

24: 31



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología

**CLONACION DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN
DEL PLASMIDO Ti DE Agrobacterium tumefaciens
EN pBR328.**

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

Luz del Carmen Castellanos Román

México, D. F.

Mayo de 1983





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCION	2
<i>Agrabacterium tumefaciens</i> y las agallas de la corona (<i>Crown gall</i>)	3
Tipos de tumores	6
Los plásmidos Ti en la inducción de tumores	9
El mapa genético de los plásmidos Ti	10
Los plásmidos Ti como vectores moleculares	15
La ingeniería genética	17
Vehículos moleculares	20
OBJETIVOS	22
MATERIALES Y METODOS	24
Aparatos	24
Cepas bacterianas	24
Reactivos	25
Purificación de plásmidos Aislamiento del pBR328	25
Purificación de plásmidos Ti Método Modificado de Currier y Nester (50)	28
Método de Koelman (1980) (51)	30
Aislamiento rápido de plásmidos grandes y pequeños, método de Kado y Liu (52)	31
Digestiones con enzimas de restricción	32
Electroforesis	32

INDICE Cont.

<i>Electroelusión</i>	33
<i>Columna de BND- Celulosa</i>	33
<i>Método de ligamiento</i>	34
<i>Transformación</i>	34
R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N	37
<i>Purificación del pBR328</i>	37
<i>Purificación del plásmido Ti</i>	37
<i>Electroelusión</i>	39
<i>Transformación</i>	41
<i>Conclusiones</i>	43
A P E N D I C E	
a) <i>Medios de cultivo</i>	45
b) <i>Soluciones para purificación de plásmidos</i>	47
c) <i>Soluciones para electroforesis</i>	50
d) <i>Soluciones para electroelusión</i>	51
e) <i>Soluciones para columna de BND - CELULOSA</i>	51
f) <i>Preparación de bolsas de diálisis</i>	51
g) <i>Soluciones amortiguadoras para enzimas</i>	52
B I B L I O G R A F I A	53

ABREVIATURAS

AIA	<i>Acido indol acético</i>
Ap	<i>Ampicilina</i>
Cm	<i>Cloranfenicol</i>
CsCl	<i>Cloruro de cesio</i>
EDTA	<i>Acido etilen diamino tetracético</i>
EtBr	<i>Bromuro de etidio.</i>
PEG	<i>Polietilenglicol</i>
PdI	<i>Yoduro de propidio</i>
P V A	<i>Alcohol Polivinílico</i>
SDS	<i>Dodecil sulfato de sodio</i>
Tc	<i>Tetraciclina</i>
u. V.	<i>ultravioleta.</i>

INTRODUCCION

Desde hace miles de años el desarrollo de la agricultura se ha basado en el mejoramiento genético de las especies cultivables, a través de la selección y propagación de caracteres deseados que aparecen espontáneamente en las poblaciones silvestres y cultivadas.

La variabilidad genética se obtiene por las mutaciones y la reproducción sexual, no obstante que esta última tiene sus limitaciones como son la imposibilidad de cruce entre especies distintas, que es impedida por las barreras reproductivas; sin embargo, el hombre empezó a eliminar poco a poco estas barreras primero con la importación de especies de un lugar a otro, la fertilización artificial, los injertos, etc., de esta manera la calidad de los productos agrícolas han mejorado notablemente, pero al mismo tiempo, debido al método de selección, las plantas han perdido muchas otras características que les permitían sobrevivir en su ambiente natural y se han vuelto demasiado dependientes del hombre, que se ha visto obligado al uso de los pesticidas y fertilizantes en los cultivos, método que contamina cada vez más el medio ambiente mostrándonos que la estrategia no es del todo adecuada.

Es necesario desarrollar nuevas variedades que posean las características adaptativas que han perdido las plantas cultivadas, pero que existen aún en las plantas silvestres como son: la resistencia a plagas, la tolerancia a la salinidad, a la sequía, al frío, etc.

El problema para llevar a cabo esto es el aislamiento reproductivo, por lo que hay que utilizar nuevas técnicas para rescatar estos genes.

Pese a la plasticidad que muestran las plantas en la formación de híbridos por fusión celular, los problemas para obtener las combina---

ciones genéticas deseadas son enormes. Es por esto que se requiere de un método mas eficiente de modificación genética para células vegetales, algo semejante a los métodos de transformación empleados en la ingeniería genética de bacterias, en donde uno o más genes perfectamente caracterizados son integrados al genoma de la célula receptora bajo un sistema de regulación conocido. Aunque el desarrollo de tal sistema se vislumbra lejano dada la complejidad genética y estructural de las células eucarióticas, existen sistemas naturales de transformación que pueden ser empleados con este propósito como el que se analiza a continuación.

Agrobacterium tumefaciens y las agallas de la corona (Crown gall)

Al igual que los animales, las plantas superiores también desarrollan tumores con una etiología muy semejante a la de los primeros. El crecimiento neoplásico o canceroso en células vegetales puede inducirse por: radiaciones, agentes químicos, virus de ARN (1). Aunque no se han encontrado virus de ADN, existe un equivalente de estos en la bacteria A. tumefaciens, como el producido en algunos híbridos de Nicotiana (2).

En 1907 Smith y Townsend (3) identifican a la especie A. tumefaciens como el agente responsable de un tipo de tumor vegetal, llamado agalla (Crown gall).

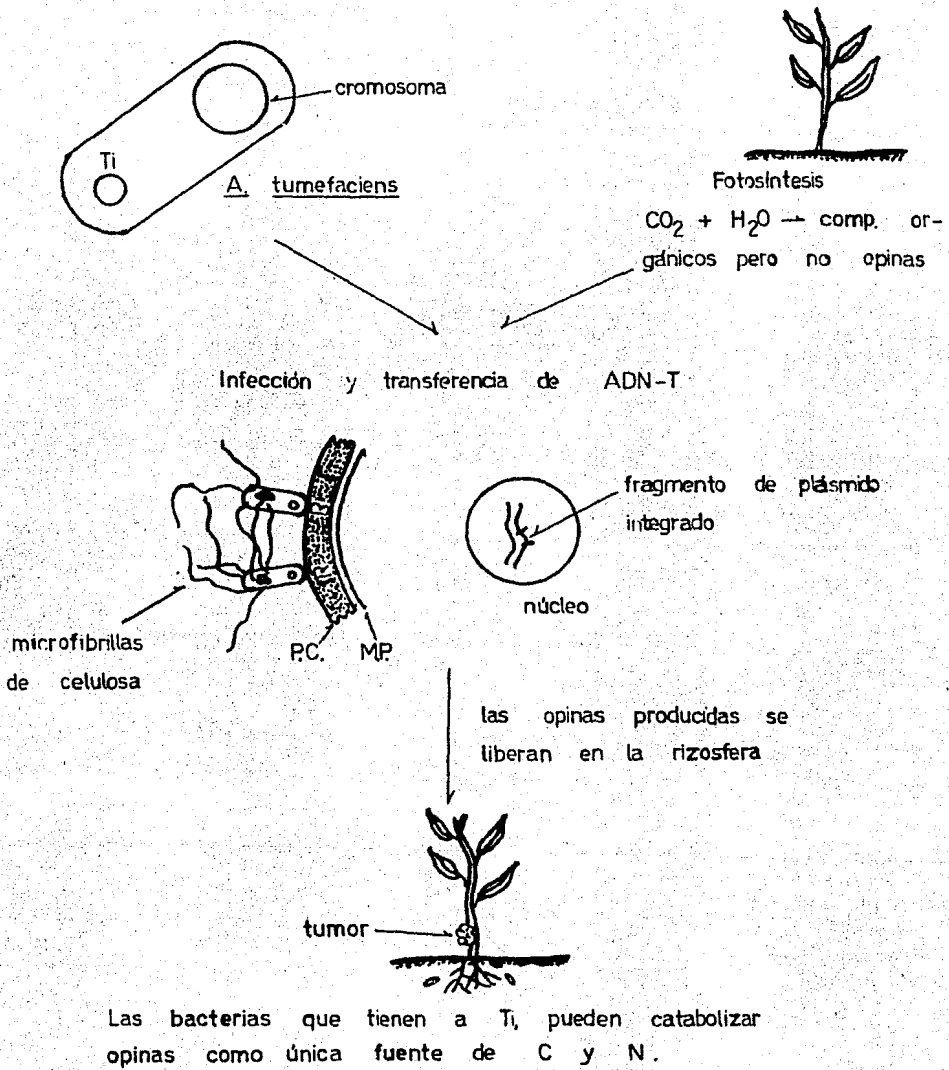
A. tumefaciens (4), (5) es un bacilo gram negativo, anaeróbico facultativo muy común en el suelo, mide de 1 a 3 μ m de largo por 0.4 a 0.8 μ m de diámetro; tiene de 1 a 6 flagelos en el mismo polo, es sensi-

ble a la luz y a la sequía, pero en suelos húmedos permanece viable y virulento por años.

Las agallas se desarrollan en heridas que permiten la entrada de la bacteria a las células vegetales (6), por lo que los tumores se forman generalmente a nivel del suelo. Casi todas las plantas dicotiledóneas -- son susceptibles a esta infección, mientras que las monocotiledóneas parecen ser insensibles a ella (7). La resistencia de estas últimas puede residir en la incapacidad de la bacteria de adherirse a la pared celular -- del vegetal. Una diferencia estructural entre las paredes a las que se une la bacteria y las que no, parece ser el grado de metilación del ácido poligalacturónico (8).

Cuando A. tumefaciens penetra a través de una herida, se pone en contacto con receptores específicos de la pared celular; una vez adherida al receptor, la bacteria comienza a sintetizar fibrillas de celulosa que atrapan a otras bacterias, formando paquetes celulares en estrecho -- contacto con la célula vegetal (9). A continuación penetra a la célula -- lo que durante muchos años se conoció como principio de inducción tumoral (P I T) y lo que hoy se sabe es que contiene la información genética -- existente en un plásmido, ver figura 1.

Los tumores producidos sintetizan compuestos nitrogenados denominados opinas, que no se encuentran en los tejidos sanos y que alteran el metabolismo nitrogenado, además son prototróficos para reguladores de -- crecimiento como auxinas y citocininas (10) pudiendo, a diferencia de los cultivos de vegetales sanos, crecer en un medio carente de estos reguladores.



Infección de una planta por *A. tumefaciens*

FIG. 1

Como sólo la bacteria puede utilizar las opinas como fuente de Carbono y Nitrógeno, la superficie del tumor es un nicho ecológico, en el cual las bacterias con información adecuada pueden crecer y proliferar selectivamente (11).

Las agallas ofrecen un modelo ideal para estudiar la regulación de la expresión genética en plantas, pero lo más importante es que ofrece un sistema para estudiar la modificación genética de células vegetales, análogo al de los virus oncogénicos de ADN, como el del SV40 que transforman células animales en cultivo (12).

TIPOS DE TUMORES

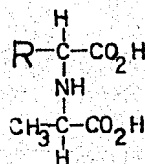
A. tumefaciens produce diferentes tumores que varían tanto en su morfología como en su fisiología.

Los tejidos tumorales adquieren la capacidad de sintetizar opinas (13), derivados de aminoácidos que podemos agrupar de la siguiente forma (14):

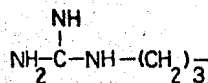
Octopinas.- Son producto de la condensación del ácido pirúvico con algún aminoácido. La enzima responsable de la síntesis de opinas -- pirúvicas es la lisopina deshidrogenasa o LpVH, que pesa 38,000 daltones y emplea NADPH como cofactor y puede utilizar 14 aminoácidos y 5 cetoácidos diferentes como sustratos.

OCTOPINAS

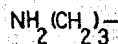
ESTRUCTURA
GENERAL



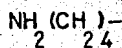
RADICAL



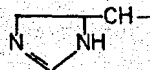
Octopina



Acido Octopínico



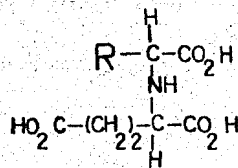
Lisopina



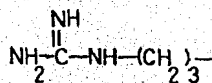
Histopina

NOPALINAS

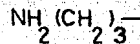
ESTRUCTURA
GENERAL



RADICAL



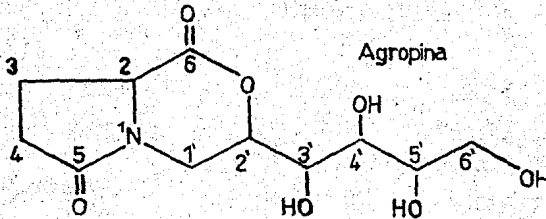
Nopalina



Acido Nopalínico u
ornalina

Nopalina. - Las opinas producto de la condensación de un aminoácido con el ácido α -cetoglutarico son sintetizadas por la enzima nopalina deshidrogenasa o NpDH, que pesa 42,000 daltones, utiliza NADPH como cofactor y solo emplea los aminoácidos arginina y ornitina como sustratos.

Un tercer tipo de opinas es la agropina, un derivado bicíclico del ácido glutámico y el azúcar hexitol (15).



Las bacterias que inducen tumores tipo octopina pueden catabolizar octopinas y agropinas, no así nopalinas; las bacterias que inducen tumores tipo nopalina, solo degradan ésta y las que inducen los llamados tumores tipo nulo únicamente catabolizan agropina.

La morfología del tumor depende tanto de la cepa infectante como de la planta hospedera, así en Kalanchoë daigremontiana (16), encontramos que los tumores tipo octopina presentan una superficie rugosa y rodeada de raíces adventicias; los tumores tipo nopalina tienen una superficie lisa y raíces en la base, llegando a formar en ocasiones teratomas. Los tumores de tipo nulo presentan una superficie rugosa y en ocasiones, raíces pero en menor cantidad que en los tumores tipo octopina.

LOS PLÁSMIDOS *Ti* EN LA INDUCCIÓN DE TUMORES

El tumor después de haber sido inducido, puede desarrollarse independientemente de la presencia de la bacteria, por lo que Braun en 1947 (17) propuso que el PIT, se transfería de la bacteria a la célula vegetal para inducir la transformación.

En 1967 Schilperoort (18) encontró secuencias de ADN de *A. tumefaciens* presentes en el genoma de células tumorales. En 1974 Zanen, Schell y sus colaboradores (19) descubrieron ADN circular superenrollado de gran tamaño en cepas patógenas de *A. tumefaciens*, no así en ocho cepas no patógenas. En ese año los mismos Schell y Schilperoort (20), descubrieron que esos plásmidos grandes eran esenciales para la tumorigénesis y que la ausencia de éstos, implicaba la pérdida de la patogenicidad, por lo que se les llamó plásmidos *Ti* (tumor inducing).

Los experimentos de conjugación en infecciones mixtas de cepas virulentas y avirulentas llevados a cabo "in planta" (21) así como transformaciones "in vitro" de cepas avirulentas con plásmidos *Ti* (22), confirmaron que la información contenida en éste es necesaria para la patogenicidad.

Por medio de hibridación de tipo ADN-ADN de Southern, Chilton y colaboradores confirmaron que una región del plásmido *Ti*, se encuentra en el núcleo de las células transformadas. A esta región se le denominó ADN tumoral o ADN-T (23). Otras investigaciones demostraron que el ADN-T está unido covalentemente al ADN cromosómico, donde existen varias copias por genoma (24) y que, al menos parte de él, es transcrito a ARN_m (25). El ARN_m de la octopina sintasa fue aislado de callos de girasol (26), y de células vegetales con ARN_m de lisopina deshidrogenasa que -

complementan con fragmentos de *Ti* (27).

Chilton y colaboradores demostraron que el ADN-T no se encuentra ni en la mitocondria, ni en el cloroplasto, solo en el núcleo (28).

Un trabajo de Thomashow y colaboradores en 1980 (29), aseguraba que en ciertos hospederos transformados, no se encontraba la región ADN-T, pero recientemente Perry y Kado (30), encontraron dicha región en este tipo de hospederos, además de encontrar que el plásmido tiene cierta especificidad por sus hospederos.

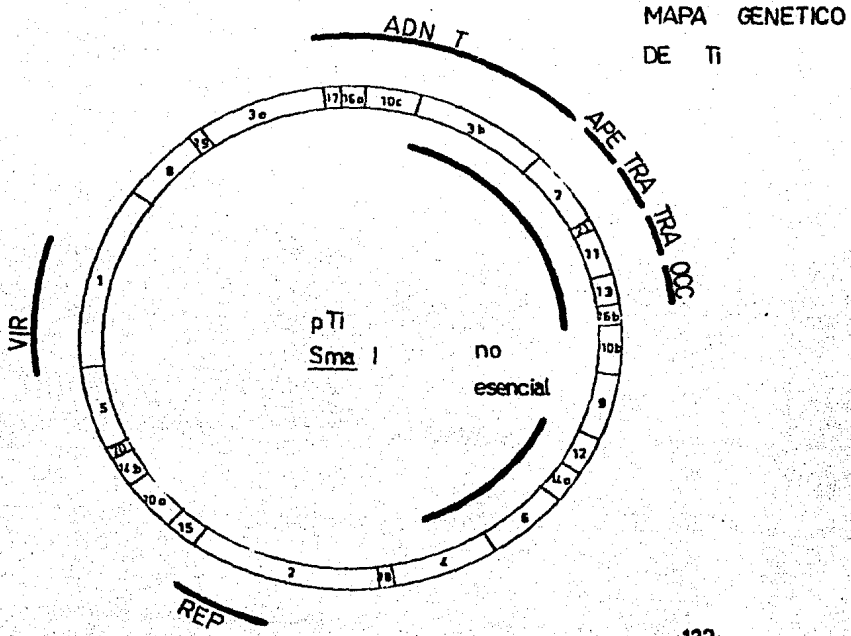
EL MAPA GENETICO DE LOS PLASMIDOS *Ti*

Los plásmidos *Ti* miden entre 95 y 156 Mdaltones (19) y son de replicación restringida (31), por lo que se encuentran en una o dos copias por célula. Aunque esto dificulta su purificación (32), existen ya datos suficientes que nos dan una idea de su organización genética y funcionamiento, ver figura 2.

Se ha encontrado que los plásmidos *Ti* de octopina son muy similares entre sí, no así los de otras clases (11).

Aunque la posibilidad que ofrecen para la manipulación genética de las plantas es obvia, su tamaño tan grande es un inconveniente, por lo que hay que preguntarse que tan necesaria es la totalidad del plásmido para la tumorigénesis.

Se ha encontrado, por medio de deleciones e inserciones producidas por transposones, que una gran región del plásmido no es indispensable para la inducción tumoral (33, 34). Algo sorprendente es que cepas portadoras de plásmidos, a los que les falta gran parte de la región de-



MAPA DE RESTRICCION DE T1

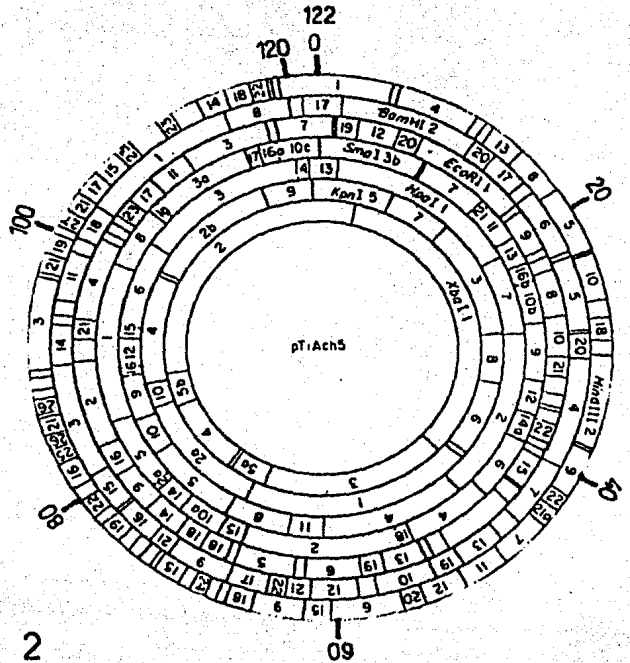


FIG. 2

recha del ADN-T, retuvieron una virulencia parcial, aunque su velocidad de crecimiento se vió muy afectada.

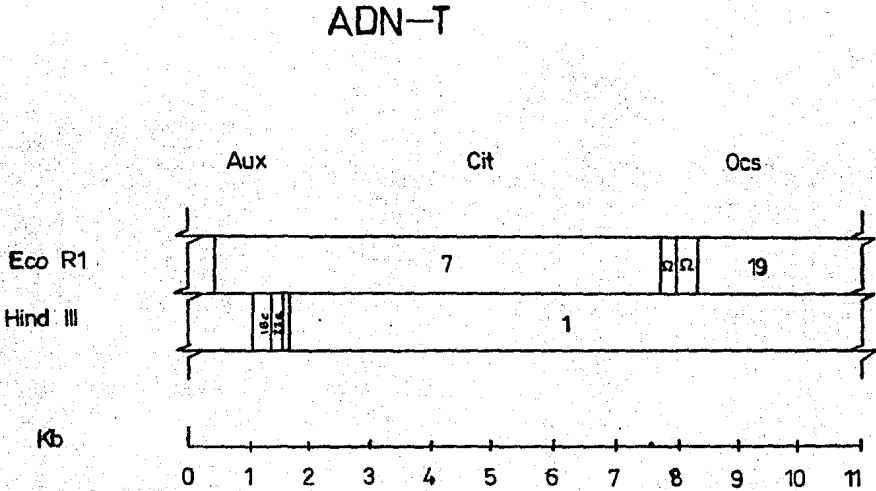
Por medio de estudios de homología entre plásmidos de octopina y nopalina (35, 36), se ha encontrado que existen genes indispensables para la tumorigénesis como son: REP, VIR y ADN-T, en tanto que APE y TRA - aunque también homólogos no son indispensables.

La región APE codifica para la protección contra la infección por el bacteriófago AP-1 y la TRA para la capacidad de conjugar, características ventajosas para la bacteria aunque no indispensables para la tumorigénesis.

La región REP es indispensable ya que es la que se encarga de la replicación. Por su parte la región VIR podría contener todos los genes necesarios para la infección de células vegetales, como serían el reconocimiento de un receptor específico, la síntesis de fibras de celulosa, la transferencia del plásmido Ti o parte de éste a la célula vegetal. No obstante en experimentos de transformación "in vitro" se ha mostrado que ni las funciones de REP ni de VIR son necesarias, lo que permite suponer que el ADN-T contiene la información de la tumorigénesis.

Recientemente Kado y colaboradores (37), encontraron que existe más de un gene involucrado en la síntesis de ácido indolacético y que ambos son necesarios para la oncogenicidad, es posible que el gene iaaP que interviene en la síntesis del ácido indolacético (AIA), se integre junto con el ADN-T en el genoma de la planta o que el AIA haga competente a la célula para la transferencia de Ti, otra posibilidad es que actúe como -segundo mensajero para activar los genes de la oncogenicidad.

El ADN-T que se ha detectado en líneas tumorales no tiene necesariamente los mismos extremos pero la parte central siempre se encuentra presente (38), ver figura 3.



Región ADN-T donde se muestran las áreas con actividad tipo auxina (Aux), tipo citocinina (Cit), y síntesis de octopina (Ocs), tomado de referencias (55,36).

FIG. 3

La región ADN-T se ha mapeado mediante la inserción de transposones, como el Tn904 y el Tn1021, que producen mutaciones y afectan alguna característica tumoral; inserciones en el lado izquierdo de la región T, producen mutantes morfológicas que hacen suponer que esta parte controla la actividad de fitohormona de tipo auxina. Por lo tanto, si se inactivan dichos genes disminuye la actividad de fitohormona semejante a auxina, en relación con la actividad de citocinina, y por lo tanto hay

formación de tallos. La inactivación de la parte central del ADN-T, parece disminuir una actividad tipo citocinina ya que estimula la formación de raíces (39). Esto es consistente con los resultados de coinfección con cantidades iguales de ambos tipos de mutantes, que produce tumores con, más o menos, la morfología del tipo silvestre. Resultados muy similares se obtendrían, si se aplicaran exógenamente al tejido tumoral "in vitro" reguladores de crecimiento.

Otros genes detectados en el ADN-T, son los que codifican la síntesis de octopina y regulan el tamaño del tumor; son afectados en mutantes con deleciones en la parte derecha del ADN-T.

Nester y sus colaboradores (40) confirmaron los resultados anteriores, al aislar 25 cepas con inserciones de Tn5 e identificar tres mutantes que afectan la morfología de los tumores y otra la síntesis de octopina.

No se conoce aún el mecanismo por el cual el plásmido Ti penetra a la célula vegetal, ni como es que el ADN-T se establece en el núcleo de la célula. Inicialmente Koekman y colaboradores (33) propusieron un mecanismo de integración similar al de los transposones, pero esto se descartó al encontrar integración de ADN-T con deleciones en el extremo derecho.

El arreglo del ADN-T en el núcleo de la célula vegetal no se ha esclarecido completamente (41, 42), pues se han encontrado copias de ADN-T o partes de éste integrados al genoma; parece ser que en plásmidos de nopalina se encuentran en grupos (tandems), no así en los de octopina donde a veces existen repeticiones de uno de sus extremos.

LOS PLÁSMIDOS Ti COMO VECTORES MOLECULARES

El plásmido *Ti* es un vector natural capaz de promover la transferencia, integración y expresión de ADN extraño en células vegetales. Con base en esto se piensa en la posibilidad de introducir y expresar otros genes extraños. Los primeros experimentos que se hicieron con *Tn7* insertado en la región ADN-T, demostraron que las células transformadas contenían al ADN de *Tn7*, aunque la resistencia al antibiótico que codifica no se expresó (43).

El grupo de Nester ha comunicado en el Simposium de ADN recombinante (1981) haber introducido y expresado el gene de ovalbúmina a células vegetales por medio de *Ti*.

Para la transformación de células vegetales, se ha utilizado tanto el plásmido purificado, como la bacteria intacta o tratada.

Schilperoort y colaboradores fueron los primeros en transformar protoplastos de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (44) utilizando células intactas de *A. tumefaciens* y confirmando la transformación por la actividad de LpDH y la presencia del ADN-T en las líneas transformadas, que es como se debe comprobar la transformación según Thomashow, Nester y colaboradores. (45).

Algo muy importante que se encontró en estos estudios, es que la secuencia de ADN-T no sólo permanece en las plantas rediferenciadas de las líneas tumorales tanto de octopina como de nopalina, sino que se re-tiene a través de la meiosis y se expresa en la primera generación (46);

tales tejidos rediferenciados de estos tumores se injertaron en plantas de tabaco y produjeron flores, frutos y semillas que dieron lugar a una F1 que retenía los marcadores.

La transformación de protoplastos empleando plásmidos T1 intactos fué lograda por Davey et al en 1980 (47), incubando protoplastos de Petunia con el plásmido en presencia de poliornitina, y seleccionando las clonas que crecían en medios libres de reguladores de crecimiento.

Los estudios realizados con protoplastos de Nicotiana tabacum que se incubaron con T1 en presencia de Ca⁺⁺ y polietilenglicol (48) confirman los resultados anteriores.

La frecuencia de transformación mas alta que se ha logrado, medida con base en la producción de octopina, fué obtenida por Hasezawa y colaboradores (49) al transformar protoplastos de Vinca rosea con esferoplastos de A. tumefaciens en presencia de PEG o PVA. La transformación es más eficiente debido, tal vez a que el plásmido T1 completo se introduce al citoplasma. Esto sugiere que si se encapsula T1 en un liposoma como lo está haciendo Nagata se deben obtener mejores resultados.

Es importante señalar que entre la F1 de los transformantes hay algunas líneas que perdieron la capacidad de sintetizar opinas, no así la de crecer en medios sin reguladores de crecimiento, mientras que -- otras presentaron la situación inversa. Es por esto que es necesario conocer muy bien el mecanismo que regula la expresión de estos genes, antes de poder utilizarlos como vectores para introducir otros genes a las células vegetales.

LA INGENIERIA GENETICA.

Cuando se tiene un ADN de gran tamaño para ser estudiado, es más fácil cortarlo en regiones específicas de tamaño más pequeño y producir gran número de copias. En la actualidad se cuenta con herramientas muy útiles dentro de la ingeniería genética, que facilitan mucho el trabajo.

La ingeniería genética se vale de la síntesis química, la secuenciación del ADN, el uso de enzimas específicas y vehículos moleculares, para formar moléculas de ADN recombinante. Ver figura 4.

Dentro de las enzimas más empleadas tenemos las enzimas de restricción que generan fragmentos de ADN constantes. Las enzimas de tipo II reconocen secuencias específicas de cuatro a seis pares de bases y -- cortan dentro de éstas generando extremos rasurados, extremos 5' saliente o extremos 3' saliente dependiendo de la endonucleasa de que se trate.

Una vez generado, los fragmentos pueden ser unidos por las ligasas de ADN, que forman uniones fosfodiéster entre el extremo 5' y el 3'. La ligasa de Escherichia coli solo puede unir extremos pegajosos, mientras que la ligasa T4 puede unir además extremos rasurados.

Otra forma de unir fragmentos de ADN, es por el método de la -- transferasa terminal: los fragmentos de ADN se digieren con exonucleasa 5' (λ) para formar extremos 3' salientes, a los que la transferasa terminal añade nucleótidos específicos. La formación de colas de poli-T en el vector y colas de poli-A en el ADN pasajero permite su unión -- por complementación.

ESTRATEGIAS DE CLONACION

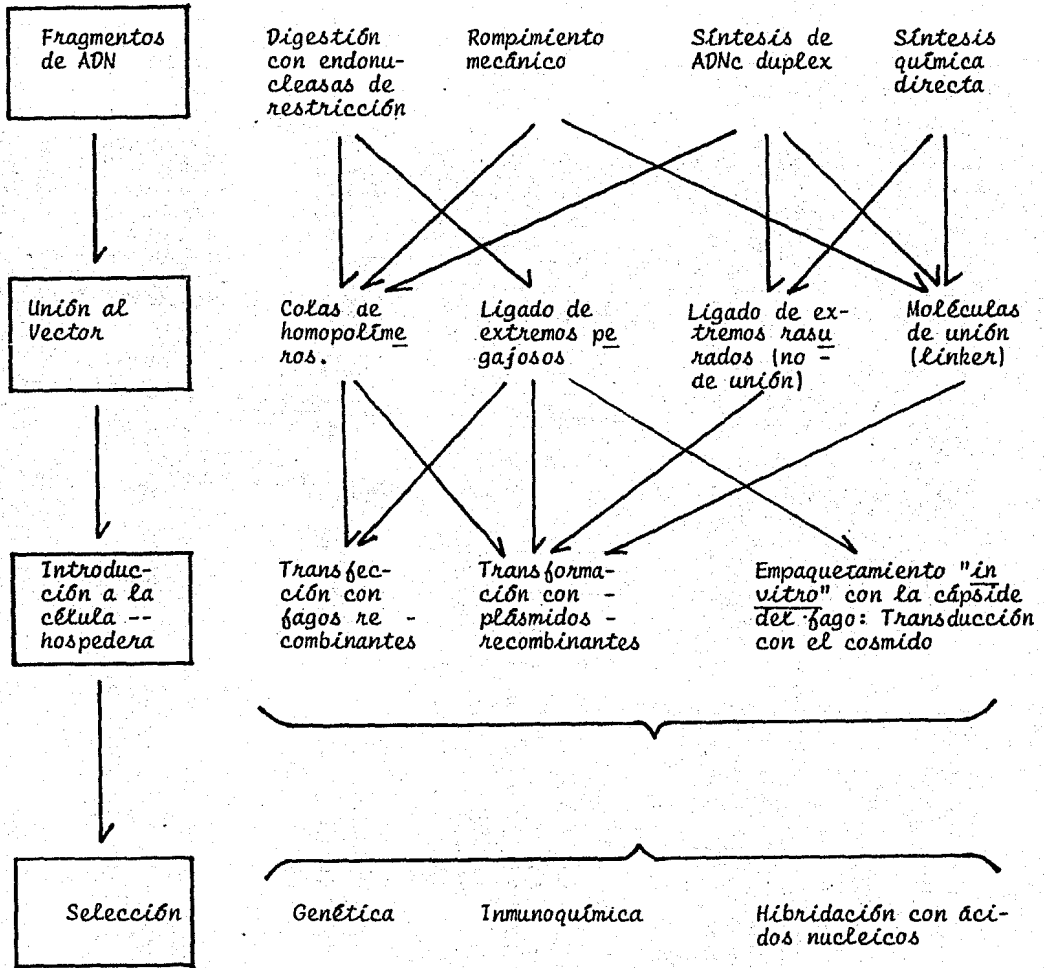
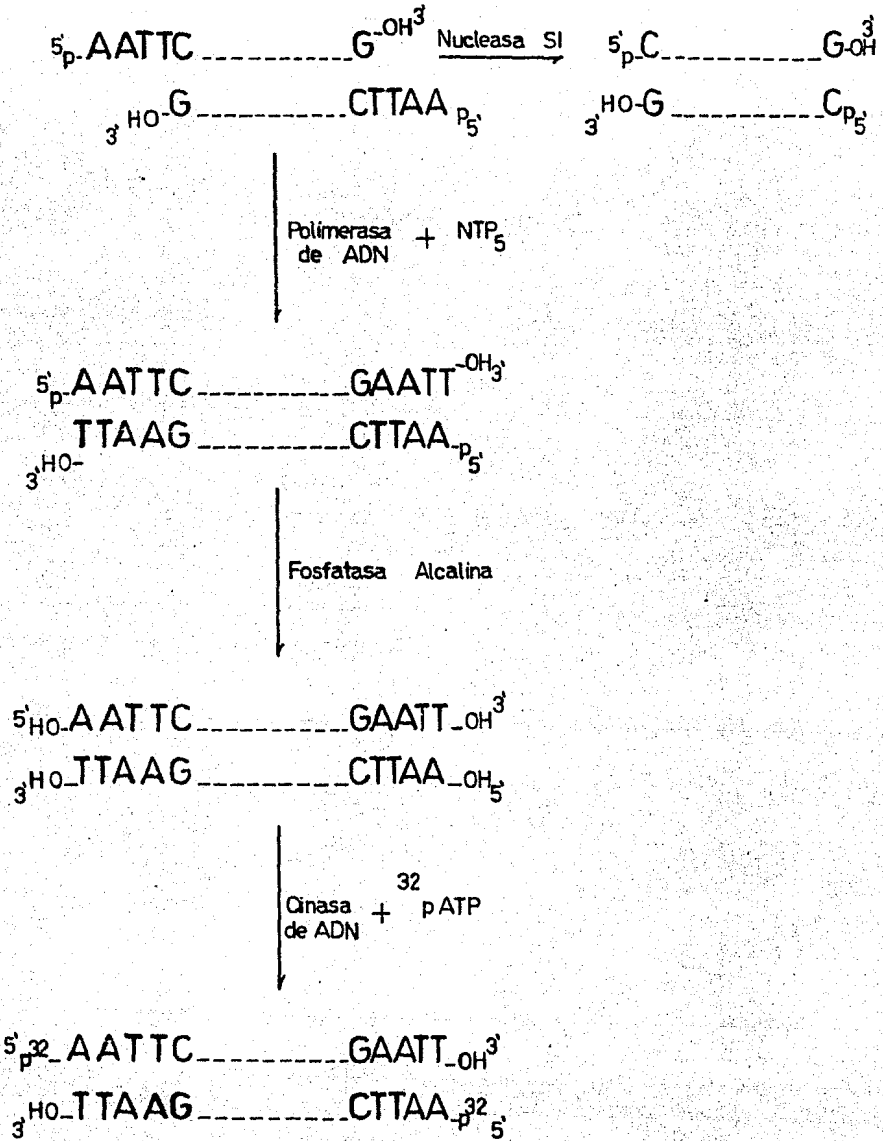


FIG. 4

Otras enzimas útiles para la formación de ADN recombinantes se muestran en el siguiente esquema (57)



Por último, la transcriptasa reversa se emplea para sintetizar ADN complementario (ADNc), que por ser una copia de ARNm evita el problema de los intrones.

VEHICULOS MOLECULARES.

Los vectores o vehículos moleculares son moléculas de ADN como los virus, plásmidos y cósmidos, que pueden incorporar ADN extraño y replicarse autónomamente dentro de un sistema biológico; de esta manera un ADN de cualquier origen puede estabilizarse dentro de una bacteria y multiplicarse.

Un buen vector debe cumplir con las siguientes características:

- 1- Ser pequeño genética y físicamente.
- 2- Ser autorreplicable y amplificable, aunque lo último no es indispensable.
- 3- Tener marcadores genéticos que permitan la selección de las moléculas recombinantes.
- 4- Contener sitios únicos para el mayor número posible de enzimas de restricción.
- 5- Tener baja probabilidad de transferencia a otras bacterias.

Encontrar un vector en la naturaleza con todas estas características es difícil, por lo que se han construido "in vitro"; un ejemplo es el pBR328 (ver figura 5) que tiene 4,900 pares de bases y presenta el fenotipo ampicilina resistente (Ap^r), tetraciclina resistente (Tc^r) y cloranfenicol resistente (Cm^r), (56).

La cepa que va a aceptar a la molécula recombinante, debe cumplir también con ciertos requisitos tales como:

- 1.- No codificar para los sitios seleccionables, ni del vehículo ni del pasajero.
- 2.- Debe ser deficiente en recombinación.
- 3.- Debe de tener requerimientos específicos tales que no permitan su sobrevivencia fuera del laboratorio.

La cepa que se usó en este trabajo es la E. coli RRI, rec A, -- pues hasta el momento es una de las mejores receptoras y estabilizadoras de moléculas recombinantes.

O B J E T I V O S.

Como se ha expuesto anteriormente es necesario conocer más sobre la organización genética del plásmido T_i , y debido a que uno de los mayores problemas que presenta es su gran tamaño, el objetivo de este trabajo es el de clonar fragmentos de restricción específicos que puedan ser empleados en estudios de transformación.

De esta manera se tendrán las bases para poder utilizarlo en un futuro, como vehículo molecular para la transformación de células vegetales, con los insertos de ADN deseados.

Para esto se propone:

- 1.- Aislar al plásmido T_i
- 2.- Aislar al pBR328

3.- Producir moléculas recombinantes de fragmentos de res---
tricción del plásmido Ti y clonarlos por "escopetazo" en pBR328 trans-
formando, en E. coli RR1 recA⁻.

MATERIALES Y METODOS

APARATOS

Baño agitador con temperatura controlada. PRECISION Sci.Co.

Mesa de agitación. Centro de instrumentos UNAM.

Incubadora de programa dual. PRECISION Sci. Co.

Estufa. EELISA.

Ultracentrifuga L5-75 Beckman. (Rotores 75Ti y 60 Ti)

Ultracentrifuga L-50 Beckman. (Rotor 30)

Centrifuga Sorvall R C - 5B. (Rotor GSA)

Centrifuga clínica DAMON/TEC DIVISION

Microfuga Beckman

Campana de flujo laminar VECO

Potenciometro Model 3550 digital pHmeter. Beckman

Aparato de electroforesis de placa vertical. LKB produkter AB.

Cámara de electroelusión.

Lámpara de ultravioleta onda corta. Ultra Violet Products Inc. San Gabriel Calif. USA.

Transiluminador de ultravioleta. Ultra Violet Products Inc. San Gabriel, Calif. USA.

Careta protectora. Ultravioleta, S.A. México.

CEPAS BACTERIANAS.

Agrobacterium tumefaciens LBA 4001 que contiene al plásmido Ti de octopina
Escherichia coli K-12 RR1 (Rec^{A-}, Pro⁻, Leu⁻, B1⁻, Str^r, Ap^s, Tc^s) se utilizó como aceptora en los experimentos de transformación

E. coli HB101 contiene al pBR328 (Ap^r, Cm^r, Tc^r)

REACTIVOS

Bactotripton y Extracto de levadura Difco.

Agar Merck.

Agarosa Sigma.

Pronasa Calbiochem grade B.

Enzimas de restricción y ligasa T4 Bio Labs, New England.

Cloruro de cesio Merck.

Los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico de las marcas Merck, Sigma, Calbiochem.

NOTA: Las recetas de las soluciones, medios de cultivo y amortiguadores se encuentran en el Apéndice

PURIFICACION DE PLASMIDOS

Aislamiento del pBR328.

- 1.- Se crece un precultivo de 5 a 10 ml, en medio Luria toda la noche.
- 2.- Se toman 2 ml del precultivo para inocular 1 l de medio M-9 y se deja en agitación a una temperatura de 37°C, por un tiempo aproximado de 6 horas.
- 3.- Cuando alcanza una densidad de 4.5×10^8 células/ml, es impor

- tante que sea antes de llegar a la fase estacionaria, se agregan 200 $\mu\text{g/ml}$ de Cm y se continúa la agitación por 16 horas.
- 4.- Se centrifuga a 7 000 rpm, 10 min en una centrifuga Sorvall y se pesa el paquete celular, 3 ml de células crecidas en medio Luria equivalen a 0.01 g que puede guardarse a -70°C .
 - 5.- Se agregan 80 ml de la solución I, más 0.1 ml de solución de ARNasa y se deja incubar 30 min a 0°C .
 - 6.- Se agregan 160 ml de la solución II agitando bien, se incuba por 10 min. a 0°C .
 - 7.- Se añaden 120 ml de la solución III y se mezclan por inversión unos segundos, los botes se congelan inmediatamente en hielo seco.
 - 8.- Los botes se centrifugan una hora a 6 000 rpm, y al sobrenadante se le agregan 2 volúmenes de etanol y se congela durante 2 horas.
 - 9.- Se centrifuga durante 60 min a 7 000 rpm 4°C y se resuspende en 40 ml de la solución IV, se lee la absorbancia, se agregan 2 volúmenes de etanol frío y se centrifuga de la misma manera.
 - 10.- El precipitado se resuspende en una solución amortiguadora - TEN 2.1 ml por cada 500 μg de ADN.
 - 11.- Se prepara el gradiente de CsCl en tubos de nitrocelulosa a los que se les agregan 2.2 g de CsCl, por cada 500 μg de ADN, 2.1 ml de ADN en TEN, más 150 μl de yoduro de propidio de una solución de 2 mg/ml Este último se trabaja en la obscuridad, pues reacciona con la luz visible; el PdI es menos-

denso que el ADN y tiene preferencia por el ADN lineal y circular con cortes, por lo que lncremento la separación de esta banda y la del ADN superenrollado. Los tubos se balancean con aceite mineral y se centrifugan en un rotor 75 Ti a --- 44500 rpm por 20 horas a 20°C.

- 12.- El tubo se perfora en la oscuridad iluminado con luz u.v., para recoger la banda inferior, que corresponde al ADN covalentemente cerrado, en un tubo de plástico.
- 13.- Se agregan 2 volúmenes de amortiguador A50, para que el --- CsCl se diluya y el complejo ADN PdI no se mueva demasiado rápido y se eluye en una columna DOWEX AG50W-X8.
- 14.- Se añade, por lo menos, un volumen de columna de A50 para lavar el ADN remanente y se revisa con luz u.v. que el PdI haya sido totalmente eliminado, de lo contrario se vuelve a pasar por la misma columna. Los siguientes pasos se pueden llevar a cabo en la luz.
- 15.- Se dializa contra 3 a 6 l de Tris HCl 10 mM EDTA 1 mM pH 8 por 12 horas o más a 4°C.
- 16.- El dializado se precipita agregando 1/25 del volumen total de una solución de NaCl 5 M y 2 volúmenes de etanol a -20°C y se deja congelar.
- 17.- Se centrifuga a 6 500 rpm por 1 hora a -4°C.
- 18.- El precipitado se resuspende en amortiguador TEN en aproximadamente 1 ml y se determina la concentración, midiendo - espectrofotométricamente a 260 nm, aproximadamente se ob--

tienen de 1 a 2 mg de plásmido por litro de cultivo inicial.

19.- El plásmido se guarda a -20 o -70°C .

Purificación de plásmidos Ti

Método modificado de Currier y Nester. (50).

- 1.- Se toma una colonia de *A. tumefaciens* que ha sido crecida en medio mínimo mas octopina y se crece un precultivo en medio TV toda la noche.
- 2.- Se toman 10 ml del precultivo y se inocula un matraz con 300 ml de TV, a una temperatura de 29°C con agitación continua de 200 rpm, hasta alcanzar una $D_{0.660} = 1$
- 3.- El cultivo se centrifuga a 7 000 rpm durante 10 min, el precipitado debe ser de color rosa.
- 4.- El precipitado se resuspende en amortiguador $T_{50}E_{20}$ 176.7 ml, precalentado a 37°C , por 1 hora.
- 5.- Se agregan 33.6 mg de pronasa disuelta en 6 ml. de $T_{50}E_{20}$ predigerida 2 horas a 37°C y se deja 5 min a la misma temperatura.
- 6.- Se añaden 4.3 ml de una solución de SDS al 20% para llevarlo a una concentración final del 1%. Hay que evitar la agitación violenta para prevenir la ruptura del plásmido. La reacción se para cuando la solución está completamente clara, más

o menos después de 30 min. pero puede dejarse toda la noche.

- 7.- A continuación se hace un tratamiento alcalino,
 - a) la solución se lleva a un pH de 12.1 a 12.3 con NaOH 3 N usando un agitador magnético y se deja reposar durante 10 min.
 - b) se regresa el pH a 8.6 a 8.8 con Tris-HCl 2 M pH7, al bajar el pH decrece la viscosidad.
- 8.- Se ajusta el lisado a 3% de NaCl p/v la solución se vuelve blanca debido a la precipitación del SDS.
- 9.- Se incuba 4 horas en hielo seco.
- 10.- Se centrifuga a 7 000 rpm, por 10 min para bajar el ADN cromosómico y las proteínas colectando el sobrenadante.
- 11.- Se agrega un volumen de fenol y se invierte.
- 12.- Se centrifuga a 10 000 rpm, 10 min a 4°C.
- 13.- Se separa la fase acuosa y se le agrega un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1); se centrifuga y se vuelve a repetir este paso.
- 14.- A la fase acuosa se le agrega lo necesario para llegar a una concentración final de MgCl₂ 15 mM, fosfatos 5 mM y 0.7 volúmenes de etanol frío. Se deja precipitando a -20°C.
- 15.- Se centrifuga a 10 000 rpm, 30 min, el precipitado se lava con etanol al 70% que contiene acetato de sodio 0.1 M pH 5.5 para remover al fenol.
- 16.- Se centrifuga a 10 000 rpm, durante 15 min y se resuspende

en agua estéril.

Método de Koekman et al, [1980] [51]

- 1.- Se centrifugan 500 ml de cultivo con una $D\ 0.660^*$ 1, a ---
7 000 rpm durante 10 min.
- 2.- El precipitado se resuspende en 100 ml de $T_{50}E_{20}$.
- 3.- Se agregan 56 mg de pronasa en 10 ml de $T_{50}E_{20}$, predigerida
una hora a $37^{\circ}C$ y 5.8 ml de una solución de SDS al 20%; se
deja reposar 30 min o hasta que la solución esté clara.
- 4.- Se lleva el pH a 12.1 a 12.3 con NaOH 3 N, 10 min.
- 5.- Se baja el pH a 8.6 a 8.8 con Tris-HCl 2 M pH 7.
- 6.- Se lleva la solución a 1 M con cristales de NaCl y se deja
4 horas a $4^{\circ}C$.
- 7.- Se centrifuga 10 min a 5 K a $4^{\circ}C$.
- 8.- Al sobrenadante se le adiciona 0.25 volúmenes de PEG 50% y
se deja a $4^{\circ}C$ por 16 horas.
- 9.- Se centrifuga a 7 000 rpm, 20 min a $4^{\circ}C$. y el precipitado
se resuspende en $T_{50}E_{20}$ aforando a 10 ml.
- 10.- Se agregan 10 g. de CsCl y 0.75 ml de Et Br a una concen--
tración de 10 mg/ml.
- 11.- Se centrifuga 60 horas a 30 000 rpm a $12^{\circ}C$.
- 12.- Se colecta la banda de plásmido que queda abajo de la del -
ADN cromosómico. Y se remueve el EtBr con tres extraccio
nes de alcohol isoamílico saturado con 20XSSC. La fase su--

perior es la que se remueve.

- 13.- Se dializa con $T_{50}E_{20}$ Por lo menos durante 2 horas.
- 14.- El dializado se extrae con un volúmen igual de fenol saturado con 0.5 M NaCl.
- 15.- Se extrae dos veces con $CHCl_3$ y se colecta la fase acuosa.
- 16.- Se precipita con 2 volúmenes de etanol absoluto por 16 hr a $-20^{\circ}C$.
- 17.- El precipitado se lava con etanol al 70% y se resuspende en el volúmen deseado con agua o Tris HCl pH 7.5

Aislamiento rápido de plásmidos grandes y pequeños, método de Kado y Liu. (52)

- 1.- Se centrifugan 2 ml de cultivo con una D.O. $600 = 0.8$
- 2.- El botón se resuspende en 100 μ l de solución E.
- 3.- Se agregan 200 μ l de solución lisadora y se mantienen a $65^{\circ}C$ por una hora.
- 4.- Se añaden 2 volúmenes de fenol-cloroformo y se emulsifican.
- 5.- Se centrifuga la emulsión y la fase acuosa se trata dos o tres veces con éter dietílico para quitar los restos de fenol.
- 6.- Se precipita con acetato de sodio 3M utilizando 100 μ l y 2 volúmenes de etanol frío, se congela en un baño de etanol-hielo seco 5 min y se centrifuga durante 15 min, el botón se seca con aire o con nitrógeno y se resuspende

en 50 μ l de agua estéril.

DIGESTIONES CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

La mezcla de reacción se prepara en el volumen deseado, generalmente 15 μ l y se compone de ADN, la décima parte del amortiguador (10X) apropiado y la enzima que no debe exceder en volumen al amortiguador adicionado, para llevarla al volumen final se usa agua estéril si es necesario.

La mezcla se incuba por lo general a 37°C durante 30 min, dependiendo de la actividad de la enzima y se para usando un quinto del volumen de mezcla para detener la reacción, o cuando es necesario se extrae la proteína adicionando un volumen de fenol saturado y un volumen de cloroformo y precipitando después con dos volúmenes de etanol.

ELECTROFORESIS

La electroforesis se llevó a cabo en un aparato de placa vertical LKB, utilizando agarosa al 0.7% en Tris-boratos-EDTA 1X. Las mezclas de restricción se llevan a un volumen final de 15 a 50 μ l, más la mezcla para detener la reacción en una proporción de 5 μ l por cada 25 μ l de muestra y se colocan en los carriles.

La electroforesis se realiza a voltaje constante 150 voltios, a temperatura ambiente o con refrigeración y de 1 a 4 horas dependiendo del tamaño del ADN.

Al terminar la electroforesis los geles se tiñen con EtBr en una solución de 0.4 μ g/ml, durante 15 min y se iluminan con un transilu-

minador de luz ultravioleta de onda larga.

ELECTROELUSION

El ADN se somete a electroforesis y posteriormente se cortan -- dos tiras paralelas al gel (en el sentido que corre la muestra) y se tiñen con EtBr para identificar la banda deseada. Una vez separada del -- gel, se fragmenta en cuadritos de 0.5 x 0.5 cm aproximadamente y se ponen en una cámara de electroelusión cubierta con amortiguador TE. La cámara se coloca entre dos recipientes con amortiguador TEA para establecer un -- puente de corriente eléctrica. Se usan dos diferentes amortiguadores para que el flujo de iones sea más rápido, es por eso que TE tiene muy pocos iones.

El voltaje se mantiene constante a 80 voltios y a una temperatura de 4°C.

Con el fin de asegurarse que el ADN ha sido totalmente electro -- eluido, se tiñe un fragmento en EtBr y se observa con luz u.v., si ya no hay flourescencia se invierte la polaridad por un minuto, para despegar el ADN de la bolsa de diálisis. El electroeluido se pasa por una columna de BND-celulosa para limpiarlo y concentrarlo.

COLUMNA DE BND-CELULOSA

- 1.- La resina se hidrata en amortiguador de lavado, y se le quitan las partículas que quedan flotando. La resina se guarda en el refrigerador.

- 2.- Se monta una columna de 0.5 cm de diámetro por 0.5 cm de altura.
- 3.- Se lava la columna con 7.5 10 ml de amortiguador de lavado.
- 4.- Se pasa la muestra por la columna. El ADN debe resuspendido en amortiguador TE.
- 5.- Se lava la columna con amortiguador de lavado, al menos un volúmen de columna completo.
- 6.- Se seca suavemente con aire.
- 7.- Se eluye con amortiguador de elusión de 300 a 500 μ l.
- 8.- Al eluido se le agregan dos volúmenes de etanol (-20°C) para precipitar el ADN.
- 9.- Se resuspende en la solución amortiguadora al volúmen deseado.

METODO DE LIGAMIENTO

A 20 μ l de ADN se le agregan 2.5 μ l de amortiguador de ligamiento, 2.5 μ l de ATP y 1 μ l de ligasa. La mezcla se incuba por 30 min a 37°C y después se mantiene a 12°C por un tiempo de 59 horas.

Se verifica que la ligación se haya llevado a cabo en un gel de agarosa.

TRANSFORMACION

Se esteriliza todo el material.

- 1.- Se inocularan 5 ml. de medio Luria con E. coli RRI $-recA^-$, y se deja crecer toda la noche.
- 2.- Se toman de 0.2 a 1 ml de precultivo y se agregan a 30 ml de medio Luria. Se dejan crecer hasta 40 unidades Klett.
- 3.- Las células se centrifugan a 10000 rpm, durante 5 min, y se descarta el sobrenadante.
- 4.- El precipitado se resuspende en 10 ml de NaCl 10 mM isotónico frío.
- 5.- Se centrifuga a 10 000 rpm, 5 min, se descarta el sobrenadante y se resuspende en 15 ml de $CaCl_2$ 30 mM frío.
- 6.- Se deja incubar en hielo 20 min. y se centrifuga a 10 000 rpm, 5 min, el precipitado debe ser anular.
- 7.- El precipitado se resuspende en 3 ml de $CaCl_2$ 30 mM frío.
- 8.- Se toman 0.2 ml y se pasan a un tubo de 15 ml con tapa de rosca donde se mezclan con 0.1 ml del ADN transformante.
- 9.- El ADN se prepara poniéndolo en un volumen final de 90 μ l en amortiguador TE y cuando está todo listo se le añade 10 μ l de $CaCl_2$ 300 mM
- 10.- Se agita suavemente en hielo una hora, se dá un pulso de $-42^\circ C$ durante 70 seg y se incuba otra vez en hielo durante 5 min.
- 11.- Se agregan 3 ml de medio Luria y se deja a $37^\circ C$, con agitación por 2 horas.
- 12.- Se platean 200 μ l en una caja Petri con medio Luria. Si después de un día las transformantes no han crecido se cen-

trifuga el resto del tubo y se platea en 2 ó 4 cajas.

- 13.- Las transformantes se seleccionan por los marcadores esperados, como pueden ser la resistencia o sensibilidad a un antibiótico.

RESULTADOS Y DISCUSION

Purificación del pB328

El método que se empleó es una adaptación del descrito por Birnboim y Doly (53) para aislamiento rápido de plásmidos recombinantes, basado en la desnaturalización selectiva alcalina de ADN cromosómico y ADN circular covalentemente cerrado. Los volúmenes de las soluciones utilizadas se variaron - hasta encontrar las mencionadas en Materiales y Métodos.

Purificación del plásmido T1

La primera extracción del plásmido T1 que se hizo a partir de seis litros de cultivo, resultó difícil de procesar debido a su volumen, por lo que en las siguientes extracciones se disminuyó éste a 0.5 y 0.3 litros. -- El método empleado fue una modificación del método de Currier y Nester, -- por este método fue difícil resuspender el ADN después de la precipitación con fosfatos y cloruro de magnesio, sin embargo la relación de absorbancia que se obtuvo a 260/280 nm fue de 1.9 y caen en el rango adecuado de 1.6 a 2 reportado por Davey (54). Al correr el gradiente de CsCl con el ADN, se encontró que además de las bandas esperadas aparecían otras de supuestos - plásmidos crípticos tanto de mayor como de menor tamaño, por lo que se pensó que se había partido de varias clonas que contenían otros plásmidos y - no de una sola que es como debe hacerse, no obstante resultó interesante - encontrar que pudiera haber tal vez dímeros de T1 o plásmidos crípticos -- muy grandes.

Por razones económicas se trató de evitar el paso de CsCl, por - lo cual se siguió el método descrito por Koekman (51) basado también en el de Currier y Nester, este método no utiliza fosfatos ni cloruro de magne-- sio para precipitar además de usar mucho menos Cscl. Se hizo una modificación

en la cual no se utilizaba el CsCl por lo que un paso anterior al uso de este, el ADN utilizado se sometió a electroelusión, se redujo al tiempo de ésta reportado de 39 horas a 50 voltios (32) a 16 horas, 80 voltios y después el electroeluido se pasó por una columna de BND-celulosa para limpiar de impurezas al ADN. El ADN electroeluido se recuperó casi en un 100%

Un nuevo método de aislamiento reportado por Kado y Liu, rápido y barato para plásmidos de gran tamaño indicaba que el ADN aislado de esta manera podía ser usado para experimentos de restricción, clonación, etc.

Para saber cuales eran las condiciones que se tenían que usar, puesto que siguiendo las descritas no se observaba el plásmido, se empezó por variar el volúmen de cultivo de 3 a 0.5 ml se utilizaron 2 ml en las siguientes extracciones, los volúmenes de las sustancias que se requirieron y el tiempo de incubación desde 0 hasta una hora con treinta minutos, en intervalos de 7.5 min, lo que se observó fue que la banda del plásmido en el gel de agarosa se intensifica al pasar el tiempo, aunque después de una hora ya no hay gran variación; el ADN cromosómico no disminuye apreciablemente.

Al probar a 93°C por 5 y 10 min, se observa mejor con el último tiempo, esto nos ayuda a descartar que haya otro plásmido que corra a la misma distancia que Ti. Un problema que se tenía es que al usar el éter aún el redestilado, el ADN se degradaba, por lo que se optó por electroeluir el ADN antes de usar el éter, para poder separar el plásmido del ADN cromosómico.

Electroelusión.

El plásmido electroeluido se trató con enzimas de restricción: Xba I, Hin d III, Eco RI y Kpn I, pero no hubo digestión, se pensó que esto pudiera deberse a restos de fenol o que hubiera una alta concentración de sales por lo que se hicieron diálisis con amortiguadores de baja salinidad, así como con agua, pero este tratamiento no cambió notablemente los resultados. El voltaje se redujo gradualmente de 100 a 50 voltios en diferentes electroeluciones posteriores pero esto tampoco dió resultado. Lo que sí se pudo observar es que en la cámara de electroelusión la temperatura se eleva mucho, a pesar de estar en un cuarto frío y cubierta con hielo. Sin embargo cuando se electroeluyó pBR328, este sí se pudo digerir, por lo que suponemos que la dificultad radica en el gran tamaño del plásmido.

Al aumentar el tiempo de incubación de Ti con las enzimas de restricción, los resultados fueron poco reproducibles pues a veces se observaban digestiones parciales y a veces no.

Por el método de aislamiento descrito por Koekman, (51) de un litro de cultivo de cultivo se obtuvieron 89 mg. de ADN tanto del cromosómico como del plásmido y al digerir con Xba I y Hin d III se observó lo siguiente:

El patrón de restricción de Ti con Xba I es el siguiente (55)

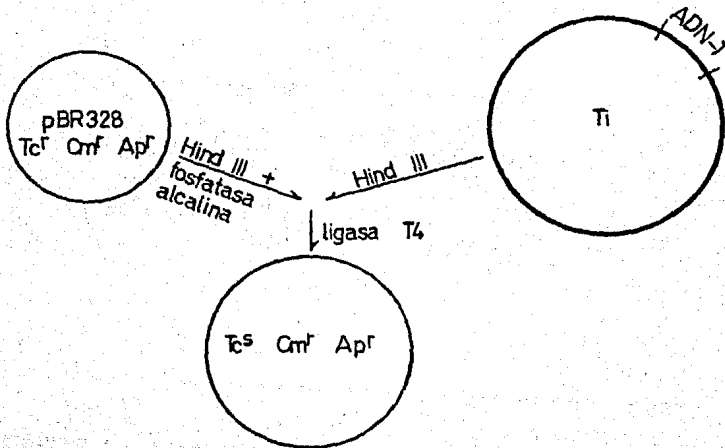
Banda	Peso (Md)	Lo que se obtuvo usando como marcadores de peso ADN de λ digerido con -
1	38.91	<u>Eco</u> RI y ADN de con <u>Hin</u> dIII,
2	36.84	

3	22.11	fué que a la altura esperada de la doble
4	9.36	banda de 4.29 Mdaltones estaba una clara
5ab	4.29	mente definida y a la distancia esperada
6	0.51	de las dos primeras bandas habla un barrido.

La digestión con Hind III no dió ningún patrón definido, debido al gran número de sitios de reconocimiento y a la presencia de algo de ADN cromosómico.

En un aislamiento posterior por este mismo método, se obtuvo una sola banda muy definida en el lugar esperado para Ti en CsCl. Sin embargo, al correr el ADN en electroforesis aparecieron dos bandas más, a distancias muy regulares unas de otras, que parecían ser formas superenrolladas del plásmido.

Con esta preparación se tuvo un patrón de Ti con Hind III más o menos clara y con ella se procedió a hacer la clonación según el siguiente esquema:



Ambos plásmidos se digirieron con Hin dIII, el pBR328 se llevó a un volumen de 100 μ l con Tris pH 7.5 10 mM se trató con 1 μ l de fosfatasa alcalina, para evitar que se religara y se dejó una hora a 65°C.

El ligamiento se confirmó en un gel de agarosa y se procedió a transformar.

Como control se utilizó ADN de lambda, el cual se fosfató, digirió y ligó.

Transformación.

Para estar seguros de que las resistencias seleccionadas están codificadas por el plásmido, se empleó como control en la transformación una parte de células RR1 competentes sin transformar y se sembraron en cajas con Cm, Ap, Tc al igual que las transformantes.

Se obtuvieron seis transformantes de los cuales cuatro presentaban el fenotipo Cm^r, Ap^r, Tc^s, lo que indica que tienen inserto; pero las otras dos colonias eran Cm^r, Ap^r, Tc^r, Esto puede deberse a que tal vez hayan quedado algunas moléculas de pB328 sin digerir y sean las que den este fenotipo, o que la remoción del grupo fosfato no haya sido completa permitiendo la recircularización durante el ligamiento, sin embargo no es muy probable ya que de haber ocurrido esto, hubiéramos observado un mayor número de transformantes.

El número tan bajo de transformantes pudo deberse, a que las células receptoras no estaban todavía competentes, sin embargo en otros experimentos de transformación con diferentes plásmidos no recombinantes, siem

pre se obtuvo un gran número de transformantes. Otra posibilidad es que el plásmido con el inserto sea muy inestable, por lo que sería recomendable también probar otros vectores.

Se hicieron aislamientos rápidos de ADN de las colonias transformantes para comprobar la presencia del inserto encontrándose que éstos no eran muy grandes.

CONCLUSIONES

Para el aislamiento de *Ti* se recomienda utilizar el método descrito por Koekman (51), pues es más fácil de llevar a cabo y se utiliza menor cantidad de CsCl.

Los métodos de aislamiento rápido para *Ti*, son muy útiles cuando se quiere detectar la presencia del plásmido, no así para los experimentos en que se requiere un análisis con enzimas de restricción, pues tanto por el método de Kado o el de aislamiento rápido para plásmidos de *A. tumefaciens* dieron resultados poco reproducibles cuando se digirieron con enzimas de restricción.

Tampoco es muy conveniente tratar al plásmido *Ti* por medio de --- electroelusión pues presenta los mismos problemas para su restricción.

Es por esto que conviene separar al plásmido *Ti* por medio de un gradiente de CsCl y una vez bien purificado, restringirlo y clonar la región ADN-T que es la que sabemos se encuentra en el núcleo de las células vegetales infectadas.

Una manera de detectar a esta región en las células vegetales sería haciendo hibridaciones de tipo ADN-ADN Southern.

El trabajo aquí descrito resuelve los principales problemas en el aislamiento del plásmido *Ti*, por lo que podemos obtener la región ADN-T clonada en un vehículo molecular y puesto que es mucho más fácil trabajar con *E. coli* que con *A. tumefaciens*, el ADN extraño que se quiera insertar se metería en el vehículo de *E. coli*.

Con el vehículo molecular que contenga a la región ADN-T podemos -- tratar de transformar células vegetales mutantes en el metabolismo hormonal para confirmar si estos plásmidos recombinantes pueden emplearse como vec-- tones para la introducción de nuevos genes a células vegetales en cultivo.

También se pueden fusionar los protoplastos de la bacteria que -- contiene al plásmido recombinante con la célula vegetal para llevar a cabo la transformación más eficientemente.

En el transcurso de la redacción de este trabajo, se recibió una cepa de E. coli con un vector que contiene a la región ADN-T con un mar-- cador, por lo que está por hacerse ahora la conjugación de esta bacteria - con A. tumefaciens cerciorándose de que el plásmido T_i ha adquirido la nue-- va información e infectar plantas para tratar de obtener la expresión del marcador en éstas.

A P E N D I C E

a) MEDIOS DE CULTIVO

Para A. tumefaciens

Medio Mínimo (Davey) (54)

K_2HPO_4	10.25 g/l	
KH_2PO_4	7.25 "	
NaCl	0.15 "	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 "	Esterilizar aparte
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.01 "	Esterilizar aparte
Glucosa	5.0 "	"
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2.5 mg/l	
Octopina	80 mg/l	Esterilizar aparte (por filtración)
Agar lavado	1%	

Caldo Luria

Hidrolizado de caseína	10 g/l
NaCl	10 "
Extracto de levadura	5 "

Medio TY

Bactotriptona	8 g/l
Extracto de levadura	5 "
NaCl	5 "

Para E. coli

Medio Luria

Triptona o peptona de

caseína purificada 10 g/l

Extracto de levadura 5 "

NaCl 10 "

NaOH 1N 2.5 ml

Para medio sólido se agregan 20 g/l de agar

Medio M 9

MgSO₄ 0.1 M 10 ml Sales 10x

CaCl₂ 0.01 M 10 ml Na₂HPO₄ 70 g

Casaminoácidos 20% 20 ml KH₂PO₄ 30 g

H₂O destilada 825 ml NaCl 5

NH₄Cl 10 g

esterilizar aparte

Glucosa 20% 20 ml H₂O destilada aforar a

1 litro

Sales 10x 100 ml

Requerimientos para la cepa RR1

Pro 4% 4 ml/l

Leu 1% 4 ml/l

BI 0.1% 0.2 ml/l

Medio NN

KH_2PO_4	13.6 g
K_2SO_4	2.61 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
CaCl_2	0.01 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 grano
KOH 10 N	10 ml

Esterilizar aparte

Glucosa 20%	10 ml
NH_4Cl 8.02g/ 100 ml	10 ml

Aforar a 1 litro con agua destilada.

b) SOLUCIONES PARA PURIFICACION DE PLASMIDOS.

I

Solución de Lisozima

(Se guarda a temperatura ambiente)

2 mg/ml lisozima

Solución para disolver la lisozima

Glucosa	50 mM
CDTA	10 mM
Tris-HCl	25 mM pH 8

II

Solución alcalina SDS

NaOH	0.2 N
SDS	1 %

III

Solución alta en sales

Acetato de sodio 3 M pH 4.8

Se disuelven los 3 moles en el mínimo volumen de agua y se ajusta el pH con ácido acético glacial.

IV

Acetato de sodio	0.1 M
Tris-HCl pH 8	0.05M

ARN
asa

10 mg./ml. en

Acetato de sodio	0.1 M
EDTA pH 7	$3,3 \times 10^{-5}$ M

Amortiguador A50

Tris-HCl pH 8	50 mM
NaCl	500 mM
NaN ₃	1 mM

Preparación de Resina Dowex A G5QW-X8 100-200 mesh (hidrogeno form).

- 1.- Vaciar la resina en un matraz de 500 ml hasta la marca de 100 ml.
- 2.- Añadir 400 ml de agua bidestilada y 32 g de NaOH (2 N), se agita.
- 3.- Dejar asentar y decantar.
- 4.- Llenar con agua bidestilada, agitar, dejar asentar y decantar.
- 5.- Llenar con agua bidestilada y añadir 10 ml de HCl concentrado, agitar y decantar.
- 6.- Repetir el paso 5.
- 7.- Lavar cinco veces con agua bidestilada
- 8.- Lavar con Tris-HCl 0.1 M pH 8.
- 9.- Almacenar con amortiguador A50.

PARA EL PLASMIDO T1

$T_{50}E_{20}$

Tris pH 8 50 mM

EDTA 20 mM

Pronasa 280 mg/50 ml $T_{50}E_{20}$ se preincuba durante dos horas a

37°C.

NaOH 3 N

Tris-HCl 2 M pH 7

PEG 6000 50 % en agua

SSC

NaCl 0.15 M

Citrato de sodio 0.015 M

PARA AISLAMIENTO RAPIDO

Solución Lisadora

SDS 3%

Tris pH 12.6 50 mM ajustar con NaOH 2 N, 1 ml.

Aforar a 100 ml y filtrar con Milipon 2 μ m tamaño del poro.

Amortiguador E.

Tris acetato 40 mM pH 7.9 (ácido acético glacial)

EDTA 2 mM

c) SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS

Tris-boratos-EDTA 10x

Tris base 108 g

Na₂EDTA 2H₂O 9.3 g

H₃BO₃ 55 g

Aforar a 1 litro pH 8.2

Mezcla para detener la reacción (10 ml)

Urea 6 g

Azul de bromofenol en agua 0.5% 1 ml

Xilencianol en agua 0.5% 1 ml

Solución de bromuro de etidio 10 mg/ml, para usar se diluye a 0.4 μ g/ml.

d) SOLUCIONES PARA ELECTROELUSION

TEA 2x

Tris-base	193.6 g
Acetato de sodio anhidro	65.6 g
Na ₂ EDTA	29.6 g

Se ajusta a pH 8.1 con ácido acético glacial y se afora a 4 litros.

TE

Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA	1 mM

e) SOLUCIONES PARA COLUMNA DE BND-CELULOSA

Amortiguador de Lavado

Tris-HCl pH 7.5	10 mM
NaCl	10 mM

Amortiguador de Elusión

Tris-HCl pH 8	1 mM
NaCl	1 M
Etanol	15 %

f) PREPARACION DE BOLSAS DE DIALISIS

- 1.- Hervir dos veces por 10 min en HNaCO₃ las bolsas de diálisis, mover con una espátula.
- 2.- Hervir dos veces por 10 min en EDTA 5 mM.
- 3.- Guardar en 5 mM y 10% de etanol

g) SOLUCIONES AMORTIGUADORAS PARA ENZIMAS

Eco RI 10x

Tris-HCl pH 7.5	1	M
MgCl ₂	0.05	M
NaCl	1.0	M

Hin dIII 10x

Tris-HCl pH 7.5	66	mM
MgCl ₂	66	mM
B-Mercaptoetanol	70	mM
NaCl	0.5	M

Xba I 10x

MgCl ₂	60	mM
NaCl	1	N
Tris pH 7.5	60	mM

Ligasa T4 10x

Tris pH 7.6	0.2	M
DTT	0.1	M
MgCl ₂	0.1	M

ATP 10x

ATP 5 mM en 0.1 M Tris pH 7.4

Fosfatasa alcalina

Tris-HCl pH 8 25 mM

0.1 u/μg de ADN

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Braun, A. C. (1978). *Plant tumors*, *Biochim. Biophys. Acta* 516: ---
167-191.
- 2.- Kehr, A. E., H.H. Smith (1954). *Genetic tumors in nicotiana hybrids*.
Brokhaven Symp. Biol. 6: 55-76.
- 3.- Smith, E.P., C.O. Townsend (1907). *A plant tumor of bacterial origin*.
Science 25: 671-673.
- 4.- Agrios, G. (1964). *Plant Pathology*. Academic Press. USA. pp. 629.
- 5.- Roberts, D., C. Boothroyd (1972). *Fundamentals of plant pathology*. --
W.H. Freeman Company. USA. pp. 402.
- 6.- Lippincott, B.B., J.A. Lippincott (1969). *Bacterial attachment to
a specific wound site as an essential stage in tumor initiation by
Agrobacterium tumefaciens*. *J. bact.* 97 : 620-628.
- 7.- De Kleene, M., J. de Ley (1976). *The host range of crown gall*. *Bot.*
Rev. 42: 389-466.
- 8.- Lippincott, J.A., B.D. Lippincott (1980). *In bacterial adherence in
receptors and recognition*. *Ser. B.* 16: 439-451. ed. E.H. Heachey --
London: Chapman & Hall.
- 9.- Matthyse, A.M., K.V. Holmes, R.H.G. Gurlitz (1981). *Elaboration of
cellulose fibrils by Agrobacterium tumefaciens during attachment
to carrot cells*. *J. bact.* 145: 583-95.
- 10.- Braun, A.C. (1956). *The activation of two growth-substance system
accompanying the conversion of normal to tumor cells in crown gall*.
Cancer Res. 16: 53-56.
- 11.- Hall, T., J. Davies (1979). *Nucleic Acids in Plants*. Vol. II. CRC
Press. USA.

- 12.- Mulligan, R.C., B.H. Howard, P. Berg [1979]. Synthesis of rabbit B-globin the cultured monkey kidney cells following infection with a SV40 B-globin recombinant genome. *Nature* 277 : 108-114.
- 13.- Bomhoff, G.H., P.M. Klapwijk, H.C.M. Kester, R.A. Schilperoort, J.P. Hernalsteens, J. Schell (1976). Octopine and nopaline synthesis and breakdown genetically controlled by a plasmid of Agrobacterium tumefaciens. *Mol. Gen. Genet.* 145: 177-181.
- 14.- Guyon, P., M.D. Chilton, A. Petit, F. Tempé (1980). Agropine in "null-type" crown gall tumors: evidence for the generality of the opine -- concept. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77; 2693-2697.
- 15.- Coxon, D.T., A.M. Davies, G.R. Fenwick. R. Self, J.R. Firmin, D. --- Lipkin, N.F. Janes (1980). Agropine, a new aminoacid derivative from crown gall tumors. *Tetrahedron Lett.* 21: 495-498.
- 16.- Hooykaas, P.J. et al (1977). Transfer of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid to avirulent Agrobacterium and to Rhizobium explanta. *J. Gen. Microbiol.* 98: 477-484.
- 17.- Braun, A.C. (1947). Thermal studies on the factors responsible for -- tumor initiation in crown gall. *A. J. Bot.* 34: 234-240.
- 18.- Schilperoort, R.A., N. Veldstron, S.O. Warnaar, G. Mulder J.A. Cohen (1967). Formation of complexes between DNA isolated from tobacco --- crown gall tumors and RNA complementary to Agrobacterium tumefaciens DNA. *Biochim. Biophys. Acta.* 145: 523-525.
- 19.- Zaenen, I., N. Van Larabeke, H. Teuchy, M. Van Montagu, J. Schell --- (1974). Supercoiled circular DNA in crown gall inducing Agrobacterium strains. *J. Mol. Biol.* 86: 109-127

- 20.- Van Larabeke, N., G. Engler, M. Holsters, S. Van Den Elsacker, I. -
Zaenen, R.A. Schilperoort, J. Schell (1974). Large plasmid in Agro-
bacterium tumefaciens essential for crown gall inducing ability. Na-
ture. 252: 169-170.
- 21.- Hooykaas, P.J., R.A. Schilperoort, A. Rörsh (1979). Agrobacterium -
tumor inducing plasmids: potential vectors for the genetic engine-
ering of plants. in: J.K. Setlow and A. Hollaender (Eds.) Genetic --
Engineering I. Plenum, New York
- 22.- Kerr, A., P. Manigault, J. Tempé (1977). Transfer of virulence "in -
vivo" and "in vitro" in Agrobacterium. Nature 265: 560-561.
- 23.- Chilton, M.D., R.K. Saiki, N. Yadov, M.P. Gordon, F. Quetier (1980).
T-DNA from Agrobacterium Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction
of crown gall tumor cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 77: 4060-4064.
- 24.- Yadov, N.S., K. Postle, R.K. Saiki, M.F. Tomashow, M.D. Chilton. --
(1980). T-DNA of a crown gall teratome is covalently-joined to host
plant DNA. Nature 287: 456-461.
- 25.- Willmitzer, L., L. Otten, G. Simons, W. Schmalenbach, J. Schröder,
M. Van Montagu, G. de Vos, J. Schell. (1981). Nuclear and polysomal
transcripts of T-DNA in octopine crown gall suspension and callus -
cultures. Mol. Gen. Genet. 182: 255-262.
- 26.- Murai, N., J.D. Kemp (1982). Octopine synthase messenger RNA isolated
from sunflower crown gall callus is homologous to the Ti plasmid of
Agrobacterium tumefaciens Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 79: 86- 90.
- 27.- Schröder, J., G.S. Schroder, H. Huisman, R. Schilperoort, J. Schell
(1981). The mRNA for lysopine dehydrogenase in plant cells is com-
plementary to a Ti plasmid fragment. FEBS Lett. 129: 166-168.

- 28.- Willmitzer, L., M. De Keuckeleer, M. Lemmers, M. Van Montagu, J. -- Schell (1980). DNA from Ti plasmid present in nucleus and absent from plastids of crown gall plant cells. *Nature* 287: 359-361.
- 29.- Thomashow, M.F., C.G. Panagopoulos, M.P. Gordon, E.W. Nester (1980). Host range of Agrobacterium tumefaciens is determined by the Ti plasmid. *Nature* 283: 794-796.
- 30.- Perry, K., C. Kado (1982). Characteristics of Ti plasmids from broad-host-range and ecologically specific biotype 2 and 3 strains of ---- Agrobacterium tumefaciens. *J. Bac.* 151: 343-350.
- 31.- Schell, J. (1975). The role of plasmids in crown gall formation by -- Agrobacterium tumefaciens in L. Ledoux (Ed.) Genetic manipulation -- with plant material. Plenum, New York.
- 32.- Nieto, J. (1981). Purificación de plásmidos Ti de Agrobacterium tumefaciens para estudios de transformación genética. Tesis Profesional. - Fac. de Ciencias. UNAM.
- 33.- Koekman, B., G. Ooms, P. Klapwijk, R. Schilperoort (1979) Genetic -- map of an octopine Ti plasmid. *Plasmid* 2: 347-357
- 34.- Ooms, G., P. Klapwijk, J. Poulis, R. Schilperoort (1980). Characterization of Tn904 insertions in Octopine Ti plasmid mutants of Agrobacterium tumefaciens. *J. Bac.* 144: 82-91.
- 35.- Hepburn, A., J. Hindley (1979). Regions of DNA sequence homology between and octopine and a nopaline Ti plasmid of Agrobacterium tumefaciens. *Mol. Gen. Genet.* 169: 163-172
- 36.- Engler, G., A. Depicker, R. Maenhaut, R. Villarroel, M. Van Montagu, J. Schell (1981). Physical mapping of DNA base sequence homologies between and octopine and a nopaline Ti plasmid of Agrobacterium tumefaciens. *J. Mol. Biol.* 152 183-208.

- 37.- Liu, S., K. Perry, C. Schardl, C. Kado (1982). Agrobacterium Ti -- plasmid indolacetic acid gene is required for crown gall oncogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 2812-2816.
- 38.- Thomashow, M., R. Nutter, A. Montoya, M. Gordon, E. Nester (1980). - Integration and organization of Ti plasmid sequences in crown gall tumors. Cell 19: 724-739.
- 39.- Ooms, G., P.J.J. Hooykaas, G. Moolenaar, R.A. Schilperoort (1981). - Crown gall plant tumors of abnormal morphology, induced by Agrobacterium tumefaciens carrying octopine Ti plasmids; analysis of T-DNA functions. Gene 14: 33-50
- 40.- Garfinkel, D., R. Simpson, L. Ream, F. White, M. Gordon, E. Nester -- (1981). Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the -- T-DNA by site-directed mutagenesis. Cell 27: 143-153.
- 41.- De Beuckeleer, M., M. Lemmers, G. De Vos, L. Willmitzer, M. Van Montagu, J. Schell (1981). Further insight on the transferred-DNA of octopine crown gall. Mol. Gen. Genet. 183: 283-288.
- 42.- Merlo, D., R. Nutter, A. Montoya, D. Garfinkel, M. Drummond, M. Chilton, M. Gordon, E. Nester (1980). The boundaries and copy numbers of Ti plasmid T-DNA vary in crown gall tumors. Mol. Gen. Genet. 177: -- 637-643.
- 43.- Hernalsteens, J. P. et al (1978). EMBO Workshop on plant tumor --- research, Noorwijkerhout, The Netherlands.
- 44.- Márton, L., G. J. Willems, L. Molendijk, R.A. Schilperoort (1979). - "In vitro" transformation of cultured cells from Nicotiana tabacum by Agrobacterium tumefaciens. Nature 277: 129-131.
- 45.- Willems, G.J., L. Molendijk, G. Ooms, R. A. Schilperoort (1981). --

- Differential expression of crown gall tumor markers in transformants obtained after "in vitro" Agrobacterium tumefaciens induced transformation of cell wall regenerating protoplasts derived from Nicotiana tabacum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 4344-4348.
- 46.- Wullems, G., L. Molendijk, G. Ooms, R. Schilperoort (1981). Retention of tumor markers in F1 progeny plants from "in vitro" induced octopine and nopaline tumor tissues. Cell 24: 719-727.
- 47.- Davey, M. R., E. C. Cocking, J. Freeman, N. Pearce, I. Tudor (1980). Transformation of Petunia protoplasts by isolated Agrobacterium plasmid. Pl. Sci. Lett. 18: 307-313.
- 48.- Krens, F. A., L. Molendijk, G. J. Wullems, R. A. Schilperoort (1982). "In vitro" transformation of plant protoplasts with Ti plasmid DNA. Nature 296: 72-74
- 49.- Hasezawa, S., T. Nagata, K. Syono (1981). Transformation of Vinca -- protoplasts mediated by Agrobacterium spheroplasts. Mol. Gen. Genet. 182: 206-210.
- 50.- Currier, T., E. Nester (1976). Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. Anal. Biochem. 76: 431- 441.
- 51.- Koeckman, B., P. Hooykaas, R. Schilperoort (1980). Localization of -- replication control region on the physical map of the octopine Ti -- plasmid. Plasmid 4: 184-195.
- 52.- Kado, C., S. Liu (1981). Rapid procedure for detection and isolation -- of large and small plasmids. J. Bac. 145: 1365 - 1373.
- 53.- Birnboim H., J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure -- for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Ac. Res. 7: 1513-1523

- 54.- Power, J., M. Davey (1979). Laboratory manual: plant protoplasts -- (isolation, fusion, culture, genetic transformation) Department of Botany. Nottingham. U.K.
- 55.- De Vos G., M; De Beuckeleer, M Van Montagu, J. Schell (1981). Restriction endonuclease mapping of the octopine tumor-inducing plasmid pTiAch5 of Agrobacterium tumefaciens. Plasmid 6: 249-253.
- 56.- Soberón X., L. Covarrubias, F. Bolívar. (1980). Construction and Characterization of new cloning vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325. Gene 9 : 287-305
- 57.- Bolívar, F. (1979). Recombinación "in vitro" de ácidos nucleicos. Ingeniería genética molecular. Rev. Lat. -amer. Microbial. 21 : 37-55