

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Reactivos.

#### 1.1 Reactivos de análisis de proteínas.

- Amersham Pharmacia Biotech (Suecia): columna HiTrap NHS-activada para purificar anticuerpos, columnas PD10.
- Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, EEUU): Docecil sulfato sódico (SDS), TEMED, acrilamida, bis-acrilamida, Tris para electroforesis, reactivo de Bradford, Immun-Start Substrate para Western Blot.
- Merck (Darmstadt, Alemania): paraformaldehído, etanol, metanol, isopropanol, glicerol.
- Millipore Corporation, Waters Chromatography División (MA, EE.UU): membrana para filtración de tampones de 0,22  $\mu\text{m}$  (modelo GVWP), membrana Immobilon-P para transferencia de proteínas.
- Schleicher & Schuell GMBH (Dassel, Alemania): membrana Nylon Nytran N para transferencia de ácidos nucleicos.

- Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): NAD<sup>+</sup> (grade III y grade AA-1), NADH (grade III), phenazine methosulfate (PMS), nitroblue tetrazolium (NBT), ácido pirúvico, ditioneitol (DTT), glutatión, Trizma Base (Tris), EDTA, suero albúmina bovina (BSA).

## 1.2. Reactivos de Biología Molecular.

- Amersham Pharmacia Biotech (Suecia):  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP, película para autorradiografía Hyperfilm-MP, Ampicilina, kit “GFX™ Micro plasmid prep” para minipreparaciones de DNA.
- Biotools (Madrid, España): marcadores de peso molecular de DNA de 1 kb.
- Boehringer-Mannheim GmH (Mannheim, Alemania): Tris, glicina, agarosa, bromuro de etidio, fosfatasa alcalina de intestino de ternera, RNAsa A, T4 DNA ligasa, fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I, Quick Spin™ Columns Sephadex® G50 Fine, marcadores de peso molecular de DNA, y la mayoría de enzimas de restricción.
- DIFCO laboratories (Detroit, MI, EEUU): peptona, extracto de levadura, agar.
- Kodak-Pathé (París, Francia): revelador para radiografías LX 24 y fijador para radiografías AL 4.
- Promega Corporation (Madison, WI, EEUU): Kit de marcaje radioactivo de sondas de DNA “Prime-a-Gene Labeling System”
- Pharmacia Biotech: algunas enzimas de restricción.
- Clontech (España): Kit para midipreparaciones de DNA “Plasmix by talent”.
- Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EEUU): glucosa, acetato de litio, acetato potásico, EDTA, formaldehído, formamida .
- Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania): marcadores VII y X de peso molecular de DNA y marcador I de peso molecular de RNA.

### 1.3. Reactivos de cultivos de plantas.

- Duchefa Biochemie BV (Netherlands): MS (Murashige & Skoog Salt Mixture), ácido nicotínico, piridoxina, sacarosa.
- Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU): 1-Cloro-2,4-Dinitro-benzeno (2,4 D), mioinositol, tiamina,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

## 2. Material biológico.

### 2.1 Material biológico vegetal.

- Línea celular de *Nicotiana tabacum* L. Cv. Bright Yellow 2 (BY2) (Kato y col., 1972).
- *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia)
- *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia) (mutante *coi1*) (Berger et al., 1996)
- *Raphanus sativus* (rábano).

### 2.2 Cepas de *E. coli*.

- **DH51 $\alpha$**  (supE44  $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1gyrA96 thi-1relA1), deficiente en recombinación. Permite, además, la  $\alpha$ -complementación con el extremo amino terminal de la  $\beta$ -galactosidasa codificada en los vectores derivados de pUC.
- **MC1061** (hsdR mcrB ara $\Delta$ 139  $\Delta$ (araABC-leu)7679  $\Delta$ lacX74 galU galK rpsL thi) con una eficiencia de transformación superior a la de la cepa DH5 $\alpha$ .

## 2.3 Plásmidos.

- **pDH51.** Vector derivado de pUC 18, que contiene el origen de replicación de *E. coli*. Es un vector de 3476 pb, posee una región con múltiples sitios de clonación que procede de pUC18, contiene el promotor del gen del RNA 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador de la transcripción. Como marcadores para la selección del vector, contiene el gen de resistencia a ampicilina (Amp<sup>R</sup>). En este trabajo, este vector se utilizó como una etapa intermedia de clonaje para preparar la construcción CaMV-FALDH, ya que posee el promotor y el terminador 35S, elementos necesarios para la expresión de genes en plantas, de las cuales carece el vector binario pBin19 (Peitrzak et al., 1986).

- **pBin19.** Es un vector que se caracteriza por contener las secuencias LB y RB necesarias para integrarse el T-DNA en el genoma de la planta (previa transformación de *Agrobacterium tumefaciens*). Contiene el gen de la neomicina fosfotransferasa (NPTII), que confiere resistencia al antibiótico kanamicina, permitiendo una selección rápida y sencilla de las plantas transformadas (Bevan, 1984).

## 3. Medios de cultivo.

### 3.1 Medios de cultivo para bacterias.

En todos los casos los medios se autoclavaron 20 minutos a 121°C y 1kg/cm<sup>2</sup>. Los medios sólidos se guardaron a 4°C durante un máximo de tiempo de 3 meses, mientras que los líquidos se mantuvieron a temperatura ambiente.

### 3.1.1 Medio Luria-Bertani (LB).

Este es el medio rico de uso más generalizado. Fue utilizado en la mayoría de las manipulaciones de *E. coli*. La composición para 1 litro de medio de cultivo es la siguiente:

- 10 g Bacto-triptona (1%)
- 5 g Extracto de levadura (0,5%)
- 10 g NaCl (1%)

Completar a 1 litro con agua MilliQ.

Ajustar pH a 7,2 con NaOH.

(Para los cultivos en placas, se añadió 15 g/l de bacto-agar (1,5%)).

Autoclavar.

### 3.1.2 Medio de cultivo Terrific Broth (TB).

Este medio de cultivo se utilizó para hacer las preparaciones de DNA plasmídico, obteniéndose una mayor cantidad de células / ml que para un mismo volumen de LB.

La composición para 1 litro de medio de cultivo es la siguiente:

- 12 g Bacto-triptona (1,2%)
- 24 g Extracto de levadura (2,4 %)
- 4 ml Glicerol (0,4 %)
- 100 ml de Fosfatos TB 10X

Completar a 1 litro con agua MilliQ.

Autoclavar.

#### Composición de fosfatos TB 10X:

- 0,17 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 0,72 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

### 3.1.3 Medio de cultivo 2xYT.

Este medio rico fue utilizado para crecer *E. coli* y para purificar la proteína FALDH fusionada con GST. La composición para 1 litro de medio de cultivo es la siguiente:

- 16 g Bacto-triptona
- 10 g Extracto de levadura
- 5 g NaCl

Completar a 1 litro con agua MilliQ.

Ajustar pH a 7,0 con NaOH.

Autoclavar.

### 3.1.4 Medio de cultivo KB para *Pseudomonas syringae*.

Este medio se utilizó para crecer *Pseudomonas syringae*. La composición para 1 litro es la siguiente:

- 20 g proteosa peptona
- 1,59 g  $K_2HPO_4$  ( ó 2.25 g  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ )
- 10 ml de glicerol

Completar a 1 litro con agua MilliQ.

Ajustar pH a 7,2 con NaOH.

(Para los cultivos en placas, se añadió 15 g/l de bacto-agar (1,5%)).

Autoclavar.

### 3.1.5 Medio de conservación de *E. coli*.

Las cepas de uso continuo se mantuvieron en placas a 4°C durante unas pocas semanas (no más de un mes). Para el mantenimiento indefinido, las cepas se guardaron a -80°C en glicerizados con una concentración final de glicerol estéril del 15%.

### 3.2 Medios de cultivo del material biológico vegetal.

#### 3.2.1 Medio de cultivo para las células de tabaco BY2.

La composición para 1 litro de medio de cultivo es la siguiente:

- 4,3 g de medio MS (Murashige & Skoog Salt Mixture)
- 1 mg de tiamina (100  $\mu$ l de un stock de 10 mg/ml)
- 200 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 0,2 mg de 2,4 D (100  $\mu$ l de una concentración stock de 2 mg/ml)
- 100 mg de mioinositol
- 30 g de Sacarosa

Ajustar a pH 5,8 con KOH 1M.

Autoclavar.

#### 3.2.2 Medio de cultivo líquido para plantas de *A. thaliana*.

La composición para 200 ml de medio de cultivo es la siguiente:

- 0,86 g de medio MS (Murashige & Skoog Salt Mixture)
- 1 g de sacarosa
- 20 g de mioinositol
- 20  $\mu$ l de glicina (Stock 20 mg/ml)
- 10  $\mu$ l de ácido nicotínico (Stock 10 mg/ml)
- 10  $\mu$ l de piridoxina (Stock 10 mg/ml)
- 2  $\mu$ l de tiamina (Stock 10 mg/ml)

Completar a 200 ml con agua MilliQ.

Ajustar a pH 5,8 con KOH 1 M.

Autoclavar.

### 3.2.3 Medio de cultivo sólido (medio GM) para plantas de *A. thaliana* y de *R. sativus*.

El medio GM se utilizó para crecer plántulas de rábano y *A. thaliana* en general. Cuando fue necesario crecer o seleccionar plantas transgénicas, el medio GM se suplementó con el antibiótico kanamicina a una concentración de 60 µg/ml.

La composición para 1 litro de medio de cultivo es la siguiente:

- 4,4 g MS ( Murashige & Skoog Salt Mixture)
- 5 g Sacarosa
- 0,5 g MES
- 8 g Agar

Completar a 1 litro con agua MilliQ.

Equilibrar el pH a 5,7 con KOH.

Autoclavar.

### 3.3 Utilización de antibióticos en los medios de cultivo.

Cualquier cepa debe ser sometida a selección para mantener un vector plasmídico. La selección más habitual en organismos procariontes, es por medio de la resistencia a algún antibiótico, para lo cual se adiciona el mismo al medio de cultivo. Dado que los antibióticos no pueden ser autoclavados es aconsejable preparar una disolución madre esterilizada por filtración, a partir de la cual se podrá añadir un pequeño volumen en el medio de cultivo ya autoclavado (nunca se debe añadir el antibiótico hasta que la temperatura esté por debajo de 60°C). Los antibióticos utilizados en este trabajo son los siguientes:

- Ampicilina: La solución madre se preparó a 50 mg/ml en agua destilada. Una vez disuelta, se esterilizó por filtración con filtros de 0,22 µm, se alícuotó en tubos



Eppendorf estériles y se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La concentración final de Ampicilina empleada en los medios de cultivo fue generalmente de 50-75  $\mu\text{g/ml}$ .

- Rifampicina: Es un antibiótico muy tóxico y fotosensible. La solución de rifampicina se preparó en metanol a una concentración stock de 34 mg/ml. La rifampicina se utilizó en cultivos de *Agrobacterium* para evitar contaminaciones con *E. coli*. La concentración final utilizada fue 150  $\mu\text{g/ml}$ .

- Kanamicina: La solución madre se preparó a una concentración de 10 mg/ml en agua. Se esterilizó por filtración con filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ , a continuación se alícuotó en tubos Eppendorf estériles y se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La concentración final de kanamicina empleada varió entre 30  $\mu\text{g/ml}$  (en cultivos de medio líquido) y 60  $\mu\text{g/ml}$  (en placas de Petri).

- Tetraciclina: La solución madre se preparó a 5 mg/ml. Se esterilizó por filtración con filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  y se alícuotó en tubos Eppendorf estériles. Se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  protegida de la luz, dado que la tetraciclina es fotosensible. La concentración final utilizada en los medios de cultivo fue de 75  $\mu\text{g/ml}$ .

## **4. Condiciones de cultivo del material biológico.**

### **4.1 Mantenimiento de la línea celular BY2.**

Para mantener la línea celular BY2, cada 7 días se pipeteó 1,5 ml de un cultivo en fase estacionaria y se diluyó en 100 ml de medio fresco (Apartado 3.2.1). Esta operación se realizó siempre en condiciones estériles, en la campana de flujo laminar y junto a la llama. El cultivo nuevo se mantuvo en la oscuridad, en agitación continua a 145 rpm, y a  $27^{\circ}\text{C}$  de temperatura.

#### 4.2 Esterilización de las semillas de *A. thaliana* y de *R. sativus*.

Las semillas de *A. thaliana* y de *R. sativus* se esterilizaron en la campana de flujo laminar (que previamente se limpió bien con una solución de lejía al 5% disuelta en agua destilada) y junto a la llama.

##### **Método:**

- 1- Pesar 5 mg de semillas (aproximadamente 250 semillas en el caso de *Arabidopsis*) en un tubo Eppendorf.
- 2- Lavar las semillas con 1 ml de etanol 96 % durante 1 minuto.
- 3- Eliminar el etanol y lavar durante 5 minutos para *Arabidopsis* ó 10 minutos para rábano con 1 ml de una solución compuesta por 30% de lejía en agua estéril y 1 gota de Tween 20.
- 4- Lavar 5 veces, durante dos minutos cada vez, con 1 ml de agua estéril.
- 5- Dejar las semillas a 4°C durante 12 horas antes de ponerlas a crecer. Esta etapa es necesaria si se quiere sincronizar la germinación.

#### 4.3 Germinación de las semillas y crecimiento de las plántulas en medio líquido.

Las semillas se pusieron a germinar en placas estériles de 6 pocillos y con agitación. En cada pocillo se adicionó 5 ml de medio líquido (Apartado 3.2.2) y aproximadamente 20-25 semillas previamente esterilizadas. El crecimiento se realizó siempre a 22°C con un ciclo de luz / oscuridad de 16 h / 8 h (día largo). A los 8 días de poner las semillas a germinar se adicionó 2 ml de medio fresco y al día siguiente (día 9) se aplicó el tratamiento correspondiente (Apartado 5). En el momento en que se recolectó el material vegetal, éste se secó con cuidado sobre un papel con el objetivo de eliminar la mayor cantidad posible de medio líquido, se pesó inmediatamente y se congeló en nitrógeno líquido. Las muestras se guardaron a -80°C hasta su uso.

#### **4.4 Condiciones de crecimiento en tierra.**

Para crecer las plantas en tierra no es necesario esterilizar previamente las semillas. Con la ayuda de un papel, se fueron dejando caer con cuidado las semillas en la tierra tratando de que quedaran lo más separadas posibles unas de otras. Se vernalizaron durante 24 horas a 4°C y después se pusieron en el incubador a 22°C y con un ciclo de luz / oscuridad de 16/8h. A los 15 días, se traspasaron a tiestos más pequeños (2 plantas por tiesto) y se cambió el ciclo luz / oscuridad a 8/16h (día corto) para potenciar el crecimiento vegetativo y así aumentar el crecimiento de la superficie foliar, obteniendo rosetas más vigorosas. La mezcla de tierra para sembrar las plantas estuvo compuesta por una parte de turba (sustrato de horticultura, Plantaflor PROFÍ) y dos partes de arena de río. Una vez que ya estuvieron listos los tiestos, se humedecieron un poco antes de plantar las semillas.

### **5. Tratamientos.**

#### **5.1 Tratamientos con ácido abscísico (ABA).**

A 100 ml de un cultivo de células BY2 se le adicionó 100  $\mu$ l de ABA (stock 100 mM) para obtener una concentración final de 100  $\mu$ M. Se recogieron alícuotas de células a las 3, 7 y 24 horas después de la aplicación del tratamiento. Los controles, uno para cada tiempo, se realizaron adicionando 100  $\mu$ l de DMSO, disolvente de ABA. Los experimentos se realizaron por triplicado.

#### **5.2 Tratamientos con ácido salicílico (SA).**

La solución stock se preparó disolviendo ácido salicílico en agua MilliQ autoclavada, y ajustando el pH a 6 con KOH (este es el pH aproximado que necesita el SA para solubilizarse). A 100 ml de cultivo de células BY2 se les adicionó 300  $\mu$ l de SA (stock 50

mM) para obtener una concentración final de 150  $\mu$ M. A las células control se les adicionó agua MilliQ estéril. Se recogieron alícuotas a las 5, 24 y 48 horas después de la aplicación de SA. En el caso de los experimentos con plantas, el SA se adicionó a los pocillos de la placa estéril donde se habían crecido las plántulas, y se recolectaron muestras a diferentes tiempos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### **5.3 Tratamientos con ácido jasmónico (JA) y metil jasmonato (MeJa).**

A 100 ml de cultivo de células BY2 se les adicionó 50  $\mu$ l de JA (stock 100 mM) para obtener una concentración final de 50  $\mu$ M. Se recogieron alícuotas de células a las 24, 48 y 72 horas después de la aplicación del tratamiento. Los controles, uno para cada tiempo, se realizaron adicionando 50  $\mu$ l de dimetil formamida, que era el disolvente del JA. Los experimentos realizados con plantas, se le adicionó a cada pocillo de la placa estéril donde estaban crecidas las plántulas diferentes concentraciones de JA (stock 100 mM) y MeJA (stock 200 mM) y se colectaron muestras a diferentes tiempos. Los tiempos de tratamiento fueron 2, 8, 24 y 48 horas. Los controles se realizaron siempre adicionando la misma cantidad de dimetil formamida. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

## **6. Extracción de proteínas totales.**

Los extractos de proteínas para realizar medidas de actividad enzimática se utilizaron de inmediato, sin congelarlos, pues de lo contrario se observaban pérdidas importantes de actividad enzimática. Los extractos de proteínas para analizar por Western Blot se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 6.1 Extracción de proteínas de las células de tabaco BY2.

Las alícuotas de células BY2 se centrifugaron a 4000 rpm y a 4°C en una centrífuga Heraeus durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su uso.

#### **Método:**

- 1- Adicionar tampón de extracción (debe estar frío) al precipitado de células en una relación 1:1 peso / volumen.
- 2- Sonicar (Sonicador Sonifier 450, Branson) la muestra 30 segundos, y ponerla en hielo a continuación (30 segundos).
- 3- Repetir el paso 2 dos veces más.
- 4- Centrifugar 10 minutos a 15000 rpm y a 4°C (la centrífuga refrigerada utilizada fue una Sigma del modelo 2MK)
- 5- Recuperar el sobrenadante y pasarlo a un tubo Eppendorf limpio.

### 6.2 Extracción de proteínas de *A. thaliana*.

#### **Método:**

- 1- Introducir la muestra en un tubo Eppendorf y adicionar nitrógeno líquido. A continuación pulverizar con un émbolo metálico especialmente adaptado para tubos Eppendorf de 1,5 ml. Evitar que se evapore todo el nitrógeno antes de que la muestra esté bien homogeneizada.
- 2- Una vez pulverizada la muestra, adicionar 150-200 µl de tampón de extracción (previamente atemperado a 4°C) y agitar bien en un vórtex para que se disperse en el tampón, evitando la aparición de espuma.
- 3- Centrifugar durante 10 minutos a 15000 rpm y a 4°C (la centrífuga refrigerada utilizada fue una Sigma del modelo 2MK).
- 4- Recuperar el sobrenadante y pasarlo a un tubo Eppendorf limpio.

**Soluciones:**

- Tampón de extracción de proteínas: Tampón Fosfato sódico (NaPi) 0,1M, pH 8, DTT 0.5 mM, PMSF 1mM, Inhibidores de proteasas Leupeptina 1µg/ml y Pepstatina 1µg/ml.

**7. Cuantificación de las proteínas por el método de Bradford.**

Este método se basa en el desplazamiento del máximo de absorbancia de una solución ácida del colorante "Coomasie Blue G-250" desde 465 a 595 nm cuando el reactivo se une a una proteína (Bradford, 1976). La absorbancia aumenta linealmente para concentraciones de proteína entre 1 y 25 µg/ml. La recta de calibrado se realizó con albúmina de suero bovino (BSA) a concentraciones entre 1 y 18 µg/ml.

**Método:**

Se prepararon diferentes concentraciones de proteína patrón (BSA) y de muestra en un volumen de 0,2 ml. Cada concentración, tanto de la recta patrón como de la muestra, se preparó por duplicado. Se diluyó el colorante (Bio-Rad laboratories) en agua destilada (1:4 v/v) y se añadieron 0,8 ml del reactivo diluido a cada una de las muestras. Se agitaron enérgicamente todos los tubos y se dejaron reaccionar durante 5 minutos. Seguidamente se midió la absorbancia a 595 nm. La linealidad se mantiene durante 1 hora. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente.

**8. Métodos espectrofotométricos.**

**8.1 Determinación de la actividad enzimática de la FALDH.**

La actividad enzimática de la FALDH se determinó midiendo la variación de absorbancia a 363 nm en la mezcla de reacción, detectando de esta manera la formación de APAD reducido como consecuencia de la actividad del enzima. Se utilizó

como coenzima el APAD porque permite aumentar la sensibilidad de la detección de la actividad FALDH entre 4 y 22 veces, debido a que la liberación del APAD reducido (APADH) es más rápida que la del NADH. La actividad se expresó en Unidades Internacionales (U). Una unidad (U) equivale a la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de APAD reducido por minuto. La cantidad de APAD reducido se calculó teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar ( $9100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) a 363 nm. Dicha actividad fue determinada en un espectrofotómetro Cary (400 Bio, Varian) con termostatación, a 25°C.

#### **Método:**

1- Adicionar en una cubeta de espectrofotómetro de 1 ml, con 1 cm de paso óptico, 836  $\mu\text{l}$  de NaPi 0,1 M pH 8, 80  $\mu\text{l}$  de muestra y 0,6 mM (30  $\mu\text{l}$  del stock 20 mM) de APAD. Leer la absorbancia a 363 nm hasta lograr que no quede nada de background (para eliminar la actividad interferente por parte de otras enzimas).

2- Añadir 1 mM de Glutación (20  $\mu\text{l}$  del stock 50 mM) (este es uno de los sustratos de la reacción). Leer a 363 nm hasta eliminar el background.

3- Adicionar 1 mM de formaldehído (34  $\mu\text{l}$  del stock que está a 30 mM). Este paso se debe hacer muy rápido para evitar que se evapore el formaldehído que es el otro sustrato.

4- Leer a 363 nm la actividad enzimática de la FALDH.

#### **Soluciones:**

- Tampón fosfato sódico (NaPi) 0,1 M, pH 8.
- APAD (dinucleótido de 3-acetilpiridina adenina) 20 mM, disuelto en NaPi 0,1 M, pH 8.
- Glutación 50 mM, disuelto en NaPi 0.1 M pH 8.
- Formaldehído 30 mM, preparado a partir de paraformaldehído por hidrólisis.

### 8.1.1 Preparación de formaldehído a partir de paraformaldehído.

El formaldehído que se utilizó para determinar las actividades enzimáticas fue preparado mediante la hidrólisis del paraformaldehído.

#### **Método:**

- 1- Mezclar 5 ml de agua MilliQ con 0,5 g de paraformaldehído en un tubo de 15 ml.
- 2- Cerrar bien el tubo y ponerlo a 100°C durante 16 horas aproximadamente.
- 3- Retirarlo de la estufa y dejarlo enfriar.
- 4- A continuación, determinar la concentración final de NADH de la siguiente manera: 10-15  $\mu$ l de solución de formaldehído diluida 1000 veces se mezcla con una solución de NAD<sup>+</sup> en exceso (4 mM) y con 0,05 unidades de formaldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas pútida* en tampón fosfato sódico 0,1 M pH 8, y se lleva a un volumen final de 1 ml. Medir la absorbancia a 340 nm en el espectrofotómetro y calcular la concentración de NADH producido teniendo en cuenta su coeficiente de extinción molar ( $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

La cantidad final de NADH producido es equimolar a la del formaldehído presente inicialmente en la mezcla de reacción.

#### **Soluciones:**

- Formaldehído Deshidrogenasa (EC 1.2.1.46) de *Pseudomonas pútida* (casa comercial Sigma)
- NAD<sup>+</sup> 4 mM.
- Tampón fosfato sódico (NaPi) 0,1 M pH 8.



## 8.2 Determinación de la actividad GSNO reductasa.

### 8.2.1 Preparación de S-nitrosoglutatión.

#### Método:

- 1- Pesar 1,53 g de glutatión reducido y disolverlo en 8 ml de agua MilliQ.
- 2- Incubar en hielo con agua la disolución anterior. Mientras tanto, preparar 10 ml de HCl 2 M (1,66 ml de HCl al 37 % en 10 ml totales). Añadir 2,5 ml de HCl 2 M a la disolución del paso 1. Incubar en hielo durante 10 minutos.
- 3- Pesar 0,345 g de nitrito de sodio en una botella de 25 ml con tapa de rosca. Añadirlo sobre la disolución de glutatión en medio ácido y agitar a 4°C durante 40 minutos (comienza a formarse un precipitado de color rosa).
- 4- Al precipitado formado, añadir 10 ml de acetona fría y dejar agitando 10 minutos más.
- 5- Centrifugar en un tubo de 15 ml a 4°C y 4000 rpm durante 2 minutos.
- 6- Lavar el pellet con agua fría. Centrifugar a 4°C y 4000 rpm durante 2 minutos.
- 7- Repetir otra vez el paso anterior.
- 8- Lavar con acetona fría a 4°C y 4000 rpm durante 2 minutos.
- 9- Repetir el paso anterior 2 veces más.
- 10- Descartar el sobrenadante y secar el pellet al vacío.
- 11- Disolver el pellet en 70 ml de agua milliQ. (Se debe obtener una concentración de S-nitrosoglutatión de 30 mM aproximadamente).
- 12- Adicionar 20  $\mu$ l de la solución de S-nitrosoglutatión a 980  $\mu$ l de agua y hacer un espectro entre 300 y 600 nm, utilizando como blanco el agua MilliQ. Calcular la concentración del GSNO producido a 335 nm teniendo en cuenta su coeficiente de extinción molar ( $800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

## 9. Métodos inmunológicos.

### 9.1 Purificación de anticuerpos específicos anti-FALDH.

En nuestro grupo se había obtenido y caracterizado un anticuerpo contra la FALDH de *Arabidopsis thaliana* (Achkor et al., 2003), pero para usarlo en experimentos de inmunolocalización en tejidos decidimos purificarlo por cromatografía de afinidad.

#### 9.1.1 Expresión y purificación de proteína FALDH recombinante.

La expresión y purificación de la FALDH de *A. thaliana* se basó en la utilización del vector de expresión pGEX-4T-2 que permitió la expresión inducida por IPTG de la proteína recombinante fusionada a la glutatión-S-transferasa (GST) en un sistema bacteriano. Para ello se utilizó el módulo de purificación por GST “Bulk and RediPack” (Pharmacia Biotech) siguiendo las instrucciones de la casa comercial con algunas modificaciones.

##### 9.1.1.1 Crecimiento del cultivo de células de *E. coli* y expresión del enzima FALDH de *A. thaliana*.

Las células de *E. coli* BL21 se crecieron en medio 2xYT (Apartado 3.1.3). El antibiótico de selección fue la Ampicilina a una concentración final de 50 µl/ml.

#### **Método:**

- 1- Inocular 10 ml de un cultivo de noche saturado en 1 litro de medio fresco 2xYT (dilución 1/100) (por duplicado). Crecer a 28°C, con agitación de 250 rpm durante 10 horas.
- 2- Inducir la expresión del enzima adicionando 0,1 mM de IPTG (a partir de una concentración stock de 100 mM). Continuar la incubación a 22°C durante 15 horas más.

3- Centrifugar el cultivo en tubos de 50 ml durante 20 minutos a 4000 rpm, congelar el pellet en nitrógeno líquido y almacenar a  $-80^{\circ}\text{C}$  para facilitar la lisis celular.

#### 9.1.1.2 Purificación del enzima FALDH de *A. thaliana*.

La GST es una proteína capaz de unirse al glutatión de la resina del módulo “Bulk and RediPack” de la casa comercial Amersham Pharmacia Biotech, de tal forma que la proteína de fusión recombinante queda retenida en la resina. En nuestro caso la GST se unió por su extremo C-terminal al extremo N-terminal de la proteína FALDH. La elución de la proteína de fusión tiene lugar gracias a la digestión con trombina, ya que la GST y la FALDH están unidas mediante la secuencia (Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln↓Gly-Pro, cortando la trombina entre los residuos Gln y Gly).

#### **Método:**

- 1- Resuspender el pellet de células de 50 ml de cultivo (Apartado 9.1.1.1) en 2,5 ml de PBS 1X con 0,5 mM de DTT y 1 mg/ml de lisozima.
- 2- Romper las células por sonicación (“Time-hold” y “Duty cycle” constantes) (sonificador Sonifer 454, Branson) durante 30 segundos. Repetir este paso 4 veces más, dejando las muestras 1 minuto en hielo entre cada ciclo.
- 3- Mezclar el contenido de todos los tubos.
- 4- Añadir una espátula pequeña de DNAasa con el objetivo de reducir la viscosidad de la muestra. Adicionar Tritón X-100 a una concentración final del 1 % (a partir de una concentración stock del 20 %).
- 5- Agitar durante 30 minutos en un agitador orbital.
- 6- Centrifugar a  $4^{\circ}\text{C}$  y 13000 rpm durante 20 minutos.
- 7- Recuperar el sobrenadante y adicionarle 4 ml de resina equilibrada al 50 % en las condiciones recomendadas por la casa comercial.
- 8- Agitar en agitador orbital durante 1 hora a temperatura ambiente, o toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ .

- 9- Centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm. Eliminar el sobrenadante.
- 10- Lavar el pellet de resina y proteína adicionando 10 volúmenes de PBS 1X con 0,5 mM de DTT por cada volumen de resina. Dejar 10 minutos en agitación a temperatura ambiente y volver a centrifugar 5 minutos a 1500 rpm. Eliminar el sobrenadante.
- 11- Repetir el paso anterior 2 veces más.
- 12- Adicionar 50  $\mu$ l de trombina y 950  $\mu$ l de PBS 1X con 0,5 mM DTT por cada ml de resina.
- 13- Agitar suavemente durante toda la noche.
- 14- Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm.
- 15- Recoger todo el sobrenadante, donde debe encontrarse la proteína pura.
- 16- Lavar de nuevo la resina con 1 ml de PBS 1X con 0,5 mM de DTT, centrifugar 5 minutos a 1500 rpm. Recuperar el sobrenadante y unirlo con el obtenido en el paso 15.
- 17- Comprobar la pureza de la proteína mediante un gel SDS-PAGE al 12.5 % (Apartado 10) y mediante medidas de actividad enzimática (Apartado 8.1)

### **9.1.2 Purificación del anticuerpo por cromatografía de afinidad.**

La purificación del anticuerpo se llevó a cabo mediante la utilización de la columna HiTrap NHS-activada (1 ml) de la casa comercial Amersham Pharmacia Biotech. Este protocolo consta de 3 partes: inmovilización del antígeno a la columna, adsorción del suero que contiene el anticuerpo policlonal de interés y elución del anticuerpo. El protocolo seguido fue el recomendado por la casa comercial con algunas modificaciones.

#### **9.1.2.1 Inmovilización del antígeno a la columna.**

El antígeno utilizado para inmovilizar en la columna fue la proteína FALDH purificada tal y como se describe en el Apartado 9.1.1.2.

**Método:**

- 1- Dializar y filtrar la proteína en buffer de unión, utilizando una columna PD-10 de Amersham. (Es importante tener entre 0,7 y 1 mg total de proteína disuelta en 1 ml).
- 2- Quitar el tapón de la columna y añadirle unas gotas de 1 mM de HCl frío para evitar la formación de burbujas.
- 3- Lavar la columna con 1 mM de HCl (3 x 2 ml) para eliminar el isopropanol. Establecer un flujo de 1 ml / minuto.
- 4- Inyectar 1 ml de la proteína pura filtrada dentro de la columna con la ayuda de una jeringa de 1 ml.
- 5- Sellar la columna e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- 6- Comenzar los lavados para eliminar las uniones inespecíficas y la desactivación del exceso de grupos NHS activos de la columna que no se unieron al ligando (proteína pura).
- 7- Inyectar 3 x 2 ml de buffer A.
- 8- Inyectar 3 x 2 ml de buffer B.
- 9- Inyectar 3 x 2 ml de buffer A.
- 10- Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos aproximadamente.
- 11- Inyectar 3 x 2 ml de buffer B.
- 12- Inyectar 3 x 2 ml de buffer A.
- 13- Inyectar 3 x 2 ml de buffer B.
- 14- Finalmente inyectar 2 ml de PBS 1X (pH 7.4) para neutralizar la columna.

**Soluciones:**

- Buffer de unión: 0,2 M  $\text{NaHCO}_3$ , 0,5 M NaCl, pH 8,3.
- Buffer A: 0,5 M etanolamina, 0,5 M NaCl, pH 8,3.
- Buffer B: 0,1 M acetato de sodio, 0,5 M NaCl, pH 4.

### 9.1.2.2 Absorción del anticuerpo a la columna.

En este punto, la columna está lista para absorber el anticuerpo que queremos purificar.

#### **Método:**

- 1- Equilibrar la columna con 10 ml de start buffer (en este caso es el PBS 1X, pH 7,4).
- 2- Dializar el anticuerpo con PBS 1X con la ayuda de un centrífugo Plus-20 de la casa comercial Millipore. (No precipitar con sulfato de amonio porque el anticuerpo pierde título).
- 3- Filtrar el anticuerpo con un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y centrifugar inmediatamente antes de aplicarlo a la columna.
- 4- Inyectar el anticuerpo a la columna. El flujo recomendado es de 0,2-1 ml / minuto.
- 5- Incubar la columna 15 minutos a temperatura ambiente.

### 9.1.2.3 Elución del anticuerpo.

El protocolo seguido es el que se describe a continuación.

#### **Método:**

- 1- Lavar la columna con 5 ml de PBS 1X.
- 2- Preparar previamente los tubos Eppendorf donde se va a recolectar el anticuerpo purificado. Adicionar a cada tubo 100  $\mu\text{l}$  de 1 M Tris a pH 8.
- 3- Eluir con 3 ml de solución de elución. Recoger alícuotas de 900  $\mu\text{l}$  en los tubos preparados en el paso anterior.
- 4- Añadir a cada alícuota 50  $\mu\text{l}$  de BSA a 10 mg/ml.
- 5- Reequilibrar la columna con la solución de almacenaje y guardar a 4°C hasta que se vuelva a utilizar. Antes de volver a usar la columna hay que equilibrar con PBS 1X.

**Soluciones:**

- Solución de elución: 100 mM glicina/HCl pH 2,7.
- Solución de almacenaje: PBS 1X a pH 7,4, azida sódica 0,1 %.

**9.2 Ensayo inmunoenzimático ELISA.**

La técnica denominada ELISA se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida, mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción, el producto de la cual, generalmente un compuesto coloreado, puede ser medido espectrofotométricamente. En esta técnica el soporte donde se inmoviliza la proteína es una placa de plástico y el sustrato utilizado para detectar la unión antígeno-anticuerpo da un producto soluble que no precipita.

Las placas utilizadas son de polietileno de gran calidad (Afora). El antígeno utilizado fue la FALDH recombinante de *A. thaliana*. El anticuerpo primario fue el anti-FALDH purificado como se describe en el Apartado 9.1.2. El anticuerpo secundario fue el mismo anti-IgG de conejo utilizado en la técnica de Western blot. El sustrato fue el p-nitrofenil fosfato (Sigma), el cual es el sustrato de la fosfatasa alcalina y da un producto soluble de color amarillo.

**Método:**

- 1- Diluir el antígeno en tampón de fijación o *coating buffer*.
- 2- Cubrir los pocillos de la placa con 50  $\mu$ l de la solución de antígeno diluída.
- 3- Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 4- Eliminar la solución del antígeno y lavar con 300  $\mu$ l de PBS 1X con Tween 20 al 0,1%.
- 5- Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C con 300  $\mu$ l de solución bloqueadora.
- 6- Desechar la solución bloqueadora y lavar con PBS 1X con Tween 20 al 0,1%.

7- Incubar con 50  $\mu$ l de anticuerpo primario disuelto en solución bloqueadora durante 2 horas a temperatura ambiente.

8- Lavar 4 veces con 300  $\mu$ l de PBS 1X con Tween 20 al 0,1% durante 5 minutos cada vez.

9- Incubar con el anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo, conjugado con fosfatasa alcalina, disuelto en solución bloqueadora a una dilución 1/3000 durante 2 horas a temperatura ambiente.

10- Lavar nuevamente 4 veces con 300  $\mu$ l de PBS 1X durante 5 minutos cada vez.

11- Añadir 50  $\mu$ l de p-nitrofenil fosfato, disuelto a una concentración de 1 mg/ml en tampón de sustrato. Dejar reaccionar entre 30 y 60 minutos hasta que la solución se vuelva amarilla.

12- Parar la reacción con 50  $\mu$ l de NaOH 2 M, y leer la absorbancia a 405 nm con un lector de *ELISA*.

#### **Soluciones:**

- Tampón de fijación o *coating buffer*: 15 mM carbonato de sodio, 35 mM bicarbonato de sodio. Ajustar pH a 9,6.
- Solución bloqueadora: 5% de leche en polvo desnatada, disuelta en PBS 1X, 0,1 % Tween 20.
- Tampón de sustrato: 1 M dietanolamina, 0,5 M  $MgCl_2$ . Ajustar pH a 9,8.

### **9.3 Análisis de proteínas mediante Western Blot.**

La técnica de Western blot se fundamenta en la separación de proteínas en un gel SDS-PAGE (Apartado 10) y en la posterior electrotransferencia a un soporte sólido de nitrocelulosa, apto para la inmunodetección. La inmunodetección se basa en la capacidad de un anticuerpo (al que se denomina anticuerpo primario) de reconocer específicamente una determinada proteína, y en la capacidad de un anticuerpo comercial (denominado anticuerpo secundario) de reconocer específicamente el



primero. Este anticuerpo secundario lleva unido un enzima que permitirá posteriormente su detección y el revelado de las bandas de la proteína reconocida por el primer anticuerpo.

**Método:**

- 1- Hacer una electroforesis en gel de poliacrilamida / SDS al 12,5% (Apartado 10), cargando 20  $\mu$ g de muestra en cada carril.
- 2- Cuando las muestras hayan llegado al final del gel, desechar el gel concentrador e incubar el gel separador en solución de transferencia durante 15 minutos aproximadamente.
- 3- Cortar la membrana (Immobilon-P, Millipore) del mismo tamaño del gel de Poliacrilamida y sumergirla en Metanol 100 % durante 5 minutos para hidratarla y así posibilitar que se transfieran las proteínas. A continuación, lavar bien la membrana con solución de transferencia.
- 4- Cortar papeles absorbentes Whatman 3 MM de igual tamaño que la membrana y que el gel y empaparlos en el tampón de transferencia.
- 5- Ensamblar el sistema de transferencia (Bio-Rad). Este es un sistema vertical de transferencia por aplicación de voltaje, donde el gel y la membrana se sitúan uno junto al otro con tres recortes de papeles absorbentes y una esponja (todo bien empapado en solución de transferencia) a cada lado. La transferencia se realiza durante 1 hora a 100 V y a 4°C, con un agitador magnético.
- 6- Teñir la membrana con la solución de tinción y desteñir con Metanol 50 %. Así podemos comprobar como se ha realizado la transferencia y hacer una foto para cuantificar la cantidad de proteína transferida en cada carril.
- 7- Desteñir la membrana con Metanol 100 % tratando que de no quede nada del colorante.
- 8- Lavar la membrana con solución PBS 1X.
- 9- Bloquear la membrana durante 2 horas con solución de bloqueo a temperatura ambiente, y agitación lenta.

- 10- Incubar toda la noche con el primer anticuerpo (anti-FALDH) disuelto en la solución de lavado I.
- 11- Lavar con agitación lenta durante 2 horas aproximadamente con la solución de lavado I, cambiándola cada 10 minutos.
- 12- Incubar con el segundo anticuerpo (Bio-Rad), preparado a una dilución 1/3000 en la solución de lavado I, durante 1 hora y media o 2 horas.
- 13- Lavar de 4 a 6 veces con la solución de lavado II, cambiándola cada 10 minutos.
- 14- Lavar de 2 a 3 veces con la solución de lavado III, cambiándola cada 10 minutos.
- 15- Lavar 10 minutos con PBS 1X.
- 16- Secar con cuidado la membrana sobre un papel.
- 17- Aplicar la solución de detección (Immun-Star Substrate) sobre la membrana. Mantenerla durante 5 minutos, evitando que se seque durante este tiempo.
- 18- Escurrir un poco la membrana y ponerla en el cassette de exposición en contacto con una película autorradiográfica. Cerrarlo bien de forma tal que no esté en contacto con la luz. Esperar de 10-15 minutos.
- 19-Revelar.

**Soluciones:**

- Tampón de transferencia 10X: 500 mM Tris, 500 mM ácido bórico.
- Solución de tinción: Metanol 50%, ácido acético 7%, Coomassie Blue 0,1%
- Solución de bloqueo: 5% de leche en polvo desnatada, PBS 1X a pH 7,4
- Solución de lavado I: 5% de leche en polvo desnatada, PBS 1X a pH 7,4, 0,1% Tween 20.
- Solución de lavado II: 5% de leche en polvo desnatada, PBS 1X a pH 7,4, 0,2% Tween 20.
- Solución de lavado III: PBS 1X a pH 7,4, 0,2% Tween 20.
- PBS 10X (1 L): 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Completar con agua MilliQ hasta 1 litro. Ajustar pH a 7,4.

## **9.4. Inmunolocalización en tejidos vegetales.**

### **9.4.1 Preparación de los tejidos: fijación e inclusión en parafina.**

La fijación del material vegetal para la posterior inmunolocalización tiene como objetivo la preservación de la morfología del tejido. La determinación de las condiciones de fijación es un proceso empírico que depende de las características estructurales propias de cada tejido. Tanto las hojas como las raíces, contienen células grandes muy vacuoladas, lo que provoca que el contenido citoplasmático se acumule rodeando la cara interna de la membrana citoplasmática.

#### **9.4.1.1 Fijación del tejido.**

La fijación del tejido se realizó tal y como se describe a continuación.

##### **Método:**

- 1- Seccionar las piezas a fijar.
- 2- Introducir las en un vial que contiene 10 ml de solución de fijación e incubar el tejido durante 1 hora.
- 3- Cambiar la solución de fijación e incubar el tejido toda la noche a 4°C.

##### **Soluciones:**

- Solución de fijación: 50% de etanol, 5 % de ácido acético, y 3,7 % de formaldehído.

#### **9.4.1.2 Inclusión de los tejidos en parafina.**

##### **A. Deshidratación.**

Los tejidos deben ser totalmente deshidratados para que posteriormente puedan ser impregnados con parafina, sustancia totalmente insoluble en agua. Para ello, el tejido

se introdujo en soluciones de concentraciones crecientes de etanol, hasta llegar al etanol absoluto como sustitución del agua (Tabla 3).

<b>Solución</b>	<b>Tiempo (minutos)</b>
Etanol 50 %	30
Etanol 60 %	30
Etanol 70 %	30
Etanol 90 %	30
Etanol 100 %	30
Etanol 100 %	Toda la noche
Etanol 100 %	60

**Tabla 3.** Deshidratación del tejido con etanol.

### **B. Infiltración con parafina.**

Superada la etapa anterior, no es posible aún impregnar el tejido con parafina ya que tampoco es miscible en etanol. Por tanto éste se sustituyó por xileno, que se comporta como un agente diafanizante ya que es soluble tanto en etanol como en la parafina fundida. Para ello, se eliminó la solución de etanol absoluto y se reemplazó por la mezcla de etanol-xileno a diferentes concentraciones (Tabla 4).

<b>Solución</b>	<b>Tiempo (minutos)</b>
Etanol 75 % - Xileno 25 %	30
Etanol 50 % - Xileno 50 %	30
Etanol 25 % - Xileno 75 %	30
Xileno 100 %	3 x 60

**Tabla 4.** Sustitución de etanol por xileno.

Finalmente, se descartó la última solución y se sustituyó por 10 ml de xileno 100 % en cada vial, a los que se le añadieron 20 pastillas de parafina (Paraplast embedding

media, paraplast plus; Sigma) dejándose la mezcla toda la noche a temperatura ambiente. A la mañana siguiente, sólo parte de las pastillas se habían disuelto en el disolvente. En este momento, los viales se incubaron a 42°C para permitir que las pastillas acabaran de fundirse totalmente (lo que sucedió en 1 hora aproximadamente). Al mismo tiempo se fundieron pastillas de parafina en un recipiente de vidrio que se colocó en un horno a 57-62°C. La parafina fundida se añadió a los viales conteniendo la mezcla tejido / xileno / parafina hasta que estuvieron  $\frac{3}{4}$  partes llenos, y se agitaron para mezclar la parafina fundida con el xileno. La mezcla se incubó a 42°C durante 4 horas (también se podía dejar toda la noche). A continuación, se eliminó la solución de cada vial y se añadió parafina fundida, mezclando por agitación e incubando a 57-62°C, al menos durante 4 horas. Este proceso se repitió 6 veces más, realizando 2 cambios diarios. Al final del proceso, la parafina había penetrado en el tejido, reemplazando por completo el agente diafanizante.

#### **9.4.2 Preparación de los bloques de parafina.**

Se colocaron moldes de papel sobre una placa caliente a 60°C. Seguidamente se vertió el tejido junto con la parafina fundida en el interior de los moldes pre-calentados de forma que la parafina cubriese totalmente cada de tejido. Antes de que la parafina se solidificase se orientó el tejido dentro de cada molde con la ayuda de unas pinzas o pipeta *Pasteur* calientes. A continuación se desconectó la placa calefactora y se dejó que los bloques solidificasen a temperatura ambiente durante toda la noche. A la mañana siguiente, los bloques ya solidificados se recogieron y se guardaron a 4°C hasta su uso.

#### **9.4.3 Preparación de los portaobjetos con poli-L-lisina.**

Durante todos los tratamientos de los cortes de tejidos era necesario que las secciones se mantuviesen adheridas a los portaobjetos. Por este motivo los

portaobjetos fueron tratados con poli-L-lisina, que genera una superficie adhesiva y provoca que las secciones de tejido queden fijadas.

**Método:**

- 1- Colocar los portaobjetos dentro de una gradilla de acero inoxidable (Shandon Lipshaw, EEUU) y lavarlos con mezcla crómica durante toda la noche.
- 2- Lavar con agua MilliQ autoclavada durante 1 hora, cambiando el agua cada 15 minutos.
- 3- Lavar con acetona durante 15 minutos.
- 4- Secar los portaobjetos a 100°C durante 2 horas.
- 5- Adicionar a cada portaobjetos 8  $\mu$ l de poli-L-lisina (1 mg/ml disuelta en agua estéril) y expandir por toda la superficie con la ayuda de un cubreobjetos.
- 6- Secar a 42°C en una placa calefactora (Histoplate Jung, Leica) durante 2 horas.

**9.4.4 Obtención de los cortes de tejidos.**

Para la obtención de las secciones de tejidos, los bloques se fijaron sobre un soporte plástico adaptable al brazo del micrótopo. Con la ayuda de un bisturí se eliminó el exceso de parafina y se perfiló el bloque de forma tal que quedase en forma trapezoidal. La base mayor del trapecio se fijó con parafina fundida sobre un soporte, mientras que la base menor constituía la zona de corte. Dicho soporte no es más que la mitad de un *Tissue-embedding cassette* suministrado por Leica. Se partió de bloques de parafina que se dejaron a -20°C durante 1 hora antes de empezar a cortar, lo que aumentó considerablemente la calidad de las secciones. Los bloques se colocaron en el micrótopo RM 2045 (Leica) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se efectuaron cortes de 8  $\mu$ m, que se depositaron con la ayuda de un pincel fino en un baño histológico con agua MilliQ autoclavada a 45°C con el fin de evitar la formación de pliegues que posteriormente dificultarían la visión de la preparación al microscopio. Las secciones se dejaron flotar en la superficie de agua caliente hasta que se estiraron

completamente, y entonces se “pescaron” con la ayuda de un portaobjetos previamente tratado con poli-L-lisina.

Las secciones ya recogidas en los portaobjetos, se colocaron sobre una placa calefactora a 37°C (Histoplate Jung, Leica) durante toda la noche, con el fin de eliminar por completo el agua remanente.

#### 9.4.5 Tratamiento de los cortes de tejidos.

El tratamiento de las muestras tenía como objetivo desparafinar los cortes de tejidos y prepararlos para la inmunolocalización, manteniendo intacta la morfología del tejido. Se sumergieron los portaobjetos que contenían las secciones de tejidos en 2 baños de xileno al 100% para desparafinar, a lo que siguió una hidratación progresiva de las secciones (Tabla 5).

Solución	Tiempo (minutos)
Xileno 100 %	2 x 10
Xileno 50% - etanol 50 %	5
Etanol 100 %	2 x 2
Etanol 90 %	2
Etanol 70 %	2
Etanol 50 %	2
Etanol 30 %	2
Agua MilliQ	2 x 5

**Tabla 5.** Eliminación de parafina e hidratación de las secciones a concentraciones decrecientes de etanol.

Todas las incubaciones se llevaron a cabo en cubetas de vidrio de 250 ml de capacidad (Shandon Lipshaw, EEUU), donde 20 portaobjetos colocados en gradillas de

acero inoxidable (Shandon Lipshaw, EEUU) quedaban totalmente sumergidos en las disoluciones.

#### 9.4.6 Inmunohistoquímica.

La inmunohistoquímica permite la detección de proteínas específicas en secciones de tejidos. Se utilizó el Kit Universal Elite Vectastain ABC (Vector Laboratories).

##### **Método:**

- 1- Inhibir la peroxidasa endógena con 0,3 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disuelto en metanol durante 30 minutos.
- 2- Realizar un lavado rápido con PBS 1X. Lavar 10 minutos más con PBS 1X.
- 3- Incubar durante 30 minutos con la solución de bloqueo.
- 4- Diluir el anticuerpo anti-FALDH (dilución 1/100) e incubar las secciones de tejido durante 1 hora.
- 5- Realizar 2 lavados durante 5 minutos cada uno con PBS 1X.
- 6- Incubar durante 30 minutos con el anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG de conejo (dilución 1/200) diluido en solución de bloqueo.
- 7- Lavar 2 veces con PBS 1X durante 5 minutos.
- 8- Incubar las secciones de tejidos con el reactivo ABC durante 30 minutos.
- 9- Lavar 5 minutos con PBS 1X.
- 10- Revelar por detección de peroxidasa con la solución DAB de revelado.
- 11- Esperar la aparición de color entre 5 y 10 minutos. (El DAB da un producto insoluble de color marrón).
- 12- Parar la reacción de color con agua.

##### **Soluciones:**

- Solución de bloqueo: 15 % (v/v) de suero de caballo disuelto en PBS 1X.



- Reactivo ABC: 30  $\mu$ l de reactivo A disuelto en 1,5 ml de PBS 1X y 0,1 % de Tween 20. Adicionar 30  $\mu$ l de reactivo B. Mezclar bien y dejarlo 30 minutos antes de ser utilizado.
- Solución DAB: 0,012 g de DAB (Diaminobenzidina) disuelta en 24 ml de PBS 1X y 8,4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 %.

#### 9.4.7 Montaje de las preparaciones.

Esta última fase constituye la manipulación final a la que se somete la preparación antes de pasar a la observación directa. Para ello se extrae el agua residual de las secciones mediante una serie de tratamientos con mezclas de alcohol-xileno. Las soluciones se deshidrataron en soluciones crecientes de etanol y se incubaron en xileno (Tabla 6).

Solución	Tiempo (minutos)
Agua MilliQ	5
Etanol 30 %	1
Etanol 50 %	1
Etanol 70 %	1
Etanol 90 %	1
Etanol 100 %	2 x 1
Xileno 50% - etanol 50 %	1
Xileno 100 %	2 x 1

**Tabla 6.** Deshidratación de las secciones a concentraciones crecientes de etanol e incubación con xileno.

Por último, las muestras se secaron 5 minutos a temperatura ambiente, se dispensaron unas gotas de medio de montaje ENTELLAN<sup>®</sup> (Merk) y se colocaron los cubreobjetos sobre las secciones de tejidos.

## 9.5. Localización de la FALDH por microscopía electrónica.

Con la finalidad de estudiar la localización intracelular de la proteína FALDH de *A. thaliana*, se realizaron experimentos de localización inmunocitoquímica sobre cortes ultrafinos de hoja que posteriormente se observaron al microscopio electrónico. Se utilizaron plantas crecidas en medio líquido, tal y como se explicó en el Apartado 4.3. Para obtener resultados óptimos, fue importante la correcta manipulación de la muestra utilizando pinzas y evitando el daño mecánico. La hoja que se quería fijar se colocó rápidamente dentro de una gota de fijador encima de una lámina fina de parafina que permitía cortarla de una forma sencilla y cómoda. La medida idónea final de la muestra fue de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> para el microscopio de transmisión. Hay que tener presente que los cortes deben de tener una forma rectangular, para poder conservar la orientación a la hora de hacer los bloques y la ultramicrotomía. Los trocitos de tejido seleccionados se colocaron dentro de un vial de vidrio que contenía el fijador (3/4 partes del vial). Las soluciones fijadoras utilizadas, muy tóxicas, obligan a realizar todas las manipulaciones dentro de una campana extractora y con guantes.

### 9.5.1 Ultraestructura.

Para la observación del tejido por microscopía electrónica, éste se incluyó en la resina Spurr. Dicha resina no es apropiada para ensayos de inmunolocalización pero sí para la observación de estructuras celulares ya que conserva los tejidos en mejor estado.

#### 9.5.1.1 Fijación del tejido.

Se utilizó una mezcla de paraformaldehído y glutaraldehído. El paraformaldehído penetra rápidamente y fija las estructuras celulares y el glutaraldehído las estabiliza permanentemente, produciendo puentes transversales entre las proteínas.

**Método:**

- 1- Incubar las muestras en solución fijadora.
- 2- Aplicar vacío durante 5 horas para que la solución fijadora penetre bien en las muestras.
- 3- Incubar a 4°C durante 24 horas.
- 4- Cambiar la solución fijadora por la solución de lavado. Todos los lavados se realizan a 4°C.
- 5- Incubar con la solución de lavado 4 veces durante 10 minutos.

**Soluciones:**

- Solución de fijación: 2 % paraformaldehído y 2,5 % glutaraldehído, disueltos en tampón fosfato de sodio 0,1M y pH 7,4.
- Solución de lavado: Tampón fosfato de sodio 0,1M y pH 7,4.

**9.5.1.2 Osmificación del tejido.**

El tetróxido de osmio es un fijador muy útil y su interés reside en su reactividad con una gran variedad de componentes celulares, en su total solubilidad tanto en fase acuosa como lipídica y en su forma compacta que asegura su penetración rápida. Estos factores junto a su potente capacidad de inhibición enzimática, le hacen ser un agente “destructor” muy eficaz. Además estabiliza y tiñe muchos componentes, en particular las importantes membranas fosfolipídicas del citoplasma. El procedimiento seguido es el que se describe a continuación.

**Método:**

- 1- Sustituir la solución de lavado del Apartado anterior por la solución de post-fijación.
- 2- Incubar a 4°C durante 24 horas.
- 3- Cambiar la solución de post-fijación por agua destilada.
- 4- Incubar con agua destilada durante 2 minutos a 4°C.

5- Realizar 2 lavados más con agua destilada, uno de 5 minutos y otro de 10 minutos a 4°C.

6- Cambiar el agua destilada e incubar a 4°C durante toda la noche.

**Soluciones:**

- Solución de post-fijación: 1 % tetróxido de osmio y 0,8 % de ferrocianuro de potasio, disueltos en tampón fosfato de sodio 0,1M y pH 7,4.

**9.5.1.3 Deshidratación del tejido.**

El agente deshidratante del tejido para la inclusión en la resina Spurr fue la acetona.

**Método:**

1- Incubar las muestras en acetona al 50%, a 4°C, durante 10 minutos.

2- Incubar las muestras en acetona al 70% durante 20 minutos, a 4°C, cambiando la solución cada 10 minutos.

3- Incubar las muestras en acetona al 90%, a 4°C, durante 30 minutos, cambiando la solución cada 10 minutos.

4- Incubar las muestras en acetona al 96%, a 4°C, durante 30 minutos, realizando cambios de solución cada 10 minutos.

5- Por último, incubar las muestras en acetona al 100%, a 4°C, durante 45 minutos, cambiando la solución cada 10 minutos.

**9.5.1.4 Inclusión en la resina Spurr.**

La resina Spurr pertenece al grupo de resinas llamadas epoxi por las características de sus componentes. Esta mezcla de polímeros de tipo epoxi tiene puentes transversales y son por consiguiente insolubles en todos los solventes. Sin embargo tienen la ventaja de proteger a las estructuras celulares de la distorsión que puede

producirse mientras se observan al microscopio electrónico. Es necesario mezclar bien todos los componentes de la resina y, en caso de que se formen burbujas, debe dejarse reposar dentro o fuera de la estufa, hasta que aquellas desaparezcan. El proceso de inclusión se detalla a continuación.

**Método:**

- 1- Incubar las muestras en solución acetona / resina (3:1) durante 5 horas y con agitación.
- 2- Incubar en acetona / resina (2:2) durante toda la noche y con agitación.
- 3- Incubar en acetona / resina (1:3) durante toda la noche y con agitación.
- 4- Incubar en resina pura durante 7 horas y con agitación.
- 5- Realizar un cambio con resina pura y dejar incubando toda la noche a 4°C con agitación.
- 6- Polimerizar durante 48 horas a 60°C.
- 7- Conservar los bloques a temperatura ambiente. A partir de este momento los bloques están listos para realizar los cortes ultrafinos.

**Componentes de la resina Spurr:**

- 10 g ERL 4206 (4-vinylcyclo-hexene dioxide) (resina epoxi)
- 6 g DER 736 (epichlorohydrin-polyglycol epoxi resin) (flexibilizador)
- 26 g NSA ((2-nonen-1-YL) succinic anhydride) (endurecedor)
- 0,4 g DMAE S-1 (2 -dimethylaminoethanol 99 %) (acelerador)
- 0,8 g DBP (dibutyl phthalate) (plastificante)

**9.5.2 Inclusión del tejido en la resina Lowicryl K4M.**

La resina utilizada para incluir las muestras con las que posteriormente se realizaría la inmunolocalización fue Lowicryl K4M. Dicha resina es hidrofílica, de baja viscosidad a temperaturas bajas (hasta -35°C). Las propiedades hidrofílicas de esta resina le

confieren dos ventajas: durante la deshidratación e infiltración la muestra puede mantenerse parcialmente hidratada y es muy útil para técnicas de inmunomarcaje. Además polimeriza con luz ultravioleta (360 nm) y esta fotopolimerización es independiente de la temperatura (los bloques pueden polimerizar a la misma temperatura a la que se produce la infiltración).

#### **9.5.2.1 Fijación del tejido.**

Con el objetivo de mantener la antigenicidad de la proteína, se llevo a cabo una fijación suave, utilizando un porcentaje bajo de glutaraldehído. El procedimiento seguido es el que se describe a continuación.

##### **Método:**

- 1- Incubar las muestras en solución fijadora.
- 2- Aplicar vacío durante 5 horas para que la solución fijadora penetre bien en las muestras y estas no queden flotando.
- 3- Incubar a 4°C durante 24 horas.
- 4- Cambiar la solución fijadora por la solución de lavado. Todos los lavados se realizan a 4°C.
- 5- Incubar con la solución de lavado 5 minutos. Cambiar dicha solución e incubar otra vez 5 minutos.
- 6- Efectuar 3 lavados más, de 10 minutos cada uno.
- 7- Tras los lavados, incubar las muestras en solución de bloqueo durante 30 minutos, a 4°C (realizar un cambio de la solución a los 15 minutos).
- 8- Volver a lavar a 4°C con la solución de lavado, durante 40 minutos, realizando cambios cada 10 minutos.
- 9- Realizar un último lavado durante 20 minutos a 4°C.

**Soluciones:**

- Solución de fijación: 4% paraformaldehído y 0,5 % glutaraldehído, disueltos en tampón fosfato de sodio 0,1M y pH 7,4.
- Solución de lavado: Tampón fosfato de sodio 0,1M y pH 7,4.
- Solución de bloqueo: Cloruro de amonio 150 mM.

**9.5.2.2 Deshidratación del tejido.**

Este proceso implica una disminución progresiva de la temperatura a medida que la concentración del agente deshidratante (que en este caso es el etanol) aumenta.

**Método:**

- 1- Incubar las muestras a 4°C en etanol al 25 %, durante 30 minutos.
- 2- Incubar las muestras en etanol al 50 % a –20°C durante 60 minutos. A partir de este momento y hasta el final, las muestras deben permanecer en constante agitación (agitador de rotación) y dentro del congelador (las manipulaciones se llevan a cabo en el interior del congelador sin sacar al exterior las muestras).
- 3- Incubar las muestras en etanol al 70 % a –35°C durante toda la noche.
- 4- Incubar las muestras en etanol al 90 % a –35°C y durante 90 minutos.
- 5- Incubar por último las muestras en etanol al 100 % a –35°C durante 3 horas, realizando un cambio de la solución al cabo de 2 horas.

**9.5.2.3 Infiltración y polimerización.**

La resina Lowicryl K4M consta de 3 componentes: Crosslinker A, Monómero B y Iniciador C. La mezcla de dichos componentes debe hacerse evitando la incorporación de oxígeno porque interferiría en la polimerización. Esto se realiza por burbujeo de gas nitrógeno con la ayuda de una pipeta *Pasteur*. La resina es muy tóxica por lo que se recomienda utilizar guantes y evitar inhalar los vapores que se desprenden.

**Método:**

- 1- Atemperar la resina a  $-35^{\circ}\text{C}$ .
- 2- Incubar las muestras en una mezcla de etanol : resina, 3:1, durante 4 horas, a  $-35^{\circ}\text{C}$  y con agitación.
- 3- Incubar en una mezcla de etanol : resina, 2:2, durante toda la noche, a  $-35^{\circ}\text{C}$  y con agitación.
- 4- Incubar en una mezcla de etanol : resina, 1:3, durante 3 horas, a  $-35^{\circ}\text{C}$  y con agitación.
- 5- Incubar en resina pura durante toda la noche, a  $-35^{\circ}\text{C}$  y con agitación.
- 6- Realizar un cambio con resina pura y dejar incubando toda la noche, a  $-35^{\circ}\text{C}$  y con agitación.
- 7- Al día siguiente realizar una última incubación de 1 hora en resina pura e incluir cada muestra individual en una cápsula de gelatina rellena con resina (para introducirlas utilizar un palillo), cerrar las cápsulas intentando que entre el mínimo de aire posible e incubarlas a  $-35^{\circ}\text{C}$  durante 60 minutos.
- 8- Polimerizar la resina con luz ultravioleta durante 48 horas a  $-35^{\circ}\text{C}$ . A partir de ese momento, los bloques (cada cápsula con una muestra individual constituye un bloque) están listos para ser manipulados. Antes de comenzar con el inmunomarcaje, se realiza sobre ellos un primer corte denominado semifino, que puede ser observado al microscopio óptico y que permite confirmar exactamente en que zona concreta del tejido se está trabajando. A continuación se efectúan los cortes ultrafinos y se depositan sobre rejillas de oro.

**Componentes de la resina Lowicryl K4M:**

- 3,6 ml Crosslinker A, 16,4 ml Monómero B, 0,1g Iniciador C (todos de la casa comercial ANAME, Madrid, España).



### 9.5.3 Inmunolocalización.

Las reacciones se realizan a temperatura ambiente, depositando las rejillas de oro sobre gotas de distintas soluciones. Dichas rejillas se colocan con la cara donde está colocado el corte hacia abajo, para que el tejido quede en contacto con la gota. Para optimizar los resultados, es importante filtrar todas las soluciones con un filtro Millipore de 0,2  $\mu\text{m}$  antes de su uso.

#### **Método:**

- 1- Colocar cada rejilla sobre una gota de 15  $\mu\text{l}$  de solución de bloqueo durante 30 minutos.
- 2- Diluir el anticuerpo primario en solución de bloqueo e incubar las rejillas con esta dilución durante toda la noche.
- 3- Lavar las rejillas 4 veces durante 5 minutos con la solución de bloqueo.
- 4- Preparar una solución (la dilución depende del lote) de proteína A-oro y centrifugarla 1 minuto a 1000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf. Incubar las rejillas durante 1 hora en esta solución.
- 5- Lavar 3 veces durante 5 minutos en gotas de tampón PBS.
- 6- Lavar 4 veces durante 5 minutos en gotas de agua destilada.
- 7- Dejar secar las rejillas un mínimo de 24 horas.
- 8- Contrastar las rejillas incubando durante 5 minutos en solución de acetato de uranilo, y a continuación durante 1 minuto con el reactivo de Reynolds.

#### **Soluciones:**

- Solución de bloqueo: 1% ovoalbúmina en tampón PBS y Tween 0,1 %.
- PBS 10X (1 L): 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Ajustar a pH 7,4.
- Acetato de uranilo: 0,1 g de acetato de uranilo disuelto en 5 ml de agua.

- Reactivo de Reynolds: 1,33 g  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , 1,76 g  $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)2\text{H}_2\text{O}$ , 2 g NaOH. Disolver primero el  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  y el  $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)2\text{H}_2\text{O}$  en 30 ml de agua destilada y luego añadir NaOH y enrasar a 50 ml con agua caliente.

#### **9.5.4 Observación al microscopio electrónico.**

Se realizaron cortes ultrafinos de 60-80 nm y se montaron en rejillas de oro que fueron contrastadas con 2% de acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras fueron preparadas y observadas en el Servicio de Ultramicrotomía de la Universidad de Barcelona, utilizando un microscopio electrónico Hitachi H-600 AB (Hitachi, Ltd, Tokio, Japón).

### **10. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS.**

La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS fue realizada según el procedimiento descrito por Laemmli (1970) en un sistema de minigel vertical (Bio-Rad, Mini-Protean II), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Para la separación de las proteínas por esta técnica, se las desnaturaliza en un medio reductor a  $95^\circ\text{C}$  y en presencia del detergente SDS, y se mantienen las condiciones desnaturalizantes durante el proceso de electroforesis. El SDS se une a las proteínas desnaturalizadas, impidiendo que éstas se reestructuren. Además, neutraliza los aminoácidos cargados de las proteínas, haciendo que se comporten como si tuvieran una relación carga-masa idéntica. Gracias a la presencia del detergente y al pH ligeramente básico del tampón de la electroforesis, se consigue que todas las proteínas migren hacia el ánodo al someterlas a un campo eléctrico. El agente reductor, el  $\beta$ -mercaptoetanol, presente en el tampón de carga, rompe los puentes disulfuro de las proteínas favoreciendo su desestructuración.

Este tipo de electroforesis se llevó a cabo en un gel compuesto por dos fases: un gel superior o concentrador y un gel inferior o de separación. El primero es de un tanto por ciento de acrilamida más bajo y un pH de 6,8. El segundo es de un tanto por ciento de acrilamida superior y un pH de 8,8. Esta diferencia de pH entre los dos geles genera un gradiente de voltaje que provoca una aceleración de las proteínas y el consiguiente apilamiento de estas en el frente electroforético. Ello tiene un efecto concentrador, que llega a su máximo justo antes de entrar en el gel inferior, obteniéndose la máxima resolución.

Como patrones de peso molecular se utilizó una mezcla de proteínas compuesta por albúmina de suero bovino (66 000 dalton), ovoalbúmina (45 000 dalton) y anhidrasa carbónica (29 000 dalton).

### **Método:**

#### **- Preparación del gel.**

- 1- Ensamblar el sistema Mini-Protean II de Bio-Rad y preparar el gel separador. Verter el gel con una pipeta *Pasteur* (sin que se formen burbujas) hasta que el frente alcance los 5 cm de altura. Acto seguido, añadir sobre el frente aproximadamente 0,5 ml de agua destilada de manera que se forme una capa regular sobre el gel. Dejar polimerizar el gel durante 30 minutos.
- 2- Desechar el agua destilada y añadir el gel concentrador hasta arriba del todo. Introducir el peine y dejar polimerizar durante 20-30 minutos.
- 3- Retirar el peine, ensamblar el sistema de electroforesis y añadir tampón de electroforesis 1X.

#### **Electroforesis.**

- 1- Diluir las muestras en tampón de carga, a una relación 3:1 (muestra : tampón). A continuación, calentar las muestras durante 5 minutos a 100°C. Finalmente, aplicar las muestras en los bolsillos del gel.

2- Conectar el aparato de electroforesis a una fuente de alimentación eléctrica a 15 mA, hasta que el colorante haya travesado el gel concentrador. A continuación, aumentar el amperaje a 50 mA. Cuando el colorante haya atravesado el gel separador, parar la electroforesis.

#### **Gel separador (12.5% de poliacrilamida)**

- 3 ml Solución A
- 1,9 ml Solución C
- 112  $\mu$ l Persulfato de amónico al 10%
- 5  $\mu$ l TEMED
- 2,5 ml de agua destilada

#### **Gel concentrador**

- 300  $\mu$ l Solución A
- 444  $\mu$ l Solución B
- 28  $\mu$ l Persulfato de amónico al 10%
- 5 $\mu$ l TEMED
- 1 ml de agua destilada

#### **Soluciones:**

- Tampón de electroforesis (1 litro): 30 g Tris/HCl pH 8,4, 144 g de glicina, 100 ml de SDS 10%. Completar con agua destilada hasta 1 litro.
- Tampón de carga 3X (100 ml): 30 ml de glicerol, 30 ml de SDS 10%, 3,75 g de azul de bromofenol, 7,5 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol, 32,7 ml de solución B. Completar con agua destilada hasta 100 ml.
- Solución A: Acrilamida 30%, Bisacrilamida 0,8%
- Solución B: 1,5 M Tris / HCl pH 8,8, SDS 0,4%
- Solución C: 1,5 M Tris / HCl pH 6,8, SDS 0,4%

### 10.1 Tinción de proteínas en geles SDS-PAGE con Coomassie Blue.

Una vez terminada la electroforesis, se sumergen los geles en la solución colorante y se mantienen durante 20 minutos. La decoloración se realizó por medio de varios lavados con la solución decolorante, que finaliza cuando el contraste entre el azul de las bandas electroforéticas y el del fondo es el deseado.

#### **Soluciones:**

- Solución colorante: Metanol 30%, ácido acético 8%, Coomassie Blue 0,15%.
- Solución decolorante: Metanol 30%, ácido acético 8%.

### 10.2 Conservación de los geles de SDS-PAGE.

Para guardar los geles de SDS-PAGE durante mucho tiempo, se recomienda secarlos envueltos en un plástico celofán tal como se describe a continuación.

#### **Método:**

- 1- Cortar 2 trozos de plástico celofán más grandes que el gel.
- 2- Sumergir el gel y el plástico celofán en la solución de secado durante 30 minutos aproximadamente.
- 3- Colocar un trozo de plástico celofán encima de un cristal, de forma tal que quede bien estirado y sin arrugas, poner encima el gel y después cubrirlo con el otro trozo de plástico.
- 4- Sujetar los plásticos al cristal con 4 pinzas (una por cada lado).
- 5- Dejar a temperatura ambiente hasta que la solución de secado esté completamente evaporada (el tiempo mínimo recomendado es de 24 horas).
- 6- Quitar las pinzas y cortar el plástico al tamaño deseado (se debe tener cuidado de no cortar los bordes del gel).
- 7- Guardar a temperatura ambiente.

**Soluciones:**

Solución de secado: 20% metanol, 10% isopropanol, 2% glicerol.

**11. Detección de la actividad enzimática FALDH por tinción por actividad de plántulas de *Arabidopsis* (técnica whole-mount).**

La tinción por actividad enzimática permitió detectar la proteína FALDH en la plántula de *Arabidopsis*. Dicha tinción se basa en que en el lugar donde hay actividad enzimática FALDH se produce la oxidación del sustrato y la reducción del coenzima ( $\text{NAD}^+$ ). El poder reductor, generado al transformarse el  $\text{NAD}^+$  en NADH, se acopla al PMS, que a su vez reduce el NBT, que es el aceptor final de los electrones. El NBT reducido es insoluble y de color azul oscuro, y precipita en aquellas zonas de la planta donde se encuentra la enzima. El PMS actúa como un transportador de electrones que acelera la reacción. Se utilizó piruvato en la mezcla de reacción, para inhibir la lactato deshidrogenasa, que podía también reducir el  $\text{NAD}^+$  a NADH. El NBT es un sustrato colorimétrico para deshidrogenasas y otras oxidasas. Todos los reactivos utilizados fueron de la casa comercial Sigma. El material vegetal fue manipulado cuidadosamente con pinzas para evitar la aparición de posibles heridas.

**Método:**

- 1- Introducir las plántulas de *Arabidopsis* en un vial de centelleo conteniendo 15 ml de solución de tinción.
- 2- Aplicar vacío durante 10 minutos para que penetre bien la solución de tinción.
- 3- Incubar en un baño de temperatura a  $42^\circ\text{C}$  y en oscuridad durante 40 minutos aproximadamente.
- 4- Parar la reacción de color con agua.
- 5- Desteñir las plántulas con solución de destinción.

6- Realizar los cambios necesario de la solución de destinción hasta que la planta adquiera una apariencia traslúcida (este paso puede alargarse varios días hasta que la clorofila de la planta se disuelva en la solución y desaparezca el background).

7- Guardar las plántulas teñidas en solución de destinción y a temperatura ambiente hasta su observación.

### **Soluciones:**

- Solución de tinción: 100 mM de fosfato de sodio a pH 7,5, 9 mM de piruvato, 0,1 % de Tritón X-100, 0,6 mM de NAD<sup>+</sup> (grade AA1), 0,02 mg/ml de PMS (phenazine methosulfate), 0,2 mg/ml de NBT (nitroblue tetrazolium). Adicionar 4,8 mM de formaldehído (stock 1,15 mM) y 1 mM de glutatión reducido (stock 100 mM) que son los sustratos de la reacción resultando una concentración de 0,73 mM de S-hidroximetilglutatión.
- Solución de destinción: Etanol al 70 %.

## **12. Preparación, análisis y manipulación de DNA.**

### **12.1 Material y soluciones.**

Todo el material de vidrio y plástico se autoclavó durante 20 minutos a 120°C y 2 atmósferas de presión antes de su uso.

Las soluciones se autoclavaron en las mismas condiciones. Las soluciones termolábiles se esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada MilliQ (Millipore).

## 12.2 Extracción de DNA plasmídico de bacterias.

La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo utilizando el kit GFX™ Micro Plasmid prep (Amersham Pharmacia Biotech) para minipreparaciones, y el kit “Plasmix by Talent” (de la casa comercial Clontech) para midipreparaciones, siguiendo las instrucciones de ambas casas comerciales. Los dos métodos son sencillos, basados en la lisis alcalina (Sambrook et al., 1989), que utilizan a continuación unas pequeñas columnas con matriz de fibra de vidrio a las que se une el DNA. De esta manera se obtiene un buen rendimiento y una alta calidad de DNA libre de RNA.

### 12.2.1 Minipreparación de DNA plasmídico.

Cuando se trabaja con vectores grandes (más de 10 Kb) se obtienen mejores rendimientos realizando la extracción de DNA mediante el método de lisis alcalina (Sambrook et al., 1989) con algunas modificaciones.

#### **Método:**

- 1- Seleccionar una colonia e inocularla en un tubo estéril con 10 ml de medio TB y el correspondiente antibiótico de selección.
- 2- Incubar a 37°C y 250 rpm durante toda la noche.
- 3- Centrifugar el cultivo de bacteria saturado en 2 tubos (5 ml de cultivo en cada uno), durante 10 minutos a 4000 rpm.
- 4- Descartar el sobrenadante y añadir a cada tubo 400 µl de la Solución I (enfriada a 4°C).
- 5- Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- 6- Adicionar 800 µl de la Solución II (preparada al momento), a temperatura ambiente.
- 7- Mezclar por inversión (no vórtex) de 6 a 8 veces aproximadamente.
- 8- Incubar exactamente 5 minutos en hielo.
- 9- Adicionar 300 µl de acetato de amonio 7,5 M y pH 7,8 (debe estar frío).



Incubar 10 minutos o más en hielo.

10- Centrifugar 5 minutos a 14000 rpm a temperatura ambiente.

11- Pipetear 800  $\mu$ l de sobrenadante y depositarlos en un tubo Eppendorf nuevo. Evitar tocar el pellet.

12- Añadir 480  $\mu$ l (0,6 volúmenes) de isopropanol a temperatura ambiente. Mezclar por inversión y vórtex.

13- Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

14- Centrifugar 10 minutos a 14000 rpm a temperatura ambiente.

15- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 500  $\mu$ l de etanol al 70 % con el vórtex.

16- Centrifugar 5 minutos a 14000 rpm a temperatura ambiente.

17- Poner a secar el pellet al vacío o a 37°C.

18- Resuspender el pellet en 15 o 20  $\mu$ l de TE (pH 7,5) o agua MilliQ autoclavada. 19- Incubar a 65°C durante 20 minutos para inactivar las DNAsas y también para ayudar a la resuspensión del pellet.

20- Guardar el DNA purificado a -20°C hasta su posterior uso.

### **Soluciones:**

- Solución I: 50 mM glucosa, 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, RNAsa 100 ng/ $\mu$ l (concentración stock 10 mg/ml).
- Solución II: 0,2 M NaOH, 1% SDS.

### **12.3 Digestión con enzimas de restricción.**

Las enzimas de restricción se unen de manera específica al DNA de doble cadena y cortan en sitios específicos. Las enzimas de restricción cortan el DNA y al mismo tiempo crean extremos libres que permiten su ligación posterior a otros fragmentos de DNA. Se añade aproximadamente 1 unidad de enzima por 1  $\mu$ g de DNA, y se incuba la mezcla de la reacción durante 1 hora a 37°C.

La especificidad de las enzimas se ve alterada si se modifican las condiciones necesarias para la actividad de la enzima. Se recomienda controlar las condiciones de digestión, tales como la concentración final de glicerol, que no debe superar el 5% del volumen total de la reacción, la cantidad de enzima, que no debe ser superior a 10 U/ $\mu$ g de DNA, la fuerza iónica, el pH del tampón de digestión o la presencia de solventes orgánicos como el etanol.

Finalizada la reacción, se deposita una alícuota en un gel de agarosa para comprobar la digestión. Si es necesario, se procede a la desproteización de la muestra de DNA mediante una extracción fenol /cloroformo / alcohol isoalílico (25:24:1), seguida de precipitación con acetato de sodio y etanol.

En el caso de que el DNA deba de ser fragmentado con más de una enzima de restricción, las digestiones pueden hacerse simultáneamente siempre que las enzimas sean activas con el mismo tampón de digestión. En estos casos es importante tener en cuenta que el volumen final de la reacción sea suficientemente grande como para mantener la concentración de glicerol por debajo del 5%. Si el tampón de digestión no es el mismo para todas las enzimas, las restricciones se realizan en serie, empezando por la del requerimiento salino más bajo y rectificando la concentración salina antes de proceder a la siguiente digestión. Si esta opción no es posible, se digiere el DNA con uno solo de las enzimas, después se inactiva la enzima y se somete a la mezcla de reacción a una extracción con fenol / cloroformo / alcohol isoalílico y precipitación con acetato de sodio y etanol, para seguidamente llevar a cabo las restricciones siguientes.

#### **12.4 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.**

Para la purificación de fragmentos de DNA una vez separados en geles de agarosa, se utilizó el método de electroelución en sacos de diálisis.

**Método:**

- 1- Tras separar los fragmentos de DNA en un gel de agarosa, cortar las bandas deseadas con una hoja de bisturí. Las bandas se visualizaban en un transiluminador de luz ultravioleta por tinción con bromuro de etidio.
- 2- Colocar cada banda individual en un saco de diálisis con la base pinzada utilizando una pinza de diálisis. Añadir 0,5 ml de tampón de electroforesis, TBE 0,5X, y a continuación extraer el aire del saco y cerrar con una segunda pinza de diálisis.
- 3- Colocar los sacos de diálisis en posición horizontal dentro de la cubeta de electroforesis. El saco debe estar en posición perpendicular al campo eléctrico, y la banda de agarosa desplazada en el interior del saco hacia el polo negativo.
- 4- Electroeluir a 100 V, durante un tiempo de 20 minutos a 1 hora (según la densidad del gel de agarosa y el tamaño del fragmento). El DNA eluirá del gel y quedará en el interior del saco.
- 5- Masajear el saco y extraer con una pipeta los 0,5 ml de tampón y depositarlos en un tubo Eppendorf. Repetir la misma operación con 0,5 ml más de tampón, y recogerlo en el mismo Eppendorf. Mezclar el contenido del tubo.
- 6- Repartir la disolución de DNA en dos tubos Eppendorf (0,5 ml cada uno), hacer una extracción fenol:cloroformol:alcohol isoamílico (25:24:1). Centrifugar durante 5 minutos y transferir la capa acuosa, que contiene el DNA, a un nuevo tubo.
- 7- Añadir 1  $\mu$ l de glicógeno (20 mg/ml) y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M, pH 5,2. Mezclar. Precipitar el DNA con 2 volúmenes de etanol. Tras centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos, lavar el sedimento con etanol 70% y secar el DNA al vacío durante 10 minutos.
- 8- Resuspender el DNA en el volumen adecuado de TE ó agua.

**Soluciones:**

- TBE 10X (1 litro): 48,4 g Tris, 55 g ácido bórico, 100 ml EDTA 0,2 M y pH 8,0. Completar a 1 litro con agua MilliQ.
- TE: 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA.

### 12.5 Desfosforilación de DNA con la fosfatasa alcalina.

Una vez digerido el vector, con el fin de mejorar la eficiencia de la posterior etapa de ligación vector-inserto, se desfosforilaron sus extremos 5' para evitar la recircularización del vector linearizado.

#### **Método:**

- 1- Resuspender el vector linearizado y purificado en 70  $\mu$ l de agua MilliQ autoclavada.
- 2- Añadir 10  $\mu$ l de tampón de fosfatasa alcalina 10X, y la mitad de la cantidad apropiada de fosfatasa alcalina. Se trabajó a una relación final de 1:1 (pmoles de vector: unidades de fosfatasa alcalina). Ajustar el volumen hasta 100  $\mu$ l con agua e incubar a 37°C durante 15 minutos.
- 3- Añadir la otra mitad de fosfatasa alcalina e incubar a 55°C durante 45 min.
- 4- Añadir 26  $\mu$ l de EDTA (20 mM) e incubar a 75°C durante 10 minutos para inactivar el enzima.
- 5- Dejar que se atempere la solución a temperatura ambiente y extraer 2 veces con fenol:cloroformol:alcohol isoamílico (25:24:1). Añadir 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5,2), mezclar, y añadir 2 volúmenes de etanol absoluto. Mezclar e incubar a -20°C durante 2 horas. Centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos y secar el sedimento al vacío durante unos 10 minutos.
- 6- Disolver el vector defosforilado en el volumen apropiado de TE o agua MilliQ autoclavada.

### 12.6 Ligación de fragmentos de DNA.

Para la ligación de fragmentos de DNA con el vector se utilizó la T4 DNA ligasa, la cual en presencia de ATP, que utiliza como cofactor, repara los cortes en las cadenas de doble hebra y une los fragmentos de restricción de DNA doble hebra con extremos romos o cohesivos.

**Método:**

- 1- A 100-200 ng de vector linearizado se le añadió la cantidad de inserto necesaria para obtener una relación molar vector:inserto 1:2 ó 1:3.
- 2- Añadir 2  $\mu$ l de tampón de ligación 10X y 5 unidades de T4 ligasa para la ligación de extremos romos ó 1 unidad de T4 ligasa para la de extremos cohesivos. Ajustar el volumen hasta 20  $\mu$ l con agua MilliQ autoclavada.
3. Incubar a 16°C durante toda la noche.

**12.7 Transformación de células de *E. coli*.**

**12.7.1 Preparación de células competentes.**

La preparación de células competentes (permeabilización de la pared y membrana de las células) se ha realizado siguiendo el protocolo de tratamiento con CaCl<sub>2</sub> frío (Sambrook et al., 1989).

**Método:**

- 1- Inocular una colonia de *E. coli* en 5 ml de LB e incubar a 37°C durante 12 horas con agitación de 300 rpm.
- 2- Transferir 1 ml del cultivo anterior a 100 ml de LB, e incubar a 37°C (300 rpm). Hay que controlar el crecimiento por medida de la densidad óptica a 600 nm, hasta que se obtenga un valor de DO<sub>600</sub>= 0,5
- 3- Transferir el cultivo a dos tubos de polipropileno de 50 ml estériles y mantener durante 10 minutos en hielo. A continuación, centrifugar durante 10 minutos a 4000 rpm y 4°C. Decantar el sobrenadante.
- 4- Resuspender suavemente cada sedimento en 10 ml de 0,1 M CaCl<sub>2</sub> frío (en hielo). La resuspensión se realiza añadiendo suavemente primero 1 ml y después el resto hasta 10 ml. Agitar suavemente sin utilizar el vórtex.

5. Centrifugar durante 10 minutos a 4000 rpm y 4°C. Decantar el sobrenadante y mantener los tubos en posición invertida durante unos segundos.
6. Resuspender cada sedimento en 2 ml de 0,1 M CaCl<sub>2</sub> frío. Dejar reposar en hielo durante un mínimo de 1 hora.
7. Las células así preparadas, pueden utilizarse inmediatamente para la transformación, o guardarse en alícuotas a -80°C, para su utilización posterior.

### 12.7.2 Transformación de células competentes de *E. coli*.

Se utilizó el método de choque térmico.

#### **Método:**

- 1- Tomar una alícuota de 200 µl de células competentes. Añadir aproximadamente 1 ng de DNA plasmídico por cada 50 µl de células competentes. Mezclar suavemente y dejar en hielo durante 30 minutos.
- 2- Transferir el tubo a un baño a 42°C e incubar durante exactamente 1 minuto. Transferir rápidamente el tubo a un baño de hielo y mantener de 1 a 2 minutos.
- 3- Añadir 800 µl de LB a cada tubo e incubar durante 1 hora a 37°C con agitación suave (200 rpm máximo) para permitir que las bacterias se recuperen y expresen el marcador de resistencia al antibiótico.
- 4- Transferir unos 200 µl del cultivo de células transformadas a placas de LB agar, conteniendo el antibiótico adecuado, y repartir las células en la superficie del medio sólido.
- 5- Mantener las placas a temperatura ambiente durante 15 a 20 minutos para que absorban el líquido.
- 6- Invertir las placas e incubar a 37°C durante 12 horas (máximo 20 horas). Si la selección se realiza por resistencia a la Ampicilina, el tiempo de incubación no ha de exceder las 20 horas, ya que la β-lactamasa que es secretada al medio por los

transformantes resistentes, inactiva al antibiótico en los alrededores de las colonias, y pueden aparecer colonias, que son sensibles a la Ampicilina, llamadas colonias satélite.

### **12.7.3 Análisis de los transformantes y selección de los clones.**

Una vez separadas las moléculas de DNA recombinante en clones individuales, se procedió a la selección de los clones deseados. Para ello, de entre todos los clones positivos, se seleccionaron algunos que se inocularon en 5 ml de medio líquido LB con el respectivo antibiótico de selección. Los cultivos se mantuvieron en un incubador a 37°C y 300 rpm durante 12-16 horas. Después de la centrifugación de los cultivos, se utilizó el pellet para realizar la extracción del DNA plasmídico utilizando el método de minicolumnas de Amersham Pharmacia Biotech (Apartado 12.2). Para saber cuales eran los clones que contenían el inserto de interés, se realizaron digestiones con enzimas de restricción (Apartado 12.3). La obtención de mapas de restricción permitió determinar el tamaño del inserto ya que la longitud del vector es conocida. Los productos de digestión fueron analizados en gel de agarosa al 1% (p/v) y tinción con bromuro de etidio, y el tamaño de los fragmentos de DNA fue determinado por comparación con patrones de peso molecular de DNA comerciales. Se seleccionaron los clones con insertos de DNA del tamaño esperado.

Previamente se había separado una fracción de 800 µl de cada cultivo, a la que se le añadieron 200 µl de glicerol al 87% estéril (concentración final 15%), y la mezcla se almacenó a -80°C. Estos glicerizados son la reserva de los clones positivos con los insertos de interés.

### **12.8 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.**

Las electroforesis se realizaron sobre un soporte sólido de agarosa en tampón TBE. En estas condiciones, a pH neutro, el DNA presenta una carga negativa de manera que

sometido a un campo eléctrico migra hacia el ánodo. Las moléculas de DNA lineal migran a través del gel a una velocidad inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. De este modo, pudo determinarse el tamaño de los fragmentos de DNA de interés en relación con marcadores comerciales de peso molecular conocidos.

La electroforesis horizontal en geles de agarosa se utilizó como método general de análisis de preparaciones de DNA, y para separar, identificar o purificar fragmentos de DNA. La concentración de agarosa utilizada varió entre 0,8 y 2%, según el intervalo de tamaño de los fragmentos a separar. En general se utilizó agarosa de calidad biológica suministrada por Pronadisa.

**Método:**

- 1- Pesar la cantidad necesaria de agarosa (dependiendo del % del gel), y añadir el volumen correspondiente de tampón TBE 0,5X.
- 2- Fundir la agarosa calentándola en un horno microondas. Agitar de vez en cuando para obtener una disolución homogénea.
- 3- Cuando la disolución empieza a enfriarse, añadir bromuro de etidio hasta una concentración final de 0,2  $\mu\text{g/ml}$  (a partir de una solución stock de 10  $\text{mg/ml}$ ). Alternativamente los geles se pueden teñir después de la electroforesis.
- 4- Cuando la disolución esté tibia, llenar el molde horizontal, colocar el peine para formar los bolsillos y dejar enfriar y solidificar durante 20 a 30 minutos.
- 5- Cuando el gel esté sólido, retirar el peine, colocar el molde dentro de la cubeta de electroforesis y llenar con el tampón de electroforesis hasta cubrir el gel (2-3 mm).
- 6- Diluir las muestras en el tampón de muestras.
- 7- Aplicar las muestra en los bolsillos. Juntamente con las muestras, se aplica 1  $\mu\text{g}$  de marcadores de peso molecular.
- 8- Conectar la electroforesis a 70-90 V y dejar hasta que el colorante azul de bromofenol llegue a 2/3 del gel.



**Soluciones:**

- Tampón de electroforesis TBE 5X: 450 mM Tris, 450 mM ácido bórico, 10 mM EDTA pH 8,0.
- Tampón de muestras 6X: 0,25% azul de bromofenol, 0,25 % xileno cianol, 30 % glicerol.

**12.8.1 Tinción de los geles de agarosa y visualización del DNA.**

Si no se añadió el bromuro de etidio durante la preparación del gel, al finalizar la electroforesis, se sumerge en una solución de bromuro de etidio de 0,5 µg/ml, durante 10 a 20 minutos. A continuación, se destiñe con agua. Los geles se iluminan con luz ultravioleta a 302 nm, para analizar las bandas de DNA.

Los colorantes xileno cianol y azul de bromofenol se utilizan para visualizar el proceso de electroforesis y como marcadores aproximados de peso molecular. Para un gel de agarosa de 1,5% el xileno cianol tiene una movilidad similar a la de un fragmento de DNA de 1,9 Kb y el azul de bromofenol una movilidad similar a la de un fragmento de aproximadamente 0,4 Kb.

El bromuro de etidio contiene un grupo que se intercala entre las bases de DNA durante la tinción. Esta interacción permite detectar las bandas de DNA con luz ultravioleta (302 nm), debido a que el bromuro de etidio es fluorescente a esta longitud de onda.

**12.9 Marcaje radioactivo de sondas de DNA.**

Para marcar radioactivamente sondas de DNA, se ha seguido el método de cebadores de secuencia al azar o “random primer”, desarrollado por Feinberg y Vogelstein (1983). Este método se basa en la capacidad de la DNA polimerasa de sintetizar una nueva cadena de DNA complementaria a la cadena molde. El

procedimiento llevado a cabo está descrito en el manual suministrado con el kit de marcaje “Prime-a-Gene Labeling System” de la casa comercial Promega. Como nucleótido marcado se utilizó el  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (50  $\mu$ Ci, 3000 Ci/mmol) de Amersham Pharmacia Biotech.

**Método:**

- 1- Descongelar todos los componentes del kit excepto la enzima Klenow que ha de permanecer a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de añadirla a la reacción.
- 2- Diluir 50 ng de DNA molde con agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 30  $\mu$ l.
- 3- Desnaturalizar el DNA durante 5 minutos a  $95$ - $100^{\circ}\text{C}$ , ponerlo inmediatamente en hielo.
- 4- Añadir la mezcla de reacción: 10  $\mu$ l de labeling buffer 5X, 2  $\mu$ l de dNTP fríos, 2  $\mu$ l de BSA (10 mg/ml), 5  $\mu$ l de  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP (50  $\mu$ Ci, 3000 Ci/mmol) y finalmente 1  $\mu$ l de enzima Klenow (5 U/ $\mu$ l).
- 5- Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 6- Eliminar los nucleótidos no incorporados pasando la mezcla por una columna de exclusión molecular Sephacryl S-400 siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Amersham Pharmacia Biotech). Guardar una alícuota de 1  $\mu$ l antes de purificar la sonda de DNA.
- 7- Determinar el porcentaje de incorporación de radioactividad en el DNA. Tomar una alícuota de 1  $\mu$ l antes de pasar la sonda por la columna de exclusión y 1  $\mu$ l después de purificada, y añadirlos a sendos filtros de celulosa Whatman. Introducir los filtros en viales de centelleo de 20 ml, con líquido de centelleo biodegradable (BETAMAX<sup>TM</sup>, ICN). Realizar el recuento en un contador de centelleo 1211 Minibeta (LKB Wallac) con el programa específico para <sup>32</sup>P.

El porcentaje de incorporación de radioactividad se calculó por la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{cpm incorporadas (después de purificar la sonda)} \times 100 \%}{\text{cpm totales (antes de pasar por la columna)}} = \% \text{ de incorporación}$$

**Soluciones:**

- Kit “Prime-a-Gene Labeling System” (Promega) que contiene labeling 5X buffer (Tris-HCl 250 mM pH 8; MgCl<sub>2</sub> 25 mM; DTT 10 mM; HEPES 1mM pH 6,6); dATP, dGTP, dTTP 1,5 mM cada uno; BSA acetilada libre de ribonucleasas 10mg/ml; fragmento Klenow de la DNA polimerasa I 5 U/μl.
- Mezcla de dNTP fríos o no marcados: 1μl de cada uno de los nucleótidos (dATP, dGTP, dTTP) para tener una concentración final de 500 μM.

### **13. Preparación y análisis de RNA.**

#### **13.1 Manipulación en condiciones libres de ribonucleasas.**

Las ribonucleasas (RNAsas) son enzimas activos y resistentes incluso en condiciones extremas. Por esta razón, durante el proceso de purificación y manipulación del RNA, es importante trabajar con material, soluciones y reactivos libres de RNAsas. El material de vidrio, de porcelana o de aluminio se debe lavar cuidadosamente, esterilizar por autoclave y dejar toda la noche a 150-200°C. El material de plástico (puntas de pipetas y tubos Eppendorf) se debe autoclavar. Las soluciones se prepararon a partir de reactivos para biología molecular libres de RNAsas. En todas las manipulaciones se utilizaron guantes.

No se utilizaron inhibidores de RNAsas porque teniendo precauciones en la preparación y en la manipulación posterior del material no se observó nunca degradación del RNA. El inhibidor DEPC es sumamente tóxico, que además puede inhibir ciertas reacciones y es incompatible con el tampón Tris.

## 13.2 Extracción de RNA total células vegetales.

Para la extracción de RNA se utilizaron 2 métodos diferentes, el primero con cloruro de guanidinio y el segundo con Trizol.

### 13.2.1 Extracción de RNA utilizando cloruro de guanidinio.

El método utilizado para la purificación de RNA total de plantas corresponde al descrito por Logemann et al., 1987. Dicho método se basa en la utilización del tampón Z6 que permite inactivar las ribonucleasas endógenas durante el proceso de extracción del mRNA del tejido vegetal y preservar su calidad. El material vegetal se congela directamente en nitrógeno líquido y se guarda a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. El tejido para congelar y triturar se coloca en el interior de un tubo Eppendorf de 1,5 ml, ocupando como máximo unas  $\frac{3}{4}$  partes del volumen del tubo.

#### **Método:**

1- Enfriar el émbolo del homogenizador con nitrógeno líquido y triturar el tejido foliar hasta que se forme un polvo fino. Adicionar 200  $\mu\text{l}$  de tampón Z6 y 20  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol, y triturar hasta descongelar el tejido vegetal. Es importante que el tejido no se descongele durante la trituración, antes de adicionarle el tampón Z6 y el  $\beta$ -mercaptoetanol.

2- Adicionar 200  $\mu\text{l}$  más de tampón Z6 y continuar la trituración hasta disgregar completamente las partículas de tejido.

3- Adicionar 400  $\mu\text{l}$  de una mezcla de fenol / cloroformo / alcohol isoamílico (25:24:1), y agitar vigorosamente en el vórtex.

*Los tubos deben mantenerse en hielo hasta que se termine de macerar todas las muestras.*

4- Centrifugar a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos a 13 000 rpm. Transferir la fase acuosa a otro tubo.

5- Adicionar 0,1 volumen de ácido acético 1 M y 1 volumen de etanol 100%. Mezclar bien y dejar toda la noche a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

6- Centrifugar 20 minutos a temperatura ambiente, a 13 000 rpm.

7- Descartar el sobrenadante y adicionar al pellet 200  $\mu\text{l}$  de acetato de sodio 3 M pH 5,2. Agitar vigorosamente en el vórtex hasta desprender el pellet de RNA de las paredes del tubo. Este paso se realiza para eliminar los polisacáridos que coprecipitan con el RNA, por eso es importante lavar bien el pellet con la solución de acetato de sodio.

8- Centrifugar durante 10 minutos a 13 000 rpm. Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con 400  $\mu\text{l}$  de etanol 70%.

9- Dejar que se evapore el exceso de etanol y resuspender el pellet de RNA en 30  $\mu\text{l}$  de agua MilliQ libre de RNAsas.

#### **Soluciones:**

- Tampón Z6: 8 M de cloruro de guanidinio, 20 mM MES pH 7,0, 20 mM EDTA.
- Acetato de sodio 3 M, pH 5,2.
- Ácido acético 1 M.
- Etanol al 100 % y al 70%.

#### **13.2.2 Extracción de RNA utilizando Trizol.**

La extracción de RNA utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) se basa en la solubilidad diferencial de las moléculas (ácidos nucleicos / contaminantes) entre dos fases no miscibles. El Trizol está compuesto por una mezcla de fenol (donde los ácidos nucleicos son insolubles) y tiocianato de guanidinio (agente desnaturante de proteínas e inhibidor de proteasas) a pH 4,5. Así, la integridad del RNA se mantiene durante la extracción. La adición de cloroformo, seguida de una etapa de centrifugación permite separar la fase acuosa que contiene el RNA de la fase orgánica (proteínas y DNA). El RNA se recupera mediante una precipitación con isopropanol.

**Método:**

1- Enfriar el émbolo del homogenizador con nitrógeno líquido y triturar el tejido foliar hasta que se forme un polvo fino. Adicionar 500  $\mu$ l de Trizol, y triturar hasta descongelar el tejido vegetal.

2- Adicionar 500  $\mu$ l más de Trizol y continuar la trituración hasta disgregar completamente las partículas de tejido. (El tejido puede almacenarse en Trizol a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 1 mes).

*Los tubos deben mantenerse en hielo hasta que se termine de macerar todas las muestras.*

3- Adicionar 200  $\mu$ l de cloroformo. Agitar vigorosamente en el vórtex durante 15 segundos.

4- Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

5- Centrifugar 15 minutos a temperatura ambiente, a 12 000 rpm. Transferir la fase acuosa a otro tubo.

6- Adicionar 500  $\mu$ l de isopropanol. Mezclar bien e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

7- Centrifugar 10 minutos a temperatura ambiente, a 12 000 rpm. Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con 1 ml de etanol 75%.

8- Dejar que se evapore el exceso de etanol y resuspender el pellet de RNA en 30  $\mu$ l de agua MilliQ libre de RNAsas o en 30  $\mu$ l de formamida (el pellet se puede resuspender con la pipeta o incubándolo 10 minutos a  $60^{\circ}\text{C}$ ).

**13.3 Determinación de la concentración de RNA.**

La medida de absorbancia a las longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm, permitió determinar la concentración de ácido nucleico presente en la solución, y su grado de pureza. El espectro de absorción del RNA tiene un máximo cercano a 258 nm y un mínimo a 230 nm, pero por razones prácticas las medidas espectrofométricas se realizan a 260 nm. La absorbancia del RNA a esta longitud de onda es igual a 1 para

una solución de 40  $\mu\text{g/ml}$  (Berger, 1987). Por otra parte, la relación de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  proporciona una estimación de la pureza de la muestra de ácido nucleico. Valores comprendidos entre 1,9 y 2,0 para soluciones de RNA son indicativos de una pureza aceptable. La presencia de proteína, que absorbe a 280 nm debido a los aminoácidos aromáticos, disminuye la relación, así como la presencia de fenol (Berger, 1987). También se ha de obtener una relación de absorbancia  $A_{260}/A_{230}$  superior a 2,0. Valores inferiores indican presencia de proteína, puesto que a 230 nm absorbe el enlace peptídico de las proteínas.

### **13.4 Electroforesis de RNA en geles de agarosa-formaldehído y transferencia a membrana.**

Esta electroforesis se llevó a cabo en condiciones que asegurasen la desnaturalización del RNA, para minimizar la formación de estructuras secundarias y conseguir así que su migración electroforética fuera inversamente proporcional ( $\log_{10}$ ) a su masa molecular. Esto se consiguió añadiendo formaldehído tanto a las muestras como al gel.

Todo el material debe estar tratado como se describió previamente, para que se encuentre libre de RNAsas. El formaldehído es muy irritante y tóxico, por lo que se aconseja preparar el gel en la campana extractora.

#### **Método:**

- 1- Pesar 1 g de agarosa y adicionar 72 ml de agua libre de RNAsas y 10 ml de MOPS 10X. Fundir la agarosa en el microondas. No dejar hervir.
- 2- Dejar enfriar hasta aproximadamente 65°C y añadir 18 ml de formaldehído. Mezclar bien hasta que la solución sea homogénea. Verter el gel en el molde horizontal, colocar el peine para formar los bolsillos, y dejar solidificar.

3- Lavar la cubeta de electroforesis con etanol y agua libre de RNAsas, colocar el gel y añadir tampón MOPS 1X a ambos lados de manera que no sobrepase mucho el gel para evitar que difunda el formaldehído y se pierdan las condiciones desnaturalizantes.

4- Realizar una pre-electroforesis a 60V durante 30 minutos.

5- Preparar las muestras. Calcular los  $\mu\text{l}$  necesarios para tener 15  $\mu\text{g}$  de RNA. Ajustar el volumen de muestra con agua libre de RNAsas hasta 14,4  $\mu\text{l}$ . Adicionar 45,6  $\mu\text{l}$  de tampón de muestra. (El marcador de peso molecular se prepara igual que las muestras).

6- Calentar las muestras a 65°C durante 10 minutos. Incubar inmediatamente en hielo hasta que se vayan a cargar en el gel. Añadir 0,4  $\mu\text{l}$  de tampón de carga.

7- Cargar las muestras en el gel y aplicar 60V durante 1 hora y a continuación 100V durante 2 horas. Cada media hora se debe mezclar el tampón MOPS 1X entre los dos lados de la cubeta.

8- Una vez terminada la electroforesis, lavar el gel 3 veces durante 10 minutos cada una con agua libre de RNAsas para eliminar el formaldehído, que podría reducir la eficiencia de transferencia.

9- Mientras tanto, recortar papel de filtro del mismo tamaño del gel, hasta obtener un montón de 7-8 cm de altura. Recortar también 3 trozos de papel Whatman del mismo tamaño del gel. Del mismo modo recortar dos tiras de papel Whatman del mismo ancho del gel pero lo suficientemente largas para que sirvan de puente entre el gel y la solución de transferencia, una vez ensamblado el sistema.

10- Recortar la membrana de Nylon Nytran N (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) del mismo tamaño del gel.

11- Incubar tanto el gel como la membrana en solución SSC 10X durante 15 minutos.

12- Rellenar la bandeja de transferencia hasta un cuarto de su volumen con el tampón SSC 10X, colocar un soporte liso sobre ella (un cristal) y poner encima las dos tiras largas de papel Whatman (previamente humedecidas en SSC 10X) de forma tal que sus extremos estén en contacto con el tampón. Situar encima el gel, y encima de éste colocar la membrana con ayuda de unas pinzas, evitando la formación burbujas.



Después poner los 3 trozos de papel Whatman empapados en SSC 10X y por último toda la pila de papeles de filtro secos.

13- Cubrir todo el sistema con una película de plástico y colocar encima un peso de aproximadamente 0,5 Kg.

14- Dejar el sistema de transferencia toda la noche y al día siguiente desmontarlo y recuperar la membrana.

15- Lavar la membrana con tampón SSC 2X.

16- Fijar el RNA a la membrana de forma covalente en presencia de luz ultravioleta. Para ello se utilizó el UV Stratalinker<sup>®</sup> 1800 (Stratagene<sup>®</sup>).

17- Teñir la membrana con solución de tinción, para comprobar que la transferencia se ha realizado correctamente. La membrana puede guardarse teñida envuelta en un plástico a 4°C durante varios meses hasta su utilización.

#### **Soluciones:**

- Tampón de muestra: 30 µl Formamida 100%, 9,6 µl Formaldehído 37 %, 6 µl MOPS 10X. Completar a 60 µl con la muestra de RNA y agua MilliQ libre de RNAsas.
- Tampón de carga: Glicerol 50 %, EDTA 1 mM, Azul de Bromofenol 0,25 %.
- Tampón MOPS 10X (1L): 41,86 g MOPS, 4,1 g acetato sódico, 3,72 g Na<sub>2</sub>EDTA, 11,5 ml 10 M NaOH. Cuando se autoclava se vuelve amarillo.
- Tampón SSC 20X: NaCl 3 M, Citrato de sodio 0,3 M.
- Solución de tinción: Acetato sódico 0,3 M pH 5,2, 0,03% Azul de metileno.

#### **13.5 Prehibridación, hibridación y lavados de las membranas.**

La posición de las moléculas de mRNA de interés se determinó mediante la hibridación de la membrana con sondas específicas de DNA marcado. Se incubó la membrana con la sonda en condiciones que favorecieron la hibridación específica, puesto que la formación de los híbridos DNA-RNA es un proceso reversible en el que

intervienen varios factores que quedan reflejados en el valor de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>).

**Método:**

1- Prehibridar la membrana con la solución de prehibridación a 65°C durante 15 minutos.

2- Desnaturalizar la sonda de DNA por incubación a 95-100°C durante 5 minutos, traspasándola rápidamente a hielo. Adicionar la sonda a la solución de hibridación.

3- Hibridar la membrana con la solución de hibridación durante toda la noche a 65°C.

*La solución de hibridación debe contener al menos 10<sup>6</sup> cpm/ml de sonda marcada radioactivamente.*

4- Lavar la membrana con solución de lavado a 65°C durante 1 hora (2 cambios cada 30 minutos) para eliminar el exceso de sonda.

5- Sellar la membrana en una bolsa de plástico.

**Soluciones:**

- Solución de prehibridación e hibridación: 0,2 M Fosfato sódico pH 7,2; 1mM EDTA; 1 % BSA; 1% SDS; agua MilliQ
- Solución de lavados: Fosfato sódico 40 mM pH 7,2, EDTA 1 mM, SDS 1 %.

**13.6 Análisis de la señal radioactiva.**

La posición de los híbridos mRNA-sonda marcada se determinó por exposición de la membrana a una película para autorradiografía, juntamente con una o dos pantallas intensificadoras, durante un tiempo variable en función de la intensidad de la señal. La exposición se realizó a -80°C. La intensidad de las bandas se cuantificó mediante el sistema Molecular Image GS-525 (Bio-Rad).

## 14. Obtención de plantas transgénicas de *A. thaliana*.

Las plantas transgénicas se obtuvieron por transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando el método del vector binario.

### 14.1 Clonaje en el vector pDH51.

El vector pDH51 (Pietrzak et al., 1986) se cortó con las enzimas *Bam*HI y *Pst*I. Al mismo tiempo, el cDNA codificante por la FALDH se obtuvo por digestión con *Pst*I y *Bgl*II, a partir del clon obtenido en el vector pBluescript SK +/- (Martínez, et al., 1996). Se realizó la ligación a una relación molar DNA vector: DNA inserto de 1:3. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de la cepa de *E. coli* MC 1061, y los transformantes se seleccionaron en placas de LB-agar conteniendo 75 µg/ml de Ampicilina. La presencia del inserto se comprobó por digestión con *Eco*RI.

### 14.2 Construcción pBin19/FALDH.

Se digirió el vector pBin19 (Bevan, 1984) con la enzima de restricción *Eco*RI, y la construcción pDH51-FALDH con la misma enzima. Se realizó la ligación a una relación molar 1:3. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de la cepa de *E. coli* 1061, y los transformantes se seleccionaron en placas LB-agar conteniendo 30 µg/ml de kanamicina.

### 14.3 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

#### 14.3.1 Preparación de células competentes.

**Método:**

1- Inocular una colonia de *A. tumefaciens* C58C1 (Zambryzki et al., 1983) en 10 ml de medio de cultivo YEP conteniendo 150 µg/ml de rifampicina. Incubar a 28°C con agitación, durante 24h aproximadamente.

2- Inocular 50 µl del cultivo anterior en 50 ml de medio YEP conteniendo 150 µg/ml de rifampicina. Incubar a 28°C hasta obtener una DO<sub>600</sub> de 0,5 (20 horas aproximadamente).

3- Centrifugar las células a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C. A partir de este momento hay que mantener las células en frío y manipularlas con cuidado.

4- Resuspender suavemente el sedimento de células en 10 ml de solución de NaCl 0,15 M, atemperada a 4°C.

5- Repetir la misma centrifugación que en el punto 3 y resuspender el sedimento de células en 1 ml de solución de CaCl<sub>2</sub> 20 mM, previamente enfriada en hielo.

6- Repartir las células competentes en alícuotas de 200 µl, congelarlas en nitrógeno líquido y guardarlas a -80°C hasta su uso.

#### 14.3.2 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

**Método:**

1- Añadir 1 µg de DNA plasmídico a una alícuota de 200 µl de células competentes, mezclar, e incubar en hielo durante 30 minutos.

2- Introducir la muestra en nitrógeno líquido durante 1 minuto y seguidamente en un baño a 37°C durante otro minuto.

3- Añadir 1 ml de medio YEP a la muestra e incubar durante 3-4 horas a 28°C con agitación suave.

4- Sedimentar las células transformadas centrifugando 5 minutos a 2000 rpm en una centrífuga Eppendorf.

5- Resuspender las células en 200  $\mu$ l de medio YEP y sembrarlas en una placa de Petri con YEP suplementado con rifampicina (150  $\mu$ g/ml) y kanamicina (25  $\mu$ g/ml). Incubar las placas a 28°C protegidas de luz, durante 3 días aproximadamente (hasta la aparición de colonias).

6- Seleccionar algunas colonias e inocular en 3 ml de medio YEP con rifampicina (150  $\mu$ g/ml) y kanamicina (60  $\mu$ g/ml). Crecer los cultivos hasta saturación a 28°C y con agitación.

7- Realizar la extracción de DNA por el método de minipreparación de DNA plasmídico (Apartado 12.2.1). Comprobar los clones positivos por reacción de PCR y mediante digestión con enzimas de restricción.

#### **14.4 Infiltración de plantas de *A. thaliana* con cultivos de *Agrobacterium tumefaciens*. Selección de semillas transgénicas.**

##### **Método:**

1- Crecer las plantas de *Arabidopsis* a 22°C, con un fotoperíodo de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, para potenciar el crecimiento de las hojas de la roseta basal. Al cabo de 4 semanas cambiar el fotoperíodo para que las plantas inician el ciclo de reproducción.

2- Cuando las plantas tengan ya el tallo primario desarrollado, seccionarlo con un bisturí en la base para promover la aparición de tallos secundarios (interesa que las plantas a transformar sean frondosas y contengan el mayor número posible de inflorescencias). Repetir esta operación de 3 a 4 veces.

3- Cuando las plantas estén listas para ser infiltradas (8-9 semanas desde que fueron transplantadas), realizar una estría a partir de un cultivo congelado de *Agrobacterium* transformado con el DNA de interés, en una placa de medio YEP suplementado con

kanamicina 30  $\mu\text{g/ml}$  y rifampicina 50  $\mu\text{g/ml}$ . Incubar a 28°C hasta que crezcan las colonias (aproximadamente dos días).

4- Escoger una colonia individual e inocular con ella un cultivo de 10 ml de medio YEP con kanamicina (30  $\mu\text{g/ml}$ ) y rifampicina (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Crecer el cultivo durante 24 h con agitación a 200 rpm, y 28°C.

5- Inocular 1 ml del cultivo anterior en 750 ml de YEP con rifampicina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) y kanamicina (30  $\mu\text{g/ml}$ ). Crecer el cultivo durante 24 horas con agitación a 200 rpm, y 28°C.

6- Controlar el crecimiento del cultivo por determinación de la densidad óptica a 600 nm hasta que se obtenga un valor de 0,8 a 1. Sedimentar las células a 3000 rpm durante 15 minutos y 4°C. Resuspender el sedimento celular en la solución de infiltración. Las células deben quedar resuspendidas en aproximadamente 1/3 de su volumen inicial.

7- Preparar los tiestos con las plantas a infiltrar, retirando las hojas muertas y presionando la tierra fuertemente.

8- Llenar un recipiente con la solución de infiltración. Agitar suavemente dicha solución e introducir los brotes florales de la planta en el líquido. Dejar la planta en contacto con la solución entre 15 y 20 segundos.

9- Cubrir la planta con un plástico durante 24 horas para mantener la humedad e introducirlas en el incubador a 22°C y con un fotoperíodo de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad.

10- Al cabo de una semana, repetir la infiltración a partir del paso 4.

11- Poner las plantas a crecer en el incubador a 22°C en fotoperíodo de día largo hasta la recolección de las semillas.

12- Para la selección de las semillas transgénicas, sembrar las semillas obtenidas en placas de Petri con medio GM-kanamicina (60  $\mu\text{g/ml}$ ). Transplantar después a tierra las plántulas resistentes.

**Soluciones:**

- Solución de infiltración: 5 % de sacarosa y 0,03 % del tensoactivo Silwet L-77. La solución de infiltración se prepara en el momento de utilizarla y no es necesario autoclavarla.

**15. Infección de plantas de *Arabidopsis thaliana* con patógenos bacterianos y oomicetos.****15.1 Crecimiento e inoculación de bacterias.**

*Pseudomonas syringae* pv *maculicola* (*Psm*) contiene el plásmido pLAFR3 ± *avrRpm1*. Las diluciones utilizadas fueron  $10^5$  o  $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup> en 10 mM MgCl<sub>2</sub> a partir de un cultivo saturado de *Psm* crecidas en el medio KB (Apartado 3.1.4) a 30°C durante toda la noche. Dichas diluciones fueron infiltradas en hojas de *Arabidopsis* con una jeringa y se esperó entre 2 y 3 días para ver el crecimiento bacteriano en la planta. Las plantas inoculadas eran de 3 o 4 semanas de edad.

**15.1.1 Contaje de bacterias de *Pseudomonas syringae*.**

A partir del segundo o tercer día después de la inoculación con la bacteria virulenta, se hicieron pequeños discos con un perforador específico para tejido vegetal. Se introdujeron 10 discos de diferentes hojas de las plantas inoculadas en un tubo Eppendorf que contenía 200 µl de medio KB, y se homogenizaron con la ayuda de un émbolo metálico. A dicho tubo se le adicionó posteriormente 800 µl más de medio KB. Se plaquearon 100 µl de diluciones realizadas ( $10^5$  y  $10^6$ ) a partir de la suspensión anterior en placas con medio sólido KB, que contenían rifampicina a una concentración de 50 µg/ml. Se dejaron crecer las colonias durante 2 días a 30°C para proceder a su contaje. Este experimento se realizó por triplicado.

## 15.2 Crecimiento e inoculación de oomicetos.

Las cepas Noco2 y Cala2 de *Peronospora parasitica* (*Pp*), fueron suministradas por el Sainsbury Laboratory, John Innes Centre, Norwich. Para determinar la aparición de síntomas de enfermedad, las conidioesporas de *Pp* fueron disueltas en agua ( $4 \times 10^4$  esporas / ml) e inoculadas mediante spray en plantas de *Arabidopsis* de 3 o 4 semanas. Antes de infectar las plantas es necesario humedecer las bandejas donde se pondrán posteriormente los tiestos para crear una atmósfera húmeda. El spray debe hacerse muy suave y de manera tal que todas las plantas queden cubiertas con una película fina de la solución del hongo, y después se deben tapar las bandejas y cerrar bien por los bordes. Las plantas inoculadas fueron mantenidas en un incubador específico con alta humedad relativa para facilitar el crecimiento de los hongos, a 19°C con un fotoperíodo de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad ( $100$  a  $160 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ ) durante 7 días.

### 15.2.1 Contaje de esporas de *Peronospora parasitica* (*Pp*) Noco2.

#### Método:

- 1- Recolectar 5 plantas infectadas con *Pp* Noco2 en un tubo de 50 ml.
- 2- Adicionar 2 ml de agua.
- 3- Mezclar con vórtex durante 30 segundos.
- 4- Colocar una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  en la cámara contadora de esporas.
- 5- Realizar el contaje en un microscopio a un aumento de 10X y con luz clara.

## 15.3 Análisis histoquímico de muerte celular en plantas y desarrollo de *Peronospora parasitica* mediante tinción con lactophenol-trypan blue.

Tanto la necrosis de las células de *Arabidopsis* como el desarrollo de mycelium de *Peronospora parasitica* dentro de la hoja de la planta fueron analizados mediante tinción con lactophenol-trypan blue, según el método que se describe a continuación.



Esta técnica fue descrita en 1990 por Koch y Slusarenko. Se basa en la tinción de color azul de las células muertas y de los hongos que han crecido infectando la planta.

**Método:**

- 1- Diluir 1:1 la solución de tinción en 100 % etanol. Adicionar 500  $\mu$ l de la dilución en un tubo Eppendorf.
- 2- Introducir aproximadamente 5 o 6 hojas de la planta infectada.
- 3- Hervir las hojas dentro de la solución durante 1 minuto. (Se debe hacer un pequeño agujero en la tapa del tubo Eppendorf antes de hervir).
- 4- Desteñir durante 1 hora en 800  $\mu$ l de solución decolorante.
- 5- Realizar un cambio de la solución decolorante y dejar en agitación suave durante toda la noche o hasta que desaparezca toda la clorofila de las hojas.
- 6- Cambiar las hojas teñidas a un tubo limpio que contenga la solución de montaje.
- 7- Con mucho cuidado y con la ayuda de unas pinzas, colocar las hojas teñidas en un portaobjetos y observar al microscopio (Leica DMRD).

**Soluciones:**

- Solución de tinción: 10 ml de ácido láctico, 10 g de fenol, 10 ml de glicerol, 10 ml de agua, 1 mg de trypan blue. Esta mezcla debe prepararse al menos un día antes de ser utilizada.
- Solución decolorante: 2,5 g/ml de clorhidrato. Se debe preparar un día antes de ser utilizada para que se disuelva bien.
- Solución de montaje: 60 % de glicerol.

**15.4 Medida de la resistencia sistémica adquirida (SAR).**

Los experimentos para medir la resistencia sistémica adquirida (SAR) se realizaron infiltrando 2 hojas de cada planta primero con la bacteria avirulenta *Pseudomonas syringae* pv *maculicola* (*Psm*), que contenía el plásmido pLAFR3  $\pm$  *avrRpm1*. Al cabo de

2 días, se aplicó a las mismas plantas una suspensión de *Peronospora parasitica* (*Pp*) Noco2 tal como se describe en el Apartado 15.2. El análisis de resultados se realizó por contaje de esporas al cabo de 7 días de la infección con oomicetos (Apartado 15.2.1). Las plantas control fueron infiltradas con 10 mM de  $MgCl_2$  y a continuación tratadas de la misma manera con *Pp* Noco2.