan las posiciones 5'- fosforilados.

Las reacciones enzimáticas fueron seguidas por electroforesis en geles preparativos de poliacrilamida al 10% en condiciones no desnaturalizantes y utilizando los colorantes bromofenol azul (BFA) y xilencianol (XC) como marcadores. Las bandas fueron detectadas mediante autorradiografía, las de talla correcta fueron cortadas y los fragmentos de ADN de doble cadena, electroeluidos a papeles de DEAE celulosa seguido de extracción con NaCl 1M a 46°C (para evitar desnaturalización) y precipitación de etanol. Las recuperaciones del gel fueron superiores al 90%.

En las figuras 5-8 se muestran los resultados de la síntesis enzimática (autorradiogramas) en los que pueden observarse los buenos rendimientos obtenidos, en general, de las síntesis enzimáticas realizadas.

En la obtención del fragmento B1C4 (135/123 pb) fue establecida la eficiciencia de ligazón mediante la variación de las condiciones de hibridación de los fragmentos. Se observó que la eficiencia es similar (ver figura 6) si se desnaturalizan los fragmentos de doble cadena a 100°C y se enfría lentamente a temperatura ambiente (condición A) o si sólo se calienta a 46°C, lo que garantiza que los extremos cohesivos se encuentren libres, y se enfría lentamente a temperatura ambiente (condición B). La condición B sería siempre la variante más conveniente, pues el consumo de tiempo es menor.

El gen sintético obtenido (ver figura 8) fue clonado inicialmente en el vector pUC 18 y secuenciado totalmente por el método de Sanger (Sanger *et al.* 1977). En la figura 9 se muestra una región secuenciada del gen, correspondiente a las bases 56-212.

También este gen sintético fue insertado en *E. coli*, utilizando diversas variantes en el extremo 5'. En este hospedero se han obtenido niveles de expresión superiores al 30% del total de proteínas producidas.*

* Ubieta R., *et al.*, resultados no publicados.

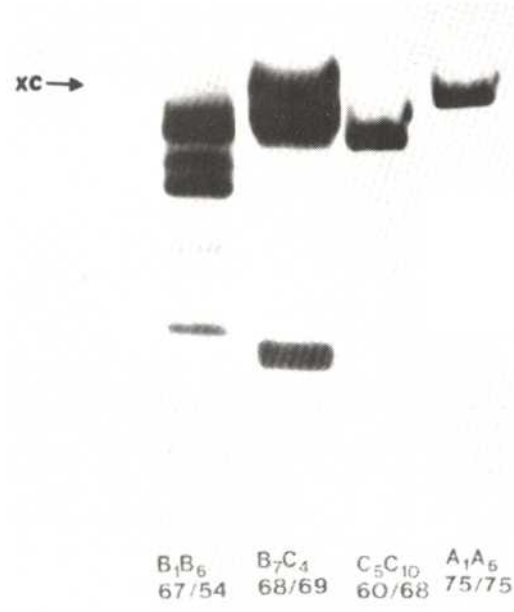

FIG. 5. Autorradiograma de la síntesis enzimática de los fragmentos B_1B_6, B_7C_4, C_5C_{10} y A_1A_6. Gel de poliacrilamida: 10 %

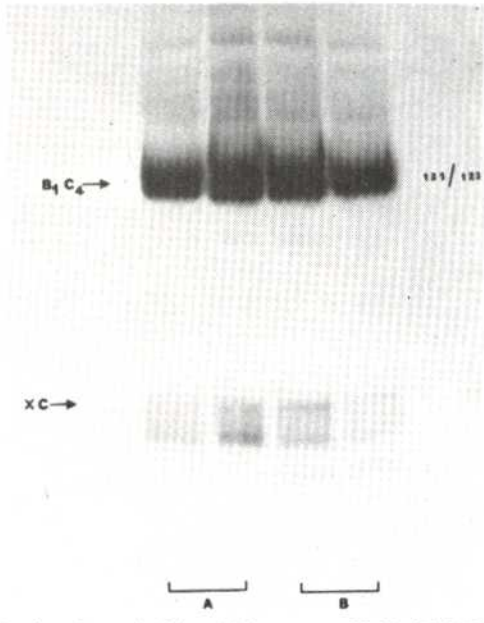

FIG. 6. Autorradiograma de la síntesis enzimática del fragmento B_1C_4 (135/123 pb).
Condiciones de hibridización: A) Calentamiento a 100°C de los fragmentos B_1B_6 y B_7C_4 y enfriamiento lento a temperatura ambiente, B) Calentamiento a 46°C de los fragmentos y enfriamiento lento a temperatura ambiente. Gel de poliacrilamida: 10%

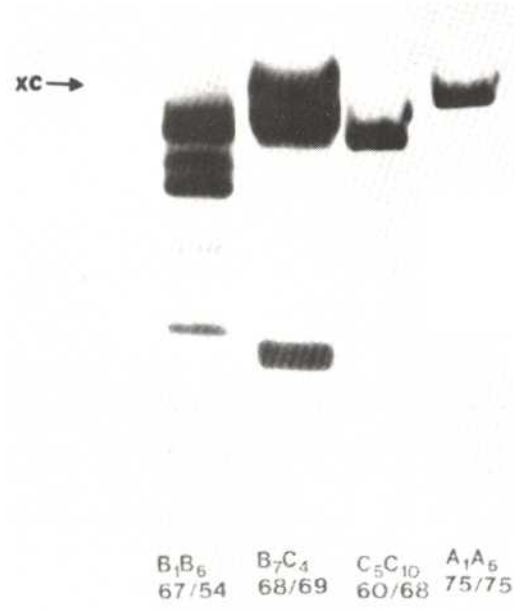

FIG. 5. Autorradiograma de la síntesis enzimática de los fragmentos B_1B_6, B_7C_4, C_5C_{10} y A_1A_6. Gel de poliacrilamida: 10 %

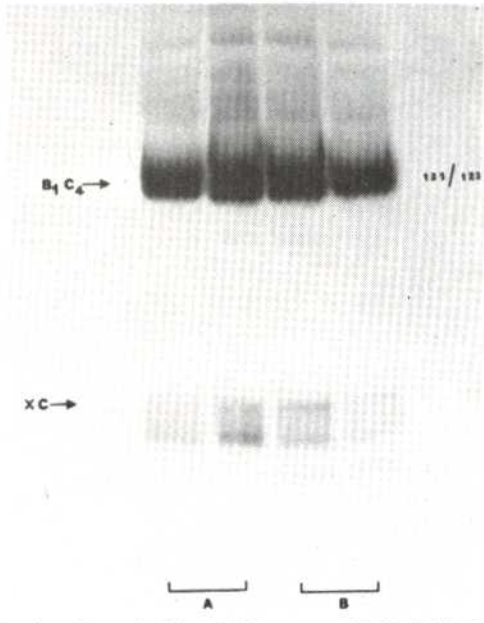

FIG. 6. Autorradiograma de la síntesis enzimática del fragmento B_1C_4 (135/123 pb).
Condiciones de hibridización: A) Calentamiento a 100°C de los fragmentos B_1B_6 y B_7C_4 y enfriamiento lento a temperatura ambiente, B) Calentamiento a 46°C de los fragmentos y enfriamiento lento a temperatura ambiente. Gel de poliacrilamida: 10%

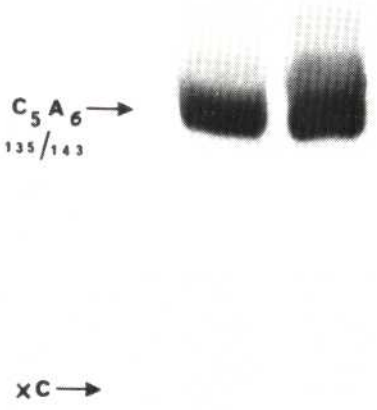

FIG. 7. Autorradiograma de la síntesis enzimática del fragmento C5A6 (135/143 pb). Gel de poliacrilamida: 10%

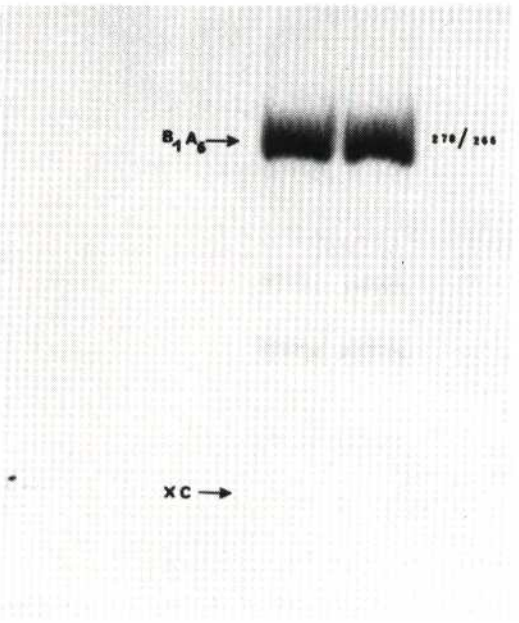

FIG. 8. Síntesis enzimática final del gen sintético de la proinsulina humana (B1A6 270/266 pb). Gel de poliacrilamida: 10%

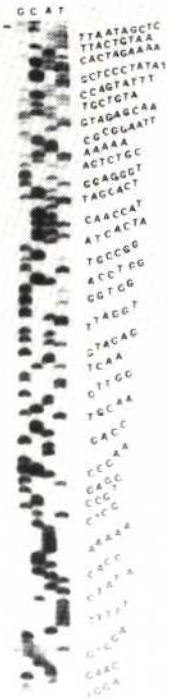

FIG. 9. Secuencia nucleotídica de la región correspondiente a las bases 56-212 del gen sintético de la proinsulina humana.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a R. Ortega por la preparación de las figuras del presente trabajo.

REFERENCIAS

BELL, G. I.; W. F. SWAIN, R. PICTET, B. CORDELL Y H. M. GOODMAN (1979). *Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding human preproinsulin*. Nature **282**: 525-527

BENNETZEN, J. L. y B. D. HALL (1982). *Codon selection in yeast*. J. Biol. Chem. **257**: 3026-3031

BERKOW, R (1982). *The Manual Merck of Diagnosis and Therapy*. 14ª Ed. Merck Sharp & Dohne Research Laboratories, NJ, USA: 1037- 1050.

BRINGAS, R. y S. PEREZ (1986). CIFSOFT: *Un paquete de programas para el análisis de ácidos nucleicos y proteínas*. Interferón y Biotenología 3(3): 225-228

BROUSSEAU, R.; R. SCARPULLA, W. SUNG, H. M. HSUING, S. A. NARANG y R. WU (1982). *Synthesis of a human insulin gene. V. Enzymatic assembly, cloning and characterization of the human proinsulin DNA*. Gene **17**: 279-289

BRUCE, H. F.; A. H. PEKAR, J. M. PETTEE, E. M. SCHIRMER, M. G. JOHNSON y R. E. CHANCE (1984). *Isolation and charaterization of a genetic variant of bovine proinsulin*. J. Peptide Protein Res. **23**: 506-515.

CREA, R.; A. KRASZEWSKI, T. HIROSE y K. ITAKURA (1978). *Chemical synthesis of genes for human insulin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**: 5765-5769

CHAN, S. J.; P. KEIM y D. F. STEINER (1976). *Cell-free synthesis of rat preproinsulins: Characterization and partial amino acid sequence determination*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**: 1964-1968.

CHOW, F.; T. KEMPE y G. PALM (1981). *Synthesis of oligodeoxyribonucleotides on silica gel support*. Nucleic Acids Res. **12**: 2807-2817.

GRATHAM R.; C. GAUTIER, M. GOUY, M. JACOBZONE y R. MERCIER (1981). *Codon catalog usage is a genome strategy modulated for gene expressivity*. Nucleic Acids Res. **9** Supp.: r43-r74.

JAYARAMAN, K.; J. SHAH Y J. FYLES (1989). *PCR mediated gene synthesis*. Nucleic Acids Res. **17**: 4403.

JIMENEZ V.; G. PADRON, L. CASTELLANOS y L. RODES (1984). *Síntesis química de oligonucleótidos por el método del fosfotriester* Interferón y Biotecnología. **1**(3): 39-51.

MARUYAMA T.; T. GOJOBORI, S. AOTA y T. IKEMURA (1986). *Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data*. Nucleic Acids Res. **14** Supp.: r151-r197.

ORLAND, M. J. y R. J. SALTMAN (1986). *Manual de terapéutica médica*. Department of Medicine, Washington University, School for Medicine. Edición Salvat S.A., Barcelona, España: 369-389.

NOLAN C.; E. MARGOLIASH, J. D. PETERSON y D. F. STEINER (1971). *The structure of bovine proinsulin*. J. of Biol. Chem. **246**: 2780- 2795.

OVCHINNIKOV Y. A.; V. A. EFIMOV, I. N. IVANOVA, S. V. REVERDATTO, N. P. SKIBA y O. G. CHAKHMAKHCHEVA (1984). *Synthesis of DNA coding for human proinsulin*. Gene **31**: 65-78.

RODES L.; V. JIMENEZ, G. PADRON, L. CASTELLANOS y G. VILLEGAS (1987). *Síntesis química rápida de desoxioligonucleótidos por el método del triester fosfórico en fase sólida*. Interferón y Biotecnología **4**(1): 37-42

SAIKI, R. K.; S. SHARF, F. FALOONA, K. B. MULLIS, G. T. HORN, H. A. ERLICH y N. ARNHEIM (1985). *Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science **230**: 1350-1355.

SAIKI, R. K.; D. H. GELAND, S. STOFFEL, S. J. SCHARF, R. HIGUCHI, G. T. HORN, K. B. MULLIS y H. A. ERLICH (1988). *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science **239**: 487-491.

SANGER, F. (1959). *Chemistry of insulin. Science* **129**: 1340-1344.

SANGER, F.; S. NICKLEN y A. R. COULSON (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 5463-5467.

SCHARF, S. J.; G. T. HORN, H. A. ERLICH (1986). *Direct cloning and sequence analysis of enzimatically amplified genomic sequences*. Science **233**: 1076-1078.

SINHA, N. D.; J. BIERNAT, J. McMANUS Y H. KÖSTER (1984). *Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII: use of β-cyanoethyl N,N-dialkiylamino-N-morpholinophosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product*. Nucleic Acids Res. **12**: 4539-4557

STEINER D. F.; S. J. CHAN, J. M. WELSH y S. C. M. KWOK (1985). *Structure and evolution of the insulin gene*. Ann. Rev. Genet. **19**: 463-484

SUNG, W. L.; F-L. YAO, D. M. ZAHAB y S. A. NARANG (1986). *Short synthetic oligodeoxyribonucleotide leader sequences enhance accumulation of human proinsulin synthesized in* Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 561- 565

VALENZUELA, P. y B. MENDEZ (1982). *Techniques in Molecular Biology*. San Francisco, USA.

WETZEL R.; D. G. KLEID, R. CREA, H. L. HEYNEKER, D. G. YANSURA, T. HIROSE, A. KRASZEWSKI, A. D. RIGGS, K. ITAKURA y D. V. GOEDDEL (1981). *Expression in Escherichia coli of a chemically synthesized gene for a "mini-C" analog of human proinsulin*. **Gene 16** : 63-71.