

ÍNDICE

RESUMEN	xii
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES

1.1 Origen y distribución del cafeto.....	3
1.2 Importancia económica del cafeto	4
1.3 Taxonomía y botánica.....	5
1.3.1 Clasificación taxonómica.....	5
1.3.2 Descripción botánica	6
1.3.3 Ecología optima para el cultivo del cafeto	7
1.3.4 Problemática del cafeto.....	7
1.4 Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (MAPK)	8
1.4.1 MAPK de plantas	9
1.5 Clonación de genes	10
1.6 Tipos de bibliotecas	11
1.6.1 Características de una buena biblioteca de ADNc.....	12
1.7 Estrategia para síntesis de una biblioteca de ADNc	13
1.7.1 Extracción de ARN	13
1.7.2 Aislamiento de ARNm	15
1.7.3 Síntesis de la primera cadena de ADNc	16
1.7.4 Síntesis de la segunda cadena de ADNc.....	17
1.7.5 Adición de adaptadores	17
1.7.6 Fraccionamiento por tamaño del ADNc	19
1.7.7 Vector de clonación.....	19

CAPÍTULO 2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general	24
2.2 Objetivos particulares	24
2.3 Diagrama experimental	25

CAPÍTULO 3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales	27
3.1.1 Material biológico	27
3.2 Métodos	28
3.2.1 Extracción de ARN total	28
3.2.2 Cuantificación de ácidos nucleicos	30
3.2.3 Aislamiento ARNm	31
3.2.4 Electroforesis de ARN	34
3.2.5 Síntesis de la primera cadena de ADNc	35
3.2.6 Síntesis de la segunda cadena de ADNc	37
3.2.6.1 Análisis de primera y segunda cadena de ADNc	39
3.2.7 Adición de adaptador <i>Sa</i> / <i>I</i>	40
3.2.8 Digestión con la enzima <i>Not</i> <i>I</i>	41
3.2.9 Cromatografía en columna	42
3.2.10 Ligación al vector de clonación	44
3.2.11 Empaquetamiento del ADNc	44
3.2.12 Evaluación de la calidad de la biblioteca	45
3.2.12.1 Titulación de la biblioteca y relación de las ufp blancas/azules	45
3.2.12.2 Evaluación del tamaño promedio de los insertos	47

CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción de ARN total y aislamiento de ARNm	48
4.2 Síntesis de ADNc.....	52
4.2.1 Síntesis de la biblioteca de ADNc con el SuperScript Lambda	52
System for cDNA Synthesis and λ Cloning	
4.2.1.1 Cromatografía en columna	54
4.2.1.2 Empaquetamiento del ADNc	56
4.2.1.3 Evaluación de la calidad de la biblioteca	57
4.2.2 Síntesis de la biblioteca de ADNc con el TimeSaver cDNA	59
Synthesis Kit	
4.2.2.1 Síntesis de ADNc y Cromatografía de exclusión molecular	59
(Sepharose CL – 4B)	
4.2.2.2 Empaquetamiento de ADNc	64
4.2.2.3 Evaluación de la calidad de las bibliotecas	66
CONCLUSIONES	68
ANEXOS	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

RESUMEN

En los últimos años se ha evidenciado que la unión de diversas señales extracelulares a diferentes receptores celulares, produce la activación de una familia de proteínas intracelulares de Serina/Treonina, denominadas proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Las MAPK forman parte de rutas o módulos de transducción de señales consistentes de tres miembros, la MAPK, una cinasa de la MAPK (MAPKK) y una cinasa de la cinasa de la MAPK (MAPKKK).

El presente trabajo, está comprendido dentro de un proyecto global cuyos objetivos consisten en estudiar la importancia que las MAPK tienen en la regulación de procesos de proliferación y diferenciación celular en cafeto.

Debido a que existe una creciente controversia en la especificidad de "sustratos específicos" para detectar indirectamente actividades enzimáticas no purificadas a partir de extractos proteicos crudos, este trabajo propone la síntesis y caracterización de una biblioteca de Ácido Desoxirribonucleico complementario (ADNc) de células en suspensión de café, como una herramienta para la clonación de los ADNc de las enzimas deseadas (MAPK) y de esta manera apoyar la descripción molecular, de aquellos eventos asociados a la actividad de las proteínas codificadas.

En éste trabajo se realizó la síntesis y caracterización de una biblioteca de ADNc de células en suspensión de café a partir de Ácido Ribonucleico mensajero (ARNm), los cuales fueron purificados a partir de Ácido Ribonucleico (ARN) total mediante cromatografía de afinidad con una resina de oligo (dT)-celulosa. Al ADNc

fueron adicionados adaptadores *Sal* I - *Not* I para posteriormente ligarlo a los brazos de lambda, lo que confiere direccionalidad 5' → 3' a los insertos, favoreciendo la posterior expresión de proteínas. Finalmente, el ADNc fue empaquetado en partículas de bacteriófago.