



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE YUCATAN

FACULTAD DE QUIMICA

**"ESTUDIO DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA
FOSFOLIPASA C EN RAICES TRANSFORMADAS
DE *Catharanthus roseus* LINEA J1"**

T E S I S

PRESENTADA POR:

Lucila Aurelia Sánchez Cach

**EN SU EXAMEN PROFESIONAL
EN OPCION AL TITULO DE**

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO



MERIDA, YUCATAN, MEXICO.

1 9 9 6

INDICE

	Página
RESUMEN	
INTRODUCCION	1
CAPITULO I	3
ANTECEDENTES	3
I.1. Señales de transducción	3
I.2. Fosfolipasa C	4
I.3. Estudios moleculares de PLC en plantas	8
I.4. PLC de <i>C. roseus</i>	9
I.5. <i>Catharanthus roseus</i>	10
CAPITULO II	12
JUSTIFICACION	12
HIPOTESIS	13
OBJETIVO	14
DISEÑO EXPERIMENTAL	15
CAPITULO III	16
MATERIALES Y METODOS	16
III.1. MATERIAL BIOLOGICO Y MANTENIMIENTO	16
III.1.1. Raíces	16
III.1.2. Plásmido que contiene la PLC de <i>A. thaliana</i>	16
III.1.3. Biblioteca de ADNc de <i>C. roseus</i>	17
III.1.4. Células de <i>E. coli</i> DH5 α	18
III.1.5. Células de <i>E. coli</i> LE-392	19
III.2. METODOLOGIA	20
III.2.1. Preparación de células competentes	20

III.2.2. Transformación de células competentes con el plásmido que contiene el ADNc de <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
III.2.3. Extracción del plásmido	21
III.2.4. Digestión del plásmido	21
III.2.5. Mapa enzimático del plásmido que contiene el ADNc de <i>AtPLC</i>	22
III.2.6. Obtención y purificación de la sonda de PLC	22
III.2.7. Marcaje de la sonda por método no radiactivo	23
III.2.8. Extracción de ADN genómico de <i>C. roseus</i>	23
III.2.9. Cuantificación de ADN genómico	24
III.2.10. Hibridación ADN-ADN (Southern-Blot)	25
III.2.11. Título de la biblioteca de ADNc de <i>C. roseus</i>	27
III.2.12. Búsqueda del ADNc de PLC en la biblioteca de <i>C. roseus</i> (Screening)	28
III.2.13. Transferencia de puntos (Dot-Blot)	29
III.2.14. Técnica para revelar películas de Autoradiografía	29
III.2.15. Técnica para revelar negativos de películas	29
III.2.16. Técnica para imprimir en papel	30
CAPITULO IV	32
RESULTADOS Y DISCUSION	32
IV. 1. Transformación de células competentes y caracterización del plásmido	32
IV. 2. Obtención y purificación de la sonda	33
IV. 3. Hibridación ADN-ADN	35
IV. 4. Búsqueda del ADNc de PLC de <i>C. roseus</i> en una biblioteca de ADNc	36
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	43
BIBLIOGRAFIA	44

RESUMEN

La comunicación intercelular se realiza a través de receptores de membrana que activan diversos mecanismos y producen una respuesta en el interior de las mismas debida a la generación de segundos mensajeros. Uno de estos mecanismos es el de la Fosfolipasa C la cual hidroliza al fosfatidilinositol 4,5 bifosfato para producir a los segundos mensajeros 1,2 diacilglicerol e inositol 1,4,5 trifosfato, los cuales activan a la proteína cinasa C y liberan calcio de almacenes intracelulares respectivamente.

Los estudios realizados en la actualidad acerca de esta enzima reportan la clonación e identificación de los genes que codifican para la misma en células animales, microorganismos, levaduras y en células vegetales. En este trabajo se presentan los avances logrados en el estudio del gen que codifica para la Fosfolipasa C en raíces transformadas de *Catharanthus roseus*.