

Pesquisaje de plantas transgénicas por reacción en cadena de la polimerasa

B. GOYENECHEA, R. MORÁN, C. GUTIÉRREZ, G. DE LA RIVA y S. PÉREZ

Agrupación de Plantas y Fertilizantes, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba

Recibido en mayo de 1990

Aprobado en septiembre de 1990

RESUMEN

La obtención de plantas transgénicas mediante la transformación genética ha permitido la introducción de nuevas características en diferentes especies. Con la finalidad de disponer de un método de evaluación temprana que permita verificar la incorporación del ADN foráneo al genoma de la planta, ha sido estandarizado un sistema basado en la reacción en cadena de la polimerasa (P.C.R.). Con este método se ha comprobado la integración del gen de la *delta*-endotoxina del *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* al genoma de plantas de tabaco transformadas.

La cantidad de tejido necesaria para la extracción de ADN total fue reducida. También se optimizaron las condiciones del P.C.R. y se comprobó la especificidad de la amplificación del gen mediante un análisis por Southern blot.

SUMMARY

The obtainment of transgenic plants through genetic transformation has allowed the introduction of new characteristics into different plant species. In an effort to create an early method to check the insertion of foreign DNA in the genome of transformed plants a system using the Polymerase Chain Reaction (P.C.R.) has been developed. Using this method, the insertion of the *Bacillus thuringiensis delta*-endotoxin gene in the genome of transformed tobacco plants has been proven.

Starting amount of transformed plant tissue for total DNA extraction was reduced. The PCR conditions were improved and the specificity of the gene amplification was confirmed by Southern blot analysis.

INTRODUCCION

La obtención de plantas de tabaco transgénicas utilizando *Agrobacterium tumefaciens* es actualmente una técnica bastante estandarizada (Herrera *et al.*, 1983; Vaeck *et al.*, 1987). Tradicionalmente, el pesquisaje inicial para las plantas transgénicas se ha llevado a cabo mediante el análisis por Southern blot y Northern blot, y en muchas ocasiones no ofrecen los resultados concluyentes esperados (Vaeck *et al.*, 1987), a causa de que aún se hace difícil la detección de una simple copia de un gen, o la expresión del mismo (Oste, 1988).

En este trabajo se describe una técnica alternativa para el pesquisaje rápido de un gran número de plantas transgénicas utilizando el P.C.R.

Las plantas transgénicas utilizadas en este trabajo fueron transformadas con una construcción que contiene el gen de la *delta*-endotoxina del *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk.), con el objetivo de obtener plantas transgénicas resistentes al ataque de lepidópteros.

El P.C.R. es un procedimiento de amplificación del ADN, que en cuestión de horas, puede amplificar un fragmento específico de ADN más de 10^8 veces (Erlich *et al.*, 1988). Su sensibilidad, velocidad y versatilidad han producido un profundo impacto en la solución de problemas como son: aumentar la eficiencia de clonación de secuencias genómicas (Scharf *et al.*, 1986; de la Riva *et al.*, 1989); secuencia directa de DNA mitocondrial y genómico (Stofflet *et al.*, 1988); análisis de variaciones de secuencias nucleotídicas (Saiki *et al.*, 1986); detección de patógenos virales y microorganismos infecciosos (Larzul *et al.*, 1989; Demmler *et al.*, 1988); identificación de animales transgénicos (Castro *et al.*, 1989); investigaciones de enfermedades genéticas prenatales (Bugawan *et al.*, 1988; Dilella *et al.*, 1988); aplicación en las ciencias forenses (Beroldingen *et al.*, 1987), etcétera.

MATERIALES Y METODOS

Extracción de ADN total

Se realizó la extracción y purificación del ADN total de plantas según el método reportado por Dellaporta *et al.* (1983). Se partió de 2 mg de tejido

de plantas de *N. tabacum* transformadas con el gen de la *delta*-endotoxina del *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. También se purificó ADN total de plantas de *N. tabacum* no transformadas y ADN total de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Este último se purificó según el método de Kronstad *et al.* (1983).

Reacción en cadena de la polimerasa

El P.C.R. se realizó usando ADN cromosomal de tabaco, tanto de plantas nativas que sirven de control negativo como transformadas y ADN del *B. thuringiensis* que se utilizó como control positivo. Se usaron oligonucleótidos sintéticos como cebadores; ambos oligos nos permiten amplificar 714 pb de la región central del gen de la *delta*-endotoxina del *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (figura 1).

La reacción se llevó a efecto según Saiki *et al.* (1988), a la cual se le realizaron algunas modificaciones como utilizar menor cantidad de ADN (0,5 μ g en lugar de 2,5 μ g) y aumentar ligeramente la cantidad de cada dNTP en la reacción (250 μ M en lugar de 200 μ M). Además, se usó el buffer recomendado por Frohman *et al.* (1990).

Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

En un tubo Eppendorf de 1,5 ml, añadimos 0,5 μ g de ADN, 250 μ M de cada uno de los dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 μ M de cada cebador, 67 mM de Tris-HCl pH 8,4; 16,6 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 6,7 mM de MgCl_2 , 6,7 mM de EDTA, 1,7 mg/ml de BSA y 3 U de Taq ADN polimerasa (Enzibiot, Cuba), en un volumen final de 100 μ l. La mezcla reactiva se cubrió con 50 μ l de parafina líquida para evitar la evaporación por condensación durante los diferentes ciclos térmicos.



Los oligos cebadores tienen la siguiente secuencia

673 (5') .GATTGGATAAGATATAATCAATTTAGAAGAG.

1387 (3') .ATTAATTCAGCACTACGATGTATCCA.

Figura 1.

FIG. 1. Diseño del sistema para el P.C.R. del gen insertado

Todas las muestras se sometieron a 30 ciclos de amplificación en un equipo automático (Hybaid, R.U.).

Para el primer ciclo se usaron las condiciones siguientes: 180 s a 94°C; 5 s a 55°C; 30 s a 72°C. En los siguientes 28 ciclos las condiciones fueron: 5 s a 94 °C; 5 s a 55°C; 30 s a 72°C. En el último ciclo: 5 s a 94°C; 5 s a 55°C; 300 s a 72°C.

Después de la reacción se tomaron alícuotas de 10 µl y se aplicaron en un gel de agarosa 0,8 %, en solución tampón Tris-Borato EDTA (Maniatis *et al.*, 1989).

Southern blot

Para confirmar que la banda amplificada corresponde al gen de la toxina del Btk se realizó un Southern blot a las muestras según la técnica descrita por Southern (1975), utilizándose como sonda radioactiva un oligo que hibrida específicamente en una zona interna de la banda amplificada. La hibridación se realizó a 65°C en solución conteniendo 6X SSC, 5X de solución Denhardt y 0,5 % de SDS. El oligo empleado corresponde a la posición 756 del gen de la toxina del Btk según lo reportado por Fischhoff (1987) y tiene la siguiente secuencia: (5')CTGTCATAGGTTAAGCTTGTCAAAGGGT.(3').

El oligonucleótido fue marcado radioactivamente con ³²P *gamma* (Cubaisótopo, Cuba), empleando polinucleótido quinasa (Enzibiot, Cuba), según la técnica descrita por Maxam y Gilbert (1980).

RESULTADOS Y DISCUSION

El resultado del análisis electroforético del producto amplificado por P.C.R., muestra la aparición de una banda de 714 pb en las muestras procedentes de plantas transformadas, similar a la obtenida en el control de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, cuya talla se corresponde a la esperada de acuerdo con el diseño de los oligos cebadores (figura 2a-b).

La figura 2b muestra el resultado de la autorradiografía del Southern blot realizada para confirmar que el fragmento amplificado corresponde al gen introducido a las plantas. De esta manera se demuestra que las bandas que se observan en la

electroforesis teñidas con bromuro de etidio, son el resultado de la amplificación específica de un fragmento del gen del *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Como resultado de este trabajo logramos seleccionar un grupo de plantas transgénicas de tabaco, que pasarán a una etapa más avanzada de evaluación para verificar su capacidad autopesticida contra lepidópteros mediante experimentos de actividad biológica en condiciones de casas verdes (Molina *et al.*, 1991).

La muestra analizada por P.C.R. correspondiente a la planta transformada 11 resultó negativa; esto no significa la ausencia del gen exógeno en su genoma, y el hecho de haber sido regenerada en un medio selectivo induce a pensar de esta forma. En estos casos se recomienda repetir el P.C.R. a partir de una nueva extracción de ADN o realizar la etapa de desnaturalización 2 ó 3 minutos más, porque se ha encontrado que cuando existen problemas relativos a la calidad del ADN empleado, este paso puede constituir una limitante a los rendimientos de la amplificación, aunque se requiere una comprobación experimental más rigurosa para demostrarlo.

En la autorradiografía se observa, alrededor de las 300 pb, una zona de hibridación que puede ser explicada por la probable presencia de fragmentos truncados a causa de la amplificación incompleta de la secuencia deseada. También en esta zona están presentes otros productos que forman parte de la mezcla de reacción y que pueden dar lugar a hibridación inespecífica.

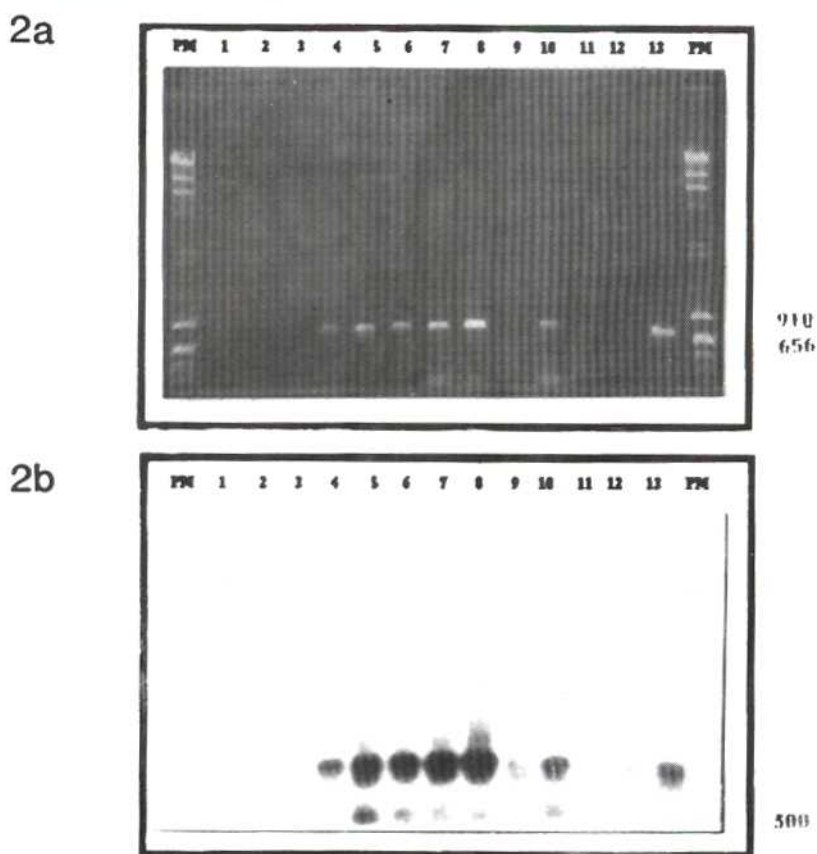


FIG. 2. a) Electroforesis en gel del producto del P.C.R.; b) Autorradiografía del Southern del producto del P.C.R. PM: Marcador de peso molecular (*Lambda* ADN digerido Hind III + pBR 322 digerido Alu I); (1-2-3) Plantas de *N. tabacum* var. SR-1 Petit Habana no transformadas; (4-5-6-7-8-9-10-11-12) Clones de plantas de *N. tabacum* var. SR-1 Petit Habana transformadas; (13):*B. thuringiensis* var. kurstaki.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo han permitido el establecimiento de un sistema de verificación temprana de la incorporación estable de un gen exógeno al genoma de las plantas transgénicas, mediante la técnica del P.C.R. Las plantas transformadas y regeneradas en un medio selectivo pueden ser analizadas en las etapas tempranas de su desarrollo con motivo de la reducción de la cantidad de material

vegetal de partida, condición necesaria para aplicar este sistema a las pequeñas plántulas. Por otra parte, se realiza en un tiempo menor que el empleado en los métodos tradicionales de Southern y Northern. También reduce el uso de compuestos radioactivos.

Se recomienda el uso complementario de un Southern blot al producto del P.C.R., cada vez que se requiera verificar la incorporación de un nuevo gen exógeno al genoma de la planta y cada vez que se requieran cebadores de nuevo diseño, lo que está determinado por la necesidad de

comprobar la especificidad de la amplificación obtenida y la ausencia de falsos positivos. Una vez conocido esto, podemos realizar los pesquisajes sin necesidad de recurrir al Southern blot.

REFERENCIAS

- BEROLDINGEN, C. H.; R. G. HIGUESI; G. F. SENSSABAUGH y H. A. ERLICH (1987). Analysis of enzymatically amplified HLA-DQ alpha DNA from single human hairs. *Am. J. Gen. B* 41: 725-731.
- BUGAWAN, T. L.; R. K. SAIKI; C. H. LEVESON; R. N. WATSON y H. A. ERLICH (1988). The use of non-radiative oligonucleotide probes to analyze enzymatically amplified DNA for prenatal diagnosis and forensic HLA typing. *BioTechnology* 6: 943-947.
- CASTRO, F. O.; A. PÉREZ; A. AGUILAR; G. DE LA RIVA, R. MARTÍNEZ; J. DE LA FUENTE y L. HERRERA (1989). Expresión del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en ratones transgénicos. *Interferón y Biotecnología* Vol. 6 (3): 251-257.
- DE LA RIVA, G.; P. ORAMAS; B. GOYENECHEA y S. PÉREZ (1989). Clonación y expresión de un gen quimérico de la toxina del *Bacillus thuringiensis* var. berliner por P.C.R. *Interferón y Biotecnología*. 6: 234-241.
- DELLAPORTA, S. L.; J. WOOD y J. B. HICKS (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1: 19-21.
- DEMMLER, G. J.; G. J. BUFFONE; C. M. SCHIMBORY y R. A. MAY (1988). Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J. Infect. Dis.* 158: 1177-1184.
- DILELLA, A. G.; W. M. HUAN y S. L. C. WOO (1988). Screening for phenyl ketonuria mutations by DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Lancet* 1: 497-499.
- ERLICH, H. A.; D. H. GELFAND y R. K. SAIKI (1988). Specific DNA amplification. *Nature* 331: 461-462.
- FISCHHOFF, D. A.; K. S. BOWDISH; F. J. PERLACK; P. G. MARRONE; S. M. MCKORMICK; J. G. NIEDERMEYER; D. E. ROCHESTER; S. G. ROGERS y R. T. FRALEY (1987). Insect tolerant transgenic tomato plants. *BioTechnology* 5: 807-813.
- FROHMAN, M. A. (1990). *P.C.R. Protocol: A Guide to Methods and Applications*. Acad. Press Inc. (Ed.) Cap. RACE.
- HERRERA-ESTRELLA, L.; A. DEPICKER; M. VAN MONTAGU y J. SCHELL (1983). Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a T-plasmid-derived vector. *Nature* 303: 209-213.
- KRONSTAD, J. W.; M. E. SCHNEPF y H. R. WHITELEY (1983). Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *Journal of Bacteriology* 154: 419-428.
- LARZUL, D.; C. BRECHOT y J. L. GUESDON (1989). "A highly sensitive detection method for hepatitis B viral DNA sequences: Monitoring of antiviral therapy". *Molecular Probes: Technology and Medical Applications*, A. Albertini (Ed.) Raven Press New York.
- MANIATIS, T.; J. SAMBROOK y E. F. FRITCH (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- MAXAM, A. M. y W. GILBERT (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods in Enzymology*. vol. 65: 499.
- MOLINA, P.; B. GOYENECHEA; R. MORAN; L. ROMERO; G. DE LA RIVA y S. PEREZ (1991). Actividad larvicida en plantas transgénicas de tabaco. *Biotecnología Aplicada* 8 (2): 191-198.
- OSTE, C. (1988). Polymerase chain reaction. *Biotechniques* 6: 162-167.
- SAIKI, R. K.; T. L. BUGAWAN; G. T. HORN; K. B. MULLIS y H. A. ERLICH (1986). Analysis of enzymatically amplified β globin and HLA-DQ alpha DNA with allele specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166.
- SAIKI, R. K.; U. B. GYLLESTEN y H. A. ERLICH (1988). "The polymerase chain reaction", In: *Genome Analysis: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, England. K. E. Davies (Ed.), pp. 141-152.
- SCHARF, S. J.; G. T. HORN y H. A. ERLICH (1986). Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* 233: 1076-1078.
- SOUTHERN, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- STOFLET, E. S.; D. D. KOEBERL; G. SARKAR y S. S. SOMMER (1988). Genomic amplification with transcript sequencing. *Science* 239: 491-494.
- VAECK, N.; A. REYNARETS; H. HOFTE; S. JANSEN; M. DE BEUCKELEER; C. DEAN; M. ZABEAU; M. VAN MONTAGU y J. LEEMANS (1987). Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 327: 33-37.