

MODIFICACIÓN DEL GEN DE LA ESPORAMINA DE BONIATO CON UN FRAGMENTO DE ADN SINTÉTICO. SECUENCIA NUCLEOTÍDICA Y EXPRESIÓN EN *Escherichia coli*

Alina López,¹ Zurima Zaldúa,¹ Eulogio Pimentel,¹ Melba García,¹ Rolando García,¹ Jesús Mena,¹ ✉ Rolando Morán¹ y Guillermo Selmar²

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado postal 387. Camagüey, Cuba.

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado postal 6162. Ciudad de La Habana, Cuba.

ABSTRACT

Sporamin, the major soluble protein of sweet potato tuberous roots (*Ipomoea batatas*), has a relatively balanced aminoacid content, but it is limited in lysine and methionine. A 240 base pair DNA fragment was designed and synthesized in order to improve the aminoacidic quality of the sporamin. From a total DNA preparation and using polymerase chain reaction, the region containing the sporamin gene and its regulatory regions was amplified. The DNA obtained was cloned and sequenced. Besides, we amplified by PCR a fragment containing the sporamin gene, the sequences coding for transit to vacuoles and the signal peptides. This region was cloned, sequenced and expressed in *Escherichia coli*. With the use of specific restriction endonucleases, two strategies were developed to insert the DNA synthetic fragment in two different positions of the structural gene for sporamin. Predictions of the possible features of the modified sporamins were performed using appropriate softwares. The genetic variants obtained were checked by restriction, hybridization and sequencing. Their expression in *E. coli* was detected by Western blotting.

Key words: essential aminoacids, protein quality

Biotecnología Aplicada 1996;13:265-270

RESUMEN

La esporamina, principal proteína del tubérculo de boniato (*Ipomoea batatas*), presenta un contenido de aminoácidos relativamente balanceado pero limitado a su vez en lisina y metionina. Se diseñó y sintetizó un fragmento de ADN de 240 pares de bases con el objetivo de mejorar la calidad aminoacídica de la esporamina. A partir de una preparación de ADN total de boniato y por reacción en cadena de la polimerasa, se amplificó la región que contiene el gen que codifica la esporamina y las secuencias reguladoras adyacentes. El ADN amplificado se clonó y secuenció. También por PCR, se amplificó un fragmento que contiene sólo el gen estructural de la esporamina y las secuencias que codifican los péptidos señal y de tránsito a vacuolas. Esta región se clonó, secuenció y expresó en *Escherichia coli*. Con el uso de endonucleasas específicas de restricción se realizaron dos estrategias en las que el fragmento de ADN sintético fue insertado en posiciones diferentes de la secuencia del gen estructural para la esporamina. Las predicciones de los posibles atributos de las esporaminas modificadas fueron realizadas a través de programas de cómputo. Las variantes genéticas obtenidas fueron chequeadas por restricción enzimática, hibridación y secuencia. Su expresión en *E. coli* fue detectada por Western blotting.

Palabras claves: aminoácidos esenciales, calidad proteica

Introducción

El boniato (*Ipomoea batatas*) es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia *Convolvulaceae*. Su cultivo, de acuerdo al volumen de las cosechas, ocupa el séptimo lugar a nivel mundial entre los destinados a la alimentación (1) y el segundo entre los vegetales. Anualmente se producen alrededor de 132 millones de toneladas métricas de este tubérculo (2).

El alto contenido de materia seca y carbohidratos le confiere fundamental importancia en usos industriales y en la alimentación animal. El boniato es también una importante fuente de provitamina A, vitamina C, potasio, hierro y calcio. El contenido de

proteínas del tubérculo varía entre el 2 y el 10 % del peso seco en dependencia del genotipo (3, 4).

La principal proteína del tubérculo es la esporamina; posee un peso molecular de aproximadamente 20 000 Da y constituye el 60-80 % del total de proteínas solubles del órgano (5, 6). Se ha comprobado que es sintetizada como un precursor de aproximadamente 4 000 Da mayor que la proteína madura (7, 8). La región N-terminal de la proteína contiene dos secuencias aminoacídicas: péptido señal y péptido transitorio, responsables de su entrada en retículo y de su localización vacuolar final (9). De manera similar a los genes de la patatina de papa, la

1. Walter WM Jr, Collins W, Purcell AE. Sweet potato protein. *J Agr Food Chem* 1984;32:695-699.

2. Ensminger AH, Ensminger ME, Konlande JE, Robson JRK. (Ed.) (1995). *The concise encyclopedia of foods and nutrition*. 1995 CRC Press, Inc.:1001.

3. Jones DB, Gersdorff CEF. Ipomoein, a globulin from sweet potatoes, *Ipomoea batatas*. Isolation of a secondary protein derived from ipomoein by enzymic action. *Journal of Biological Chemistry* 1931;93:119-126.

esporamina es codificada por una familia multigénica, aunque a diferencia de la patatina no presenta intrones. En el caso de la esporamina se reportaron dos subfamilias: A y B, que tienen homologías superiores al 94 % intrasubfamilia y alrededor del 83 % intersubfamilia (8, 10, 11).

En plantas de boniato sometidas a condiciones normales de crecimiento en campo, los ARN mensajeros para la esporamina están presentes casi exclusivamente en el tubérculo y muy poco en otros órganos. Esta característica evidencia la regulación órgano-específica a que están sometidos estos genes (10).

Al ser la esporamina la proteína mayoritaria del tubérculo, su calidad aminoacídica influye en la calidad proteica de este órgano. El contenido de aminoácidos tanto en la esporamina A como en la B es relativamente balanceado, sin embargo presenta limitaciones en lisina (Lys) y metionina (Met) (6). Estas limitaciones hacen necesario el suplemento proteico a aquellas dietas basadas en boniatos. La ingeniería genética puede ser usada como herramienta para corregir esta deficiencia nutricional. El gen de la esporamina A constituye un mejor candidato para ser utilizado como punto de partida en la estrategia de modificación, dada su mejor calidad aminoacídica en relación con la B.

La estabilidad de las proteínas heterólogas utilizadas para incrementar el valor nutricional en algunos cultivos ha sido baja. En este trabajo, la mejoría de la calidad nutricional se aborda a través de una estrategia diferente a las reportadas hasta el momento; de ahí su importancia. La fusión del fragmento nucleotídico en zonas internas del gen de la esporamina persigue como propósito que la proteína quimérica posea mayor estabilidad.

En el presente trabajo se describe el procedimiento realizado para obtener dos variantes genéticas modificadas de la esporamina A con un fragmento de ADN sintético cuyos codones codifican un elevado número de Lys y Met entre otros aminoácidos. Ambas variantes fueron clonadas en vectores plasmídicos, secuenciadas y expresadas en *Escherichia coli*. Las construcciones genéticas obtenidas serán utilizadas para lograr plantas transgénicas de boniato que tengan mejor calidad nutricional.

Materiales y Métodos

Purificación de la esporamina y obtención de anticuerpos específicos

La esporamina de boniato fue purificada a partir de tubérculos frescos de la variedad CEMSA 78-354. El proceso de purificación fue desarrollado según (5). Los resultados se chequearon por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5 %, en condiciones desnaturizantes (12). El grado de pureza de la fracción final de la esporamina fue estimado por densitometría. Los anticuerpos específicos fueron

obtenidos en conejo y purificados por el método de Harlow y Lane (13). El título se determinó por inmunodot blot (14) frente a una curva de concentraciones crecientes de esporamina.

Purificación de ADN total de boniato

Se realizó extracción y purificación de ADN total a partir de hojas de boniato de la variedad CEMSA 78-354 según el procedimiento reportado por Dellaporta SL, et al (15). Se utilizaron 5 mg de hoja como material de partida.

Reacción en cadena de la polimerasa y clonación

Se llevó a cabo a partir de ADN total de boniato. Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados de acuerdo con la secuencia reportada (10), incluyendo ligeros cambios para facilitar su posterior clonación. Como resultado, se originaron extremos susceptibles a digestión *Hind* III en 5' y *Eco* RI en 3'. El procedimiento se efectuó según (16) y el fragmento obtenido se digirió *Eco* RI-*Hin* dIII y clonó en un vector pUC19 previamente tratado con las mismas enzimas de restricción. Los clones recombinantes (pSpor1) se chequearon por restricción con endonucleasas y por hibridación de colonias con un oligonucleótido diseñado para reconocer una región interna del fragmento clonado. Se les determinó la secuencia nucleotídica.

A partir de pSpor1 se amplificó, según Saiki RK and Erlich HA (17), el fragmento que contiene el gen estructural para la esporamina. El oligonucleótido 3' empleado fue el mismo que en la reacción anterior. El utilizado para la región 5' fue modificado en un nucleótido respecto a la secuencia original para introducir el sitio *Nco*I. El fragmento resultante fue digerido *Eco* RI y clonado en un vector pUC19 tratado *Sma* I-*Eco* RI. Los clones recombinantes (pES) fueron chequeados con endonucleasas apropiadas y se expresaron en *E. coli*.

Determinación de la secuencia nucleotídica

Se llevó a cabo por el método de Sanger (14) a partir de 10 µg de ADN del plásmido recombinante pSpor1 y preparado por lisis alcalina con el empleo de columnas Qiagen. Las reacciones de secuencia fueron procesadas en un secuenciador automático Pharmacia LKB usando el kit de secuenciación AutoReadTM. Con las mismas condiciones, este procedimiento se llevó a cabo para secuenciar las variantes modificadas de la esporamina obtenidas.

Diseño y síntesis del fragmento de ADN para la modificación de la esporamina

Se diseñó un fragmento de 240 pares de bases. Su secuencia es similar a la del High Essential Aminoacid Encoding DNA (HEAAE-DNA), reportada para el mejoramiento de la calidad nutricional de la patatina de papa (18). Este fragmento codifica un péptido con alto contenido en aminoácidos esencia-

4. Varon D, Collins W. Ipomoein is the major soluble protein of sweet potato storage roots. *HortScience* 1989;24(5):829-830.

5. Li H, Oba K. Major soluble proteins of sweet potato roots and changes in proteins after cutting, infection, or storage. *Agric Biol Chem* 1985;49(3):737-744.

6. Maeshima M, Sasaki T, Asahi T. Characterization of major proteins in sweet potato tuberous roots. *Phytochemistry* 1985;24(9):1899-1902.

7. Hattori T, Nakagawa T, Maeshima M, Nakamura K, Asahi T. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for sporamin, the major soluble protein of sweet potato tuberous roots. *Plant Molecular Biology* 1985;5:313-320.

8. Murakami S, Hattori T, Nakamura K. Structural differences in full-length cDNAs for two classes of sporamin, the major soluble protein of sweet potato tuberous roots. *Plant Molecular Biology* 1986;7:343-355.

9. Hattori T, Ichihara S, Nakamura K. Processing of a plant vacuolar protein precursor *in vitro*. *European Journal of Biochemistry* 1987;166:533-538.

10. Hattori T, Nakamura K. Genes coding for the major tuberous root protein of sweet potato: Identification of putative regulatory sequence in the 5' upstream region. *Plant Molecular Biology* 1988;11:417-426.

11. Hattori T, Yoshida N, Nakamura K. Structural relationship among the members of a multigene family coding for the sweet potato tuberous root storage protein. *Plant Molecular Biology* 1989;13:563-572.

12. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.

13. Harlow E, Lane O. (Ed.). *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. N.Y. 1988.

14. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.

15. Dellaporta SL, Wood J, Hicks B. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1983;1:19-21.

16. Goyenechea B, Morán R, Gutiérrez C, de la Riva G, Pérez S. Pesquisaje de plantas transgénicas por reacción en cadena de la polimerasa. *Biotecnología Aplicada* 1998;8(2):237-241.

17. Saiki RK, Erlich HA. *Genome Analysis, A Practical Approach*. Davies KE (Ed.). Oxford. U.K. 1988.

les, frecuentemente deficientes en proteínas de origen vegetal. La inserción del fragmento diseñado en la secuencia de la esporamina incrementaría entre dos y tres veces el contenido de Lys y Met, respectivamente.

La síntesis se llevó a cabo en un ensamblador de nucleótidos (Pharmacia LKB-Gene Assembler Plus) y su posterior purificación fue realizada por HPLC usando columnas de fase reversa.

Expresión de la esporamina en E. coli

Un cultivo de *E. coli* MC 1066 que contiene el plásmido pES se creció a 37 °C y se indujo con 0,4 mM de IPTG. Las células se cosecharon por centrifugación y se resuspendieron en tampón PBS IX. Se realizó ruptura por ultrasonido y se colectó el sobrenadante. Se determinó la concentración de proteínas totales (19). El chequeo de la expresión se realizó por Western blot de acuerdo al protocolo establecido (14), empleando anticuerpos de conejo específicos para esporamina.

Modificación genética de la esporamina

Para insertar el fragmento de ADN sintetizado en el gen de la esporamina, se consideró la presencia de puentes disulfuros, punto isoelectrico, perfiles hidrofóbicos e hidrofílicos y de estructura secundaria, así como evitar variaciones bruscas de la talla molecular; todo esto respecto a la proteína nativa. Para ello se utilizó el programa de cómputo "DNA Strider" (20).

A partir de pES se diseñaron dos estrategias de modificación. Primero pES se digirió Sall, eliminándose un fragmento de 29 pares de bases; luego se trató con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y con fosfatasa alcalina. El fragmento de ADN sintético fue digerido DraI - HincII para su clonación en el sitio creado en pES. El ligamiento se llevó a cabo empleando T4 DNA ligasa. La segunda variante abarcó la digestión BstXI de pES, luego se trató con S1 nucleasa con el propósito de originar extremos romos y con fosfatasa alcalina. El fragmento de ADN sintético también fue digerido DraI - HincII e insertado con el empleo de T4 DNA ligasa. Los clones recombinantes derivados de ambas variantes: pESS1 y pESB2, fueron chequeados por hibridación de colonias con un oligonucleótido que reconoce el fragmento sintético insertado. La orientación del inserto fue corroborada por restricción enzimática. La secuencia nucleotídica de los clones pESS1 y pESB2 fue realizada según se describió anteriormente.

Clonación en vectores pET

Plásmidos de la serie pET (21) fueron purificados según Sambrook, et al. (14) y digeridos NcoI-EcoRI. De pESS1 y pESB2 se extrajo la banda NcoI-EcoRI

que fue clonada en los vectores pET previamente preparados, y se originó pETS1 y pETB2, respectivamente. El chequeo de la clonación se realizó por restricción enzimática.

Expresión de las variantes modificadas de la esporamina en E. coli

Las células de *E. coli* que contienen el plásmido PGP1-2 (22) se transformaron con los plásmidos recombinantes pETS1 y pETB2. Se crecieron a 28 °C durante 3 h, se sometieron a 42 °C por 30 min para inducir la expresión y finalmente a 37 °C por 1,5 h. El precipitado celular obtenido por centrifugación del cultivo fue resuspendido en 10 mL de solución tampón PBS IX y sometido a ruptura por ultrasonido según se describe anteriormente. Se colectó el sobrenadante de ruptura por centrifugación y se determinó la concentración de proteínas totales (19). El chequeo de la expresión fue realizado por Western blot (14) empleando los anticuerpos específicos para esporamina.

Resultados y Discusión

El ADN total, extraído a partir de hojas de boniato, se obtuvo con alto grado de pureza y altos rendimientos, lo que coincide con lo reportado por Varadarajan GS y Prakash CSA (23).

Este ADN se tomó para amplificar, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, el gen de la esporamina A y las regiones regulatorias adyacentes. Se obtuvo un fragmento de 1 182 pares de bases cuya talla coincidió con el rango a esperar.

La utilización de pequeñas cantidades de material vegetal (5 mg) para la extracción del ADN total y la posibilidad de amplificar a partir de él al gen de la esporamina puede permitir hacer pesquisajes a las futuras plantas transgénicas en estadios tempranos de su desarrollo.

Según el análisis de homología realizado entre la secuencia del gen estructural obtenida por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la reportada para un gen de la subfamilia A de las esporaminas (11) (Figura 1), existe un 92,3 % de identidad. En cuanto a la predicción de la composición aminoacídica entre ambas proteínas se muestra un 86,3 % de homología con 30 aminoácidos diferentes. La PCR fue realizada en más de una ocasión y varios clones secuenciados, observándose en todos los casos los mismos cambios de nucleótidos al realizar el alineamiento de las secuencias. Los valores de homologías obtenidos resultan similares a los que se reportan intrasubfamilia y superiores a los existentes entre subfamilias. Por esta razón, el gen aislado debe pertenecer a la subfamilia A de las esporaminas, siendo atribuibles las diferencias a aquellas que existen entre las variedades de boniato.

18. Yang MS, Espinoza NO, Nagpala PG, Dodds JH, White FF, Schnorr KL, Jaynes JM. Expression of a synthetic gene for improved protein quality in transformed potato plants. *Plant Science* 1989;64:99-111.

19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-269.

20. Marck C. "DNA Strider": a "C" program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucl Acid Res* 1988;16:829-836.

21. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. Use of T7 RNA Polymerase to direct the expression of cloned genes. *Methods Enzymology* 1990;185.

22. Tabor S, Richardson CC. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;84:4767-4771.

23. Varadarajan GS, Prakash CS. A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. *Plant Molecular Biology Reporter* 1991;9(1):6-12.

Figura 1. Secuencia nucleotídica del gen estructural para la esporamina A obtenido por PCR. Análisis de homología con respecto a la secuencia reportada. pSpor1: del fragmento obtenido por PCR. PIMO23: de la secuencia reportada. El carácter demostrativo de que dos residuos alineados son idénticos es: '|'

PIMO23	- ATGAAAGCC-TTCACACTCGC--TCTCTTCTTAGCTCTTTCCCTCTATCT	- 47
pSpor1	- ATGAAAGCCCT-CACACTCGCACT-T-TTCTTAGCTCTTTCCCTCTATCT	- 47
PIMO23	- CCTGCC- AATCCAGCCCATTCAGGTTCAATCCCATCGCCTCCCCACC	- 96
pSpor1	- CCT-CCCCAATCCAGCCCATTCAGGTTCAATCCCATCGCCTCCCCACC	- 96
PIMO23	- ACACACGAACCCGCTCCTC-TGAAACTCCAGTACT-CGACATCAACGGC	- 144
pSpor1	- ACACACGAACCCGCTCCTC-GAAACTCCAGTACTA-GACATCAACGGC	- 144
PIMO23	- GACGAGTCCGCGCCGGGAACTACTACATGGTCT-CCGCATAT-GG	- 192
pSpor1	- GACGAGTCCGCGCCGGGAACTACTACATGGTCTAC-GCCATATTGG	- 193
PIMO23	- GGAGCC-GGCGGGGAGGGCT-AAGACTCGCCCACTTGGACAC--GATGT	- 238
pSpor1	- G-AGCCTG-CGGGGGAGGGCTGA-GACTCGCCCACTTGGG--CTTGATG-	- 237
PIMO23	- CCAA-A--TGCGCCAGCGACGTCATCGTATCCCCAACGACTTAGACAAC	- 285
pSpor1	- --AACAAATTGCGCCAGCGACGTCATCGTATCCCCAACGACTTAGACAAC	- 285
PIMO23	- GGGCACC-CCATCACCATCAGCCGGCGACGG-CCGACCCGGAA-TCCAC	- 332
pSpor1	- GGGCACCCTC-ATCACCATCAGCCGGCGACGGTC-GACCCGGAAG-CCAC	- 332
PIMO23	- CGTGGTCATG-GCGTCGAC-CTACCAGACTTCCGGTTCAACATCGC-CA	- 379
pSpor1	- CGTGGTCATGA-CGTCGACG-TACCAGACTTCCGGTTCAACATCGCG-A	- 379
PIMO23	- --CCAA-CAAACGTGTGCGTGA-ACAACG-TGAACTGG-GGAATCCAG-CA	- 422
pSpor1	- TG--AAG-AAACTGTGCGT-ACACAA-GATGAACTGGCG-AATCCAGT-A	- 422
PIMO23	- CGACAGCGCGTCCGGGCGAGT-ATTT--CCTGAAAGCCGGCGAGTTTGT-G	- 468
pSpor1	- CGACAGCGCGTCCGGGCGAGT-ATTT--TGAAAGCCGGCGAGTTTGTGTC-	- 468
PIMO23	- TCCGA-TAATAGCAACCAGTTCAAGATTGAGGTTGTG-ATGCCAACCTT	- 516
pSpor1	- TCCGAC-AATAGCAACCAGTTCAAGATTGAGGTTGT-GGATGCCAACCTT	- 516
PIMO23	- AACTTCTACAACTCACTTACTGTC-AGTTCGGCTCCGACAAATGCTACA	- 565
pSpor1	- AACTTCTACAACTCACTTACTGTC-GTTCGGCTCCGACAAATGCTACA	- 565
PIMO23	- ACGTCGGCAGATTC--CAGACCCCATGTTGAGGACCACGCGTTTGGCTC	- 613
pSpor1	- ACGTCGGCAGATTC--A-GACCCCATGTTGAGGACCACGCGTTTGGCTC	- 613
PIMO23	- TCT--CCAATTC-TC--CCTTCG-T--TTTTGT-CATCAAACCTACCGA	- 653
pSpor1	- TCTGGC--AT-CATCAA--T--GATGGTT--GTG-ATCAAACCTACCG-	- 652
PIMO23	- T-GTG -657	
pSpor1	- TTGTG -657	

A partir del plásmido pSpor1 se amplificó por PCR un fragmento de 864 pares de bases correspondiente al gen estructural de la esporamina y las secuencias codificantes para los péptidos señal y transitorio, así como la región regulatoria 3'. Tanto la secuencia reportada como la obtenida de pSpor1 sirvieron de base para el diseño de los oligonucleótidos cebadores. Los clones recombinantes pES mostraron, con diferentes endonucleasas, el patrón de restricción esperado.

En el Western blot para detectar la expresión en *E. coli* de la esporamina, la proteína procedente de tubérculos utilizada como control positivo migró a una talla de alrededor de 4 KDa superior a la esperada según las predicciones para la proteína madura (Tabla 1). Este comportamiento, atribuido a la adopción de conformaciones que retardan ligera-

mente la migración en gel por la presencia de puentes disulfuros y determinadas condiciones de desnaturalización, ha sido reportado para esta proteína (7, 8). La expresión en *E. coli* de pES dio lugar a una proteína de alrededor de 28 KDa (unos 4 KDa por encima de la esporamina natural). La diferencia en talla entre ambas puede deberse a la presencia de 114 nucleótidos en la secuencia 5' del gen; éstos codifican 38 aminoácidos responsables de la localización subcelular de la proteína en células de plantas que no son procesados en *E. coli*. De estos resultados puede inferirse que la diferencia de alrededor de 8 KDa superior que se muestra en la expresión de pES en el Western blot en relación con la predicción de talla para la proteína madura, aproximadamente la mitad se atribuye a regiones no procesadas y la otra, a un retardo en la migración

Tabla 1. Propiedades moleculares y composición aminoacídica de la esporamina A y de las variantes genéticas obtenidas. a) pES, b) pESS1, c) pESB2.

Predicciones	pES	pESS1	pESB2
Peso molecular (Da) de la proteína no procesada	24364,12	33307,10	33979,89
Peso molecular (Da) de la proteína madura	20550,52	29493,50	30166,29
Punto isoelectrico de la proteína no procesada	8,44	8,4	8,13
a.a. cargados (RKHYCDE)	26,24	29,05	28,49
a.a. ácidos (DE)	7,09	9,78	9,86
a.a. básicos (KR)	9,22	11,45	10,96
a.a. polares (NQCSTY)	32,27	27,09	27,12
a.a. hidrofóbicos (AILFWV)	36,52	34,92	35,07
Lys	4,96	7,26	7,12
Met	2,13	4,19	4,38
Trp	0,35	1,12	1,10

electroforética debido a razones conformacionales, de manera similar a como ocurre con la proteína natural proveniente de tubérculos.

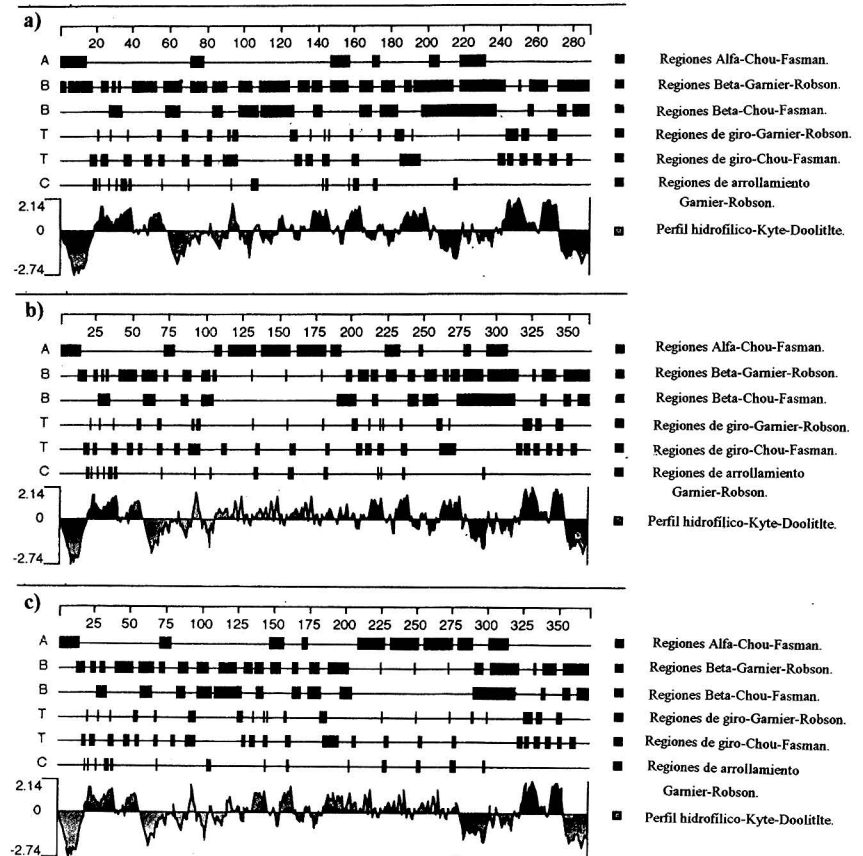
Las estrategias para la inclusión del fragmento nucleotídico sintético en el gen de la esporamina se basaron fundamentalmente en las predicciones de estructura secundaria, de perfil hidrofílico y otras características, tanto de la proteína nativa como de las variantes quiméricas (Figura 2). Las principales diferencias radican en un ligero incremento del contenido de hélices alfa, acompañado de una ligera disminución en el contenido de regiones beta en las variantes modificadas en relación con la secuencia de la proteína natural. Comparativamente entre las variantes modificadas no existen diferencias sustanciales en lo que concierne a los parámetros contemplados en la predicción, aunque existen diferencias en los sitios seleccionados para la inserción. Para la variante pESS1, la diferencia en estructura secundaria antes mencionada es más notable en la región entre los aminoácidos 100 y 200, mientras que en pESB2 se encuentra hacia la región comprendida entre los aminoácidos 200 y 285, aproximadamente. El perfil hidrofílico muestra un comportamiento similar entre la proteína codificada por el gen estructural y las variantes derivadas de ella. En estas últimas se puede observar un desplazamiento del patrón mostrado precisamente a partir de los aminoácidos codificados por el fragmento de ADN sintético insertado.

La diferencia en talla de aproximadamente unos 10 KDa más (Tabla 1) que poseen las variantes genéticas en relación con la esporamina natural, es un aspecto que se tuvo en cuenta desde el diseño de las estrategias de modificación contemplando la inclusión de un fragmento de ADN en la secuencia del gen estructural para la proteína. En cuanto a la composición aminoacídica, pueden esperarse incrementos muy notables en el contenido de Lys, Met y

Trp en las variantes en relación con la esporamina natural, mientras permanece casi invariable la proporción de los restantes aminoácidos. Este análisis permite suponer que las variantes pESS1 y pESB2 dan lugar a proteínas de mayor calidad nutricional teniendo en cuenta la composición de aminoácidos esenciales.

Los resultados de la secuenciación de los clones pESS1 y pESB2 coincidieron con los patrones espe-

Figura 2. Predicción de estructura secundaria y perfil hidrofílico para la esporamina A y las variantes genéticas obtenidas. a) pES, b) pESS1, c) pESB2.



rados. Es decir, el fragmento oligonucleotídico sintético para el caso de pESS1 quedó incluido en la región mediana del gen estructural sin alterar el marco de lectura. De igual modo sucedió con el pESB2, pero insertado próximo a la región 3' del gen.

Con los plásmidos recombinantes pETS1 y pETB2, portadores de las variantes químéricas de la esporamina, se transformaron cepas de *E. coli* y se detectó su expresión por Western blot (Figura 3). Las líneas 3 y 4 muestran las bandas correspondientes a las variantes pETS1 y pETB2, las cuales se observan a una talla aproximada de 37 KDa. De forma similar a lo descrito para la expresión de pES, al compararlas con los valores que aparecen en la Tabla 1, éstas migran, unos 4 KDa por encima de lo previsto, para la proteína no procesada y unos 8 KDa más en relación con la predicción de talla para la proteína madura.

Dada esta similitud de comportamiento en electroforesis pudiera inferirse que en las variantes, a pesar de la inserción del fragmento sintético, la proteína química ha conservado su capacidad de formar puentes disulfuros en este sistema bacteriano. En la línea 1, la esporamina natural purificada de tubérculos de boniato, presenta dos bandas muy próximas que inmunorreaccionan con el anticuerpo policlonal utilizado. Este comportamiento ha sido

reportado (6) cuando no se utilizan condiciones extremas de desnaturalización.

Los atributos que muestran las construcciones obtenidas, en especial su secuencia y expresión en *E. coli*, permiten predecir su posible utilización en estrategias para el incremento de la calidad nutricional del boniato, así como de otros cultivos cuyas limitaciones estén originadas por deficiencias en el contenido de los aminoácidos Lys, Met y Trp.

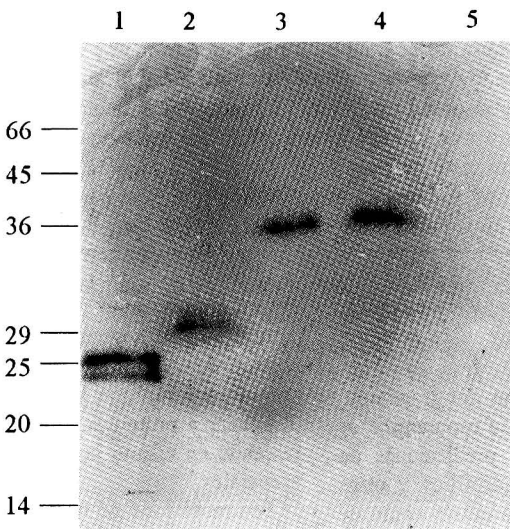


Figura 3. Western blot de la expresión de las variantes genéticas modificadas de la esporamina. Línea 1: 50 µg de esporamina purificada de tubérculos de boniato. Línea 2: 20 µg de proteínas totales de *E. coli* transformada con pES. Línea 3: 20 µg de proteínas totales de *E. coli* transformada con pETS1. Línea 4: 20 µg de proteínas totales de *E. coli* transformada con pETB2. Línea 5: 20 µg de proteínas totales de *E. coli* transformada con pET sin inserto. Los valores correspondientes a la composición de aminoácidos expresan la frecuencia de aparición con respecto al total.

Recibido en octubre 1995. Aprobado en septiembre 1996.

SAMIG

Sistema de Archivo Multimodal de Imágenes Médicas

Los sistemas **SAMIG** consisten en una red de estaciones de trabajo autónomas, con diferentes niveles de prestaciones que permiten su conexión directa a los equipos generadores de imágenes radiológicas: TAC, RMI, US, ASD, MN, etc.

SAMIG posee tres prestaciones fundamentales:

- Base de Datos para el almacenamiento y manipulación de los pacientes y estudios radiológicos.
- Técnicas avanzadas del Procesamiento Digital de Imágenes que brindan una alta calidad diagnóstica.
- Posibilidades de comunicación: directamente con los equipos generadores de imágenes, entre estaciones de trabajo conectadas a la red **SAMIG** dentro de la institución y/o estaciones de trabajo externas a la misma.

La adquisición de los estudios puede realizarse mediante la conexión directa a equipos generadores de imágenes digitales o realizando la digitalización con el uso de frame grabbers conectados a centrales de TV o cámaras CCD. Además existe la posibilidad de captar imágenes de scanners de alta resolución.

Las estaciones de trabajo pueden almacenar múltiples imágenes médicas sobre discos ópticos de alta capacidad con fines docentes e investigativos. El Procesamiento Digital de Imágenes permite resaltar detalles que no son visibles a simple vista o que se aprecian con dificultad.

SAMIG permite la transmisión de estudios entre estaciones de trabajo ubicadas en diferentes instituciones hospitalarias mediante el empleo de modems y líneas telefónicas.



eicisoft

Centro de Robótica y Software

Calle 24 #408 Vedado, C. Habana, Cuba. Telf. (537) 30-9913, 30-9916; Fax (537) 33-3181; email: eicisoft@ceniai.cu