



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VEHÍCULOS
MOLECULARES DE CLONACIÓN, PARA EL ESTUDIO DE LA
TRANSCRIPCIÓN EN ESCHERICHIA COLI**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

ZURITA ORTEGA, MARIO ENRIQUE

Ciudad Universitaria, Distrito Federal,

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

19 No 157

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Ciencias

CONSTRUCCION Y CARACTERIZACION DE VEHICULOS MOLECULARES
DE CLONACION, PARA EL ESTUDIO DE LA TRANSCRIPCION EN
Escherichia coli

TESIS

que para obtener el grado de

BIOLOGO

presenta

RODOLFO ENRIQUE CURITA GARCIA

[1982?]

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

	Pág.
I. <u>INTRODUCCION</u>	1
1) INGENIERIA GENETICA MOLECULAR	1
1.1 <u>Generación de Moléculas Recombinantes</u>	2
1.2 <u>Plásmidos como Vehículos Moleculares de Clonación</u>	7
1.3 <u>Fagos en E. coli como Vehículos Moleculares</u>	9
1.4 <u>Síntesis Química en DNA en Estudios de Recombinación</u> <u>In vitro</u>	10
2) SECUENCIAS REGULATORIAS INVOLUCRADAS EN LA PROMOCION DE LA TRANSCRIPCION EN <u>E. coli</u>	16
2.1 <u>Promotores</u>	17
2.2 <u>Regiones de DNA Reconocidas por Moléculas Efectoras</u>	21
2.3 <u>Regiones de DNA que Especifican Terminación de la</u> <u>Transcripción</u>	23
II. <u>JUSTIFICACION</u>	24
III. <u>ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</u>	25
IV. <u>MATERIAL Y METODOS</u>	31
V. <u>RESULTADOS</u>	52
1) CONSTRUCCION Y CARACTERIZACION DE PLASMIDOS	52
1.1 <u>Construcción del Δ360:28</u>	52
1.2 <u>Caracterización por Endonucleasas de Restricción</u> <u>del Δ360:28</u>	55
1.3 <u>Construcción del Δ37</u>	55

	Pág.
1.4 <u>Secuencia Nucleotídica de los Operadores y el Promotor Canónico en el pΔ37</u>	58
1.5 <u>Curvas de Crecimiento de la Cepa D1210 (Cepa Super-- productora de Represor Lac) Conteniendo los plásmidos pΔ36op y pΔ37 con y sin Inductor Gratuito, en Presencia de Antibióticos</u>	64
2) <u>DESARROLLO DE LA TECNICA DE MUTAGENESIS SITIO ESPECIFICA POR OLIGONUCLEOTIDOS SINTETICOS; SISTEMA DE PLASMIDO</u>	66
2.1 <u>Obtención de DNA de Plásmido en forma II</u>	68
2.2 <u>Obtención de DNA Circular de Cadena Sencilla</u>	71
2.3 <u>Condiciones de Reparación</u>	71
VI. <u>DISCUSION Y CONCLASIONES</u>	75
VII. <u>REFERENCIAS</u>	82
VIII. <u>APENDICE</u>	86

I. INTRODUCCION

1) INGENIERIA GENETICA MOLECULAR

Desde el año de 1953, en que J. Watson y F. Crick propusieron el modelo de la doble hélice con giro a la derecha, para la estructura secundaria del DNA (1), la biología molecular ha recorrido un largo y exitoso camino hasta la fecha. Parece que este gran descubrimiento encendió - la mecha de una serie de espectaculare sucesos dentro de esta rama de la Biología. Dichos acontecimientos comprendieron desde la deducción del -- código genético la forma en que, el mensaje contenido en el DNA es traducido a proteínas, previa síntesis de mRNA hasta la comprensión de la regulacion de la expresión genética en ciertos operones bacterianos (2).

Los descubrimientos realizados en los años 50's, 60's y principios de los 70's, fueron efectuados gracias al desarrollo de las técnicas de investigación en genética, bioquímica y biología molecular. Sin - embargo, el gran tamaño del genoma y su compleja organización molecular, no permitían en aquel entonces, disectar regiones específicas de DNA que, de este modo, pudiesen ser sometidas a estudios exhaustivos.

A principios de la década de los 70's, como consecuencia de - una serie de descubrimientos previos, como la identificación y caracterizacion de enzimas cuyo substrato es el DNA (3), se empezó a desarrollar - la técnica conocida como Ingeniería genética molecular o Recombinación -- in vitro de Acidos Nucléicos (4). Esta técnica permitió que el genoma -- pueda ser fragmentado y que los fragmentos sean aislados y propagados a - través de multiplicación celular o clona molecular de DNA (4).

La Ingeniería Genética Molecular puede ser descrita de la siguiente forma: dos o más fragmentos de DNA son recombinados in vitro mediante el uso de una serie de enzimas; uno de los fragmentos, llamado vector o vehículo molecular es capaz de replicarse en la célula huésped y el otro, el fragmento clonado, es replicado en la célula por estar unido covalentemente al vehículo.

A continuación se discutirán algunos de los detalles de esta metodología.

1.1 Generación de Moléculas Recombinantes

Existen diferentes alternativas para la generación de fragmentos de DNA. El más utilizado es el uso de enzimas de restricción. Estas enzimas, son endonucleasas que cortan los enlaces fosfodiéster del DNA. Existen tres clases de enzimas de restricción: a) enzimas de clase I, - ~~las cuales fueron las primeras en descubrirse,~~ que reconocen una secuencia específica, pero el corte es en una región inespecífica. b) Enzimas clase II, las cuales reconocen secuencias específicas y cortan dentro de esta secuencia. c) Enzimas de clase III, que reconocen una secuencia específica y cortan en un cierto número de bases después de esta secuencia - (5).

Por sus características, las enzimas de restricción clase II son las más utilizadas. Estas como se mencionó anteriormente, reconocen secuencias específicas de 4, 5 y 6 pares de bases. Las endonucleasas de restricción clase II catalizan la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster en el DNA en puntos donde los nucleótidos complementarios están ordenados

en secuencias con simetría rotatoria: una palindromía comparable a una palindromía lingüística (5).

En la figura (1) se ejemplifican algunas enzimas de restricción clase II, así como la secuencia que reconocen.

Algunas de estas enzimas de restricción cortan las dos cadenas del DNA en los enlaces fosfodiéster localizados uno directamente sobre el otro en la doble hélice, generando extremos rasurados. Otras de estas endonucleasas rompen cada una de las cadenas de tal forma que las uniones fosfodiéster rotas quedan desplazadas entre sí, dando lugar a fragmentos con extremos de cadena sencilla que van de dos a cinco nucleótidos. Hay endonucleasas que generan extremos de cadena sencilla en la posición 5' y otros que generan estos extremos en la posición 3'; todas ellas dejan el grupo fosfato en la posición 5'.

~~de los métodos usados para generar fragmentos de DNA es~~ Otro de los métodos usados para generar fragmentos de DNA es a través de la purificación de mRNA, A partir de este RNA se puede obtener cDNA, utilizando la enzima transcriptasa reversa (6). El rompimiento mecánico controlado es un tercer método para generar fragmentos grandes (mayores de 10,000 pares de bases) (7). Un cuarto método es la síntesis química de DNA; se puede diseñar químicamente un fragmento de DNA que tenga una secuencia específica, y ésta ser clonada para su estudio o expresión del producto codificado (ver después).

Una vez obtenido un fragmento de DNA éste es unido covalentemente a otro (el vehículo molecular) usando una ligasa de DNA, siendo la más utilizada la codificada por el fago T4 (8). Estas enzimas son capa-

Figura 1. ENDONUCLEASAS ESPECIFICAS Y LAS SECUENCIAS QUE RECONOCEN

Tetranucleótido		Pentanucleótido		Hexanucleótido	
<u>AluI</u>	AG↓CT	<u>EcoRII</u>	CC(^T / _A)GG	<u>AvaI</u>	C↓PicGPuG
<u>HaeIII</u>	GG↓CC			<u>BamHI</u>	G↓GATCC
<u>HhaI</u>	GCG↓C			<u>BqIII</u>	A↓GATCT
<u>HpaII</u>	C↓CGG			<u>BaII</u>	TGG↓CCA
<u>MboI</u>	↓GATC			<u>EcoRI</u>	G↓AATTC
<u>TaqI</u>	T↓CGA	<u>HphI</u>	CGTGA - 8p.b.	<u>HindIII</u>	A↓AGCTT
		<u>MboII</u>	GAAGA - 8p.b.	<u>HpaI</u>	GTT↓AAC
<u>HinfI</u>	G↓ANTC			<u>PstI</u>	CTGCA↓G
<u>DpnI</u>	↓GATC cuando esta modificado			<u>XmaI</u>	C↓CCGGG
				<u>HaeI</u>	(^A / _T)GG↓CC(^T / _A)
				<u>HaeII</u>	PuGCGC↓Pi
				<u>HincII</u>	GTPi↓PuAC

Roberts, R. (1976) (5).

ces de unir dos extremos de DNA, formando un enlace fosfodiéster entre un extremo 5' y otro 3'. De esta forma, se pueden construir moléculas recombinantes las cuales son introducidas en la célula huésped (Figura 2).

Anteriormente, se ha mencionado que un fragmento de DNA heterólogo es unido o ligado a un vehículo molecular, por lo tanto es obvia la importancia del vehículo molecular de clonación al cual nos referimos enseguida.

Desde 1976 a la fecha, se han diseñado una serie de vehículos moleculares que pueden ser introducidos en diferentes especies, los cuales presentan características particulares dependiendo del organismo en el que son introducidos. Se han construido vehículos moleculares para bacterias, hongos, células vegetales y células de vertebrados (9,10). Cabe señalar que los vehículos moleculares más utilizados son los que presentan como célula receptora a Escherichia coli, dado que a nivel genético y molecular es el organismo mejor comprendido y permite una selección fácil de moléculas recombinantes. Por lo tanto, se mencionarán las características de los vehículos moleculares de E. coli.

Idealmente los vehículos moleculares útiles para clonación en E. coli deben de presentar las siguientes características:

- a) Que sean replicones autónomos
- b) Que puedan ser purificados en gran cantidad para su caracterización física
- c) Que su tamaño sea pequeño
- d) Que presentan sitios únicos de restricción preferiblemente localizados genes estructurales de marcadores genéticos

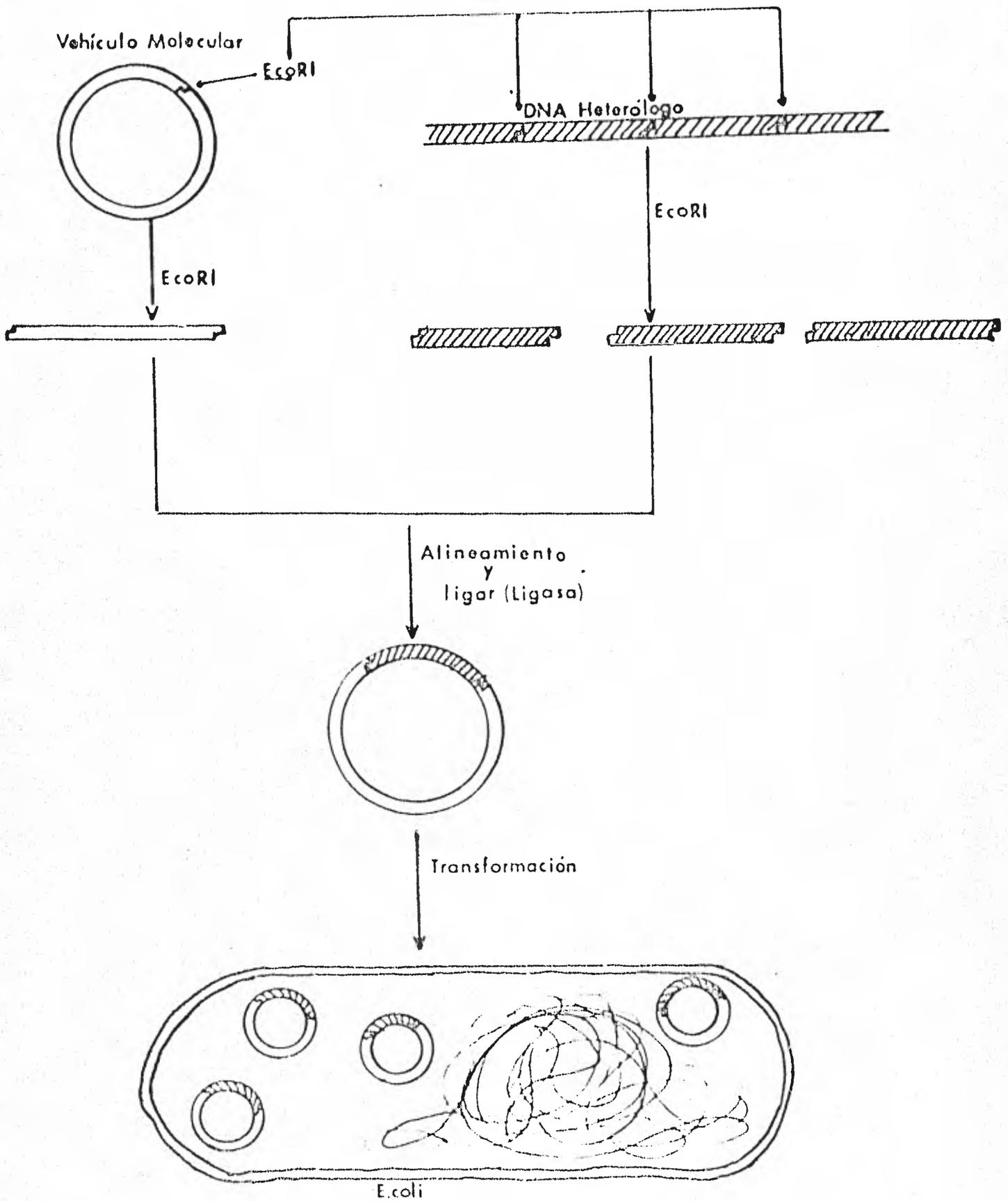


FIGURA 2. Esquema de la construcción de moléculas recombinantes usando las técnicas convencionales de ingeniería genética molecular.

- e) Que presenten características que permitan una fácil selección de moléculas recombinantes
- f) Que se conozca la secuencia nucleotídica completa del vehículo

En E. coli se han utilizado como vehículos moleculares plásmidos y fagos (λ M13, etc.) principalmente. Inicialmente nos referiremos a los plásmidos como vehículos moleculares de clonación y posteriormente, mencionaremos las propiedades de clonación de fagos de E. coli, principalmente en el fago .

1.2 Plásmidos como Vehículos Moleculares de Clonación

Los plásmidos son moléculas de DNA circular, extracromosomales, de replicación autónoma y generalmente dispensables para la célula. Estas moléculas de DNA han sido ampliamente utilizadas como vectores. Se ha trabajado principalmente con dos tipos de plásmidos, como vehículos, los cuales se distinguen por sus propiedades de replicación. Unos monocopia como el plásmido pSC101 y otros multicopia como el ColE1 (11).

Los plásmidos multicopia son altamente utilizados en la actualidad, entre ellos destacan aquellos que han sido construidos in vitro y que son derivados del plásmido pBR1. Estos plásmidos llevan genes que codifican para resistencia a antibióticos, lo que permite una fácil selección de las células que portan estos vectores. Los plásmidos mejor caracterizados y que presentan ventajas sobre los demás como vehículos moleculares de clonación son los de la serie pBR (pBR313, pBR322, pBR325, pBR27, pBR328, pBR329) (12-15). En la Figura 2 se dan las características de estos plásmidos moleculares de clonación.

Figura 3. CARACTERISTICAS DE LOS PLASMIDOS DE LA SERIE pBR. COMO VEHICULOS MOLECULARES DE CLONACION

Nombre	Modo de replicación	Peso molecular $\times 10^6$	Sitios únicos de restricción	Marcadores genéticos	Referencia
pBR313	pMB1	5.6	<u>EcoRI</u> <u>HindIII</u> <u>BamHI</u> <u>SalI</u> <u>HpaI</u>	Ap ^r , Tc ^r , inmunidad a colicina E1	(12)
pBR322	pMB1	2.8	<u>EcoRI</u> , <u>HindIII</u> , <u>BamHI</u> , <u>SalI</u> , <u>PstI</u> , <u>AvaI</u> , <u>PvuII</u>	Tc ^r , Ap ^r	(12)
pBR325	pMB1	3.7	<u>EcoRI</u> , <u>PstI</u> , <u>SalI</u> , <u>HindIII</u> , <u>BamHI</u>	Tc ^r , Ap ^r , Cm ^r	(13)
pBR327	pMB1	2.16	<u>EcoRI</u> , <u>HindIII</u> , <u>BamHI</u> , <u>SphI</u> , <u>SalI</u> , <u>PstI</u> , <u>AvaI</u>	Tc ^r , Ap ^r	(14)
pBR329	pMB1	2.7	<u>BalI</u> , <u>EcoRI</u> , <u>PvuII</u> , <u>PvuI</u> , <u>PstI</u> , <u>HindIII</u> , <u>BamHI</u> , <u>SphI</u> , <u>SalI</u> , <u>AvaI</u>	Tc ^r , Ap ^r , Cm ^r	(15)

1.3 Fagos en E. coli como Vehículos Moleculares

Los vehículos moleculares fágicos más utilizados en E. coli principalmente son derivados del fago λ . Una característica de todo derivado de λ que puede usarse como vector, es la ausencia de sitios de restricción usados para clonación en la región indispensable o esencial y la presencia de uno o más sitios dentro de la región dispensable. La eliminación de sitios de restricción en las regiones esenciales del genoma de λ ha sido lograda por medio de la selección de mutantes o mediante la introducción por recombinación de deleciones y substituciones que cubren -- estos sitios. Otro vector, fué construído de tal forma que todos los sitios de la endonucleasa EcoRI, en el genoma del fago fueron eliminados; -- posteriormente, se introdujo un nuevo sitio de restricción para la endonucleasa EcoRI, que queda comprendido en el gen que confiere inmunidad al fago λ 434, mediante la substitución de la región de inmunidad de λ por -- la del 434 (16,17).

En la mayoría de los vectores fágicos diseñados para clonación con EcoRI, uno de los fragmentos en el centro del genoma del fago, ha sido escindido con EcoRI, dando origen a un fago con dos sitios de EcoRI. Cuando éste es digerido con esta endonucleasa se generan tres fragmentos, los dos más grandes comprenden los extremos del fago. Los vehículos moleculares derivados de λ , presentan la ventaja de que se pueden clonar fragmentos grandes de DNA (hasta 20,000 pares de bases), lo cual es difícil de lograr con plásmidos. Sin embargo, para manipulaciones más finas (como caracterizar totalmente una región de DNA) y para clonar fragmentos de 100 a 10,000 pares de bases, los plásmidos son más adecuados.

Paralelamente al desarrollo de las técnicas de recombinación in vitro de ácidos nucleicos, ha habido un progreso importantes en la síntesis química de polinucleótidos; ello ha tenido como consecuencia que la ingeniería genética molecular cuente con una herramienta útil que permite, en muchas ocasiones, realizar de un modo más sencillo, elegante y directo la clonación y caracterización de regiones de DNA.

1.4 Síntesis Química de DNA en Estudios de Recombinación in vitro

No es el objetivo de esta introducción, detallar los procedimientos de la síntesis química de DNA, sólo hasta con mencionar que existen diferentes métodos para realizar la síntesis de polinucleótidos; que el método que fué utilizado inicialmente es el del diéster desarrollado por Khorana (18), que posteriormente fué desarrollado el método del triéster (19), el método de la polinucleótido fosforilasa (70) y que recientemente se ha desarrollado el método del fosfotriéster en fase sólida, el cual permite la generación de oligonucleótidos a partir de la unión del primer nucleótido a un sólido de soporte y adicionar posteriormente los nucleótidos siguientes, permitiendo la síntesis de segmentos grandes (hasta 40 bases) en poco tiempo (19).

Por lo que respecta a los usos de los oligonucleótidos sintéticos en estudios de recombinación in vitro de DNA, cabe mencionar varios aspectos: uno de los primeros ejemplos del uso de oligonucleótidos sintéticos que tuvo un gran impacto en experimentos de DNA recombinante, fué la clonación y expresión del gen sintético para la hormona humana somatostatina en E. coli (21). En dicho trabajo, se construyó por síntesis química de DNA la región completa que contiene la información que codifica para la

la hormona humana somatostatina, este segmento de DNA sintético fué clonado en el pBR322 en forma de un gen híbrido con la secuencia que codifica para la β -galactosidasa de E. coli y se demostró que se producía somatostatina, biológicamente activa, después de separarla de la proteína híbrida. De forma similar se han clonado las secuencias de DNA sintético que llevan la información genética, para las cadenas A y B de insulina, hormona de crecimiento y el gen de interferón de leucocito (22,23). En teoría se puede construir por síntesis química de DNA cualquier gen de una proteína de importancia social, teniéndose conocimiento de la secuencia de aminoácidos de ésta.

Otra aplicación que aporta la síntesis química de oligonucleótidos, es la de utilizar adaptadores ("linkers") que contienen la secuencia de DNA que es reconocida por una o más endonucleasas de restricción y que pueden ser ligados a fragmentos de DNA para facilitar su clonación -- (19), Figura 4.

Uno de los métodos más empleados en experimentos de secuenciación de DNA, es el que ha sido descrito por Sanger y colaboradores (24). En esta técnica el fragmento de DNA que se desea secuenciar se encuentra en un vehículo molecular que funciona como templado para la DNA polimerasa I, que incorpora nucleótidos a partir de un primero. La reacción es incubada en presencia de desoxiribonucleótidos (uno de ellos radioactivo) y de un didesoribonucleótido para cada base que se desea leer, de tal manera que existe la probabilidad que el didesoribonucleótido sea incorporado en cada una de las posiciones en las cuales es complementario. Al ser incorporado el didesoribonucleótido, éste ya no es sustrato para la --

Adaptadores de EcoRI:

CCGAATTCGG
GGCTTAAGCC

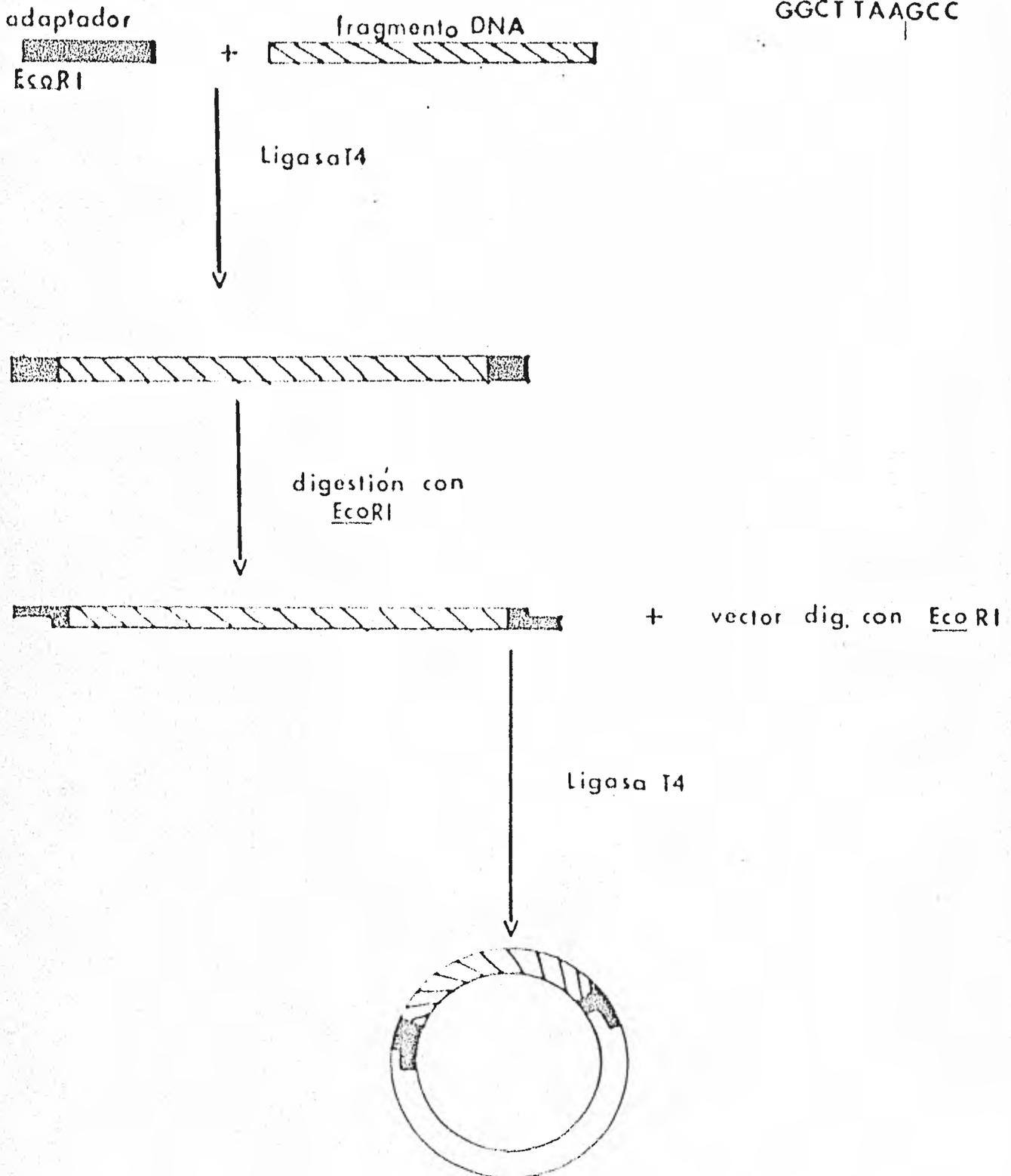


FIGURA 4. Esquema del uso de adaptadores sintéticos en experimentos de clonación molecular de un fragmento de DNA.

DNA polimerasa y por lo tanto la reacción se para en esta posición, resultando una población de moléculas de diferente tamaño que corresponden a la posición donde fué incorporado el didesoxiribonucleótido específico. Por medio de síntesis química de DNA se han diseñado oligonucleótidos que hibridan en puntos específicos en un DNA templado y que pueden funcionar como primeros en el método de secuencia de Sanger.

A partir del conocimiento de la secuencia de aminoácidos de una proteína, se puede deducir las secuencias nucleotídicas probables que codifican para la proteína; tomando ventaja de ésto se pueden construir oligonucleótidos sintéticos que sean complementarios a la secuencia del gen de interés y que pueden funcionar como sondas o rastreadores de clonas de cDNA. De este modo, fué aislada una clona que contenía el gen del citocromo C de levadura (25).

Una herramienta poderosa para la alteración de un gen, es hacer mutagénesis dirigida. Existen varios métodos para realizar mutagénesis en sitios directos (26), pero el método más preciso y flexible depende del uso de oligodesoxiribonucleótidos sintéticos. El proceso utiliza un oligonucleótido que sea complementario a la región blanco que se quiere mutar, pero que presente una o más bases desiguales, sobre las cuales se quiere efectuar la mutación. Tal oligonucleótido es hibridizado contra el DNA blanco el cual puede estar como DNA de cadena sencilla o como DNA en forma II (relajado que contenga una mella en un enlace fosfodiéster). Una vez realizado ésto, el oligonucleótido funciona como primero en una reacción de síntesis de DNA polimerasa I (fragmento grande) y posteriormente, sellado con la ligasa de T4. De esta forma, se obtiene un DNA re-

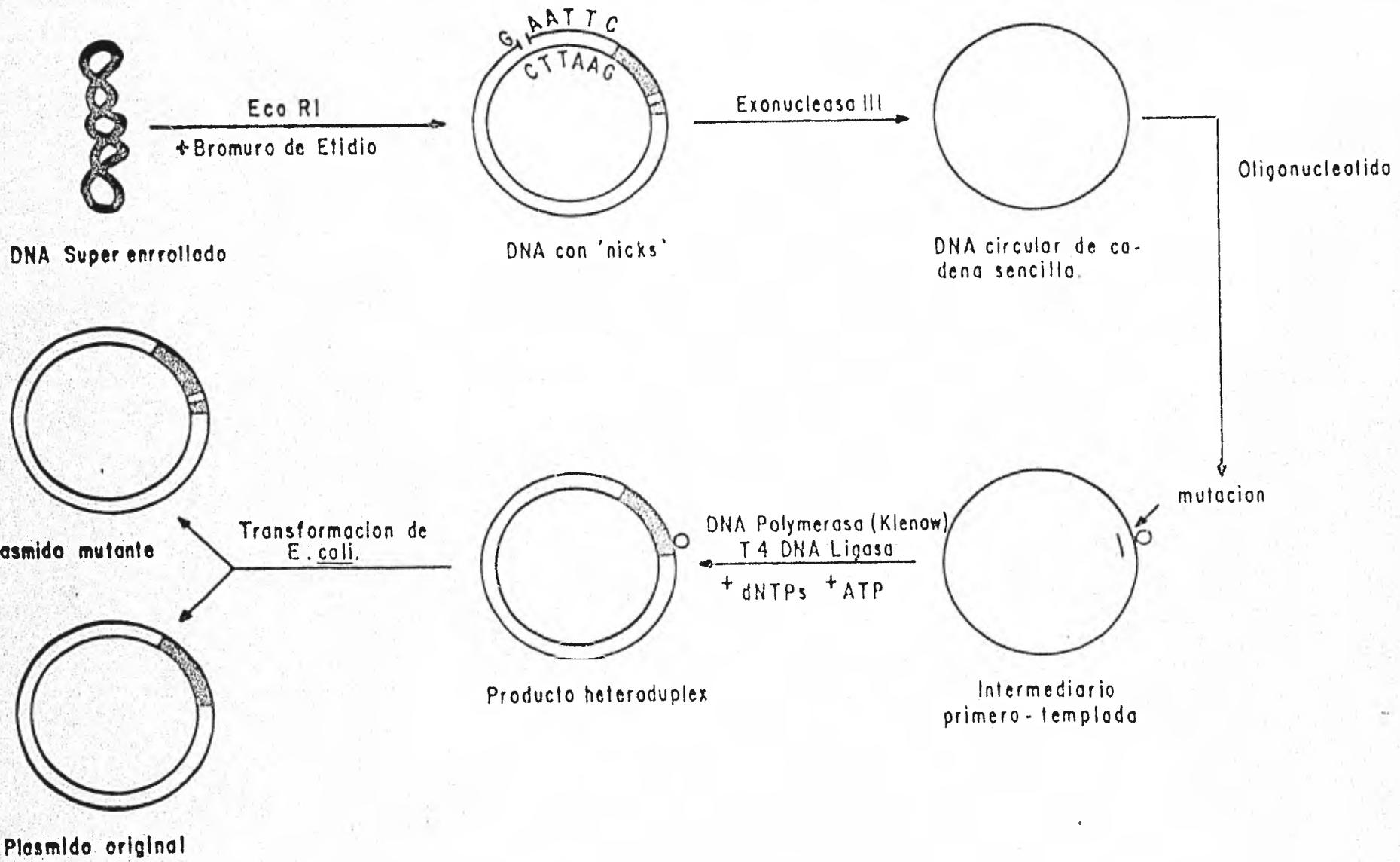


FIGURA 5. Esquema de la técnica de mutagénesis sitio específica dirigida por oligonucleótidos sintéticos en plásmido (ver el texto).

parado el cual es usado para transformar a E. coli. En la célula se copian ambas cadenas de DNA durante la replicación del plásmido, obteniéndose el DNA que lleva la mutación deseada, Figura (5). Posteriormente - para determinar aquellas colonias o placas que contengan el DNA de plásmidos o fago con la mutación de interés, se realiza una hibridización en colonia o hibridización en punto (para fagos), utilizando condiciones en las cuales híbridice preferencialmente el oligonucleótido con aquellos - DNAs que sean totalmente complementarios y se puede distinguir el efecto de una base desigual al hibridizar (27). Por último, y para demostrar que la mutación está en la o las bases deseadas se obtiene la secuencia de DNA de la región blanco. Hay que señalar que este método de mutagénesis in vitro presenta ventajas sobre cualquier otro. Las ventajas principales son: a) la mutación se puede realizar en una base específica y se pueden hacer transiciones, transversiones, inserciones y deleciones; b) aparentemente se pueden ocasionar deleciones específicas hasta de -- 300 pares de bases y (J. Rossi, comunicación personal) c) el mismo oligo nucleótido que se usa como mutágeno se usa como rastreador para localizar las colonias o placas con la mutación (28).

De esta forma, las técnicas de recombinación in vitro de ácidos nucleicos y la síntesis química de DNA, aportan las herramientas adecuadas para poder estudiar regiones regulatorias en el genoma, disectar y secuenciar genes.

2) SECUENCIAS REGULATORIAS INVOLUCRADAS EN LA PROMOCION DE LA TRANSCRIPCION EN E. coli

La expresión genética es controlada, en parte, a nivel de transcripción de RNA. La síntesis de RNA está regulada en una variedad de señales específicas codificadas en el DNA; algunas de las cuales son sitios específicos para el inicio de la transcripción (promotores) y otras son sitios de terminación de la transcripción para la RNA polimerasa.

La regulación transcripcional está dada por la modulación de la eficiencia con la cual la RNA polimerasa puede reconocer e interactuar con estos sitios (29).

La secuencia de bases particular de DNA, con la cual interactúa la RNA polimerasa, en parte determina la efectividad (fuerza) del promotor o del sitio de terminación. Asimismo, un número de moléculas efectoras pueden influenciar positiva o negativamente esta interacción entre la RNA polimerasa y el DNA. En muchos casos, estas moléculas efectoras también reconocen una información, contenida en la secuencia nucleotídica en el DNA templado, la cual está adyacente y/o sobrelapada con el sitio de acción de la RNA polimerasa. Sin embargo a pesar de estas similitudes, ocurren diferencias estructurales las cuales especifican las variaciones funcionales que existen entre los sitios que regulan diversos operones. En esta parte se resumirá alguna información acerca de las secuencias de DNA involucradas en el control, promoción y terminación de la transcripción en E. coli.

2.1 Promotores

Definiremos un promotor de E. coli, como aquella secuencia de DNA que es reconocida por la RNA polimerasa, formando un complejo a partir del cual la enzima puede iniciar la síntesis de RNA en forma dependiente de DNA (37).

Los patrones de síntesis de RNA in vitro de genomas de fagos, muestran que regiones diferentes son transcritas con intensidad (fuerza) diferente; inmediatamente se hace la siguiente pregunta ¿qué es lo que determina la fuerza de un promotor? Para contestar esta pregunta existen al menos dos parámetros que deben estar relacionadas con la fuerza de un promotor: a) la velocidad de formación del complejo RNA polimerasa-promotor y b) la velocidad con la cual la RNA polimerasa puede iniciar la transcripción.

En varios promotores la velocidad de iniciación de la síntesis de RNA es altamente rápida comparada con la velocidad de formación del complejo (20). Por otro lado tanto la estabilidad del complejo, como la velocidad de formación de éste, varían considerablemente entre promotores y puede, contribuir a la fuerza de éstos (31).

La RNA polimerasa de E. coli se une a una larga variedad de promotores in vitro, formando un complejo en el cual el DNA en la región del promotor es desenrollado casi una vuelta de la doble hélice (32). -- Este complejo es altamente estable y ha permitido determinar propiedades, físico-químicas y bioquímicas, de la reacción. En experimentos de protección ("foot print") contra digestiones con DNasa I, el tamaño del DNA --

protegido fué alrededor de 70 a 80 nucleótidos y cubre las regiones de --
-60 a + 20 del promotor (los números positivos o negativos, se refieren --
a la posición hacia arriba o hacia abajo, a partir del primer nucleótido
contenido en el RNA transcrito; (Figura 6). Interesantemente una de las
dos cadenas de DNA, es protegida con menor eficiencia que la otra, indi--
cando una orientación de unión de la proteína al templado.

Se ha, podido secu-nciar un gran número de promotores de --
E. coli y éstos han sido sujetos a estudios comparativos. Se ha observa--
do que hay ciertas secuencias que están altamente conservadas en todos --
ellos. Alrededor de la región de -10, Schaller y Pribnow, (33) descubrie--
ron una región de alta homología, la cual es nombrada comunmente como --
"caja de Pribnow". La secuencia prototípica es TATAAT, en la cual la po--
sición ocupada por la timina subrayada, está conservada en todos los pro--
motores investigados hasta la fecha. Otras dos bases que también se en--
cuentran altamente conservadas son las dos iniciales (TATAAT). Una segun--
da región de homología ha sido identificada alrededor de la posición -35.
Aquí hay un trinucleótido altamente conservado, cuya secuencia es TTG. La
secuencia TTG es seguida hacia abajo por tres nucleótidos que están un --
poco menos conservados y que dan como resultado el exámero TTGACA.

Rasgos comunes pueden también ser observados en secuencias --
aledañas al sitio de inicio de la transcripción, de tal forma que esta --
reacción (inicio de la transcripción) es altamente selectiva con respecto
al nucleótido con el cual inicia; la cadena de RNA comienza predominante--
mente con una purina, donde A es más frecuente que G (34). En algunos --
casos sin embargo, C o U pueden iniciar. Siguiendo esta especificidad, --

el sitio de inicio de la transcripción está localizado dentro de una secuencia, poco conservada (CAT) a 6 ó 9 pares de bases hacia abajo de la región de -10 (34). En la figura 6 se pueden observar algunas propiedades del complejo RNA polimerasa-promotor.

Se ha podido determinar que mutaciones en las regiones de --10 y -35 afectan la fuerza del promotor. Por ejemplo, una sustitución en la T en la posición -6 de la caja de Pribnow, baja dramáticamente la fuerza de un promotor; lo mismo ocurre con la T en la posición -11 y con la G de la región de -36. Por otro lado también hay mutantes que incrementan la fuerza de un promotor; estas mutaciones en todos los casos acercan más la secuencia del promotor a la de un promotor con sentido (29).

Con respecto a los mecanismos por los cuales la RNA polimerasa de E. coli reconoce las secuencias anteriormente mencionadas como un promotor y a partir de éstas es capaz de iniciar la transcripción, existen estudios no muy completos. McKlure (35) a propuesto el siguiente modelo para describir la forma en la cual la RNA polimerasa se une a un promotor e inicia la transcripción:



- donde:
- $\left[\text{RNAP} \right]$ = Concentración de RNA polimerasa
 - $\left[\text{Pr} \right]$ = Concentración de secuencias reconocidas como promotor
 - $\left[\text{RNAP-Pr} \right]_c$ = Concentración de complejo cerrado
 - $\left[\text{RNAP-Pr} \right]_{ac}$ = Concentración del estado de transición entre el complejo cerrado y el complejo abierto
 - $\left[\text{RNAP-Pr} \right]_a$ = Concentración de complejo abierto

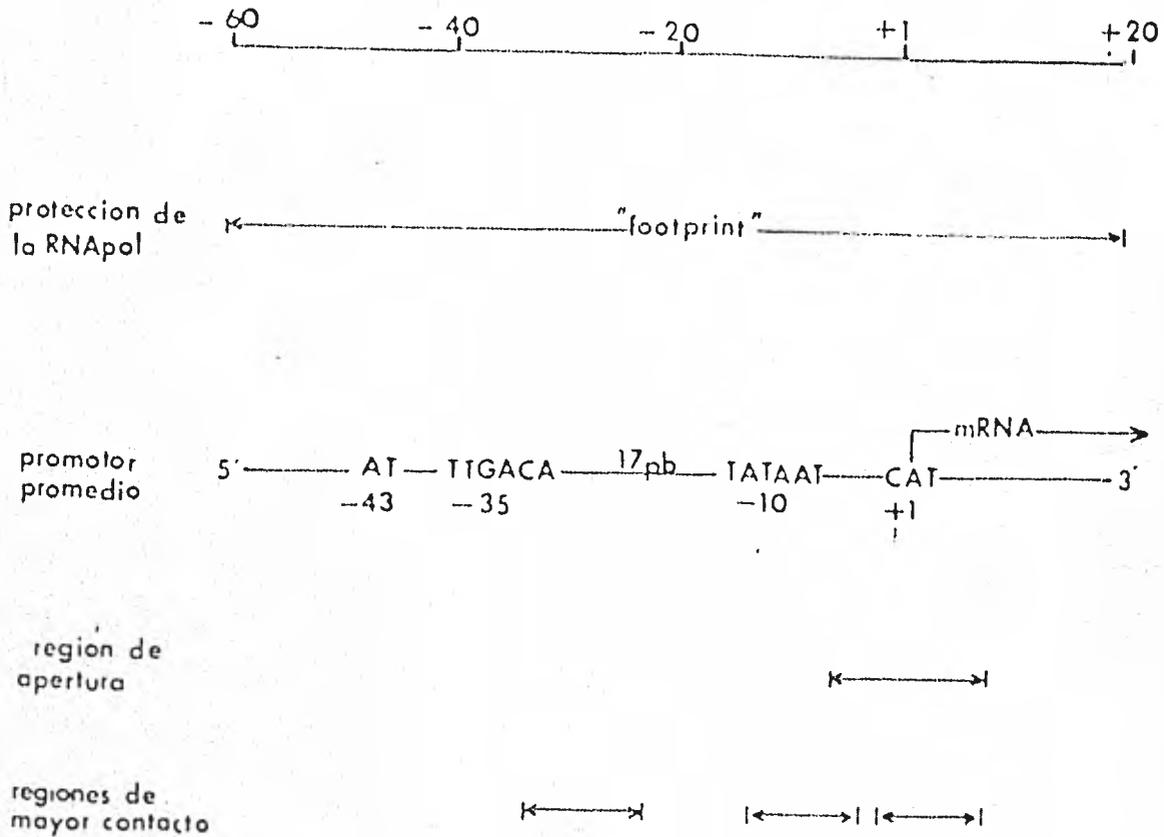


FIGURA 6. Esquema de las características de un promotor de E. coli. a) el número de pares de bases que es protegido por la RNA polimerasa en experimentos de protección contra digestiones de DNAasaI. b) La secuencia de un promotor procariote. c) La región en la cual ocurre la isomerización. d) Regiones de mayor contacto en el complejo RNA polimerasa promotor.

La denotación complejo cerrado explica el momento en el que la RNA polimerasa se une a un promotor, en otras palabras cuando la polimerasa se ancla al promotor. El complejo abierto se define cuando la RNA polimerasa se encuentra a punto de iniciar la transcripción y es un estado irreversible. W. McKlure ha calculado las constantes de equilibrio para cada uno de los pasos de la reacción, en algunos promotores y ha determinado que para unos la eficiencia está dada por la constante de equilibrio de formación de complejo abierto y que para otros, la velocidad de unión de la RNA polimerasa al promotor está más relacionado con la fuerza de éste.

Por otro lado W. Gilbert y colaboradores han realizado estudios de protección con RNA polimerasa, contra reactivos que modifican ciertas bases en el DNA y que posteriormente sensibilizan a los enlaces fosfodiéster a la hidrólisis (36). Utilizando este sistema, se ha podido sugerir que la región de -10 es importante para el reconocimiento del promotor por la RNA polimerasa y que las regiones de -35 y -10 son importantes para la isomerización. Asimismo, se ha podido determinar que las bases que aparentemente interactúan con la RNA polimerasa tienen sus grupos funcionales (que pueden formar uniones débiles) localizados preferencialmente hacia un lado de la molécula de DNA, lo cual sugiere que la distancia entre las regiones de -10 y -35 es altamente importante.

2.2 Regiones de DNA Reconocidas por Moléculas Efectoras

En la mayoría de los operones bacterianos la RNA polimerasa se une a un promotor y normalmente una región adicional, una región regu-

ladora, se encuentra localizada junto al promotor. Esta región es requerida para proveer un mecanismo por el cual la célula pueda regular la frecuencia con la que la RNA polimerasa inicia la transcripción del operón.

Esta región regulatoria, que actúa como un control de la frecuencia de transcripción, funciona como una válvula permitiendo que la RNA polimerasa transcriba en alta o baja cantidad de RNA codificado en el operón específico. Tal frecuencia con la cual el operón es transcrito no depende solamente de la eficiencia del promotor como tal, sino también del grado con el cual la región reguladora restringe el paso de la RNA polimerasa por los genes del operón o la unión de ésta, al promotor (37).

Las regiones regulatorias se han clasificado en dos clases fundamentales, una de estas es el operador que es una válvula que por sí sola está abierta, permitiendo que moléculas de RNA polimerasa puedan transcribir a una alta frecuencia; ésta es regulada por ser cerrada progresivamente. La otra es la región conocida como iniciador, la cual es una válvula que se encuentra por sí sola cerrada, restringiendo la transcripción de la RNA polimerasa a una baja frecuencia; ésta es regulada por ser abierta progresivamente. En ambos casos los mecanismos de cierre y apertura de la válvula, alteran la frecuencia con la cual la RNA polimerasa puede transcribir, utilizando proteínas reguladoras específicas y moléculas pequeñas específicas para cada operón.

Tales regiones, el operador y el iniciador, pueden, al menos parcialmente, sobrelapar con el promotor de tal forma que las proteínas que se unen a ellos pueden interaccionar directamente con la RNA polimerasa (37).

2.3 Regiones de DNA que Especifican Terminación de la Transcripción

Se han realizado comparaciones de las secuencias de los sitios de terminación de la transcripción, revelando tres rasgos en común; a) - una región que comprende una secuencia repetida invertida precedente al - sitio de terminación; b) residuos de Uridina son encontrados en la parte final del RNA transcrito; y c) secuencias ricas G/C, de longitud variable son encontradas anteriormente al sitio de terminación.

En el mecanismo de terminación de la transcripción se ha determinado que el RNA que es transcrito tiene un papel importante, se propone que éste puede formar estructuras secundarias en la región de terminación, que pausan el paso de la RNA polimerasa por su templado (38). Esta pausa permite que la RNA polimerasa pueda disociarse y que probablemente, este fenómeno es catalizado por factores como el producto del gen rho (39). Este factor a su vez está sujeto a un control más complejo como es el caso del producto del gen N del fago λ que aparentemente antagoniza la acción de rho.

Se ha observado que las señales de terminación intervienen en forma directa sobre la expresión genética en operones biosintéticos. Se ha demostrado que una secuencia que semeja a un terminados está involucrada directamente en el mecanismo de atenuación de estos operones (40).

II. JUSTIFICACION

Como se mencionó anteriormente la recombinación in vitro de ácidos nucleicos, es en la actualidad una de las metodologías más útiles para el estudio de los fenómenos que regulan la expresión genética. Así mismo se ha mencionado que la síntesis química de DNA es una herramienta importante en la biología molecular actual.

Por otro lado también se ha mencionado que una de las regiones importantes que regulan la expresión de genes en procariotes y seguramente en eucariotes es el promotor. Por lo tanto, dado que se cuenta en el laboratorio con las mencionadas herramientas para poder efectuar estudios encaminados a la comprensión de la regulación de la expresión genética en procariotes y que un mejor entendimiento a acerca de este fenómeno puede aportar información relevante tanto a nivel de ciencia básica como de ciencia aplicada, nuestro objetivo central es la comprensión del proceso por medio del cual la RNA polimerasa puede reconocer una secuencia como un promotor, y que factores de esta región son realmente determinantes para que el fenómeno de la transcripción pueda llevarse a cabo.

III. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Tratando de indagar en el nivel más fundamental de la expresión genética; el reconocimiento de la RNA polimerasa por el promotor; X. Soberón en colaboración con J. Rossi y K. Itakura (41), construyeron por medio de síntesis química un segmento de DNA que contiene la secuencia de nucleótidos promedio de un promotor de E. coli. Dicha secuencia fué basada en el conocimiento de 50 secuencias de promotores reportadas y dado que regiones de alta homología han sido determinadas se construyó un promotor consenso, como un modelo de promotor. Cabe señalar que un promotor procariote que contenga la secuencia consenso no ha sido encontrada en la naturaleza, lo cual es interesante.

El promotor consenso fué sintetizado usando el método del -- fosfotriestery y presenta las siguientes características: es un segmento de 42 pares de bases que contiene en la región de -35 la secuencia consenso (TTGACA), en la región de -10 la secuencia TATAATG; un sitio de -- EcoRI inmediatamente hacia arriba de la región de -35, una distancia promedio de 17 pares de bases entre -10 y -35 y exactamente en medio del -- promotor un sitio de HpaI, que facilitará manipulaciones tales como delección de nucleótidos o intercambio de regiones funcionales (Figura 7). -- Hay que mencionar que el promotor no incluye la secuencia consenso alrededor del sitio de inicio de la transcripción.

Al fragmento de DNA sintético que contiene el promotor con--senso se le ligó el adaptador sintético de HindIII, después fué digerido con las endonucleasas de restricción EcoRI y HindIII y clonado en un de--

FIGURA 7.

-35

-10

PROMOTOR CONSENSO

-----G A A T T C T T G A C A A T T A G T T A A C T A T T T G T T A T A A T G T A T T C C C A A G--

Rosenberg y Court

-----t t - - t g T T G A C A -t t t --- 6 - 9p.b. --- a t t t T A T A A T g --- 4 - 7p.b.c a t -----Pu

Siebenlist, et al.

-----T A A T T ^C_G T T G A C A T T T T T T - T A C T A T T ^T_G G G T A T A A T G C - - - C C A T C A-

FIGURA 7. Secuencia nucleotídica del promotor consenso comparada con las secuencias promedio reportadas por Rosenberg y Court (29) y Siebenlist et al. (36).

rivado del plásmido pBR327. Este plásmido se dirigió con la enzima HindIII, se trató con la exonucleasa Bal31 para deletar el promotor del gen de resistencia a tetraciclina, se restauró el sitio de HindIII por medio de adaptadores sintéticos y se cortó con las enzimas EcoRI y HindIII. Este DNA se mezcló con el fragmento de DNA sintético que lleva el promotor consenso y se ligó con ligasa de T4. El plásmido resultante fué el p Δ 36 el cual se demostró que confiere resistencia a tetraciclina (Figura 8).

Ya que la resistencia a tetraciclina no es fácil de medir y que para posteriores estudios del promotor consenso se requiere que el producto del gen que transcribe sea fácil de cuantificar, se insertó en HindIII del p Δ 36 el fragmento de DNA que lleva el gen del acetiltransferasa de cloranfenicol; el plásmido resultante fué el p Δ 36Cm.

Paralelamente a ésto y para poder mantener un control sobre la función del promotor, John Bossi clonó en el sitio de EcoRI del p Δ 36 un segmento de DNA sintético que lleva la secuencia del operador lac (no publicado), este plásmido se denominó p Δ 36op.

En el trabajo reportado por X. Soberón y colaboradores (41) se demostró concluyentemente que el promotor consenso es funcional in vivo lo que favorece su uso como modelo de promotor para estudios de interacción con la RNA polimerasa.

Una de las regiones cuya relevancia precisa en el funcionamiento de un promotor, no ha sido evaluada, es la distancia comprendida entre -10 y -35. El promotor consenso es un modelo ideal para explorar

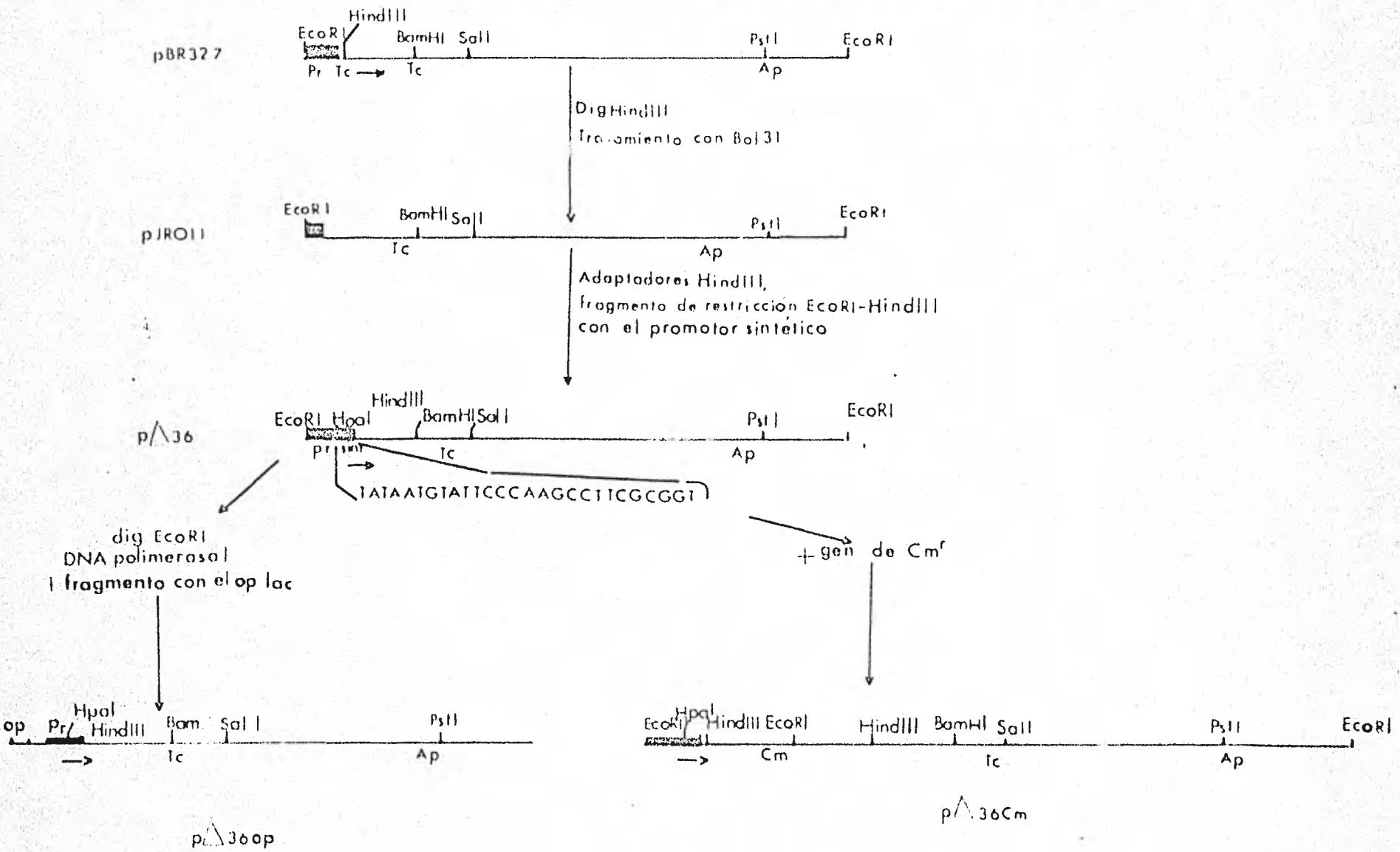


FIGURA B. Diagrama general de la clonación y subclonaciones en diferentes plásmidos del fragmento de DNA sintético, que contiene la secuencia del promotor canónico.

este aspecto. Por otro lado la técnica de mutagénesis sitio específica - dirigida por oligonucleótidos es un sistema idóneo para ocasionar inserciones o deleciones específicas entre la región de -10 y -35, lo cual variará la distancia entre estas dos regiones y usando el sitio único de -- HpaI, que está localizado en medio del promotor, las mutaciones obtenidas pueden ser recombinadas.

Un vehículo molecular adecuado para realizar estudios de transcripción a partir del promotor consenso, debe de transcribir un gen cuyo producto sea fácil de medir y la transcripción a partir del promotor debe estar bajo el control de una región reguladora. Este plásmido debe de -- presentar sitios de restricción en posiciones adecuadas que faciliten la recombinación del promotor. Por otro lado, para desarrollar la técnica - de mutagénesis sitio específica dirigida por oligonucleótidos sintéticos lo más conveniente es tener el sitio blanco (promotor) en un plásmido pequeño. Por lo tanto, son tres los objetivos principales de este trabajo;

- a) Construir y caracterizar un vehículo pequeño, que posea el operador lac de E. coli inmediatamente hacia arriba del promotor con--senso y que a partir de éste, se transcriba el gen del acetiltransferasa de cloranfenicol, de tal manera que se pueda usar como un sistema adecuado para estudiar los mecanismos de transcripción.
- b) Tener limitado al promotor consenso por sitios únicos para endonucleasas de restricción, de tal manera, que se facilite la recombinación de regiones funcionales del promotor.
- c) Desarrollar la técnica de mutagénesis sitio específicas, derivada por oligonucleótidos sintéticos en plásmido.

IV. MATERIAL Y METODOS

1) REACTIVOS

Los reactivos fueron obtenidos en las siguientes casas comerciales:

- J. T. Baker, USA: azul de bromofeno, xilencianol
- Bayer de México: ampicilina (Binotal)
- Bio-Rad Laboratories, USA: agarosa, B-mercaptoetanol, persulfato de amonio, poliacrilamida, Bis, resina A-50, resina Dower 50X-X8, sodio-dodecil-sulfato (SDS), Tritón X-100, TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina)
- Bioxón de México: agar bacteriológico, peptona de caseína (Casa-- aminoácidos), peptona de caseína purificada (triptona)
- Calbiochem Laboratories, USA: Yoduro de propidio
- Merck de México: extracto de levadura, TRIS (Hidroximetil-aminometano), urea.
- PL Biochemical USA: ddNTP (Dideoxirribonucleótidos trifosfato)
- New England Nuclear, USA: [p³²] ATP
- Sigma de México: aceite mineral, albúmina, bromuro de etidio, cloranfenicol, cloruro de cesio, nucleósidos trifosfato, tiamina, -- X-gal (5-bromo, 4-cloro, 3-indolil B-D-galactósido)
- J.T. Baker de México: todos los demás

2) CEPAS Y FAGOS

E. coli K12 -MC1061. Es auxótrofa de prolina, leucina y vitamina B1.

Resistente al antibiótico estreptomina

E. coli K12 -D1210. Auxótrofa de prolina, leucina, vitamina B1,

Contiene una mutación que sobreproduce el represor del operón de lactosa.

E. coli K12-JM101. Contiene una delección de la región lac-pro del cromosoma. El episoma lleva el operón de la biosíntesis de prolina, el operón lac con las siguientes mutaciones: una mutación en el promotor del gen lac I, que sobreproduce represor; una delección en el gen estructural de la β -galactosidasa que resulta en la producción de un segmento carboxilo terminal de la enzima inactiva.

FAGO M3mp7.

El fago lleva una pequeña parte del operón de lac. Esta parte incluye una región reguladora y también la información para los primeros 146 residuos de aminoácidos del gen estructural para la β -galactosidasa, que es el segmento complementario a la delección de la región de la β -galactosidasa del episoma contenido en la cepa JM101.

Los productos polipeptídicos, de la región lac del episoma de la JM101 y del fago, forman una proteína que presenta actividad de β -galactosidasa, cuando una célula es infectada. El fenotipo lac es identificado por placas azules en un medio que contenga Xgal e IPTG. (Inductor gratuito del operón lac).

3) MEDIOS DE CULTIVO

<u>Caldo de Luria (medio completo)</u>		<u>Medio YT</u>
-Tryptona	10 g	-8g Tryptona
-Extracto de Levadura	5 g	-5g Extracto de Levadura
-NaCl	10 g	-5g NaCl
-NaOH 2.5 N	1 ml	- 1 litro - H ₂ O
-Agua destilada	1 litro	

M-9 (medio semicompleto)

Esterilizar junto:

-Peptona de caseína	15 g
-MgSO ₄ 0.1 M	10 ml
-CaCl ₂ 0.01 M	10 ml
-agua destilada	860 ml

Esterilizar por separado:

-Sales 10X	100 ml
-Requerimientos de	10 ml

Aminoácidos (2%)

Glucosa al 20%

(En caso de utilizar otras fuentes de carbono se añaden 15 g de glicerol o bien 3.75 g de glucosa y 11.25 g de glicerol).

Las sales 10 X del medio M-9:

-Na ₂ HPO ₄	70 g
-KH ₂ PO ₄	30 g
-NaCl	5 g
-NH ₄ Cl	10 g
-H ₂ O	1 lt.

Cajas de Petri

Agregar 20 g de agar por litro de cultivo

4) ENZIMAS

4.1 Endonucleasas de Restricción

Estas enzimas fueron adquiridas a Bethesda Research Laboratory, o preparadas en el laboratorio según el método de Green (42). Las condiciones de reacción para cada una de las endonucleasas de restricción se describen a continuación:

- EcoRI 0.1 M Tris pH 7.5
 5.0 mM MgCl₂
 0.1 M NaCl
 0.0002% NP₄₀

- HaeIII 6 mM MgCl₂
 6 mM Tris pH 7.5
 6 mM -mercaptoetanol

- HindIII 6.6 mM Tris pH 7.5
 6.6 mM MgCl₂

Las incubaciones se llevan a cabo a 37°C durante 60 minutos.

4.2 Polimerasa I de DNA (Fragmento Klenow)

Se obtuvo de Boehringer Mannheim y sus condiciones de reacción están dadas por la solución amortiguadora del método de Sanger (29). Estas condiciones son:

- 6.6 mM Tris pH 7.5
- 6.6 mM NaCl
- 6.6 mM MgOAc₂
- 6.6 mM DTT
- 20°C

4.3 Ligasa de T4

Esta enzima se purificó en el laboratorio, a partir de células infectadas con el bacteriófago T4. Sus condiciones:

- 20 mM Tris pH 7.6
- 10 mM Ditiotreitól (DTT)
- 10 mM MgCl₂
- 5 mM ATP en 0.1 Tris pH 7.4
- 12°C

4.4 RNasa A

Esta enzima se obtuvo de Sigma de México. Sus condiciones de reacción son, a 20°C:

- 10 mg/ml de enzima en polvo en 0.1 M acetato de sodio
- 3.3×10^{-5} M EDTA pH 5

Calentar a 85°C por 10 minutos

4.5 Lisozima

Se obtuvo de Sigma de México. Las condiciones de reacción son:
5 mg/ml en 25 mM Tris pH 8, se incuba a 20°C.

4.6 Cinasa de Polinucleotidos

Esta enzima se adquirió de New England Nuclear USA. Sus condiciones son:

- 50 mM Tris-HCl, pH 7.6
- 10 mM MgCl₂
- 5 mM Dithiothreitol (DTT)
- 0.1 mM Espersmidina
- 0.1 mM EDTA
- 37°C

4.7 Nucleasa SI

La reacción con Nucleasa SI (un obsequio de P. Seeburg) fué -- realizada variando la temperatura de reacción:

- Tris -HCl (pH 7.5) 1 M
- ZnCl₂ 0.05 M

4.8 RNA-Polimerasa

Esta enzima se adquirió de Boehringer, Mannheim y sus condiciones son:

- 20 mM Tris-HCl
- 10 mM MgCl₂
- 1 mM EDTA
- 0.5 mM BSA
- 37°C

5) Transformación de una Cepa de E. coli

Se llevó a cabo según el método descrito por Cohen et al. (43) con ciertas modificaciones:

- 1) 30 ml de cultivo con 5×10^8 células por ml creciendo exponencialmente en el medio de Luria, se centrifugan a 10 Krpm (para fines prácticos, las Krpm se abreviarán con la letra K), 5 minutos y el precipitado o "pelet" se lava con 15 ml de 10 mM NaCl frío.
- 2) El precipitado se resuspende en 15 ml de 30 mM CaCl_2 frío y se mantiene en hielo por 20 minutos.
- 3) Se centrifugan las células 3 minutos a 5K y se resuspenden en 3 ml del mismo CaCl_2 frío.
- 4) Inmediatamente, 0.2 ml de esta suspensión de células se agregan a un tubo conteniendo 2 ug de DNA (circular y cerrado) en 30 mM CaCl_2 en un volumen final de 0.1 ml.
- 5) Se mezcla suavemente y se mantiene el tubo por 60 minutos, a 0°C.
- 6) Se les da a las células un pulso térmico a 42°C por 70 segundos, e inmediatamente se pasan a un baño a 0°C por 5 minutos.
- 7) Se agregan a 3 ml de caldo Luria y se incuban a 37°C con agitación (200 rpm) por 2 horas.
- 8) El cultivo se "platea" en cajas Petri con medio Luria sólido (2% de agar) y ampicilina (0.1 mg/ml) para la elección de las colonias transformantes.

6) Preparación de DNA de Plásmido

El DNA de plásmido se preparó mediante la amplificación de - cultivos en crecimiento, en fase exponencial, a través de la adición de 170 mg/l de cloranfenicol o 300 mg/l de espectinomicina (44).

La extracción y purificación se hizo conforme al método de - lisado claro descrito por Betlach et al. (45) y consta de los siguientes pasos para 1 litro de cultivo:

- 1) Incubar 5-10 ml de cultivo en medio Luria toda la noche
- 2) Agregar 5 ml de este inóculo a un litro de medio M-9
- 3) Incubar el cultivo a 37°C con agitación hasta llegar a una densidad de células de 4.5×10^8 células/ml. Se agrega entonces el -- cloranfenicol (170 mg/l). La agitación se continuá por 16 horas.
- 4) Se centrifugan las células en el rotor GSA (Sorvall) a 6000 rpm por 10 minutos.
- 5) Congelar las pastillas de células
- 6) Suspender las células en un total de 10 ml/l de sacarosa al 25% en Tris-HCl 50 mM, pH8, EDTA 1 mM pH8, y mantener en hielo.
- 7) Agregar, en el orden indicado:
 - 2 ml EDTA 0.25M, pH 8
 - 1 ml lincosima (5 mg/ml en Tris-HCl 0.025 M, pH8)
 - 0.1 ml RNasa (10 mg/ml en acetato de sodio 0.1M; EDTA 3.3×10^{-5} M, pH 7; precalentada a 10 min. a 85°C para quitar la RNasa).
- 8) Mezclar suavemente y dejar reposar en hielo 15 min.

- 9) Agregar 3 ml de mezcla lítica Tritón 3 X (3 ml Tritón X -100 al 10%, 75 ml de EDTA 0.25 M, 15 ml de Tris-HCl 1 M pH 8, 7 ml de -- agua), mezclar suavemente y dejar reposar en hielo 15 min.
- 10) Centrifugar en tubos de polipropileno en el rotor SS34 (Sorvall) a 17 K por 40 min.
- 11) Decantar el sobrenadante en una probeta inmediatamente. Anotar el volumen y vaciar en una botella de plástico de 250 ml.
- 12) Agregar un volumen de agua desionizada.
- 13) Agregar un volumen (respecto al total) de fenol frío saturado (fenol saturado en amortiguador: mezcla 1:1 de fenol, destilado sobre zinc, y Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM pH 7.5. Equilibrar 16 hrs. -- con agitación a 4°C), mezclar y agregar un volumen de cloroformo -- igual al de feno y agitar.
- 14) Centrifugar en rotor HS-4 (Sorvall) a 6.5K, 10 min.
- 15) Remover la fase acuosa (superior) y pasarla a otra botella, cuidando de no acarrear la película de proteínas de la interfase.
- 16) Agregar 1/20 del volumen total de 5M NaCl y agitar. Agregar 2.2 volúmenes de etanol a -20°C una hora y media cuando menos para -- que el DNA precipite.
- 17) Centrifugar en rotor HS-4, a 6.5K, por 60 min. Descartar el sobrenadante y secar la botella con una corriente de aire frío y suave.
- 18) Resuspender el precipitado en 5 ml de agua. Adicionar 1 ml de glicerol estéril y mezclar suavemente.

- 19) Colocar la suspensión en una columna de A50 (partículas del gel de agarosa para cromatografía por filtración; Bio-Ra) de 2 x 35 cm. Se corre con amortiguador A50 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.5 M, pH 8; NaN_3 1 mM; EDTA 1 mM, pH8). Se colectan fracciones de 4 ml.
- 20) Determinar la densidad óptica (D.O) a 260 nm para cada fracción. El DNA de plásmido se encuentra usualmente entre los tubos 12 y 20. (Una DO de 1.0 equivale a 50 ug de DNA/ml).
- 21) Reunir las fracciones que contienen el DNA y agregarles 2.2 volúmenes de etanol a -20°C . Mantener a -20°C al menos 1.5 hrs.
- 22) Centrifugar en rotor BS-4 a 6.5K por 60 min. Decantar y secar -- con una corriente de aire suave.
- 23) Resuspender el precipitado en 2.1 ml de amortiguador TEN (Tris-HCl 10 mM, pH 7.6; NaCl 10 mM; EDTA 1 mM) por cada 0.5 mg de DNA.
- 24) Se prepara un gradiente isopícnico a equilibrio en cloruro de cesio y yoduro de propidio (Pdl). Para esto:
Agregar en tubos de 5 ml de nitrato de celulosa (1/2" x 2"), por tubo:
 - 2.2 g de CsCl sólido
 - 2.1 ml de DNA en TEN
 - (debe trabajarse en penumbra a partir de este momento ya que el Pdl reacciona con la luz)
 - 0.150 ml de Pdl (solución de 2 mg/ml)
 - 2.3 ml de aceite mineral para balancear los tubos de centrifuga.

- 25) Centrifugar en el rotor SW50.1 (Beckman) a 38K por 20 hrs. a 20°C.
- 26) El DNA será visible con luz ultravioleta (UV) dado que el P₆₁ -- fluoresce al iluminarse con ella. Se observan 2 bandas; la superior que corresponde al plásmido roto relajado y la inferior que corresponde al plásmido superenrollado, covalentemente cerrado.
- 27) Bajo luz UV se pica el fondo de los tubos y se colecta lentamente el DNA de cada una de las bandas.
- 28) Correr el DNA a través de una columna de intercambio iónico -- (Dowex 50W-X8, Bio-Rad; tratada con ácido y luego base, 1N cada uno, neutralizada y almacenada en Tris-HCl 0.1 M, pH 8; NaCl -- 0.5M). Se colocan 2-3 ml de resina en una columna pequeña, y se equilibra con 10 ml de amortiguador de resina Dowex (Tris-HCl -- 50 mM pH 8; NaCl 1M; EDTA 1 mM), por cada ml de resina.
- 29) Colocar la muestra, diluída 1:1 en amortiguador de Dowex, eluir y luego lavar la columna con otro volumen de amortiguador. Revisar con luz UV que todo el P₆₁ haya quedado en la resina; si algo quedo, volver a lavar y pasar por la columna.
- 30) Dializar el DNA contra 4 litros de Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM pH 8; por mínimo 12 horas a 4°C. Cambiar el amortiguador y repetir la operación.
- 31) Sacar de la bolsa de diálisis y precipitar añadiendo 1/2) volumen de NaCl 5 M, y 2.2 volúmenes de etanol a -20°C por mínimo 3 hrs.
- 32) Centrifugar en el rotor HS-4, a 6.5 K por 60 min.
- 33) Resuspender en 0.5 - 1 ml de agua y medir la DO a 260 nm para determinar la concentración de DNA (usualmente 0.5 - mg/ml).

7) Electroforesis de DNA en Geles de Agarosa o Poliacrilamida

La electroforesis se llevó a cabo en placas, conforme a las condiciones descritas por Bolívar et al. (12).

- 1) Agarosa en polvo (Bio-Rad) al 1% se disuelve por ebullición durante 1-2 min. en solución Tris-boratos-EDTA (Tris-base 90 mM; EDTA - 2.5 mM; H₃BO₃ 90 mM pH 8.2).
- 2) Se vacían los geles y se dejan solidificar.
- 3) Las muestras, en un volumen final de 15-30 ul por carril (0.3-1 ug de DNA por carril) se disuelven en 6 ul de mezcla de parado SM -- (para 10 ml; 6 g de urea; 1 ml de 0.5% azul de bromofenol en agua; 1 ml 0.5% X Xilencianol en agua) y se colocan en los carriles.
- 4) La electroforesis se lleva a cabo a un voltaje constante de 150 V a temperatura ambiente por 60 min. utilizando amortiguador Tris-boratos-EDTA.

Los geles de poliacrilamida para DNA (fragmentos de DNA de peso molecular menor de 1 Md) se preparan de la siguiente forma:

- 1) Se mezclan 6 ml de Tris-boratos-EDTA 5 X 7.5 ml de solución de -- acrilamida bisacrilamida (29.2% y 0.8% respectivamente).
16.4 ml de agua y 0.15 ml de persulfato de sodio al 10% en agua.
- 2) Se desgasifica la mezcla y se le adicionan 15 ul TEMED y se vacía rápidamente en las placas.
- 3) La electroforesis se lleva a cabo a 150 V por 60 minutos.
Después de terminada la electroforesis, los geles se sumergen en

una solución de bromuro de etidio (4 mg/ml) y al someterlos a luz ultravioleta se observan las bandas.

Para fotograficar los geles se utiliza un filtro de gelatina - amarillo No. 9 Kodak-Wratten y película Polaroid NPTipo SS con una cámara MP-5 Polaroid.

8) Electroelusión de Geles de Agarosa para Purificación de Fragmentos de DNA

- 1) El DNA digerido con la endonucleasa correspondiente, se somete a electroforesis en un gel de agarosa (0.8%). Una vez identificada la banda de DNA que se desea aislar, el gel se corta con un bisturí y se coloca en una cámara de electroelusión (en fragmentos de 0.5 x 0.5 cm aproximadamente) y se cubren con amortiguador TE.
- 2) Se establece un puente de corriente eléctrica entre 2 cámaras -- utilizando amortiguador TEA:
 - 193.6 g Tris-base
 - 65.6 g acetato de sodio anhidro
 - 29.6 g Na₂EDTAse ajusta al pH a 8.1 con ácido acético y se lleva a un volumen -- final de 4 litros. Para usar esta solución se diluye 1:1.
- 3) Se mantiene en 80 V constantes por 3 horas a 4°C.

El DNA electroeluido se recupera directamente de la cámara, soluble en el amortiguador TE.

Con el fin de asegurarse que todo el DNA ha sido electroeluído, un fragmento del gel colocado en la cámara puede teñirse en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml), se somete a luz ultravioleta y si no se observa fluorescencia quiere decir que todo el DNA ha sido electroeluído. Si se observa fluorescencia, se deja que la electroelusión continúe hasta que la fluorescencia desaparezca.

El DNA obtenido se precipita con 1/20 volumen de 5 M NaCl y 2.2 volúmenes de etanol a -20°C.

Este DNA se mantiene a -20°C al menos por 2 horas. Posteriormente se centrifuga y el precipitado se seca para eliminar el etanol (con una corriente leve de aire). El precipitado se disuelve en agua o en amortiguador TE.

9) Sistema de Secuencia en el Fago M 13

El M13 es un fago filamentososo de cadena sencilla de DNA, específica de E. coli (+). La forma replicativa intracelular del M13 y sus derivados, es semejante a un plásmido en los siguientes aspectos: a) un pequeño tamaño, 7,238 pares de bases de longitud (M13mp7); b) alto número de copias, casi 200 por célula; c) varios sitios de clonación que dejan extremos cohesivos y/o rasurados; d) una fácil selección de fagos recombinantes por inactivación de inserción; cambio de placas azules a placas blancas. La forma de cadena sencilla del fago (cadena +), está empacada dentro de una cápside de proteína y el M13 en esta forma es expulsado fuera de las células, sin ocasionar lisis celular. Si un DNA pasajero es clonado directamente y el fago purificado, se separan las cadenas comple-

mentarias, una orientación del DNA clonado en cada una de las cadenas. La preparación de DNA de cadena sencilla de fago recombinantes es sumamente -- fácil y rápida de obtener en grandes cantidades; resulta un DNA puro que - contiene la clona en forma de cadena sencilla.

9.1 Transformación

De 1ng de forma replicativa circular, casi 1,000 transforman-- tes pueden ser obtenidas. Un DNA en forma replicativa digerido y vuelto a ligar, da una eficiencia de transformación del 50%. El método de transfor-- mación es el siguiente:

- 1) Las células son crecidas hasta 0.6 de densidad óptica a 660 nm.
- 2) Las células se centrifugan (30 ml. a 7,000 rpm. durante 5 minutos.
- 3) Se resuspenden en 15 ml. de CaCl_2 50 mM y almacenadas en hielo du-- rante 20 minutos.
- 4) Se centrifugan a 7,000 rpm. durante 5 minutos y se resuspenden en 3 ml. de CaCl_2 50 mM.
- 5) Se toman 0.3 ml de las células competentes y se agregan aproximada mente 2ng del vehículo, se incuban en hielo 40 minutos.
- 6) Se dá un choque térmico de 42°C durante 2 minutos y se adicionan directamente 0.01 ml. de IPTG 100 mM, 50 ul de Xgal (2%, 0.2 ml. de células en fase exponencial y 3 ml. de agar de superficie.
- 7) Se vacía ésto directamente sobre cajas de medio YT sólido, se de-- ja que el agar se solidifique totalmente y se incuba a 37°C durante 12 horas.

9.2 Síntesis in vitro de DNA

La clonación en el M13, provee templado de DNA de cadena sencilla para síntesis in vitro. Esto permite la producción de un DNA de cadena sencilla, para determinar la secuencia nucleotídica, usando el sistema de dideoxinucleótidos como terminadores de polimerización.

a) Preparación de DNA templado de cadena sencilla: las placas recombinantes obtenidas en la transformación, se toman cada una de ellas con un palillo estéril y se ponen a crecer en medio líquido YT 2X. Las células con los fagos son incubadas a 37°C. en agitación fuerte durante 7 horas. Después de este tiempo, son transferidas a tubos Eppendorf y las células son bajadas con una microfuga. El sobrenadante es recuperado y se suman 250 μ l de una solución de PEG al 40% en NaCl 5 M.

Se mezcla por inversión el tubo y se deja precipitando el fago a temperatura ambiente durante 15 minutos, se centrifuga 5 minutos y el sobrenadante es deshechado. El precipitado es resuspendido en 200 μ l de amortiguador TE y son sumados 200 μ l de fenol saturado, se agita fuertemente durante 10 segundos, se remueve el fenol y se suman 200 μ l de una mezcla de fenol/cloroformo (1:1). Se agita vigorosamente 10 minutos y se remueve la fase acuosa. Se suman 20 μ l de acetato de sodio 3M pH 5 y 0.5 ml de etanol, se pone a precipitar el DNA a -20°C durante 20 minutos y se centrifuga 5 minutos. El precipitado es resuspendido en 10 μ l de amortiguador TE. La producción va de 2 a 10 μ g de DNA de cadena sencilla.

b) Secuencia de DNA por el método de terminadores

La reacción de terminación de cadena es utilizada como la des-

cribe Sange (24) con las modificaciones siguientes: mezclar el templado (2 ul) con 10 ng de primer y 1.5 ul de amortiguador Hin (Hin 10X: 60 mM de Tris-HCl pH 7.5, 60 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT y 500 mM de NaCl) y llevar a un volumen final de 10 ul. Se incuba a 55°C durante 3 minutos y se deja apareando a temperatura ambiente. Se suenan 15 µCi (550 Ci/mmol) de dATP [α -³²P] por templado. Tres soluciones de nucleótidos tiene que ser preparadas: mezclas de desoxinucleótidos trifosfatos, solución de desoxinucleótidos trifosfato y solución cara. Las mezclas O de desoxinucleótidos trifosfato marcados como G^{*}, A^{*}, T^{*} y C^{*} son preparadas de la siguiente forma:

	G [*]	A [*]	T [*]	C [*]
0.5 mM dGTP	1 µl	7.5 µl	10 µl	10 µl
0.5 mM dATP	10 µl	7.5 µl	1 µl	10 µl
0.5 mM dCTP	10 µl	7.5 µl	10 µl	1 µl
Amortiguador Hin				
10 X	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl

Las soluciones de 0.5 mM de los dNTP's son preparadas a partir de lotes 10 mM de cada uno. Las soluciones este de dNTP's son las siguientes: 1 mM dATP, 1.25 mM dGTP, 2 mM dTTP y 1 mM dCTP; cada una es preparada a partir de stocks 10 mM. La solución cara es 0.5 mM dATP.

La reacción es efectuada en tubos de polipropileno siliconizados. El complejo primer-templado es puesto en hielo y mezclado con

la marca. De este se agregan 2 μ l para cada tubo de la reacción el cual contiene 1 μ l de la solución O correspondiente, 1 μ l del ddNTP correspondiente, 0.4 μ l de amortiguador Hin 10X 1.5 μ l de agua y 1 μ l de DNA polimerasa (fragmento Klenow); aproximadamente se ponen 0.1 unidades de enzima por reacción. La reacción es incubada 15 minutos y al final de este tiempo se adicionan 2 μ l de la solución caza. Se incuba 10 minutos y la reacción es terminada, por la suma de 4 μ l de una solución que contiene Xilen Cianol al 3%, azul de bromofenol al 3%, Formamida desionizada al 99% y EDTA 10 mM pH 7.5. Después de añadir la mezcla que para la reacción ésta es incubada 3 minutos a 95°C y 2 μ l son usados por carril en el gel de secuencia.

9.3 Geles de Poliacrilamida-Urea

Se utilizan geles al 8% de poliacrilamida de dimensiones: 35 cm X 43 cm X 0.2 mm. La solución para el gel se prepara de la siguiente forma:

- Urea	40.2 g
- Poliacrilamida- Bis (40% - 2%)	20 ml
- Tris foratos 10X	10 ml
- $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	1.0 ml
- agua destilada hasta	100 ml

La solución se disuelve con agitación. Se añaden 50 μ l de TEMED y el gel polimeriza en aproximadamente 5 minutos, por lo que debe vaciarse rápidamente. Los vidrios no deben tener grasa ya que si no se quedan burbujas atrapadas y el gel no sirve. Una vez vaciado el gel se

le coloca el peine adecuado para hacer los carriles.

Una vez polimerizado el gel, se retira el peine y los carriles se lavan perfectamente para evitar que se quede acrilamida en los pozos.

Se monta el gel en una cámara vertical y se llena con amortiguador Tris boratos 1X.

Cada carril debe tener 2 l de solución de reacción.

El gel se corre con un voltaje inicial de 2.0 KV por 10 minutos, y posteriormente se corren a 65 watts constantes hasta que el azul de bromofenol salga del gel.

9.4 Autorradiografía del Gel

Una vez corrido el gel, se le quita uno de los vidrios y el gel se cubre con una película de plástico delgada (Kleen Pack) evitando que queden burbujas o arrugas. En completa oscuridad se expone el gel a una placa de radiografía (Kodak) y se envuelve en papel oscuro para evitar que le entre luz.

El filme se expone 12 horas a una temperatura de -20°C para evitar difusión de las bandas.

Para revelar la película se utilizan reactivos de Kodak para revelado y fijación de películas.

10) Microensayo de DNA de Plásmido

Se utilizó el método modificado de extracción alcalina de DNA de plásmido reportado por Birnboim y Doly (46). Se preparan las siguientes soluciones:

- I) 2 mg/ml lisozima de 50 mM glucosa, 10 mM EDTA y 25 mM Tris-HCl pH 8.
- II) 0.2 N Na OH y 1% sodio-dodecil-sulfato (SDS)
- III) 3 M acetato de sodio pH 4.8 (el Ph se ajusta con ácido acético glacial).
- IV) 0.1 M acetato de sodio en 0.05 M Tris-HCl pH 8
- V) 1 mg de RNasa A en 1 ml de agua con 5 mM Tris-HCl pH 8 (la mezcla se hierve por 10 minutos).

El procedimiento es como sigue:

- 1) 2 ml de cultivo incubado 19 hrs se centrifugan en tubos Eppendorf y las células se lavan con 10 mM NaCl.
- 2) Se centrifugan las células y posteriormente se resuspenden en -- 100 µl de solución I y se mantienen a 0°C por 30 minutos.
- 3) Se agregan 200 µl de solución II y los tubos se agitan suavemente. La suspensión se torna transparente y ligeramente viscosa.
- 4) Después de 5 minutos a 0°C, se agregan 150 µl de solución III y el tubo se invierte cuidadosamente hasta que se forme una malla de -- DNA.
- 5) El tubo se mantiene 60 minutos a 0°C. Durante este tiempo se precipita el DNA cromosomal, proteínas y RNA de alto peso molecular.

- 6) La centrifugación por 5 minutos produce un sobrenadante claro. Se extraen 0.4 ml de este sobrenadante y se transfieren a otro tubo.
- 7) 1 ml de etanol a -20°C se agregan con el fin de precipitar el DNA de plásmido. El tubo se mantiene a -20°C por 30 minutos.
- 8) El precipitado se colecta por centrifugación y posteriormente se disuelve en 100 μl de solución IV y se reprecipita con 200 μl de etanol a -20°C .
- 9) Se repite la operación número 8.
- 10) Se centrifuga de nuevo y el precipitado se seca para eliminar los residuos de etanol.
- 11) El precipitado se disuelve en 36 μl de agua destilada y se agrega a esta solución 4 μl de la solución V. El tubo se incuba a 37°C por 20 minutos.

{ Una vez obtenido de este modo el DNA, puede tratarse con enzimas de restricción o bien puede utilizarse para transformación de otras cepas.

V. RESULTADOS

1) CONSTRUCCION Y CARACTERIZACION DE PLASMIDOS

1.1 Construcción del p Δ 36opCm

Con el objeto de tener un plásmido que tenga el operador de lactosa y el promotor consenso y que a partir de este se transcriba el gen de la acetiltransferasa de cloranfenicol, se realizó el siguiente experimento de recombinación in vitro de DNA. Como se observa en la Figura (8) en el p Δ 36cp, tenemos que a partir del promotor, el cual aparentemente está bajo el control de los operadores de lactosa, se transcribe el gen de resistencia a tetraciclina; por lo tanto se decidió substituir el gen de resistencia a tetraciclina por el de la acetiltransferasa de cloranfenicol. Para este objetivo se tomó al p Δ 36 Cm, como fuente de gen de la acetiltransferasa de cloranfenicol, dado que puede ser obtenido con una digestión total de HindIII. El gen de la acetiltransferasa de cloranfenicol se encuentra flanqueado por dos sitios de HindIII, con su sitio de unión a ribosoma y sin promotor (47).

Para obtener el gen de resistencia a cloranfenicol, se digirieron 10 μ g de DNA de plásmido (p Δ 36 Cm) con la endonucleasa HindIII. El producto resultante fué sometido a una electroforesis preparativa en agarosa al 1%, se cortó la banda más pequeña que lleva el gen de la acetiltransferasa de cloranfenicol y se electrocluyó.

Para quitar el gen de resistencia a tetraciclina del p Δ 36op, este plásmido se digirió con la enzima AvaI, el DNA resultante fué tratado

con la nucleasa SI, de tal forma de obtener fragmentos rasurados; a este DNA de plásmido se le unieron adaptadores de HindIII y posteriormente, se cortó con la enzima HindIII de tal forma que se pudo separar el gen de -- resistencia a tetraciclina del resto del vehículo, quedándonos de esta -- forma extremos cohesivos para la enzima HindIII en el plásmido. El frag- mento de mayor peso molecular fué separado del gen de resistencia a tetra- ciclina por electroforesis preparativa en un gel de agarosa al 1% y some- tido a electroelución.

El fragmento obtenido de esta electroelución se mezcló con el fragmento que lleva el gen de la acetiltransferasa de cloranfenicol en -- proporción molar de 5:1 (5 de fragmento de acetiltransferasa de cloranfe- nicol y 1 de vehículo) y fué sometido a una reacción de ligasa de DNA, -- usando la enzima de ligasa de T4. El DNA ligado se usó para transformar la cepa de E. coli MC1061; las recombinantes fueron seleccionadas directa- mente en cajas de medio Luria suplementados con ampicilina y cloranfeni- col. Las clonas se analizaron por medio de un microensayo de DNA inspec- cionando el patrón de restricción con la endonucleasa HaeIII. Hay que -- señalar que como se conoce el patrón completo de restricción del p 36op y del gen de la acetiltransferasa de cloranfenicol, se esperaba un patrón específico para el plásmido que tuviese el gen de resistencia a cloranfeni- col regulado a partir del promotor consenso y los operadores sintéticos - del operón de lactosa. El plásmido obtenido es el p Δ 36oCm y en la Figu- ra 9 se puede observar un esquema de su construcción.

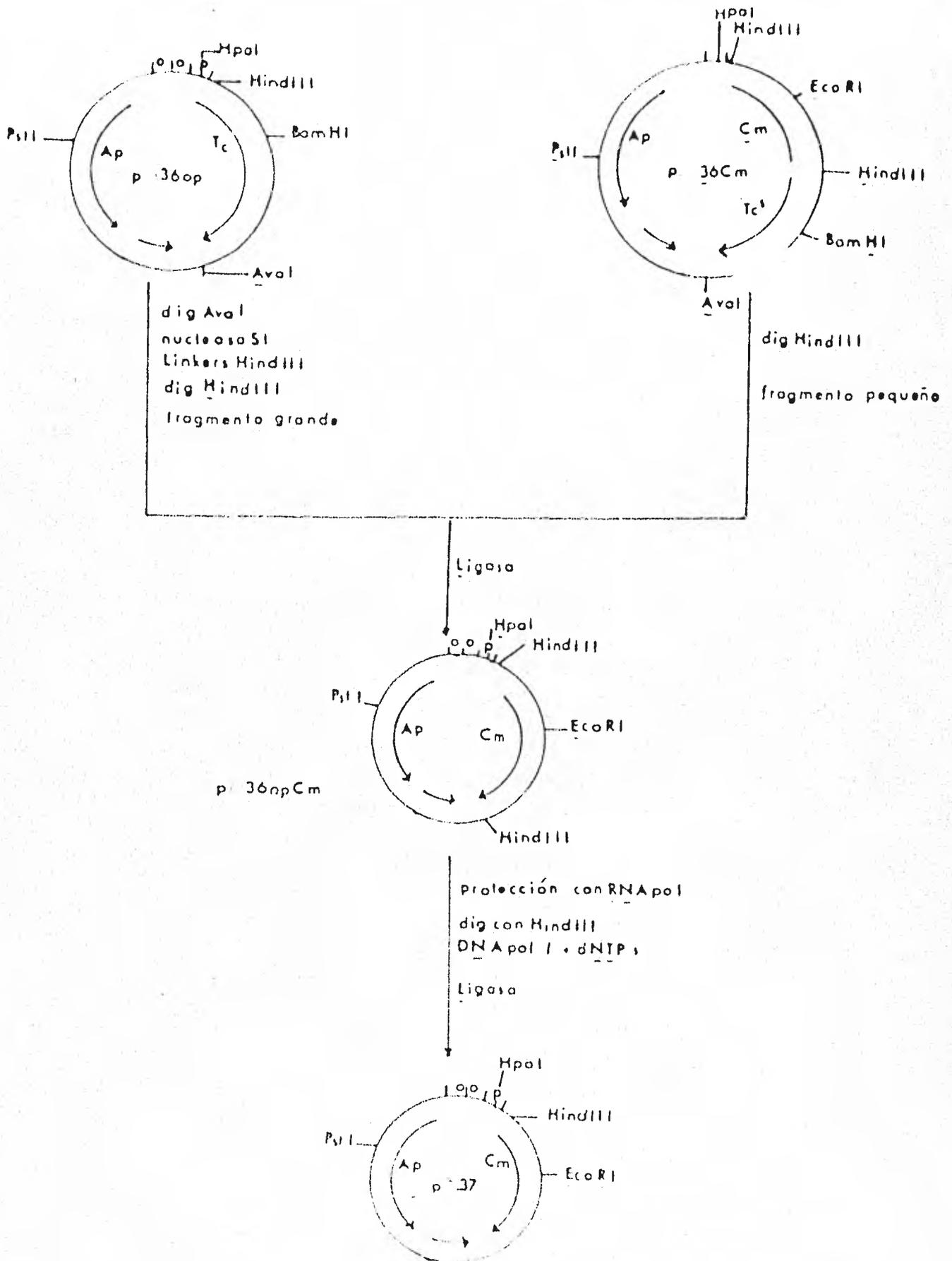


FIGURA 9. Esquema de la construcción de los vehículos moleculares $p\Delta 36opCm$ y $p\Delta 37$. --

1.2 Caracterización por Endonucleasas de Restricción del p_{360pCm}.

De las clonas analizadas se seleccionaron dos plásmidos que -- conferían resistencia a cloranfenicol; estos fueron el p Δ _{360pCm-2} y -- p Δ _{360pCm}. Ambos fueron purificados y analizados por patrones de diges-- tión con las enzimas HaeIII y AluI. En la Figura (10) se puede observar que en el plásmido p_{360pCm} los fragmentos 7, 8 y 10 del patrón de res-- tricción con HaeIII corresponden a los sitios internos esperados, prove-- nientes del gen de la acetiltransferasa de cloranfenicol y que los frag-- mentos 4 y 5 corresponden al tamaño esperado, que es de 265 y 260 pares de bases respectivamente, de las fusiones en HindIII del gen de la acetil-- transferasa de cloranfenicol. En el p Δ _{360pCm-2} se puede observar que -- hubo un gran inserto de DNA extraño en la banda 3 correspondiente al pa-- trón de digestión con HaeIII del p Δ _{360p}; probablemente se ligó en esta -- región un fragmento grande de DNA cromosomal contaminante; el plásmido -- no fué caracterizado más allá de este punto.

De esta manera se obtuvo un vehículo molecular pequeño, de -- 2660 pares de bases (aproximadamente 1.8×10^6 daltons) en el cual el gen que confiere resistencia a cloranfenicol se transcribe a partir del promo-- tor consenso y éste probablemente está bajo el control del operador de lac tosa.

1.3 Construcción del p Δ ₃₇

A pesar de que el p Δ _{360pCm} es ya un plásmido adecuado para ha-- cer estudios de transcripción a partir del promotor consenso, éste presen-- ta dos sitios de HindIII, que flanquean al gen de la acetiltransferasa de

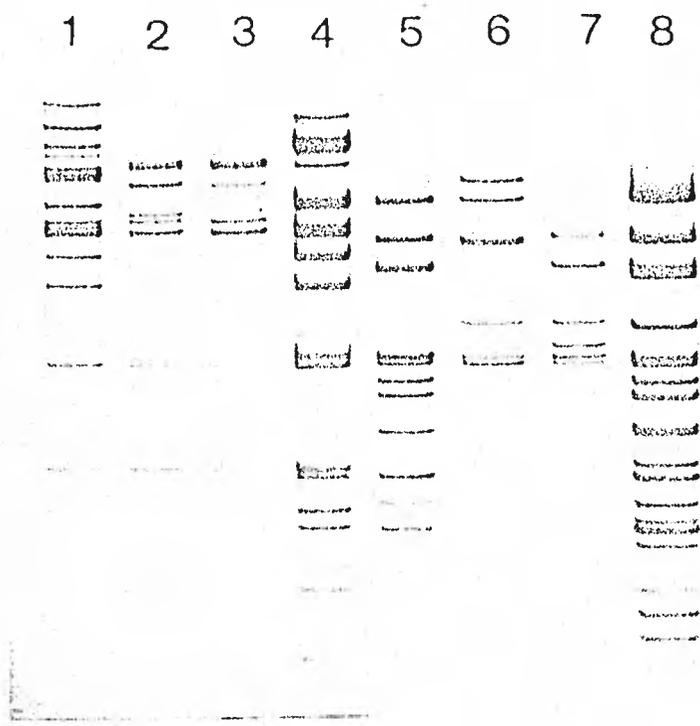


FIGURA 10. Caracterización con endonucleasas de restricción de los plásmidos $p\Delta 360Cm$ y $p\Delta 360Cm-2$. Carril Núm. 1: $p\Delta 360Cm$ digerido con Alu I; carril 2: $p\Delta 360Cm-2$ + Alu I; carril 3: $p\Delta 360Cm$ + Alu I; carril 4: pBR328 con Alu I; carril 5: $p\Delta 360Cm$ digerido con HaeIII; carril 6: $p\Delta 360Cm-2$ + HaeIII; carril 7: $p\Delta 360Cm$ + HaeIII; carril 8: pBR328 + HaeIII.

cloranfenicol. Un sitio unico de HindIII, proximal al promotor consenso permitiría realizar mejores manipulaciones del vehículo, como es modifi-- car con exonucleasas al promotor, o clonar nuevos fragmentos de DNA de ma-- nera que queden bajo el control del promotor canónico. Por lo tanto se - decidió eliminar el sitio de HindIII distal al promotor.

Para lograr este objetivo, se incubaron 4 pmolas del p 36pCm con 44 pmolas de RNA polimerasa (proporción molar de 10:1, a una concentra-- ción de 66 mM de KCl durante 10 minutos). Bajo estas condiciones la RNA polimerasa se une a todas las secuencias de DNA que pueden ser reconoci-- das como un promotor y, en ausencia de nucleótidos, la enzima se queda -- anclada. Después de este tiempo se sumaron 30 unidades (3 ul) de la en-- zima HindIII, ajustando la concentración de KCl a 66 mM, e incubando la - mezcla de reacción 30 minutos más. De esta forma, la enzima solo cortó - en el sitio de HindIII distal al promotor, ya que el proximal está prote-- gido por la RNA polimerasa (53).

El DNA de plásmido en su forma lineal, fué tratado con DNA po-- limerasa I (fragmento grande), en presencia de los 4dNTP's, para rellenar los extremos cohesivos de HindIII y de esta manera eliminar el sitio de - esta enzima distal al promotor. El DNA fué sometido a una reacción de li-- gasa y transformado en la cepa de E. coli MC1061.

Las transformantes fueron analizadas, por microensayo de DNA de plásmido y se buscaron aquellos vehículos que solo tuviesen un solo si-- tio de HindIII. De 12 microensayos de DNA realizados, todos los plásmidos tenían un sitio para la enzima HindIII.

Para demostrar que el sitio único de HindIII está localizado en forma proximal al promotor consenso se realizó una doble digestión -- HaeIII. En la figura (11a) se puede observar que el plásmido obtenido, el p Δ 37, solo presenta un sitio de HindIII y en la figura (11b) se puede ver que en una digestión doble HaeIII-HindIII, la banda número 4 del patrón -- con HaeIII, que contiene el sitio proximal de HindIII al promotor, desaparece dando lugar a 2 bandas más pequeñas que coinciden con el tamaño esperado.

El p Δ 37 es un plásmido más versátil que el p Δ 36op y el --- p Δ 36cm, para realizar estudios de transcripción usando el promotor consenso como modelo de promotor.

1.4 Secuencia Nucleotídica de los Operadores y el Promotor Canónico en el p Δ 37

A pesar de que por el patrón de restricción del p 36op nosotros sabíamos que continúa a la región de -35 del promotor consenso, existe un segmento de DNA que equivale en tamaño a dos veces el operador sintético del operón de lactosa, no podíamos asegurar que así fuese por este simple hecho; por otro lado, tampoco sabíamos la orientación en la que -- estaba este fragmento con respecto al promotor. Por lo tanto, se decidió realizar la secuencia nucleotídica de esta región. El sistema de secuenciación usado fue el del fago M13 (46), el cual permite una fácil selección de moléculas recombinantes y se puede purificar templado de cadena -- sencilla en forma rápida y eficiente (ver Material y Métodos).

Para clonar en el fago M13 la región reguladora de interés, el p Δ 37 fue digerido con la endonucleasa TaqI. Dado su pequeño tamaño --

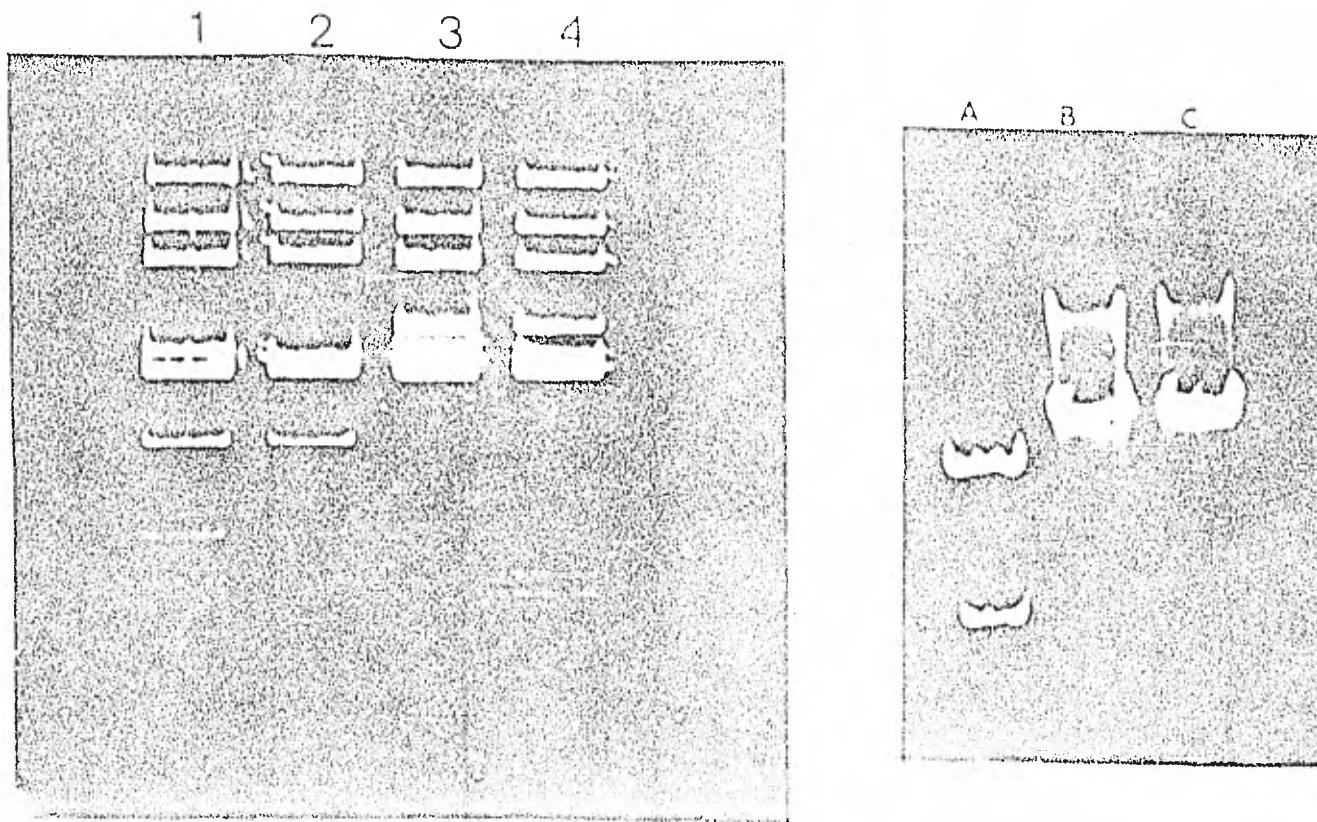


FIGURA 11. Demostración de que el sitio único de HindIII en el $p\Delta 37$ está localizado en forma proximal al promotor consenso. Figura 11 a) Carril A: digestión del $p\Delta 36pCm$ con HindIII; -- carril B: $p\Delta 37$ digerido con HindIII; carril C: $p\Delta 37$ con EcoRI (el $p\Delta 37$ sólo tiene un sitio de EcoRI). Figura 11 b) Carril 1: $p\Delta 37$ digerido con BaeIII-HindIII; carril 2: $p\Delta 36pCm$ digerido con BaeIII-HindIII; carril 3: $p\Delta 37$ digerido con BaeIII y carril 4: $p\Delta 36pCm$ digerido con BaeIII.

el p Δ 37 sólo tiene 4 sitios para esta enzima y esto facilita la purificación de la banda correspondiente. La enzima TaqI reconoce la secuencia -TCGA, dejando extremos cohesivos 5' terminales, que son compatibles con los producidos por la endonucleasa AccI, que reconoce la secuencia GTCGAC y de la cual el M13mp7 tiene un solo sitio en el poliadaptador. En la figura (12) se puede apreciar un esquema de la estrategia de clonación seguida en el fago. El fragmento de TaqI que lleva el promotor fué ligado al M13mp7 (el cual había sido digerido con la enzima AccI) y transformado en la cepa de E. coli JM101. Aproximadamente el 40% de las placas obtenidas fueron recombinantes. Se tomaron 12 placas infectivas al azar y a partir de ellas se purificó DNA de cadena sencilla. Se realizó la secuencia de 4 de ellas como se indica en material y métodos. En la Figura (13) se muestra la secuencia nucleotídica de la región regulatoria en la cual se pueden leer, primero el promotor y después los operadores a partir del primero universal de secuencia. Con este método de secuencia fué posible leer 250 pares de bases.

A partir de los datos de secuencia pudimos comprobar que los operadores se encuentran repetidos y totalmente adyacentes a la región de -35 del promotor consenso. También se pudo determinar que los operadores se encuentran en orientación invertida a como están localizados en el operón de lactosa Figura (14).

Ya que existen datos experimentales que muestran asimetría en la unión del represor y el operador (49), que el represor lac aparentemente interactúa más fuertemente con el brazo izquierdo del operador y que el represor solo se une a una cara del operador (50) nos planteamos la pre-

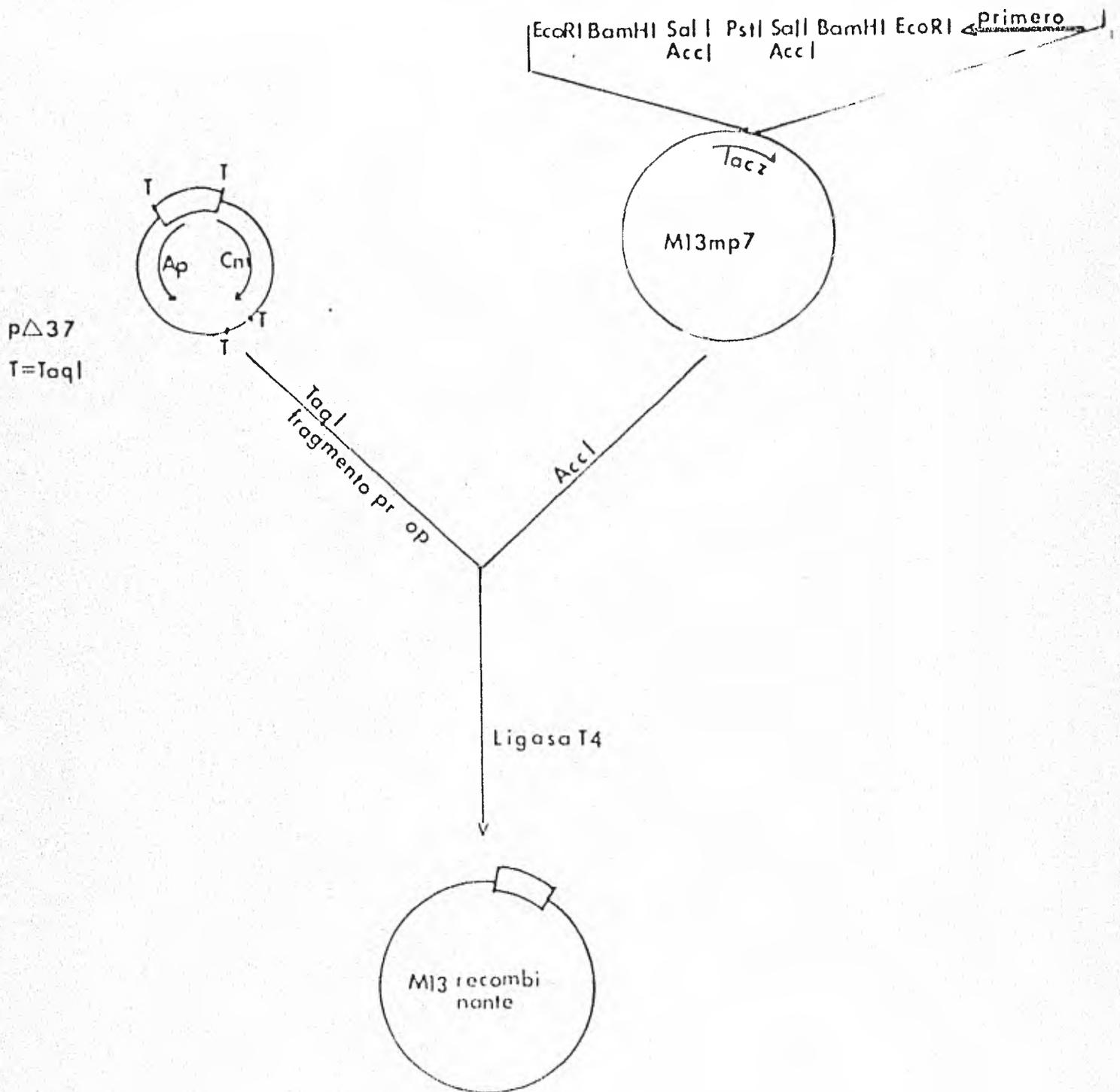


FIGURA 12. Esquema de la estrategia seguida para la clonación de los operadores de *lac* y el promotor sintético en el fago de cadena sencilla M13.

op2	op1	-35	-10	+1	
AATTGTTATCCGCTCACAATT	AATTGTTATCCGCTCACAATT	AATTGTTGACAATTAAGTTAACTATTGTT	ATAAATGTATTCCCAAGCTT		o
<u>TTAACAATAGCCGAGTGTAA</u>	<u>TTAACAATAGCCGAGTGTAA</u>	<u>TTAAGAACTGTTAATTAATTGATAAACAAT</u>	<u>TATACATAAAGCTTCAA</u>		
		promotor consenso			

-35	-10	+1	op lac	
ACCCCAAGCTTTACACTTTATGTTCCGCTCGTATGTTGTTGG	AATTGTTGACCGAATAACAATT			b
<u>TGGGCTCCGAAATGTCAAATACAAGCCGAGCATACAAGACACC</u>	<u>TTAACACTCCCTATTGTTAA</u>			
promotor lac				

FIGURA 14. Comparación de la posición y orientación del operador de lactosa y de los operadores sintéticos, con respecto al promotor que regulan. Como se puede observar los operadores de lac están en posición de orientación diferente con respecto al promotor consenso (a), a como se encuentra localizado y orientado en el operón de lactosa (b).

SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL
PROMOTOR Y DE LOS OPERADORES
SINTETICOS.-

C I A G C I A G

SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL
PROMOTOR Y DE LOS OPERADORES
SINTETICOS.-

C I A G C I A G



gunta siguiente: ¿Puede el represor de lactosa ejercer un efecto inhibitorio sobre la unión de la RNA polimerasa al promotor consenso a pesar de que su sitio blanco está en otra posición y orientación con respecto a lac?

1.5 Curvas de Crecimiento de la Cepa D1210 (Cepa Superproductora de Represor lac) Conteniendo los Plásmidos p 36op y p 37 con y sin Inductor Gratuito, en Presencia de Antibióticos

Para contestar la pregunta formulada en el inciso anterior, se realizó una curva de crecimiento de una cepa superproductora de represor (lag Iq) la D1210 conteniendo el p 36op (en el cual a partir del promotor consenso se transcribe el gen de resistencia a tetraciclina) o el p 37 (que confiere resistencia a cloranfenicol, a partir del promotor conónico) en presencia del antibiótico correspondiente y con IPTG o sin él (IPTG es un inductor gratuito de la β -galactosidasa).

Para realizar ésto se transformó la cepa de E. coli D1210 con el p 37 y el p 36op y se seleccionaron las transformantes en cajas con medio Luria en presencia de ampicilina. Se tomó una colonia de cada una y se incubó en medio líquido Luria (5 ml) durante 12 horas. De este cultivo se inoculó en matraces Klett con un volumen de 30 ml cada uno y se incubó a 37° con aeración, probando diferentes concentraciones de antibiótico con y sin IPTG, para cada uno de los plásmidos. El crecimiento fué determinado en un espectrofotometro Bausch and Lomb a 540 nm de longitud de onda. En la tabla siguiente, se puede observar las lecturas tomadas en diferentes tiempos y a diferentes concentraciones de antibióticos.

p Δ 36op Tc^r

p Δ 37 Cm^r

Concentración antibiótico (mg/ml.)		+IPTG			-IPTG			+IPTG			-IPTG		
		0.03	0.06	0.12	0.03	0.06	0.12	0.03	0.15	0.30	0.03	0.15	0.30
Tiempo (hrs)	3	0.08	0.02	0.01	0.07	0.02	0.05	0.28	0.08	0.01	0.25	0.00	0.08
	3.5	0.09	0.02	0.05	0.05	0.02	0.08	0.41	0.12	0.05	0.35	0.01	0.07
	4	0.12	0.01	0.06	0.05	0.02	0.03	0.60	0.18	0.03	0.53	0.01	0.07
	4.5	0.15	0.01	0.07	0.02	0.02	0.04	0.63	0.25	0.03	0.63	0.01	0.01
	5	0.20	0.03	0.03	0.05	0.02	0.04	0.67	0.34	0.05	0.64	0.01	0.06
	5.5	0.26	0.01	0.02	0.02	0.02	0.05	0.69	0.45	0.04	0.63	0.01	0.05
	7	0.35	0.93	0.03	0.03	0.03	0.05	0.68	0.58	0.58	0.64	0.02	0.07

La concentración de IPTG fue de 10 mM, constante para todos los casos.

En la Figura (15) se puede observar el comportamiento de la D1210 con el p 37 y el p 36op en presencia de su antibiótico respectivo con IPTG y sin él.

En los datos obtenidos a partir de la curva de crecimiento se puede observar, que para el p 36op (que confiere resistencia a tetraciclina) a 0.03 mg/ml del antibiótico se vé una marcada diferencia en cuanto a la resistencia a tetraciclina con o sin IPTG. Por otro lado en el p Δ 37 solo a la concentración de 0.15 mg/ml. de cloranfenicol se puede observar una diferencia notable en cuanto a la resistencia por el antibiótico con y sin el inductor gratuito. Con este experimento se demuestra en forma indirecta, pero concluyente, que al unirse el represor de lactosa a los operadores sintéticos que están adyacentes a la región de -35 el promotor consenso, ejercen un efecto represivo sobre la unión de la RNA polimerasa al promotor; esto a pesar de la posición y la orientación de los operadores con respecto al promotor en relación a la configuración silvestre.

2) DESARROLLO DE LA TECNICA DE MUTAGENESIS SITIO ESPECIFICA POR OLIGONUCLEOTIDOS SINTETICOS; SISTEMA DE PLASMIDO

Como se mencionó en la introducción, una de las aplicaciones más importantes que aporta la síntesis química de DNA es la mutagénesis sitio específica, dirigida por oligonucleótidos sintéticos. Asimismo, en los antecedentes se dijo que no hay datos suficientes acerca de si la distancia entre -10 y -35 de un promotor es determinante en el mecanismo de unión de la RNA polimerasa o su isomerización a complejo abierto.

En esta parte del trabajo reporte algunos adelantos en cuanto

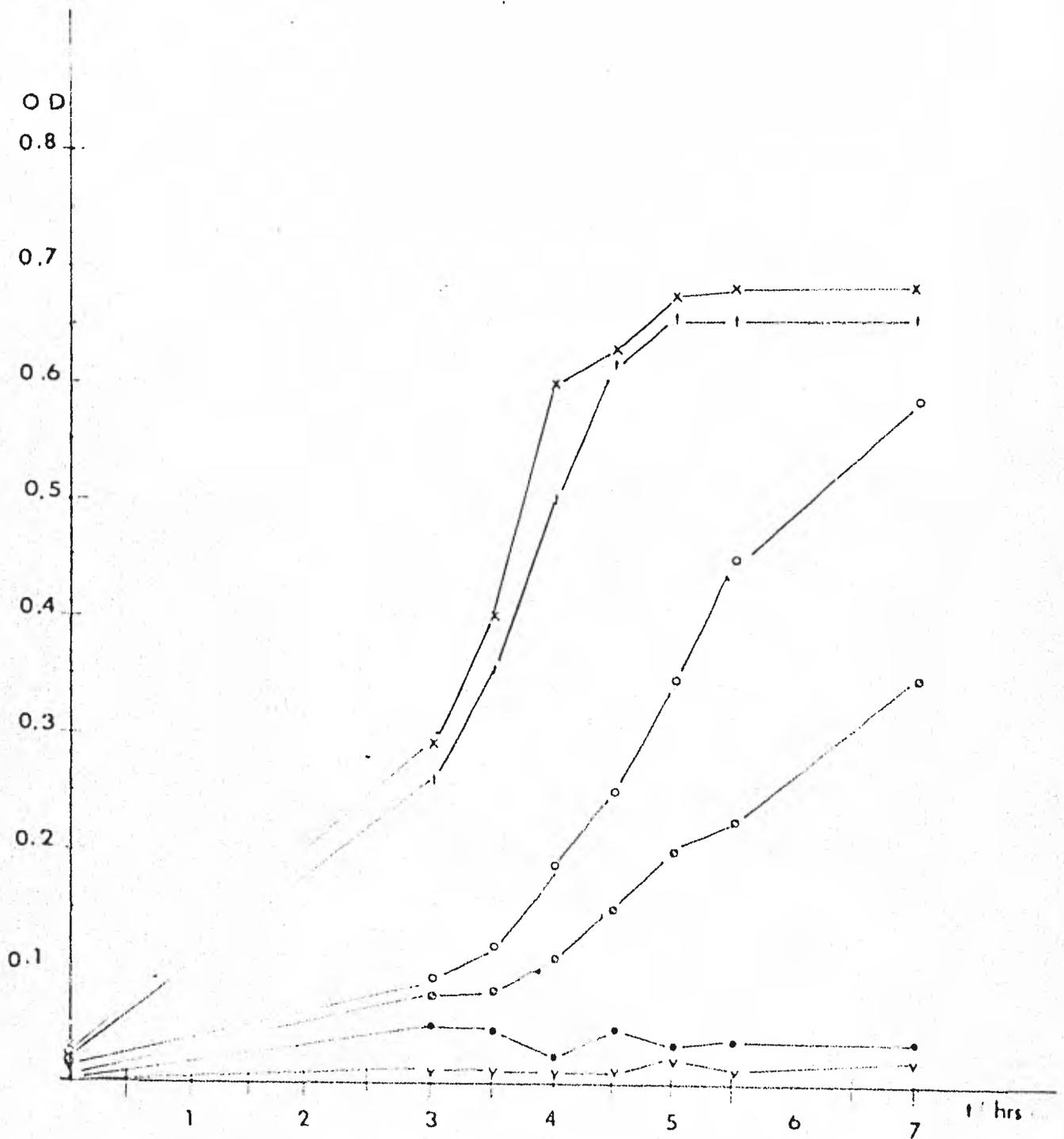


FIGURA 15. Curva de crecimiento de la cepa D1210 (superproductora del represor de lactosa) con el p Δ 36op y el p Δ 37, en presencia de su antibiótico respectivo con y sin IPTG: x—x D-1210 con el p Δ 37 en presencia de Cm (0.03 mg/ml) y de IPTG a una concentración de 10 mM; t—t D1210 con el p Δ 37 en presencia de Cm (0.02 mg/ml) y sin IPTG; o—o D1210 con el p Δ 37 en presencia de Cm (0.15 mg/ml) y con IPTG; o—o D1210 con el p Δ 37 en presencia de Cm (0.15 mg/ml) y sin IPTG; e—e D1210 con el p Δ 35 op en presencia de Tc (0.02 mg/ml) con IPTG; v—v D1210 con el p Δ 36op en presencia de Tc (0.02 mg/ml) sin IPTG.

al desarrollo de este sistema de mutagénesis en plásmido.

Brevemente resumida la técnica de mutagénesis sitio específico dirigida por oligonucleótidos en plásmido consiste en tener la región de interés (secuencia blanco de la mutación) en un plásmido. Este DNA de plásmido se pasa de la forma I (superenrollado) a la forma II (relajado), por una mella usando una endonucleasa en presencia de bromuro de etidio y estas dos formas de DNA se separan en un gradiente continuo de CsCl. El DNA en forma II, es tratado con la exonucleasa III de E. coli, que corta solo a partir del extremo 3' hidroxilo, de tal forma que se obtiene un DNA de cadena sencilla circular. Este DNA de cadena sencilla funciona como templado en una reacción de síntesis in vitro de DNA, usando DNA polimerasa, la cual empieza a incorporar nucleótidos a partir de un oligonucleótido sintético, que funciona como primer. Este oligonucleótido hibrida en condiciones permisivas contra la región que se desea modificar, a la cual es complementario, excepto por las bases que se quieren mutar. El DNA reparado se usa para transformar a E. coli K12, las colonias que llevan el plásmido con la mutación son inspeccionadas usando el sistema de hibridación en colonia, modificado por Wallace (51) y por último se comprueba que se tiene la mutación haciendo secuencia de DNA de las clonas positivas.

2.1 Obtención de DNA de Plásmido en forma II

Para tener las condiciones adecuadas de la reacción de obtención de DNA de plásmido relajado a partir de DNA superenrollado se realizó una titulación de esta reacción. Las condiciones fueron las siguientes: 10 μ g de DNA de plásmido (p Δ 37) fueron incubados con 10 unidades -

de la enzima EcoRI, en presencia de bromuro de etidio (100 µg/ml) en -- amortiguador Hin (7 mM de NaCl, 7 mM de Tris HCl pH 7.5, 7 mM de acetato de Magnesio y 7 mM DTT); la reacción fué efectuada en un volmen final de 50 ul. Se tomaron alícuotas de 10 ul a diferentes tiempos y se paró la reacción adicionando 5 ul de solución de paro de reacción. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1%, horizontal, a 60 volts, durante 6 horas.

Como se puede observar en la Figura (16a), desde el tiempo 0 con enzima, empieza a aparecer la banda correspondiente al DNA relajado, incrementándose ésta con el tiempo y simultáneamente va desapareciendo -- la banda que corresponde al DNA ⁺superenrollado. También a partir del -- minuto 5 se empieza a notar una banda que corresponde al DNA lineal, que también se incrementa a medida que el tiempo de la reacción avanza. La figura (16b) sirve como patrón de referencia del tipo de migración de -- cada una de las formas de DNA en una electroforesis horizontal de agarosa, corrida a 3v/cm.

A partir de los datos obtenidos con esta titulación, se obser-- vó que 60 minutos es el tiempo de incubación más adecuado bajo estas con-- diciones dado que a este tiempo el DNA superenrollado desaparece comple-- tamente. También a este mismo tiempo de incubación, existe la presencia de DNA de plásmido en forma III (lineal), lo cual no es conveniente. Se hicieron modificaciones en las concentraciones de enzima y bromuro de -- etidio con respecto a la concentración de DNA, para tratar de obtener un máx-- imo rendimiento de DNA relajado, en ausencia de DNA lineal, sin embar-- go nunca se pudo evitar que el DNA lineal apareciera. Por lo tanto se --

FIGURA 16b

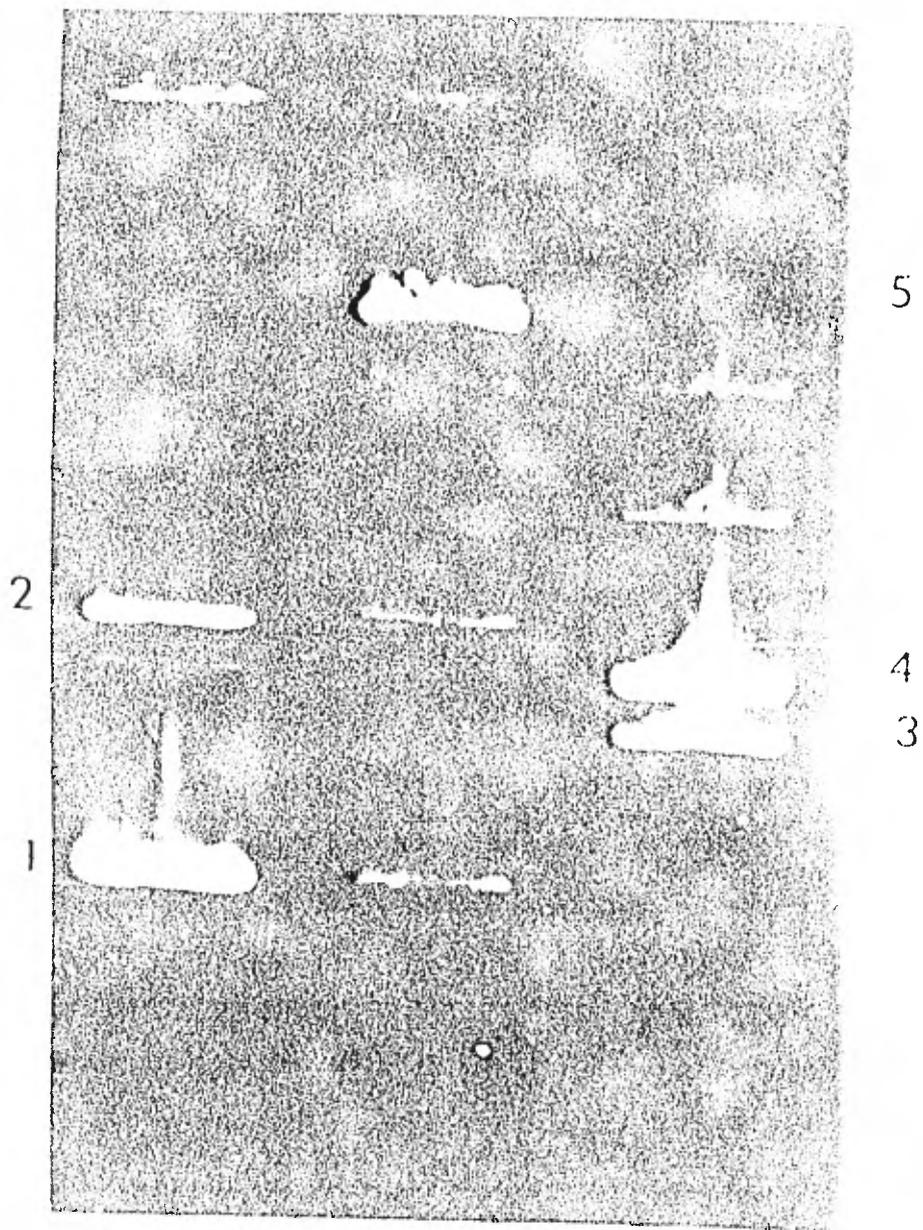


FIGURA 16 a

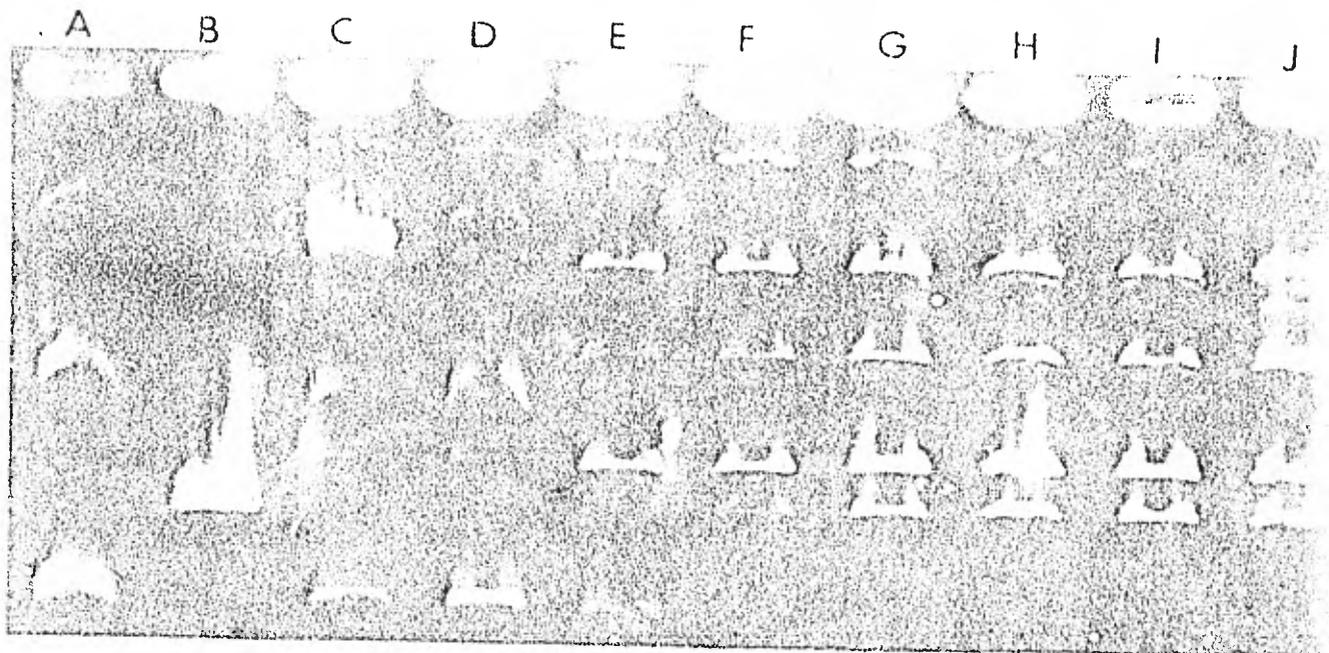


FIGURA 16. a) Titulación de la reacción de obtención de DNA en forma II, a partir de DNA en forma I usando una endonucleasa (*EcoRI*) en presencia de bromuro de etidio; carril A) DNA sin digerir en presencia de bromuro de etidio; carril B) DNA de plásmido lineal; carril C) DNA relajado; carril D) DNA de plásmido con enzima en presencia de bromuro de etidio al tiempo 0; carril E) cinco minutos de reacción; carril F) diez minutos de reacción; carril G) treinta minutos de reacción; carril H) sesenta minutos de reacción; carril I) noventa minutos de reacción; carril J) ciento veinte minutos de reacción. b) Patrón de referencia del tipo de migración de cada una de las formas de DNA en una electroforesis horizontal de agarosa a 2V/cm: 1) -- DNA forma I (superenrollado); 2) --- DNA superenrollado; 3) - - - DNA en forma III (lineal); 4) DNA en forma II (relajado); 5) DNA circular.

prefirió tomar las condiciones iniciales y tomar el tiempo óptimo de reacción de 1 hora.

2.2 Obtención de DNA Circular de Cadena Sencilla

Para encontrar las condiciones óptimas del tratamiento con la exonucleasa III, se procedió a hacer una titulación de la reacción, con respecto al tiempo. Las condiciones fueron las siguientes: 4 µg de DNA relajado, más 28 unidades de exonucleasa III (1.5 l), fueron incubados en 50 µl de Tris-HCL pH 7.2, 10 mM, 2 mM de MgCl₂, 1 mM de -mercapto stanol a 37°C. Se tomaron alícuotas de 10 µl en diferentes tiempos y sometidas a electroforesis en gel de agarosa. En la Figura (17) se puede observar que desde el tiempo 0 con la enzima, la exonucleasa III empieza a actuar y que entre 10 y 15 minutos la reacción prácticamente se ha completado. Por lo tanto se decidió que bajo estas condiciones el tiempo óptimo de incubación fuera de 10 y 15 minutos.

2.3 Condiciones de Reparación

Para obtener las condiciones adecuadas de reparación, estas han sido probadas con base en los datos reportados por Wallace (51) y sujetas a modificaciones. Inicialmente el oligonucleótido usado como mutágeno, fué un dodecámero, que presenta la secuencia TTAAC^{*}TATGT, el cual es complementario a una parte de la secuencia comprendida entre -35 y -10, excepto por una base del promotor canónico y con el que se desea hacer una delección sencilla en la posición que muestra el asterisco.

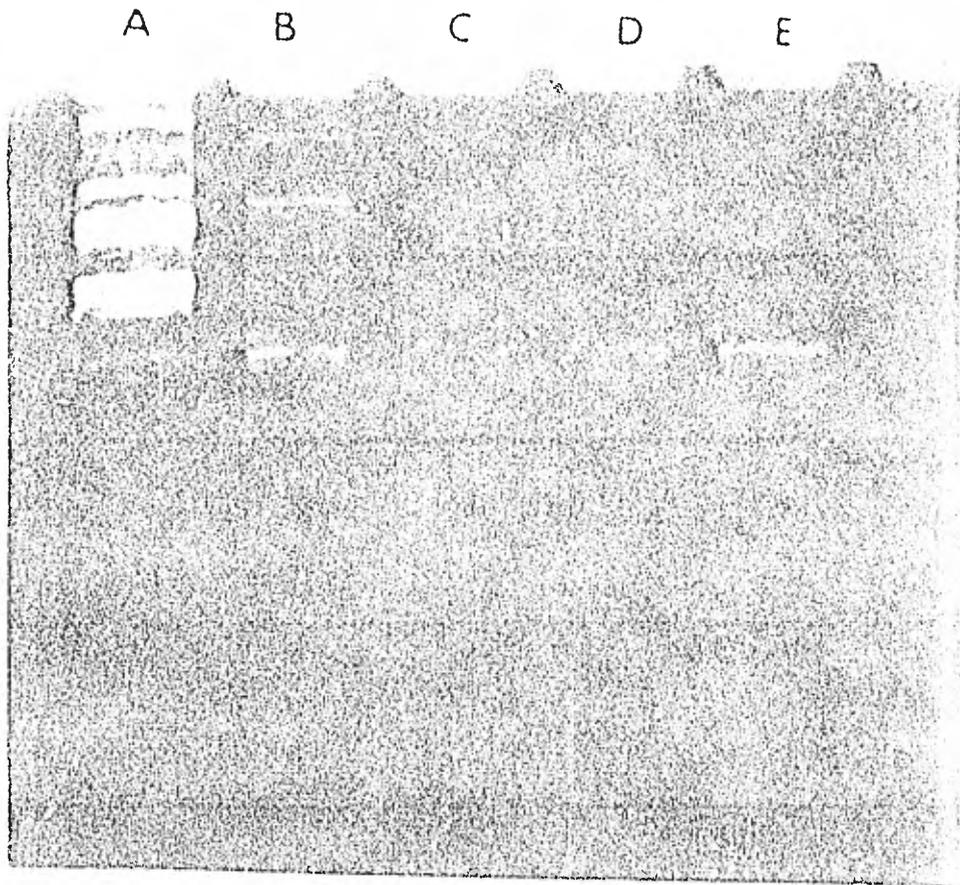


FIGURA 17. Titulación de la reacción de obtención de DNA circular de cadena sencilla a partir de DNA en forma II. Carril A) Tiempo 0 en presencia de exonucleasa III; carril B) cinco minutos de reacción; carril C) diez minutos de reacción; carril D) veinte minutos de reacción; carril E) treinta minutos de reacción.

En los experimentos de reparación, usando este oligonucleótido, se observó que la eficiencia es demasiado baja y esto se supuso es -- debido a que el dodecámero es muy poco estable al hibridar con su templado.

La poca estabilidad del dodecámero, sería atribuible a que es una longitud muy corta y rico en bases A y T, lo que daría por consecuencia que su T_m (temperatura de deshibridación) sea de aproximadamente 28°C y su T_d (temperatura de hibridación) esté comprendida entre los 26 y 24°C aproximadamente (52).

Para superar este inconveniente, se sintetizó un hexadecámero con la siguiente secuencia: TTAGTTTAACTATTTGTT, el cual presenta ahora un T_m de 38°C y una T_d entre 36 y 34°C (cada par de bases G-C = 4°C ; cada par de bases A - T = 2°C).

La reacción de reparación usando el hexadecámero como primero se realizó de la siguiente manera: el oligonucleótido fué fosforilado en su extremo 5' usando la Kinasa del fago T4 como se reporta en Material y Métodos. Cinco microgramos de DNA circular de cadena sencilla, fueron -- mezclados con 64 pmolas del hexadecámero en Tris-HCl pH 7.5, 25 mM, 10 mM de MgCl_2 , 50 mM de NaCl y 1 mM de DTP, hervido durante 5 minutos y enfriado lentamente durante 20 minutos. Después de este tiempo la reacción fué ajustada a 0.8 mM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfatos, 0.4 mM de ATP, más 90 unidades de DNA polimerasa (fragmento grande) por mililitro y 15,000 unidades de DNA ligasa de T4 por mililitro. La reacción -- fué incubada a 16°C durante 12 horas.

El DNA de la reacción de reparación fué usado para transformar la cepa de E. coli MC1061. Las transformante fueron seleccionadas en medio sólido con ampicilina y las colonias fueron transferidas a filtros de nitrocelulosa (Milliporo HATFO90), para ser analizadas por el método de hibridación en colonia reportado por Wallace (52). Hasta en el momento en que se reporta este trabajo, no ha podido ser identificada una colonia que lleve el plásmido con la deleción sencilla en el promotor consenso. Sin embargo se han obtenido mejores rendimientos de reparación con el --- hexadecámero y es probable que la mutación sea localizada en poco tiempo.

VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Dos vehículos moleculares que nos permitirán hacer estudios -- sobre los mecanismos de transcripción, a partir de un promotor modelo, -- fueron construídos por recombinación in vitro de DNA.

El plásmido p Δ 36opCm, es un vehículo que tiene el promotor -- canónico, el cual está bajo el control del operador de lactosa (que está repetido en tandem) y en el que a partir de éste se transcribe el gen de la acetiltransferasa de cloranfenicol. Este vehículo presenta caracterís-- ticas interesantes, como que a partir del promotor consenso se transcribe un producto que es fácil de cuantificar (la proteína que confiere resis-- tencia a cloranfenicol). Esto nos permitirá medir, en forma indirecta la eficiencia del promotor para condiciones diferentes. Asimismo, en caso de que por manipulaciones futuras el promotor consenso incremente su fuerza (35), el operador de lactosa podrá controlar la frecuencia de transcrip-- ción a partir del promotor consenso, y nos permitirá hacer estudios de la influencia de una zona reguladora, sobre el funcionamiento del promotor -- (podría esperarse, que un promotor muy fuerte confiriera una desventaja -- selectiva a las células que lo lleven en forma de multicopia). Otra ca-- racterística importante es que este vehículo molecular presenta un tamaño pequeño (2,660 pares de bases), lo cual lo hace realmente atractivo para experimentos de clonación, ya que a pesar de su bajo peso molecular pre-- senta dos genes de resistencia a antibióticos, con sitios únicos para en-- zimas de restricción localizadas dentro de estos genes y es adecuado para iniciar el desarrollo de la técnica de mutagénesis sitio específica diri-- gida por oligonucleótidos sintéticos.

Como se dijo en los resultados, el p Δ 36pCm presenta dos sitios de restricción para la enzima HindIII que flanquean el gen de la acetiltransferasa de cloranfenicol. Este tiene la ventaja que este plásmido se puede usar como fuente de un fragmento de DNA que lleva el gen de la acetiltransferasa de cloranfenicol, por medio de una simple digestión con la enzima HindIII.

Sin embargo, para futuros experimentos que permitan clonar fragmentos de DNA que estén bajo el control del promotor consenso, es importante que tenga un solo sitio para la enzima HindIII y que esté localizado entre el promotor y el gen de la acetiltransferasa de cloranfenicol. Esto facilitará la recombinación de zonas funcionales del promotor, usando el sitio interno en el promotor de HpaI y el sitio proximal de HindIII. Por lo tanto, se construyó el p Δ 37, el cual como se mencionó anteriormente es un vehículo más versátil para estudios de transcripción, usando el promotor consenso como modelo y puede ser utilizado como vehículo molecular de clonación. El p Δ 37 presenta sitios únicos de restricción para las siguientes enzimas: PvuII, EcoRI, BalI, HindIII y HpaI, que inactivan al gen de la acetiltransferasa de cloranfenicol si fragmentos de DNA son insertados en esta región; y de las enzimas PvuI y PstI, que inactivan al gen de resistencia a ampicilina si son interrumpidos Figura (9).

Con los datos obtenidos a partir de secuencia, se pudo comprobar que durante la clonación del operador sintético de lactosa en el sitio único de EcoRI del p Δ 36 (antecedentes); el operador quedó repetido. Asimismo, encontramos que los operadores se encuentran en orientación invertida con respecto a su localización en el operón de lactosa. Esto podría

ocasionar que los operadores no fueron funcionales, dado que se ha reportado (50), que la simetría que presenta el operador es una característica importante en la unión del represor al operador y que probablemente juega un papel en el mecanismo de represión sobre el operón de lactosa.

Para comprobar que el represor, al unirse al operador, reprime la transcripción a partir del promotor consenso a pesar de estar en orientación invertida y en una posición diferente con respecto al promotor; se hizo una curva de crecimiento en presencia o ausencia de IPTG. Con los datos obtenidos, se demostró que los operadores ejercen un efecto represivo sobre el promotor (Figura) (15).

Esto nos indica que, independientemente de la posición y orientación el operador ejerce un efecto represivo cuando la molécula del represor se une a él. Hay que mencionar que inmediatamente a -35 del promotor consenso, empieza el primer operador de lac. Como sabemos, por los datos revisados por Bujard (34), la RNA polimerasa cubre aproximadamente 80 nucleótidos, que van de -60 a + 20. Al unirse el represor al operador, se sabe que cubre aproximadamente 26 bases; por lo tanto lo más probable es que al unirse el represor (que es un tetrámero, de una sola subunidad), impida estéricamente que la RNA polimerasa se una al promotor.

Para que esto realmente ocurra, tenemos que tomar en cuenta -- que tanto la RNA polimerasa (36), como el represor (50), se unen en un solo lado de la molécula de DNA. Así pues, si este fuese el caso, la orientación del operador con respecto al promotor consenso, debería de estar en tal forma que tanto la RNA polimerasa y el represor lac se unan en este --

caso aproximadamente a la misma cara del DNA.

Otra consideración que se tiene que hacer, es que al estar invertido el operador, la orientación de unión con respecto al promotor debe ser rotada casi 180° con respecto a lac. Este podría influenciar su actividad represiva sobre la formación del complejo RNA polimerasa promotor. Sin embargo, se ha reportado que el lado izquierdo del operador (en su posición normal) es al cual se une más fuertemente el represor. En la Figura (18) se puede ver que este lado izquierdo, queda adyacente al promotor consenso, lo cual es consistente con la presencia de represión. En otras palabras, el efecto de represión sobre la unión de la RNA polimerasa al promotor por el represor podría ser más eficiente en esta orientación, por la posición que tiene con respecto al promotor. Para comprobar esto, se requeriría cambiar la orientación de los operadores con respecto al promotor consenso y medir en forma comparativa el efecto represivo del represor lac en ambas orientaciones, titulando directamente la concentración de la acetil transferasa de cloranfenicol.

Con los dos vehículos moleculares que fueron construidos en este trabajo, se empezó a desarrollar la técnica de mutagénesis sitio específica derivada por oligonucleótidos sintéticos. Para efectuar esto, se empezó por montar las condiciones óptimas de la reacción, para obtener DNA en forma II, a partir de DNA en forma I. Las condiciones que consideramos adecuadas, se reportan en los resultados. Esto nos ha permitido que ahora la reacción sea prácticamente rutinaria y reproducible. Un problema que hemos tenido es, que desde una fase temprana de la reacción, la enzima comienza a digerir totalmente al DNA de plásmido, ocasionando molé

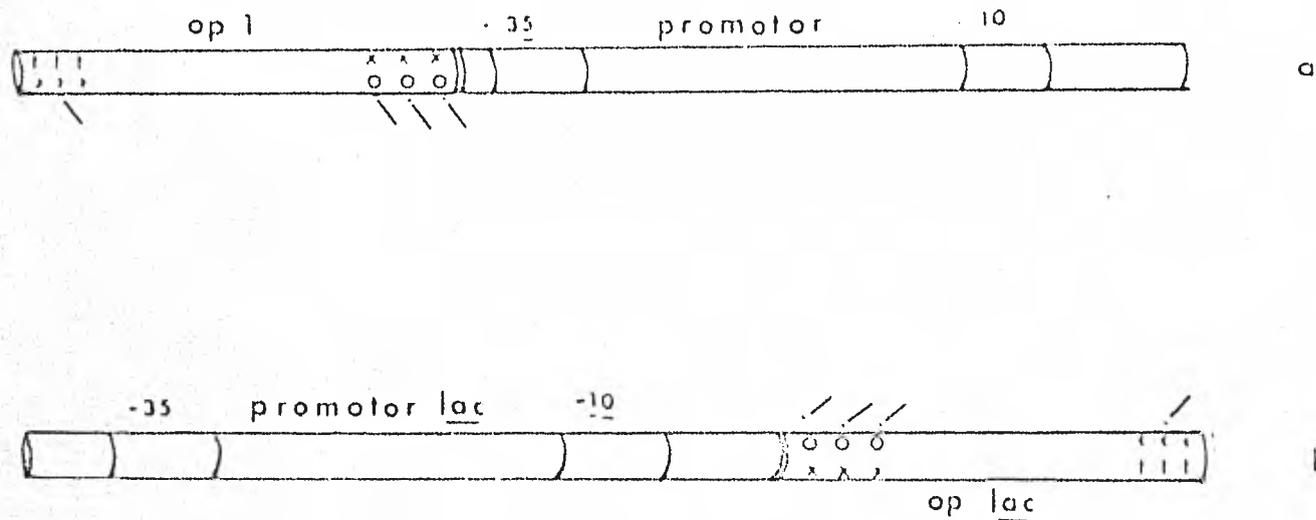


FIGURA 18. En este esquema se puede apreciar la disposición y orientación del operador de lactosa con respecto al promotor consenso y con respecto al promotor de lac. Como se puede apreciar la región de mayor contacto del represor con el operador (flechas) se encuentra adyacente a -- ambos promotores. En lac hacia abajo de -10 y el promotor consenso hacia arriba de -35.

culas lineales. Se varió la concentración de enzima y la concentración de bromuro de etidio, con respecto a la concentración de DNA el problema siguió persistiendo. Por lo tanto, se decidió que las concentraciones iniciales eran las mejores, esperando que el DNA lineal no afecte a los pasos siguientes de esta metodología.

Las condiciones óptimas para obtener DNA circular de cadena sencilla, a partir de DNA relajado, están de acuerdo con las reportadas por B. Wallace (51). Aparentemente la reacción es fácil y las titulaciones fueron bastante reproducibles. Sin embargo, esta reacción es totalmente dependiente de la calidad de purificación de la Exonucleasa III y del DNA, ya que en ocasiones el DNA es totalmente degradado.

Recientemente, Bruce Wallace (comunicación personal) ha realizado mutagénesis sitio específicas usando DNA relajado como molde de reparación, saltándose el paso de la Exonucleasa III; ya que éste ocasiona los problemas que mencionamos. Esta opción está siendo probada en laboratorio.

Con lo que respecta a las condiciones de reparación, hemos tenido eficiencias muy bajas, usando el dodecámero como primero de la reacción. Por lo tanto, se sintetizó un hexadecámero, que es más estable y con el que se están logrando mejores rendimientos. Con este oligonucleótido, nos hemos dedicado a la búsqueda de la colonia que contenga el plásmido con la delección sencilla en el promotor consenso. Se han obtenido colonias (aproximadamente 3,000) a partir de DNA reparado. Se ha iniciado la búsqueda de la clona que contenga el plásmido con la mutación

en el promotor, sin tener resultados positivos, sin embargo se han rastreado un número bajo de colonias (200) y es probable aún que la clona positiva esté en estas colonias ya que se ha reportado que la eficiencia de obtención de mutación con este sistema va de el 0.5% al 7%.

VII. REFERENCIAS

1. J.D. Watson and F.H.C. Crick. 1953. Nature, Vol. 171, N° 4356, 737-738.
2. F.H. Portugal and J.S. Cohen. 1979. A century of DNA. Cambridge Massachusetts, U.S.A.
3. R.L.P. Adams, R.H. Burdon, A.M. Campbell, and R.M.S. Smellie. 1979. The Biochemistry of Nucleic Acids, Academic Press, N.Y.
4. F. Bolívar. 1979. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 21: 37-55.
5. R.J. Roberts. 1976. Critical Rev. Biochem. 4, 123-164.
6. F. Rougeon, F., Kourilsky. F. March. 1975. Nucleic Acids Research, 2, 2365-2378.
7. D.S. Hogness and J.R. Simons, 1974. Journal of Molecular Biology 9, 411: 438-
8. S.N. Cohen, A.C. Chang, H.W. Boyer and R.E. Helling. 1973. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 70: 3240-3244.
9. R. Stein, Y. Gruenbaum, J. Pollack, A. Razin and H. Cedar. 1982. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 79; 61-65.
10. M. Wigler, D. Levy and M. Perucho, 1981; Cell, Vol. 24, 33-40.
11. R. Novick, R. Clowes, S. Cohen, R. Curtis III, N. Data and S. Falkow. 1976. Bacterial. Rev. N° 40: 168-189.
12. F. Bolívar, Rodríguez, R., P. Greene, M.C. Botlach, H. Heyneker, H. Bayer, J. Cross; and S. Falkow. 1977. Gene, 2; 95-113.
13. F. Bolívar. 1978; Gene, 4, 121-

14. X. Soberón, L. Covarrubias and F. Bolívar. 1980. *Gene*, 9; 287-305.
15. L. Covarrubias and F. Bolívar; 1982, *Gene* 17, 52-59.
16. A. Ramback and P. Tiollais. 1974. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71; 3921-3927.
17. M. Thomas, J.R. Cameron and R.W. Dawis. 1974. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71; 4579-4583.
18. H.G. Khnorana. 1979. *Science*, 203; 614-
19. K. Itakura and A. Riggs. 1980. *Science* Vol. 29; 1401-1405.
20. S. Gillam, P. Jahnke, C. Astell, S. Phillips, C. Hutchison and M. Smith. 1979. *Nucleic Acids Research*. 6, 2973.
21. K. Itakura, T. Hirose, K. Crea, A.D. Riggs, H. Heynecker, F. Bolívar and H.W. Boyer. 1977. *Science*, 198; 1056-1061.
22. D. Goeddel, D. Kleid, F. Bolívar, H. Heynecker, D. Yansura, R. Crea, T. Hirose, A. Kvaszewski, K. Itakura and A. Riggs; 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 1763-1767.
23. M.D. Edge, A. Greene, G. Heathcliffe, P. Meacock, W. Schuch, D. Scanlon, T. Atkinson, C. Newton and A. Markham; 1981, *Nature*, Vol. 292; 20; 756-761.
24. F. Sanger, S. Nicklen, A.F. Coulson. 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74; 5463-5467.
25. D.L. Montgomery, E.D. Hall, S. Gillam and M. Smith. 1978. *Cell*. Vol. 14; 673-680.
26. Dr. Shertle and D. Nathans. 1981. *Ann. Rev. Genet.* 15. 265-294.
27. E. Wallace, M. Johnson, T. Hirose, T. Hiyake, E. Kawashima and K. Itakura. 1981. *Nucleic Acids Research* Vol. 9, 4; 879-894.

28. B. Wallace, P. Johnson, T. Shoji, M. Schöld, K. Itakura and J. Abelson. 1980. *Science* 209; 1396-1400.
29. M. Rosenberg and D. Court. 1979. *Ann. Rev. Genetic.* 13; 319-353.
30. M.J. Chamberlain. 1976. En RNA polymerase. pag. 17. Cold Spring Harbor Laboratory. N.Y.
31. V.A. Gavin and H. Bujard. 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 76, 189-193.
32. J. Sancier and J. Warry. 1975. *Nature* 239; 167-168.
33. D. Pribnow. 1975. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol. 72; 784-787.
34. H. Bujard. 1980. *Trends in Biochemical. Sci.* October 270-274.
35. D.K. Hawley and W.R. McClure. 1982. *Journal of Molecular Biology.* 157. 493-525.
36. U. Siebenlist, R. Simpson and W. Gilbert. 1980. *Cell*, Vol. 20; 269-281.
37. Goldberger R.F. 1979. en *Biological Regulation and Development*. Plenum Press. N.Y.
38. S. Adhya and M. Gottesman. 1978. *Ann. Rev. of Biochem.* 47, 967.
39. G. Galluppi, and J.P. Richardson. 1976. en *RNA polimerase*. Cold Spring Harbor. 657.
40. K. Bertrand, J.L. Kom, P. Lee and C. Yanofsky. 1979. *Journal of Molecular. Biol.* 117, 227.
41. X. Scheron, J. Rossi, G. Larson and K. Itakura (en publicación).
42. P.J. Greene, B. Heyneker, M. Estlach, F. Bolívar, R. Rodríguez, A. Covarrubias, K. Bachman and H. Boyer. 1978. *Nucleic Acids, Research* 5, 2773-2780.

43. S. Cohen, A. Chang and C. Hsu. 1973. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 3240-3244.
44. R. Clewel. 1972. Journal of Bacteriology. 110: 667-676.
45. M. Betlach, V. Herschfield, B. Chow, W. Brown, H. Goodman and H. Boyer. 1976. Fed. Proc. 35: 2037-2043.
46. H. Birnboim and J. Doly. 1979. Nucleic Acids Research. Vol. 7, 6: 1513-1523.
47. R. Rodríguez (en publicación).
48. F. Sanger, A. Coulson, B. Barrell, A. Smith and B. Roe. 1980. Journal of Molecular Biology 143; 161-178.
49. M. Barkley and S. Bourgeois. 1980. The operon, Cold. Spring Harbor. N.Y. 177; 215.
50. D. Goeddel, D. Vansura and M. Carothers. 1978. Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 8, 3578-3582.
51. B. Wallace, M. Schold, M. Johnson, P. Dembereck and K. Itakura. 1981. Nucleic Acids Research 12; 3410.
52. B. Wallace, J. Schaffer, J. Murphy, J. Bonner, T. Hirose and K. Itakura. 1979. Nucleic Acids Research. Vol. 8 Núm. 11, 3543-3557.

APENDICE

ABREVIATURAS

Apr	=	Resistencia a ampicilina
Cm ^r	=	Resistencia a cloranfenicol
d	=	dalton
D.O	=	Densidad óptica
DTT	=	Ditiotritol
mg	=	Miligramo
ml	=	Mililitro
mμ	=	Nanómetros
p.b.	=	Pares de bases
rpm.	=	Revoluciones por minuto
Tc ^r	=	Resistencia a tetraciclina
mg	=	Microgramo
ul	=	Microlitro

NOTAS

- DNA plásmido forma I = Superenrollado
- DNA plásmido forma II = Relajado (circular con un "nick")
- DNA plásmido forma III = Lineal
- DNA polimerasa, fragmento Klenow, es el fragmento grande de la enzima sin la actividad 5' → 3' exonucleasa.