

# Estudio de la transición nucleohistona-nucleoprotamina "in vivo" e "in vitro". Clonación, secuenciación y expresión del gen de la protamina galina.

Rafael Oliva Virgili

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

ESTUDIO DE LA TRANSICION NUCLEOHISTONA-NUCLEOPROTAMINA  
IN VIVO E IN VITRO. CLONAJE, SECUENCIACION Y EXPRESION  
DEL GEN DE LA PROTAMINA GALINA.

R. OLIVA

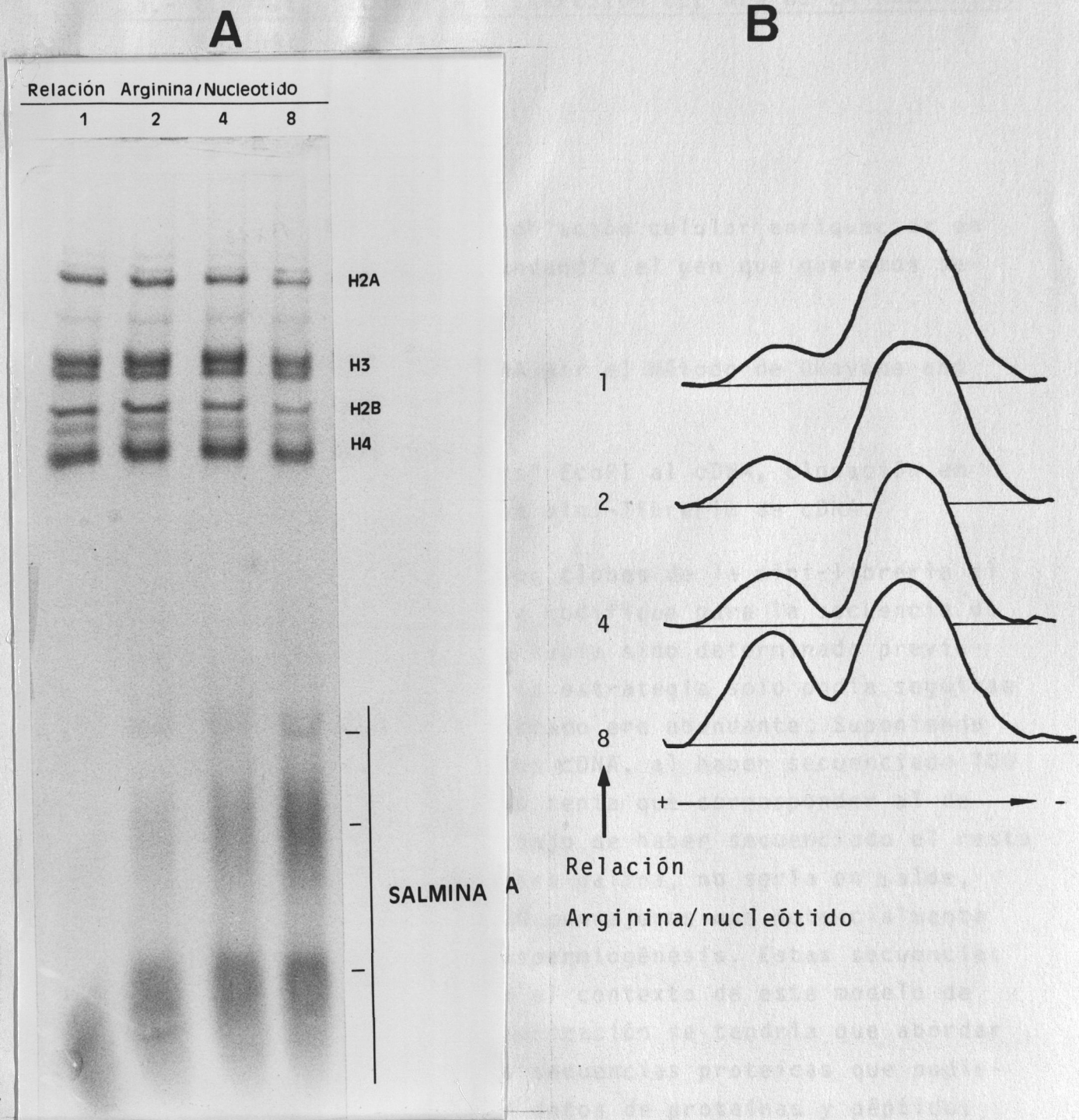


Fig 82.

Unión de la protamina salmina al ADN.

La metodología está descrita en fig 81. El componente minoritario que acompaña a la protamina salmina comercial (Salmine "Free base" de la Sigma) (ver fig 64 y 65) presenta una mayor afinidad hacia el ADN que el componente mayoritario. (fig "A" y "B"). Fig "A": electroforesis en gel de PA-tritón-urea del material unido al ADN a la relación arginina/nucleótido indicada. Fig "B": scan de la zona de la protamina salmina del gel "A".

### 3.3.- CLONAJE, SECUENCIA Y EXPRESION DEL GEN DE LA PROTAMINA GALINA:

#### 3.3.1.- Estrategia seguida:

1º) Obtención de una población celular enriquecida en células que expresen en abundancia el gen que queremos secuenciar (pag. 114).

2º) Preparación de cDNA por el método de Okayama and Berg (1982) (pag. 121-122)

3º) Adición de "linkers" EcoRI al cDNA, clonación en M13mp9 y construcción de una mini-librería de cDNA.

4º) Secuenciación de los clones de la mini-librería al azar hasta encontrar uno que codifique para la secuencia de la protamina galina (que ya había sido determinada previamente a nivel proteico). Esta estrategia solo podía seguirse si se asumía que el cDNA buscado era abundante. Suponiendo que representara el 1% de los cDNA, al haber secuenciado 100 clones, estadísticamente uno tenía que corresponder al de la protamina galina. El trabajo de haber secuenciado el resto de clones que no son protamina galina, no sería en balde, por corresponder éstos a ARN mensajeros que potencialmente se expresarían durante la espermiogénesis. Estas secuencias serían pues interesantes en el contexto de este modelo de diferenciación. y su caracterización se tendría que abordar inicialmente comparando las secuencias proteicas que pudieran codificar con bancos de datos de proteínas y péptidos de secuencia conocida.

5º) Una vez encontrada una pequeña secuencia que codificaba para el extremo C-terminal de la protamina galina, se reparó en que no sería posible secuenciar el gen completo utilizando el método enzimático de Sanger. Esto sería debido a que el gen completo se replegaría sobre sí mismo debido a su riqueza en "CG". Se completaría pues la secuencia del gen de la protamina galina mediante el método de Maxam and Gilbert.

6º) Estudio de la expresión del gen de la protamina galina a lo largo de la espermatogénesis.

### 3.3.2.- Aislamiento del ARN y selección del poly A<sup>+</sup> mRNA:

#### 3.3.2.1.- Preparación de suspensiones celulares enriquecidas en espermátidas alargadas y redondas:

La centrifugación a pocas "xg" de una suspensión de células testiculares de gallo, dió lugar a un sobrenadante enriquecido en espermátidas alargadas y redondas (pag 114)(fig 83). La población de espermátidas alargadas y redondas, en donde potencialmente se expresaría el gen de la protamina galina, suponía en esta población enriquecida el 85% de las células (fig 83).

#### 3.3.2.2.- Aislamiento del ARN:

La población enriquecida en espermátidas alargadas y redondas se utilizó para la preparación de ARN. Se utilizó para ello el método del tiocianato de guanidina (Chirgwin, 1979), excelente para evitar los fenómenos de degradación por parte de las RNAasas.

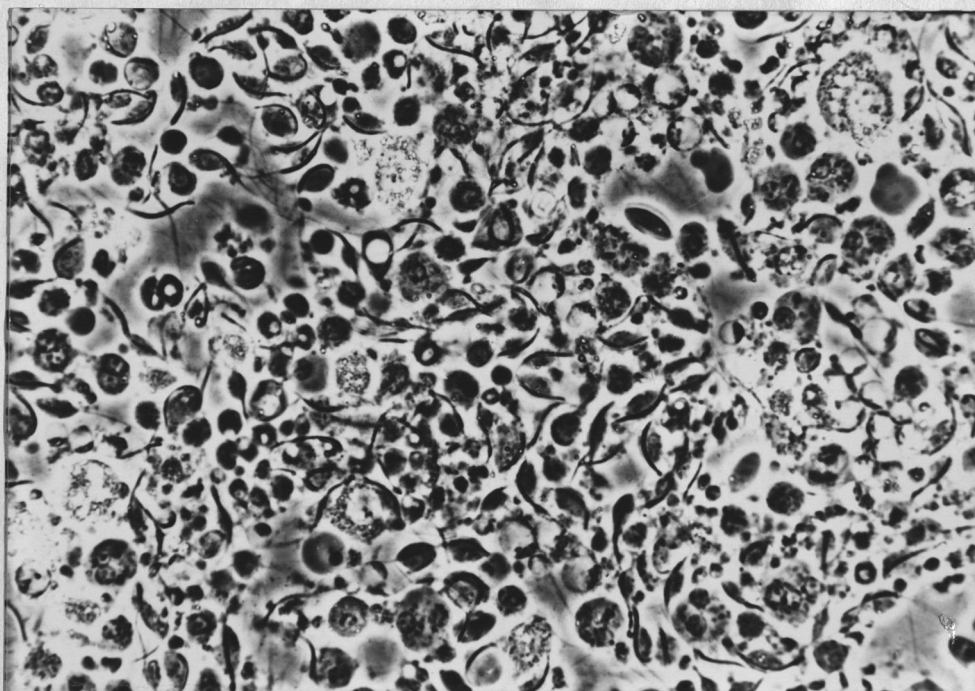
El espectro ultravioleta del pellet obtenido por este procedimiento, mostró corresponder al típico para un ácido nucleico, indicando que no existía contaminación proteica (fib 84-A).

El análisis del ácido nucleico aislado, mediante electroforesis en gel de Formaldehido-agarosa 2%, mostró los ARN ribosómicos 28s y 18s intactos y un "smear" de ARN (fig 84). Sobrecargando los geles podía observarse una pequeña cantidad de ADN contaminante que no interfirió en las etapas de selección del poly A<sup>+</sup> mRNA.

#### 3.3.2.3.- Selección del poly A<sup>+</sup> mRNA:

El poly A<sup>+</sup> mRNA fué seleccionado por cromatografía en oligo dT-celulosa (pag 116-117) (fig 85).

La determinación del tamaño de la primera cadena de cDNA indicó que el ARN mensajero aislado por este procedimiento se hallaba íntegro y poseía un tamaño adecuado para proceder a su clonación (fig 86).

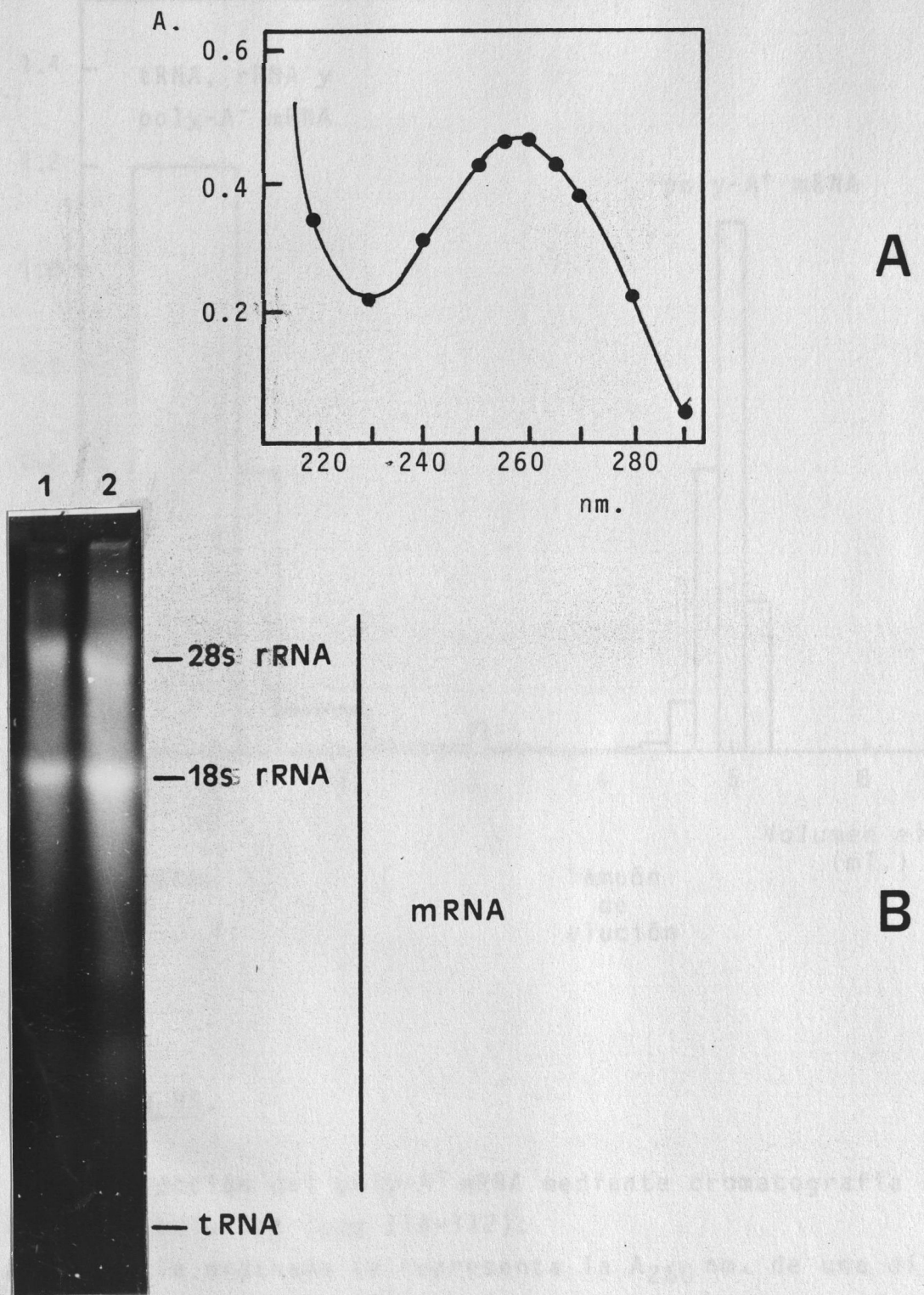


ESPERMATIDAS ALARGADAS	52%	
ESPERMATIDAS REDONDAS	33%	85%
OTRAS CELULAS (multinucleadas, meioticas y premeioticas, de sertoli y hematies)	15%	15%

Fig 83.

Composición de la fracción de células enriquecida en espermátidas alargadas y redondas utilizada para la preparación del polyA<sup>+</sup> mRNA.

La suspensión de células obtenida por este procedimiento (pag 114) está constituida en un 85% (aproximadamente) de espermátidas alargadas y redondas. El tiempo total desde la obtención del tejido hasta la suspensión de células es de 60. min. Fotografía obtenida con un microscopio de contraste de fase Zeiss ST-143.



**Fig 84.**

Obtención del ARN.

A.- Espectro de la disolución de ARN obtenida (pag 114-116).

B.- Electroforesis en gel de Formaldehido-agarosa 2% del ARN aislado. 1: 5.4 ug y 2: 10.8 ug.

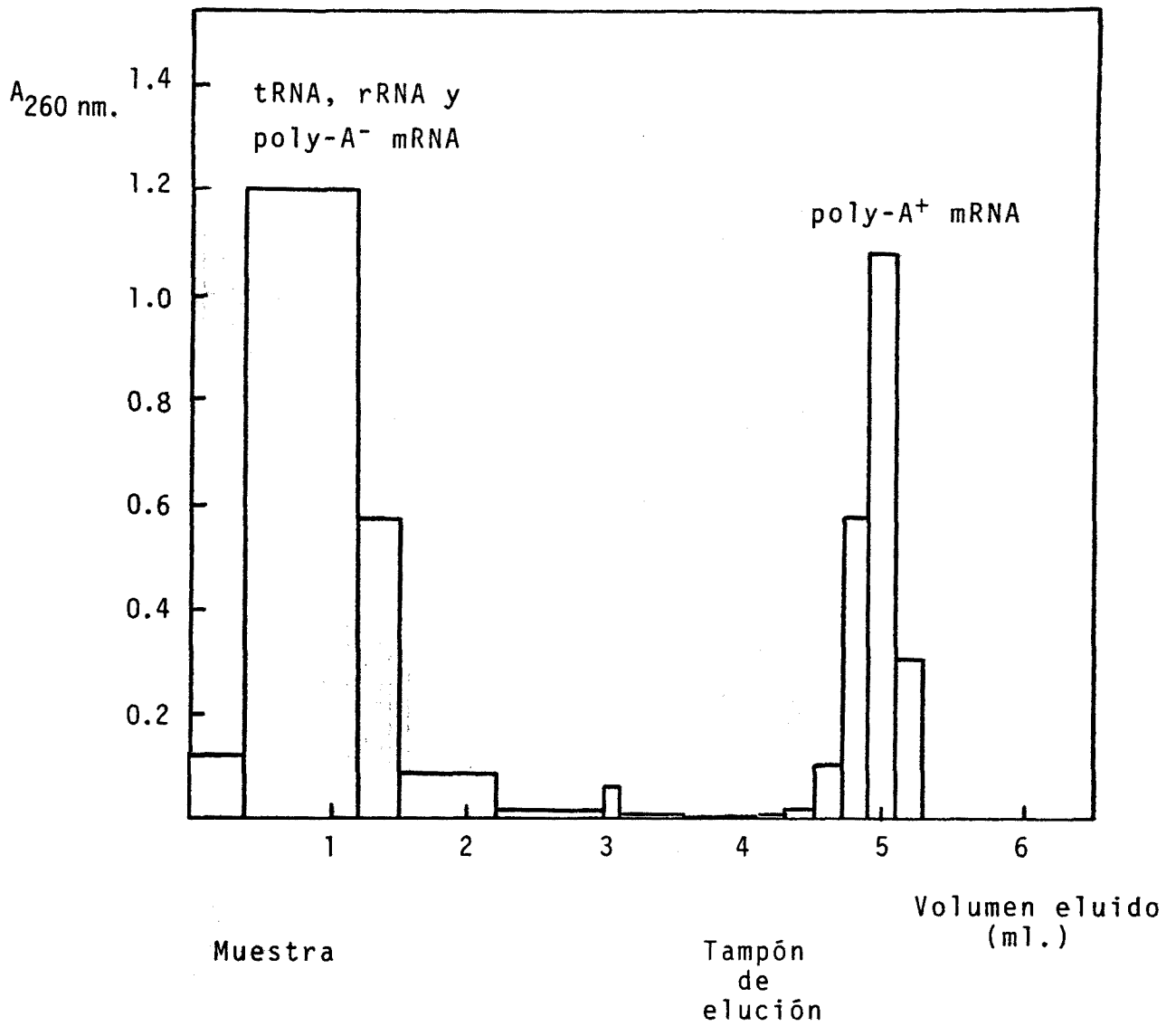


Fig 85.

Selección del poly-A<sup>+</sup> mRNA mediante cromatografía en oligo-dT celulosa (pag 116-117).

En la ordenada se representa la A<sub>260 nm.</sub> de una dilución 1/10 del material eluido por la columna.

El poly-A<sup>+</sup> mRNA eluido poseía un tamaño adecuado y estaba íntegro, según se desprende de la medición del tamaño del cDNA (ver fig 86) y de su utilización en los "Northern blots" (pag 249-252).



### 3.3.3.- Síntesis del cDNA, adición de "linkers" y clonaje en M13:

#### 3.3.3.1.- Síntesis del cDNA:

Alicuotas del cDNA preparado por el método de Okayama and Berg (198 ) (pag 121-122) fueron analizadas en geles desnaturizantes para DNA de agarosa 1.5% y autorradiografía, indicando que la síntesis de las 1ª y 2ª cadenas de cDNA había sido correcta y de un tamaño adecuado (Fig 86).

#### 3.3.3.2.- Adición de "linkers" EcoRI al cDNA:

El resultado de la ligación de "linkers" EcoRI al cDNA se analizó mediante electroforesis en gel de 1% agarosa-TAE y autorradiografía. La fig 87 indica que el cDNA con los extremos reparados y los sitios de restricción para EcoRI metilados, posee un tamaño adecuado, y que este tamaño experimental el pequeño incremento esperado de tamaño tras la adición de los "linkers".

#### 3.3.3.3.- Separación de los linkers libres del CDNA+ linkers, resultado de la digestión del cDNA con un exceso de linkers (punto anterior). Selección del tamaño de cDNA que interesa:

Para la separación del cDNA+linkers de los linkers libres, se han utilizado dos métodos independientes: Electroforesis en gel de 1% agarosa de baja temperatura de fusión seguida de extracción fenólica de la zona del gel que interesa, y mediante cromatografía en Sepharosa 4B (pag 124). Ambos métodos dieron buenos resultados.

En fig 88 se muestra el perfil de la separación de los linker libres mezclados con el CDNA+linkers mediante cromatografía en Sepharosa 4B. Alicuotas de las fracciones eluidas de la columna fueron analizadas mediante electroforesis en gel de 1% agarosa-TAE y autorradiografía. Los resultados indicaron que hasta cierto punto, este método de cromatografía sirve para seleccionar un tamaño de cDNA más adecuado para encontrar el gen a buscar.

## cDNA

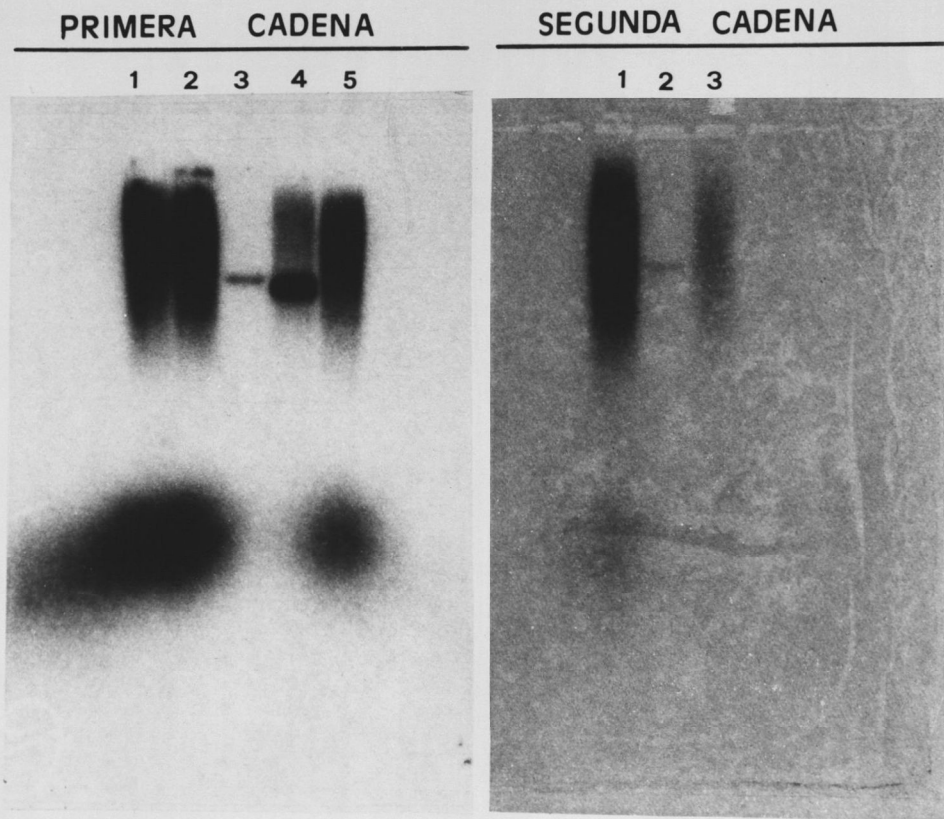


Fig 86.

Control del tamaño del cDNA, 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> cadenas.

Las 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> cadenas de cDNA (pag 121-122) se analizaron mediante geles desnaturalizantes alcalinos para DNA de agarosa 1.5% (pag 142-143) y autorradiografía.

1<sup>a</sup> cadena de cDNA: pozos 1, 2 y 5, pozo 3: Marcador de 660 bases. Pozo 4: Marcador del cDNA de la  $\beta$ -globina de pollo.  
2<sup>a</sup> cadena de cDNA: pozos 1 y 3, pozo 2: marcador de 660 bases.  
La manchas de mayor movilidad electroforética corresponden al <sup>32</sup>p- -CTP no incorporado al cDNA.



Fig 87.

Adición de linkers EcoRI al cDNA (pag 123).

Nº1: Marcador de tamaño  $\lambda$ -HindIII. Nº2: cDNA con los extremos reparados y sin linkers. Nº3: cDNA después de la adición de los linkers y previa digestión con EcoRI.

El DNA se analizó en geles de 1% agarosa-TAE (pag 142) y autorradiografía.

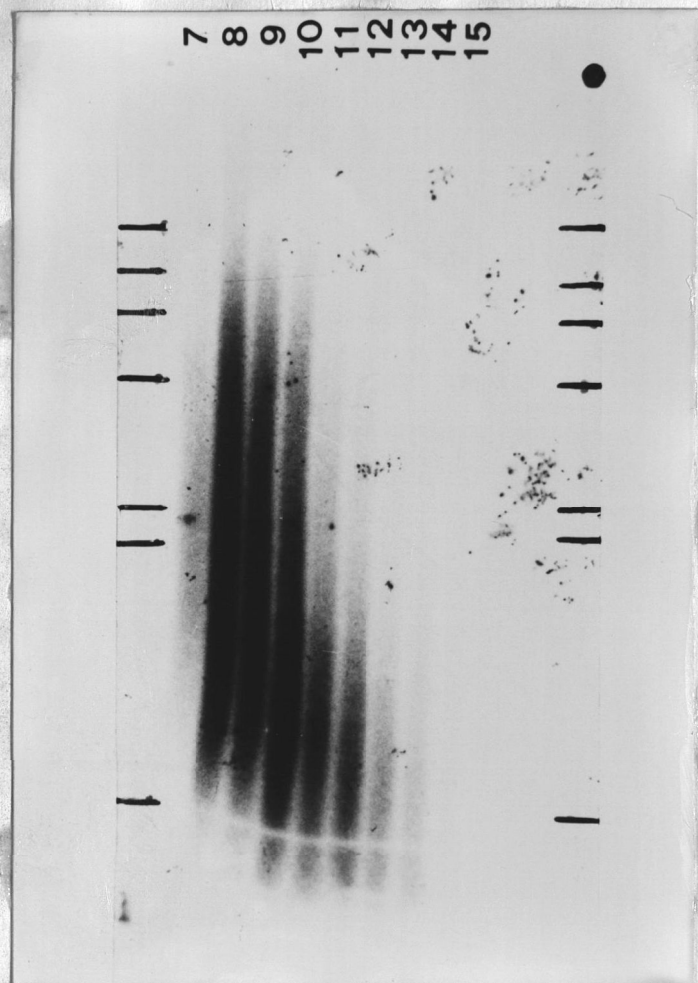
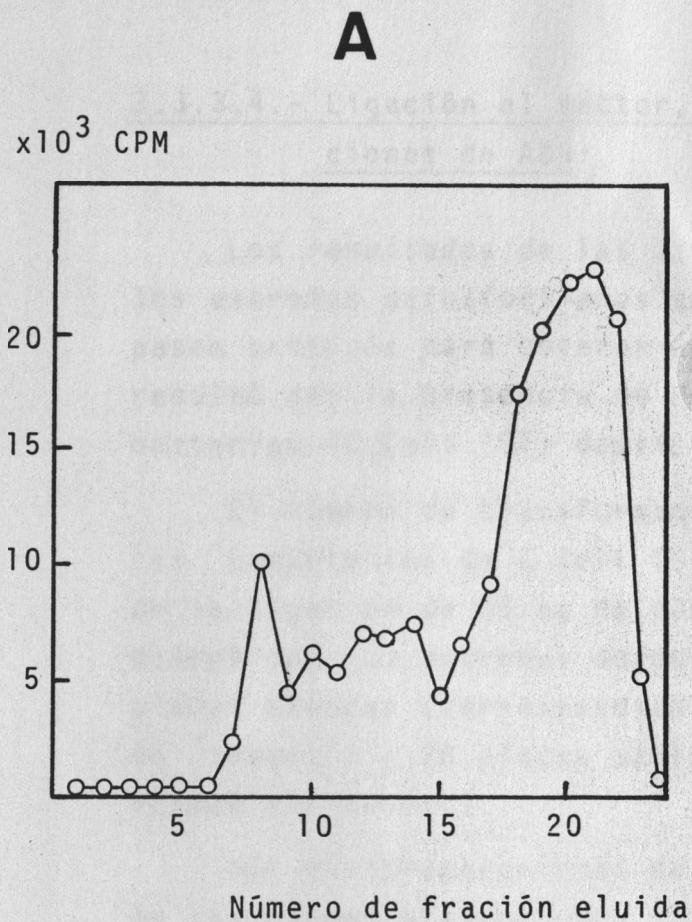


Fig 88.

Separación de los linkers libres del cDNA conteniendo linkers, producto de la digestión con EcoRI del cDNA+linkers (fig 87, pozo N°3), mediante cromatografía en Sepharosa 4B (pag 124).

A.- Radioactividad del material eluido de la columna de Sepharosa 4B. Se recogieron fracciones de 2 gotas en tubos ependorf y la radioactividad de cada fracción se determinó con un contador de centelleo. Las fracciones eluidas entre la 7 y la 15, corresponden a cDNA conteniendo linkers. A partir de la fracción N°16, se eluyó el colorante (azul de bromofenol), la radioactividad no incorporada al cDNA y los linkers libres.

B.- Alícuotas del material eluido de "A" fueron analizadas mediante electroforesis en gel de 1% agarosa-TAE (pag 142) y autorradiografía. Los números de la foto "B", corresponden al número de fracción eluida, y las rallas laterales indican la posición de los marcadores de tamaño  $\lambda$ -HindIII.

#### 3.3.3.4.- Ligación al vector, transfecciones y minipreparaciones de ADN:

Los resultados de las ligaciones del insert a M13mp9 con los extremos defosforilados se muestra en fig 89. Uno de los pasos críticos para obtener un buen número de transformantes resultó ser la presencia de  $Mg^{++}$  durante el crecimiento de las bacterias (E.Coli TG1) destinadas a ser células competentes.

El número de transformantes obtenidos transfecando células competentes de E.Coli TG1 (pag 125-126) con el resultado de la ligación de 35 ng de cDNA+linkers a 20 ng de vector M13mp9 con los extremos defosforilados, fue una media de 185 placas blancas (correspondientes a clones de M13mp9 conteniendo "insert") y 28 placas azules (correspondientes a clones de M13mp9 sin insert).

431 minipreparaciones de ADN fueron realizadas a partir de las clones blancos (pag 127) antes de 24 horas de iniciada la siembra. Esta rapidez es debida a que el vector M13mp9 conteniendo "insert" es inestable si está dentro de la bacteria, mutando en "insert" y con frecuencia perdiéndolo. Una vez aislado el ADN (M13mp9+insert) es perfectamente estable durante años si se guarda congelado ( $-20^{\circ}C$ ) en Tris 10mM pH 8.0, EDTA 0.1 mM.

La cantidad de ADN obtenida de una sola placa por este procedimiento (pag 127), es de unos 5 ug. Este ADN puede ser utilizado directamente para transfectar células competentes, existiendo de esta forma la posibilidad de obtener tanta cantidad de ADN como se quiera (0.5 ng de ADN dan lugar a unas 100 placas blancas). El ADN obtenido en todas estas minipreparaciones es de cadena simple. Alícuotas de las minipreparaciones de ADN fueron distribuidas ordenadamente sobre filtros de nylon, permitiendo la posibilidad de hacer "screenings" con los clones aislados (fig 91 y 92).

En total fueron secuenciados 114 clones (la mayoría de ellos al azar) de las 431 minipreparaciones de ADN, obteniendo 3 secuencias correspondientes a pequeños fragmentos del extremo C-terminal codificante y región 3' no codificante del gen de la protamina galina conteniendo la señal de poliadenilación (pag 230-234).

Ligación y transfección Nº	Fragmento a insertar		ng de vector M13mp9 defosforilado	colonias		Clon Nº
	Procedencia	ng teóricos		A	B	
1	Zona del cDNA con un tamaño de 400-1000 bp separado mediante electroforesis (pag 124)	7	20	12	2	1
2	La misma que el Nº1	12	20	19	12	13-17
3	cDNA+linkers de las fracciones 10-13 obtenidas por cromatografía (pag 124)	21	20	0	12	23-24
4	cDNA+linkers de las fracciones 7-9 obtenidas por cromatografía (pag 124)	21	20	2	2	-
5	-	-	20	5	4	-
6	La misma que el Nº3	35	20	11	210	35-205
7	1 ul del DNA de la minipreparación del clon Nº59 100x diluido		-	0	114	206-215
8	La misma que el Nº4	35	20	45	160	217-325

Fig 89.

Tabla resumen de los resultados de las ligaciones y las transfecciones realizadas. "A" indica placas azules y "B" indica placas blancas. Las células competentes utilizadas en las ligaciones 1-5, se prepararon en ausencia de Mg<sup>++</sup>.

### 3.3.4.- Secuencias obtenidas:

r13  
TTGAACCATTTATAAGTTAAAAAGGCATCAGCTCCCTACGG

r24  
CCCGBCTGCCGCTCCGCCAAATAAACGCCBTGGCACCGBG

r35  
TTGGTGGAAATGGCTGCTTTAACCTAAGAGAAGCAGTCTCCACTAAAGTCAGAC  
CCAGCATGAAGCCCCATTGAAGAGTAACTTCTTACCTACATCAGTTTCTAGCATGTTGAATGATCTGGATGCACCTCATC  
AAATCATGGCTGTTGTTGATCTCTTTCCGACAGCAGTCCCACAG

r 37  
AAAGCCCTCAAAATCTGCAACACTTCAGGCATACAAGAACTTCATGCAGATGCGTTATGCAGATGAGTTGTCCTCTGC  
TGTGTTGGTCCCAGTAAGTAAATTAATTAAGTAACTTCTATTAAACTACAGG

r 38  
ATCTGAATGTTTCTGAGTGTGCATGGGTGCCGCTGATCATTGTTCTGAGTGTGCTGCAGGTTATACACAACAGCCATGC  
TCTGGTGTGGTGTGGATGGGCAACG

r40  
GACGGGCTGCCGGTCCGGGTATAAGCGGACCTCTCTCTCCGCCCCCGAGCGAAGTCTCCCTCCGCCCCCG  
CCCGCGCTCCCCACCCCTTCTCCGGCCGCGGAGAAGGGCATGGAGTTCGCGGGAGCCTATAAAAGCCCTGACA  
GCCGCCGAGGCCAAGGCCGTTGCGATAGCGAGGAGCCGGCCGCGCA

r41  
ACCTCACTGTGATGATGTTAAGACTGGCATTATTCCTTTACAAACCACCTGTGAAACAACCTGGACTTACTA  
ATTTTGCCATAAAAACCCATACATTAGCTAAAATATGTAAGCCCTTTGTTGTTAATACATGCAAAATTAATAAGT  
ACTGTTGACTACTGAAAAAAAAAA

r 42  
AAGTGTCCTGCTCTTCCAGAAAGTGATCCAAGTCCAATAGGTTTGTGTGACAAAGCCCTTCTATATACGAGAGTGTAGC  
GAACTTAGGGTGAACCCATGTTATTATCTCTTTCTTCTGGTGGAGCTGGTGTCAAGACACTTT

r43  
CATGGAGACAACGAGAAATGGCTGTATCGACCACCTGTCAGATGTGAAGAACTGGAGGCATTGGAATTGTCCC  
CTTCTGCTGACGAATCGACATCATGCTGAGTGAAGTGCAGCCAGCT

r44  
TTTTTATCAATTGAAATGTGAGTGTGAGTTGAGTTGGAATATGATCTATGTBAAAGTCCCTACCTACTTAAAAAG  
ATCAGGAAGATCTGCCACAGAAATGCTGTAGGAAATCAGTCTAAGTTGCTGCTAGCAAGCTGGGGATGAGGT  
AA

r 45  
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTTCCAAGAGTTTTTATTTCTATGAACACTGTTATATTACGCTATGTTATTGATTC  
TGGGTTTTCTCAATTCAGACTCTTCTATTCTGCTGTTTTTTCATTTTCAGTTCACAACTTTTATGGTGCATCATGTTCA  
CTTCTCTCCTCTTTT

r 46  
TTTTTTTTTTTTTGTTTTAATTTCTATTTTGTGTGTTTTTTCATTTGCTTTTTTGGTGTGTTTTTTTTTTTT  
TTTTTCAGGTGGTTTTTCGTAGTTTTTTCGGGGTAGTTTTTGGTAGTTTTTCTGTGGGGCCTCTGTGCACTT  
GTTTTTTTTTTTTTGTGGGTTTTT

r47  
TTTTTTTTTTTTTTTGCCTCAGAGCCGCGTCCCGTGGAGCTTACTGCTGCCAGACAACCCGCGTGGCCATA  
GAGCCGGACGGGTCGAACCCACAGGGACCCCGAGGCGCCTCACABAACGAGCAACCCAGCCGCCCG  
1

r 49  
ATTAAGGAAAAGCAAAAAGGTGGTTAGAATGACCAACCAGAGAGTAGTTCTGGTGTTCGGAGTTCAGTCTGGAACACCT  
TTGTTCCAGCCATTATTTTGGACCAAGACTGAAAGTGTGGTCATA

r 50  
GGAGGTGAACCCGAGAAAGTGGGGACAGCTGTGGGCAGCAGABAGATCAGCATCTGATGGCACTGTGGSAAGGGACCAC  
GTCGTCCCCGGCCGGTCTGCTGCTTGAATTTGAGTCTCAGCTGCGGTGTAGGGAGCACCAGCAATAAAGGGGACTGTGG  
CGATCGTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

r 51  
ATGTCATGGACAGGTCCTTTTCTCACACCTGCACTAAATGGGTGTTCTCTGGTCCACATGCAAAACAGAAAGGGAAGCGC  
TGTGCCACACGGCCCTAACACTGGTACTGCTAATCTTCTTACTGTCTCCATAGACTAGAGAGCTCTGGTTCATGGTACC  
AAGTTGGCTGAACAGCTACATCTAAG

r 52  
TTTTTCATTTTCAGAAAGCTTTTACTAAATACCAAGAAAGAGAGSTTGGACTCATAAAACCTGGTGCAGAAAGGCATGGCTGTT  
CTTAAAGGCCAGTACTACAATGTTTTCGTGGTCATTTTGCAGGAGCTGTGCCCACTTTTGTACCATTTAGC

r 53  
ATGTGTAAGTACCCTGGGTCTTGAAACACAGAAACATGTGCTGGAGAAGCTTAGTTCAGTTA6CTGAGCAGCTTCCTT  
TTCATTGCTGAAGTCAACC

r 54  
AAAGCAGACCAAAAGAACTCCCAGGCAGGGCAGGGCGACAGTACCCGCTGAAATTCAGGACC66CCATTGGGGGCAATA  
ACTTGAATTTGAAGTGGTAACGATTCGTAAATTGCTGCAAAACAAATGCAGTATTATTACATGATCAGCTGTGAGGAA  
GCCAACACTGCTGCTTCCACCCGGTGGGAATAACCTTTATTTAAA

r 57  
ATCAGCAGTTTCAAAATAGAACCCTCTGGTTGAGAATACCACAGAAATCATTTTTAAGACCACAAAACAGGGCACCTACAT  
CAGGCAGTTGCTTTGTATTTTGTATTTCTCA

r 58  
TTCACAGCAGGAGCGCGGAGCCACGGCTCGCACAGGACCCGCTCCTCTGGCCAAGGGAGAAGTGAT  
TTGAGTGTGAAACCTCGCTTCTACCGGAGACTGGGAGCAGAAGA

r 59  
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCGTTGCCACGGCGTTTATTGGCGGGG6CAGGTGGGGGGCCGGGGGTGC  
GGCGGGGCTCAGTABC6GCGCGCGGCTCAGTAGCGGGCGCGCGCGGGCGGGGA

r 60  
AGAGTTCGCCACGATGCCCGCCGCGCACCCGCAATAAAACCCGCCGCGCTACCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AAA

r 61  
ATAAAATGTCAGATTACCTGCTTTAAATAGTCGTGTTTTGAATTCCTACACTGGCCTATTATATACTAATGCTCTTAA  
TGCACACTCTGTGGACATTTAAGCTTTGAT

r 62  
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGCTTTGGAACACAGTTAATTGTTAATGGAGTTGAAAAAGATAGCAACACAGCA  
CCAGAATGAAAGGCGATGAACAGCTCTAGATGGCAGATGTGAAAGAACAGC

r 63  
CTGGCATTAGCTGCCCACTCAAGTTGTACAAAGCAGACCAAA6CCTTCCTTTACTCAATTGGTGGCATAACTACAGATAT  
CTCTGCATCAGTGTCTCTGGCGGGCCGGTTGGGCTTCCATCCTTAGACAGCTTGACTATCAGACCCTGCAAGTGGGAGCA  
CAGCCTCTACTTCAGTCTTAGAAAACCTCTGACCGACTGAATCGATCGCAGAGATTAACCTTGAAGGGAAAAAAAAAA

r 64  
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAACCGTTTCAGCTTGTATTATGTTTCAAGTCCCTTTAAAGGCAATAGA  
GTTTAAAGATCTTGTCAACAGGAAGGGTGGGGTGGGACAGGGAGAACGGCAGACCTTTTATTAAACCTTTAAAGAG  
TTCTAACTCACATTGCAAGTGAACAACAAGAGCCATAAAGC

r 65  
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCAGGAAGCCCTTTATTAAGTCAAAGTATGAAAGGAGAAACTACTGCTATTTCATCAG  
GCTTCTCTTCTGAGTGGTTCATATTGAGCCAGTTTGGTTTTTCAAGTTTTTATTCTCTTCCAACACAGCTTCATATTTT  
CCTTCAGCTCTGCTACTTCCAGCGAAGTGCCTCCATTTCTGGACTCTCAGGAGCTGAAGCTCCAGGTGATGCTTCG

r 66  
ATGAATTCAGCAATCGAATGGAAGTACTGCGGAGTTTTTATGTGCAATATGCAGACTATGCTCCAGAGACAAACC  
CATTACCATCCTCTTGC6CAACTAAGGCATGTTATTCTCAGTGAA

r 68  
AGAAGACAGCTGTGATAGAACATGCTTCGGCATCTGCAACTTAGTTCAGCAGTCAATTTATTGATGATGATCCTGACAGAG  
AAAAAA

r 69  
TTTTTGAAGAGATGAAACAGAAATCAGTTTTAATCTTACATTCCAAGAGGATATATGAAAGTATGTCATCTAGCAACTCTATAC  
CTCTTAAAGAGAGATGAACACAGAAATCACAGATAGAAAA

r 70  
TCTGAGCTGCCTAGCACTGCAAGAGATACCTCCAATGATGTTATATCAGATATATAGTCGTTTTATTAGTCAAGGTTAGC  
TCAG

r 71  
TTTGATATAGAAATTTTATTGCAATACCTGTATTCTAAACGTACAGATGCAATGACCCATTACAGACTTTAAGACCTGGC  
CACATAGAGAAGTGAAGAGCTCATTCTGTATTACAGCCAAAGTTGGTAGGACTT-AAAGTGCAGGAAAGCTTCTCCAG  
TCTCTCCAAGAAAACAGGATTCACATATTTTGGTCCAAGATGATGTTAAGTTGGAGCTG



r 72  
TCAGAAAAGTAATTGCAGCTGAACCGGCCAAGAAATTGCAATAGGGTGTCCAACCTAAATAGAAGCCCTGTAGGTGTAGAC  
AAATGGAACCCACACCAATCTCCAGGCC

r74  
TTTAAC TGACAAAATTAAGT GACACTTTGGT GCTATTTAACCAACCACTTTTAAGAGGAACAATACCAC  
CTGCGTTTTCTTTTTACCAATAAACTTTTAAATTATGGCTGTATAAAAAA

r75  
AAAAAACCCAGTAACTACTGTATCTGTAAAGATTACACTGGCTTTCTCTGGTAGTTTCTGTTCAGGGA  
AAGCTTAAGTTAGCAAGACTGAGCAGAGTATGTGTGTTTTGGTACTCACTTAACAGCACAGAACA  
AGGTGGAGTAATTAATC

r95  
TTTTAAATATTTCTTGTAAAGTAGAGGCTTAGBAGBAGBACGAAGACGGTAGGCTTGGATTTATTGCTACTGCCATTTCT  
AGGATGGTTAGTAGGAATAGGATGAGTGCCG

r208  
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCGGTTGCCACGGCGGTTTATTGGCGGGGGCAGGTTGGGGGGCCGGGGGTGC  
GGCGGGGCTCAGTAGCGGCGGGCGGGCGGCTCAGTAGCGGCGGGCGGCGGGGGA

r210  
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCGGTTGCCACGGCGGTTTATTGGCGGGGGCAGGTTGGGGGGCCGGGGGTGC  
GGCGGGGCTCAGTAGCGGCGGGCGGGCGGCTCAGTAGCGGCGGGCGGCGGGGGA

r217  
TGCAGTGGGAGCAGTACCAGGGTGGTGTGGGATGGCTGGTGTGCTGAAAACCTTGCTTTAAGATGAGAAGCTGTGAG  
CCGGCTCAGTGTGCGACAATGGAGCCTCCAGACAATGTCTGAACTGCCTCAAGACTTTGCTTGAGGGTGTGAGCAGAG  
CTGTCAATAAACAGAAAACAGAAAGACATTGCTCCCTTTTAGCTTCTATTTCCAAGAGTTCACTGACTTCCAAAAAGAG  
AATCCAAATTTGAT  
TTTAACAGAAAGTGGTTGAAAATTTGATTTCAAGCAGGAGTCCAGAGAAAGGA

r218  
CCTCGCACGCAGCGTTCCCTTAAGGCGGCCGACGCCCCCAGTCTTGCAGGATATGTGCGTATCCCCGTGAAGAGGC  
AGAAGATGGAGTGGGCTGGAGCAGCTGAAGCACCACACCGGTGGTGGCCGACCCGGGATTTCAACGCAATCGATG  
AGTACAAAACCCCTGGATGCCACCACGAACCCATCTCTGATCC TGCCGCCBCTCAGATGCCTGCATACLAGAAACTTGTG  
GATGATGCGGTTG

r219  
CAGCAACGGAGGAGAAATCTCAGACTAAGAGGCCAGCAGTCAAGCAGCTGTGTGTTAAGTAGTGATGATGAGA  
TGAACAAGAGATAATGATGTGTATGTAAACAGATAAAGTGTCTCGAGAGCTGGGACTGGAGGATGAACTGC  
AATCGCAAAGCCTTCTGGTACTGTTAGCTGTCCAATTTGTATGGATGGTTACTCGGA

r220  
TGACGTGAAGTTGTTTTGCTGTTTGAACAAAAGAGGACTGGTCACTCTTTAAGCACTTCTTGAGCATATCTTACAAGG  
CCACTATTTTCCG

r221  
TTTTTTATTCACATCACCATATTGTTTTGCCAAAGTCTAGGCTTCTTAAAAGAGCCAGGAAGCAAGACCCAAAAGCTAC  
ACCCGAACTGCACCTAAGGGCACTGTGGTCAGGAGCACCAGCCAGCTACACTGCTCATATCTGCTGTGTCTACTTTTGC  
CAAACGAGTTTCCCTA

r222  
GGGCCGGGGTTTTGCTGTTTTGAGAAAACACAGTTGAAGGGGGGAAAAATAAATTTATTTTTGAAAAGTGAATAAC  
CCTATACCTTCCAACCTGAAGTCAGAAAGCGAAAAGGCGACTAAAATATTACGAGAATTTACAGAAAATACTTCCAGAAA  
TGGACCTGATAAAATCATACCTCCCATGTGATAGCTAAAGCCAAAGGCCCTTGACGTTTTGTCTGTTTCAAGCTGGATT  
TTTGG

r 223  
TGCTTCCGGAAGCGGTGTGCCGCGCGCGGGTGTGCTTCCGTTCTGCTG666AGGCTGTACGGGACAGCCCGCCCGG  
TCTCGCCCTCGCCCCGTTCGATCGGCCGAGCGTGGGGGCGGGCGCCAGGGCTTCCCGTCTGCGCCCCGCCCCGGCC  
GCCCCAGTGGTCTCGCGGGAGCCAGTCAAGGTTTTATTTAGCTGTGAATTT

r225  
TTACATTACATCTAGBCAAAGATGTAAGTGTGAATCTAATTTAATTAGCTTAATACTTTCCACTAAAATATGTGTTTC  
TGCTATCTGTAATCTGAATGCTGTGCTGGCTGAATCTGTAACACAGCTACAGAGAGAGTAGGGATTGCCATTCAC  
AGGC

r226  
GATTTCTGTGCTGCCTTCAAAGCAGCAGGGTGTACACAGTTTTTGTCAAAGCCAGTAGAAGTGGATAAAACCTTTTCAGT  
TGACAGGACTAGGCTTTGAGACAAACCACTATCTCT

r227  
GGAGAATCAACCAGGAGGCTGCCAGAAAGCCACTGCGCTTTTCTTCACTGAAGGAACGCGGTGGGAACGGACTGGCCG  
TACCACCAAGCCAAAAGCTGACGCGACGTGGCTTCCCAAAGAGCGGCTTGACAGAAAGCTGGGGAACGACAGAG  
CTTGAGAAAGCCCAAGGAGAGGTGGACGCAAGGT

r250  
TTTTTTTTTTTTTTTTTAAGGTAGAAAGATTCACTTTAAACCAGGCAGAAAGTGGCACGGAACCGCTCTGCTAGGGAG  
CACGCCATACCATGGTGGCGGCTTGGGCCAGCCGCTCTGTGGGATGTGGGAGTGGGGATGGAGACAAACTGGCAT  
GGCTGTATGGCTGCAGGAGCAGAGGGCACAGAGAGCCCCAGCCCCGGGACAGGAGCAGGACAGGGCACAGCTCTGCTGC  
TGAGGGGCTCCAGC  
TCCTA

r 252  
TTTTTTTTTTTTTAAGGATGCTGGCAACCAATTTATTTGTTTTAGTTAGTCGATGCCCTTACTGTTCTCTCTCAAAT  
AGGAGGCCCCAGACCAAGGAGACTATTGGCCTGGGCTCTGTTCAAGTCTCTGCTAGCT

r254  
CAGAGGCAAAACAGGAGATAGCAAAGAGGAAAGGCGAAAGAACTTTTCTGAAAGCAGTGGAAAGAGGCAAAATGGGG  
CCCTTTATGAAGCCATCAAGTTTTATCGCCCTAGCCATGACGCTTGTCCCTGACATTGAGTTAAGATCGCCATACACGG  
TCCCCAGATGGTGATGGAGTTGGAAAGCGGTGCATTGAGGACAATGAAGAGGATGGCAAAATGGCTGATCTCTGTGAGA  
TTCCAGCCAACAG  
TTAAGTTTTACAGGAATCTTCTGTCAACTTTGTGAGCCTGAGCTT

r256  
AAAGAAGAGATGCTTTCTGTGGTGTGGTAAATCCCATCCTCTTGBATTTTCATCTTCTGTAAAGCCAGCATAGGCAAA  
TAAATCAAGTCTTCTCTCCAGCTTCTCTTTGTGAGAATGAGCAGTGTCTGGCAGATGGCTGTCTAT

r261  
CCGCCGCCGGTATGGGAGCCGCCGCCGCCGCCGCTACTGAGCCGCCGCCGCCGCCGCTACTGAGCCGCCGCCGCCACCC  
CCCAGTGCCTCCGCAATAAAACCGCCGTGGCAACCGGGAAAAA

r281  
TTTTTTTTTGTGGATGCAAGAAGCTTTATTGGAATGAACATGTGCAGAGGAAGCTTTTCTTGGAAAGCAAGTCATCTTCAG  
TTACCACCCCTGAGGCGCACACCAGGTGCAGGGTGGACTCCTTCTGGATGTTGTAGTCAGACAGGGTGCCTCATCTTCC  
AGCTGTGCCAGCAAGA

r283  
GTGCAATCCCAAGGATGAAGAAGAAAAGTCAGAAGAAGAGGAGCTGGAATTTCTCCACTGTCCATGCCAAGCAGCCTG  
TATCACTCTAGCACAGGGCAATTCATTGCTATAACTCCAGGTGGTACAATCCAGATTTCTAGTCCACCTTCTGATGGTGC  
CCAGGGACTGCAGACGTTAACAAATGACAAATTCAGGAAGTCTCCTCAGCCGGGTGCTACCATTGTGCAATACACAGCAGT  
CATCTGATGGTACA  
CAGCAGTTTTTGTCTCGAAGCCA

r284  
TCTGAAATGGTGAAGTCCCAAGGATTTCTGTAGGAGATGTGAAGATCGTGAGCTGAAGTGAATGCTGGTG  
GGAAACTCCTGAGGATTTTGCATTTTTCTTTTTCCCTTTGAAGGAATTTATGTTTGAAGAAGTTGATA  
ACCATTAGCGACGCTTTTGAATAAAGTAACAAAAA

r285  
ATAGCTGTTTCTGTGTGAAATGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAAGCATAAAGTGTAAAGCCT  
GGGGTGCCTAATGAGCGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTGGGAAGCCTGTCTGTG  
CAGCT

r295  
AGATGGAACCAAGGTGAGGGTTCTAGCAGAGAAGATGGGCAGGTATTAGAGCAATCCACCCTGGAAGTGAACAATCT  
CCATCTTCCAGGTGACTTAATGAAGCCGAAGTCCAGGTGATATTTGTGGCGCTTGTAGAGCATATTTCTTGT

r298  
GTCTGTGATTATACGTGTTTTCAGTAGAAACCTAAACCAGAAAGGACAGCTCATCTGATGAACCATTCCAGC  
CCTCTTCTTTACGGCTTCTTAAACTTTCATGTGTGCTAGAAGTGGCTTTGAGGGGACAGAGGACCTT  
TCAGTTAATGCTAATGTGGTGCCTTTGGTACATCAGTGTGTTGTCACCAAGCAGAGTCATTTTGCAGT  
TATTTTTAAGCTAGAAGAAGAGTCTTCCAGACAATAGAGAT

r299  
TAGTATTTGGACTTCGTTTACCAGACTGAGCGTGGCGTG

r315  
GGACTGCAGAACTTTGCTCCTGAACCCAGGAAAGAAAGGATGGATCBAAGAGGGCAGGCTGAGCAGCAGCTGTCCATCTG  
TATGATCACGCCTGGAATTTACAAGTCTCCTGAGATGCCACATCAGTGGGACTTCTCAGCAGCGATGCTGGGAAGAGGA  
AAACTGCCACTGCTGCAGAAAGAACACTTGTGCAGTGGGGTGCAGAAAGCTCAGCCCGTGGGTGAGTCTGGGTGAGCTGCT  
CAAAGGCTAGTCA  
TTGTTAATGAATAGA

r316  
AGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGTGGTTTGGCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGTGATGGTGGTCCGAAATCGGCAAAAT  
CCCTTATAAATCAAAGAAATAGCCCCAGATAGGGTTGAGTGTGTGCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAAAGC  
TGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCAACAAATCAGTTTTTGG  
GGGTCG

r320  
TAGCTCCTCGCCAAAAGCCTCCGTGAAAGCAGCCCCAGCTGACAGCTCCAGCAGTGAACAGCAGTACTCTGACACAGACG  
TCGAGCAGGTGTCTGCAAAACCAAGCAGAAAGCAAACCCCTCCGGACGAGGACGCCACGGGAGCATCCAAAAAGAG  
AAGGGGGCAGGAAAAATTGATG

r322  
TTCTTGGAGGTGGCTGACTGGACAGACAAAGCAGCTAGTCACTCTGGAAGATCTATCAGTGGTGTCTGGAGTTCTG  
CATCATTAACAATGATGAAGTGAATGTAATTGGATGATGTTGTAGCBAAGCCAGGAACCGGGAAGAACAGAACTCTGG  
TGGCTTATCCTCAGATGGAAAAATTTT

r323  
TATTTTCCCTTTTCAAGTCAAACTACTTTATCATGTAGCTATACAGATTAGACAGCTAAGGAACAGACAAATGAAGCAA  
ACTGCCAGAGATTTCAACAACAGCAAGGCTAAGAACTGGATGTCTGCTCCACTATCCTCTCCATGTACGCGCT  
TCACTTTTGGGAAGTCTGAGTGCATTTTACTCATCTCTGGCGCATTTCACTAATTGATG

r324  
AGCAAGCTTGCSTAACTCATGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATGTTTACCCTCACAAATCCACACAA  
ACATACGAGCCGGAAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGC  
CGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTGGGAAGCCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACG  
GCAGGGGGAGAGGAGGTTTGCSTATTGGGCGCTCTCCGTTCTCT

De los 114 clones secuenciados, 3 correspondieron a pequeños fragmentos del extremo C-terminal codificante y región 3' no codificante del gen de la protamina galina conteniendo la señal de poliadenilación (fig 93), 21 eran ilegibles, 18 corresponden a Poly A<sup>+</sup> mRNA todavía no identificados y el resto a "inserts" del cDNA cuya secuencia todavía no se ha identificado.

La secuencia obtenida correspondiente al extremo 3' del cDNA del gen de la protamina galina (clon N°59) es la siguiente:

```

          143          133          123          113          103
GASCCGCCGCCGCCGCCGCTACTGAGCCGCCGCCGCCGCCGC
                               SerArgArgArgArgArg
SerArgArgArgArgArgArgTyrEnd

```

```

          93          83          73          63          53          43
TACTGAGCCGCCGCCGACCCCCACGTGCCCCCGCCAATAAAACCGCCGTGGCAACCGGG
TyrEnd

```

```

          33          23          13          3
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

### 3.3.5.- Búsqueda de otros clones del gen de la protamina galina:

#### 3.3.5.1.-Resultado de la hibridación de los 431 clones con una sonda preparada a partir del clon N°59:

El ADN de cadena sencilla del clon N°59 fué utilizado para preparar una sonda que fuese complementaria a los clones que contuvieran secuencias del gen de la protamina galina correspondientes a la cadena "sin sentido". El resultado fué la obtención de 2 clones (fig 91), cuya secuencia resultó ser efectivamente complementaria a la secuencia del clon N°59. Estos dos clones seguían teniendo un tamaño reducido y no aportaron información nueva. No obstante fueron utilizados para preparar una sonda que fuese complementaria a los clones que contuvieran secuencias del gen de la protamina galina correspondientes a la cadena "con sentido" (entre los que debería hallarse el clon N°59).

#### 3.3.5.2.- Resultado de la hibridación de los 431 clones con una sonda preparada a partir del clon N°24:

El ADN de cadena sencilla del clon N°24 fué utilizado para preparar una sonda que fuese complementaria a los clones que contuviesen secuencias del gen de la protamina galina correspondientes a la cadena "sin sentido". El resultado de la hibridación, fue la obtención de varios clones claramente positivos (fig 92). Los clones 206-215 son un replatado del clon N° 59. Los clones N° 426-431 son un replatado del clon N° 282. Efectivamente el clon N° 59 y los clones 206-215 mostraron hibridación. El resto de clones resultaron ser ilegibles, excepto tres: dos de ellos (N°38 y N° 47) mostraron pequeñas secuencias ricas en "C" y "G", y el otro (N° 261), aunque difícil de leer mostró corresponder al extremo 3' del gen de la protamina galina siendo algo más largo que el clon N° 59 (fig 93 y 94).

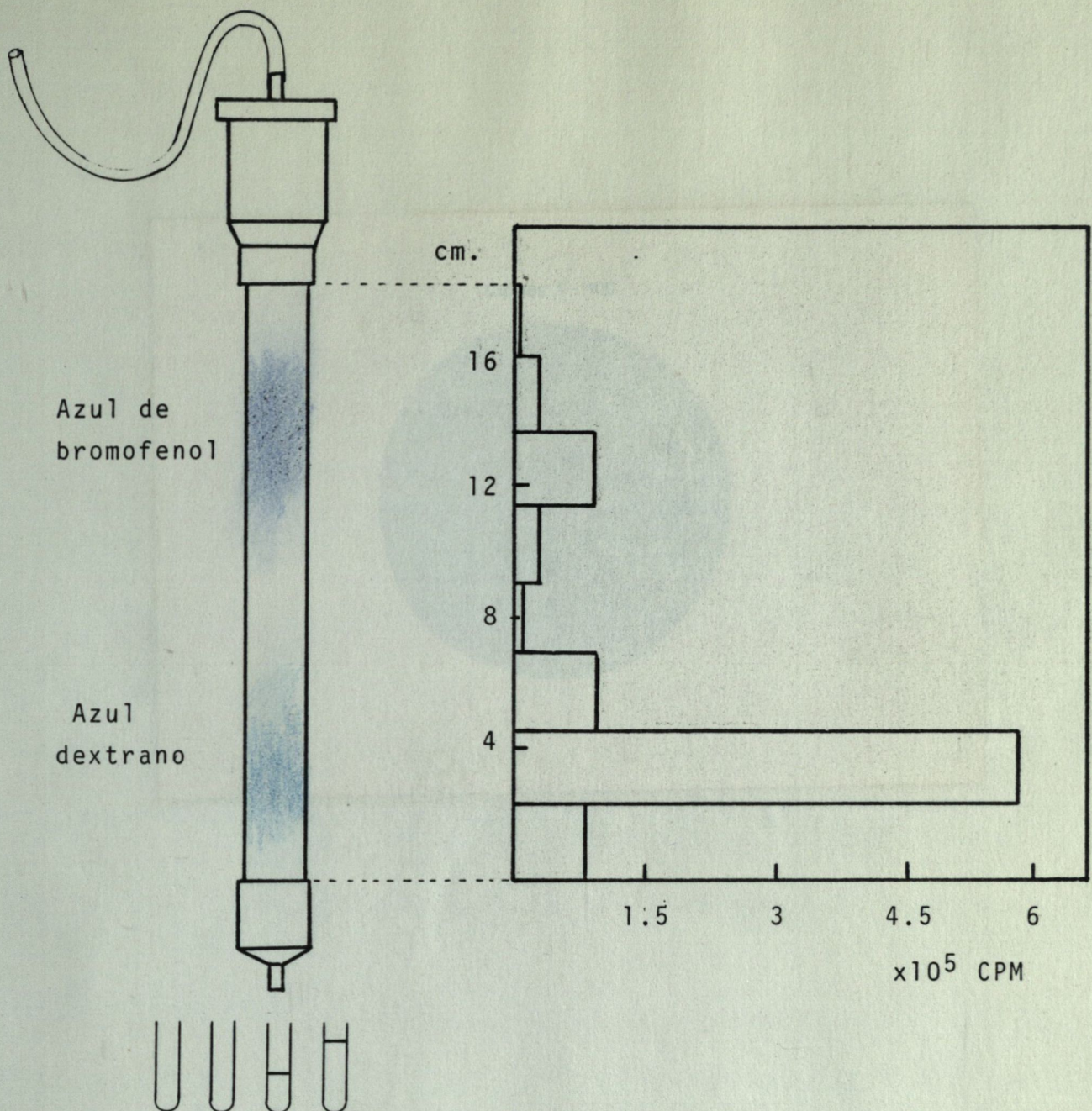


Fig 90.

Preparación de las sondas para las hibridaciones. Sondas preparadas según pag 129-130 fueron purificadas del isótopo libre no incorporado mediante cromatografía en Sepharosa G75. La ordenada de la gráfica indica la altura de la columna, y las abcisas la radioactividad medida con un contador Geiger. La radioactividad no incorporada a la sonda migra junto con el azul de bromofenol, y la sonda migra y resulta eluida junto con el azul dextrano. Las diferencias entre la radioactividad libre y la radioactividad de la sonda indican que la incorporación de <sup>32</sup>P-CTP a la sonda ha sido buena.

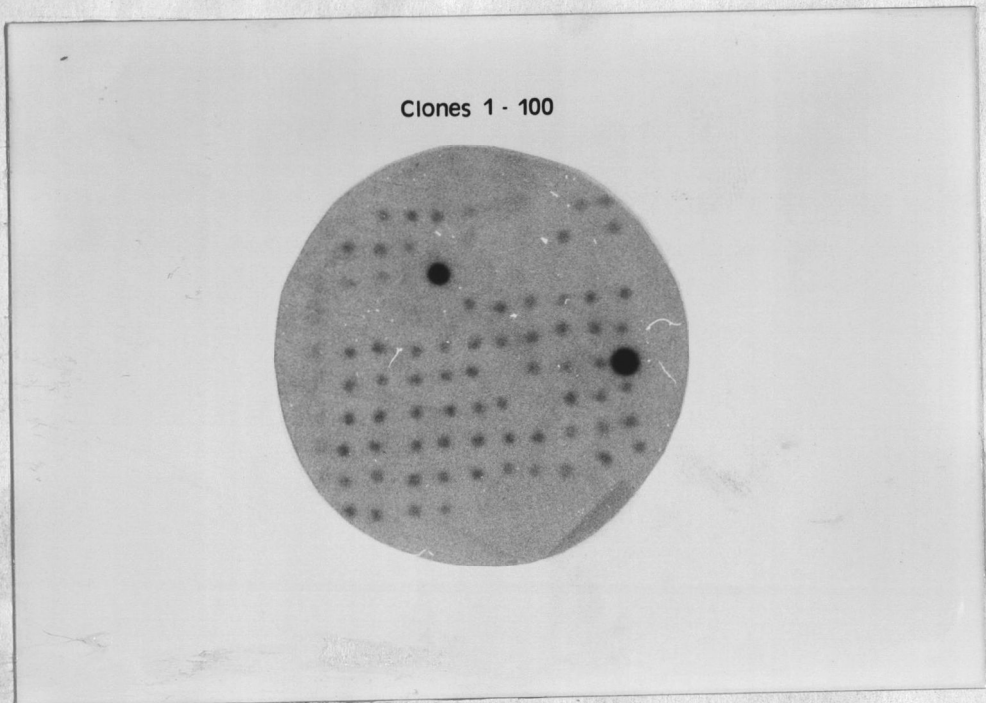


Fig 91.

Resultado de la hibridación de los clones 1-100 de la mini-librería de cDNA con una sonda complementaria a la cadena "con sentido" del cDNA del clon N° 59. La sonda se preparó según está descrito en pag 128-129 (sonda tipo "1").

Se detectaron dos clones positivos (N° 24 y N° 60). Tras ser secuenciados, ambos clones mostraron secuencias complementarias a la del clon N° 59. Las secuencias de los clones N° 24 y N° 60 son de pequeño tamaño (ver pag 93 ).