



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

“IZTACALA”

ASLAMIENTO DE MUTANTES t_1
DEL BACTERIOFAGO LAMBDA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A

GABRIELA OLMEDO ALVAREZ

SAN JUAN IZTACALA, MEXICO

1985



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.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE
GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGA
CION Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO -
NACIONAL BAJO LA DIRECCION DEL Dr. GABRIEL GUARNEROS P.

A MIS PADRES

A DOLORES , CARMEN , Y MONICA

A MERCEDES Y LOURDES

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gabriel Guarneros por sus muchas enseñanzas en el área de Genética e Investigación

A mis compañeros Tere Hernández, José Manuel Galindo, Benito Estrada, Luis Kameyama, José Bueno, Plinio Guzmán, y Jaime Alvarez de la Cuadra.

A los señores Elías García y Arnulfo Zarco por la eficiente preparación de los medios y el material utilizados en este trabajo.

Mi profundo reconocimiento

A la Escuela Nacional de Estudios Profesionales
Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de
México.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional.

CONTENIDO

	Pág.
INDICE DE ABREVIATURAS	
INDICE DE FIGURAS	
INDICE DE TABLAS	
<u>RESUMEN</u>	1
<u>INTRODUCCION</u>	3
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	19
Bacterias y Virus	19
Medios de Cultivo	19
Soluciones	20
Método de propagación y de titulación de bacteriófagos.	23
Ensayo para distinguir entre bacterias con fenotipo gal ⁺ y gal ⁻ .	23
Ensayo para distinguir entre bacteriófagos con fenotipo t _I ⁺ y t _I ⁻	24
Método de transducción del marcador <u>recA</u> de <u>E. coli</u> con P1 c1r100 cm ^r .	24
Método para checar el marcador <u>recA</u> .	25
Mutagénesis con E.M.S.	26
Obtención de fagos que llevan integrado el plásmido (fásmidos)	27
Inducción de fásmidos	28

	Págs.
Método de inactivación de bacteriófagos por tratamiento con agentes quelantes para estimar su contenido de DNA	29
Método para cuantificar integrasa. Ensayo de superinfección	29
Aislamiento de DNA de plásmido	31
- Aislamiento de DNA de plásmido a partir de 500 ml de cultivo.	31
- Método de aislamiento rápido de DNA de plásmido.	33
Método de transformación de bacterias.	34
Obtención de suspensiones concentradas de bacteriófago.	35
Recombinación entre bacteriófagos	37
Inactivación de bacteriófagos con citrato de sodio.	38
Extracción de DNA del bacteriófago lambda.	38
Enzimas y condiciones utilizadas en restricción.	39
Electroforesis de DNA en genes.	39
Ensayo de galactocinasa.	41

RESULTADOS1.- Selección de mutantes t_I en el plásmido.

Transducción de la mutación <u>recA</u> bacteriana a la cepa SA1943.	44
Frecuencia de aparición de colonias rojas por recombinación entre el plásmido y la bacteria.	44
Fenotipo de las cepas SA1943 y SA1943 <u>recA</u> portadoras de los plásmidos sib^+ , $sib2$, y $sib3$.	47
Mutagénesis etil metano sulfonato.	52
Selección de mutantes en el plásmido.	52

2.- Transferencia de la mutación del plásmido al fago.

Transformación de los plásmidos candidatos t_I^- a la cepa SA1943.	57
Ensayo para distinguir entre fagos t_I^+ y fagos t_I^- .	58
Obtención de fásmidos.	63
Inducción de fásmidos con mitomicina.	63
Inactivación del fásmido con citrato de sodio.	64
Selección de fagos 464 t_I^- <u>nutL</u> imm 434.	67
Construcción de los fagos <u>lac</u> imm434 <u>cII41</u> por recombinación.	70
Ensayo de superinfección con los fagos <u>lac</u> t_I^- imm434 <u>cII41</u> .	70

Crecimiento de los fagos candidatos t_I^- en la cepa C600 rap^- .	76
Patrón de restricción de los fagos t_I^- con HinDIII y BamHI.	76
Patrón de restricción de los plásmidos candidatos t_I^- con HinDIII y EcoRV.	81
Ensayo de galactocinasa de los plásmidos candidatos t_I^- .	86
<u>DISCUSION Y CONCLUSIONES</u>	87
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	97

INDICE DE TABLAS

	Págs.
TABLA 1. Lista de cepas utilizadas.	21
TABLA 2. Lista de fagos utilizados.	22
TABLA 3. Transducción de la mutación <u>recA</u> a la cepa SA1943 por transducción con el fago P1 C1r 100 cm ^r .	45
TABLA 4. Frecuencia de aparición de revertantes <u>galK</u> ⁺ en las cepas SA1943 y SA1943 <u>recA</u> portadoras del plásmido pKG1800 <u>sib</u> ⁺ .	48
TABLA 5. Fenotipo de los plásmidos pKG1800 <u>sib</u> ⁺ , <u>sib2</u> y <u>sib3</u> en las cepas SA1943 y SA1943 <u>recA</u> a diferentes temperaturas.	50
TABLA 6. Selección de fagos candidatos <u>t_I</u> ⁻ .	68
TABLA 7. Cuantificación de integrasa en los fagos candidatos <u>t_I</u> ⁻ por el ensayo de superinfección.	74
TABLA 8. Crecimiento de los fagos candidatos <u>t_I</u> ⁻ en la cepa C600 <u>rap</u> ⁻ .	77
TABLA 9. Unidades de galactocinasa de los plásmidos candidatos <u>t_I</u> ⁻ en la cepa SA1943 <u>recA</u> .	85

INDICE DE FIGURAS

	Págs.
FIGURA 1. Secuencia de nucleótidos y estructura secundaria del RNAm del terminador \underline{t}_I de lambda.	5
FIGURA 2. Mapa del genoma de lambda.	8
FIGURA 3. Reacción de integración y escisión del bacteriófago lambda.	13
FIGURA 4. Regulación del gene <u>int</u> de lambda.	16
FIGURA 5. Frecuencia de aparición de mutantes en la cepa SA1943 <u>recA</u> (pKG1800 sib^+) tratada con E.M.S.	53
FIGURA 6. Frecuencia de sobrevivencia de la cepa SA1943 <u>recA</u> (pKG1800 sib^+) tratada con E.M.S.	55
FIGURA 7. Sistema de transferencia de la mutación del plásmido a lambda.	59
FIGURA 8. Ensayo para distinguir entre fagos \underline{t}_I^+ y \underline{t}_I^- .	61
FIGURA 9. Frecuencia de sobrevivencia de fagos y fásmidos a tratamiento con citrato de sodio.	65
FIGURA 10. Construcción de los bacteriófagos <u>lactrp</u> W205 <u>red</u> 114 <u>cIIam41</u> .	71
FIGURA 11. Patrón de restricción HindIII y imm434 <u>cII</u> ₄₁ candidatos \underline{t}_I^- .	79
FIGURA 12. Patrón de restricción con HindIII y EcoRV de los plásmidos pKG1800 sib^+ con fenotipo \underline{t}_I^- .	82
FIGURA 13. Plásmido pKG1800.	89

INDICE DE ABREVIATURAS

<u>bio</u>	Operón de <u>E. coli</u> para la utilización de biotina.
cpm	Cuentas por minuto
DNA	Acido desoxiribonucleico
D.O.	Densidad óptica
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
E.M.S.	Etil metano sulfonato
<u>gal</u>	Operón de <u>E. coli</u> para la utilización de galactosa
	Lambda
moi	Multiplicidad de infección
pb	Pares de bases
PEG	Polietilén glicol
RNA	Acido ribonucleico
RNAsa	Ribonucleasa
RMAm	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Tris-HCl	Tris (hidroximetil)-aminometano-hidrocloruro
UFP	Unidades formadoras de placas
X-G	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactósido

RESUMEN

Los eventos de terminación de la transcripción son importantes en el control de la expresión de los genes. Un caso concreto de ello es el terminador t_I del bacteriófago lambda, el cual está involucrado en la regulación del gene int. El gene int codifica para la enzima integrasa que cataliza la recombinación entre el DNA del fago y la bacteria, durante la fase lisogénica de este virus temperado.

La regulación de la expresión de Int es compleja; son dos los promotores que transcriben al gene, mas únicamente a partir de P_I se traduce efectivamente el mensajero de int. El RNAm proveniente del promotor P_L es degradado post-transcripcionalmente, debido a que más allá del gene se encuentra un elemento regulador (sib) cuya función es prevenir la traducción de la integrasa. Curiosamente, t_I y sib comparten una misma secuencia de nucleótidos, y de este modo se formará una estructura de terminación para el operón de P_I, pero de retroregulador para el de P_L.

Se han aislado mutaciones puntuales de sib (Guarneros et al., 1982. PNAS 79:238-242), pero resultados del laboratorio muestran que éstas mutaciones no afectan visiblemente al terminador, por lo que resultaba interesante aislar mutantes t_I para obtener mayor información acerca de la región que comparten sib y t_I, y definir con precisión los elementos de la estructura necesarios para la terminación.

El aislamiento de dichas mutantes se efectuó mediante mutagénesis dirigida, utilizando para ello el plásmido pKG1800 en el cual fuera insertado el terminador t_I . A partir de los plásmidos seleccionados como candidatos t_I^- se intentó transferir la mutación a lambda por recombinación con el fago lactrp W205 nutL imm434. Se obtuvieron cinco fagos con el fenotipo deseado.

Se ensayó cuantitativamente la producción de integrasa, encontrándose que uno de los fagos presentaba un comportamiento tipo sib^- y dos más daban valores intermedios (entre sib^+ y sib^-), sin embargo, se encontró también, que, por crecimiento de los fagos en una cepa rap⁻, en algunos de dichos fagos la transcripción hacia la izquierda estaba afectada. Así mismo, el patrón de restricción con HinDIII y BamHI de uno de los fagos presentó alteraciones.

Al parecer algunas de las observaciones obtenidas de los fagos son resultado de artefactos generados durante la transferencia de la mutación mediante la formación de fásmidos con HinDIII y EcoRV no mostró modificaciones. Mediante un ensayo cuantitativo de la enzima galactocidasa se observó que los plásmidos seleccionados como t_I^- daban valores 4 y 6 veces más altos que el plásmido control t_I^+

INTRODUCCION

I.- Terminadores de la transcripción.

Al proceso en el cual la RNA polimerasa sintetiza un RNA mensajero a partir de información genética presente en el DNA se le conoce como transcripción. Es a este nivel donde los organismos procariotes precisan de una regulación muy fina, puesto que la transcripción ocurre de modo simultáneo a la traducción; dicha regulación es compleja e involucra muchos elementos, entre los cuales se reconoce cada vez más la importancia de los terminadores de la transcripción.

El operón, como unidad policistronica funcional se define hoy en día por la ocurrencia de un sitio de terminación eficiente, sin embargo, la función de un terminador no se limita a señalar un sitio donde finalice la transcripción, ocurren también como elementos de modulación (atenuación) que permiten un control diferencial de la expresión dentro de los operones (Bauer, 1983) y son responsables de lo que conocemos como polaridad (Adhya y Gottesman, 1978).

Se espera que todos los sitios de terminación tengan características estructurales comunes, requeridas para la repuesta de la RNA polimerasa a ese sitio. Las estructuras primarias de muchos terminadores han sido analizadas y se han encontrado algunas similitudes. (Rosenberg y Court, 1979). Una clasificación de terminadores divide a éstos

en dos categorías en base a su comportamiento in vitro: terminadores simples y complejos. (Platt, 1983).

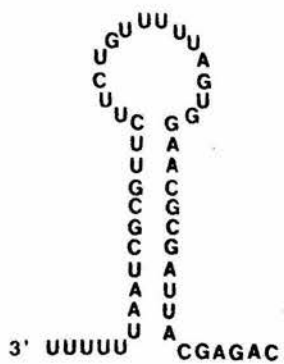
Los terminadores simples son los que funcionan eficientemente in vitro y no requieren de más factores que la RNA polimerasa. Consisten de segmentos de DNA ricos en guanina y citosina que presentan simetría diaxial y están seguidos por una región que contiene de 4 a 8 residuos de uridina cerca del término 3' del transcrito y que se encuentran como 20 nucleótidos antes del sitio de terminación; un ejemplo de terminador simple se muestra en la Figura 1A, y corresponde al terminador t_I del bacteriofago lambda.

Los modelos de terminación basados en estas características proponen que la simetría diaxial es responsable de la formación de estructuras intramoleculares de orquilla en el transcrito de RNA (Adhya y Gottesman, 1978; Rosenberg y Court, 1979) y que las uridinas facilitan la disociación del transcrito del templado (Farnham y Platt, 1980), ya que los híbridos RNA-DNA con apareamiento rU-dA son excepcionalmente inestables.

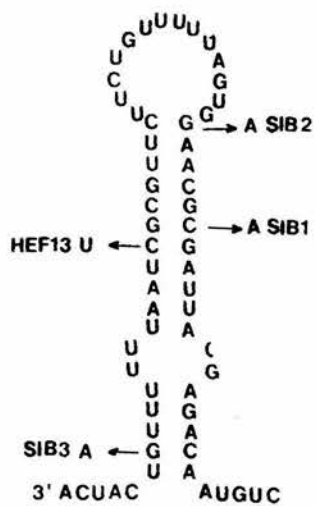
Los terminadores complejos, por otra parte, carecen de simetría diaxial o segmentos con residuos de uridinas, y su principal característica es la dependencia de la RNA polimerasa de factores proteicos adicionales para poder llevar a cabo la terminación. Dentro de estas proteínas las más estudiadas son los factores Rho y NusA de E. coli.

FIGURA 1. Secuencia de nucleótidos y estructura secundaria del RNAm del terminador t_I de lambda. (a) El terminador t_I de lambda. El palíndromo invertido, seguido de varias uridinas, permiten la formación de una estructura secundaria en el RNAm típica de un terminador de la transcripción simple. (b) Estructura secundaria de sib. Se indica la localización de las mutaciones puntuales sib 1, 2, 3, y hef13. La transcripción a través del terminador resulta en la formación de una estructura de doble tallo y doble asa denominada sib, que sirve como elemento retroregulador de int (Guarneros et al., 1982).

A



B



II.- El Bacteriófago Lambda.

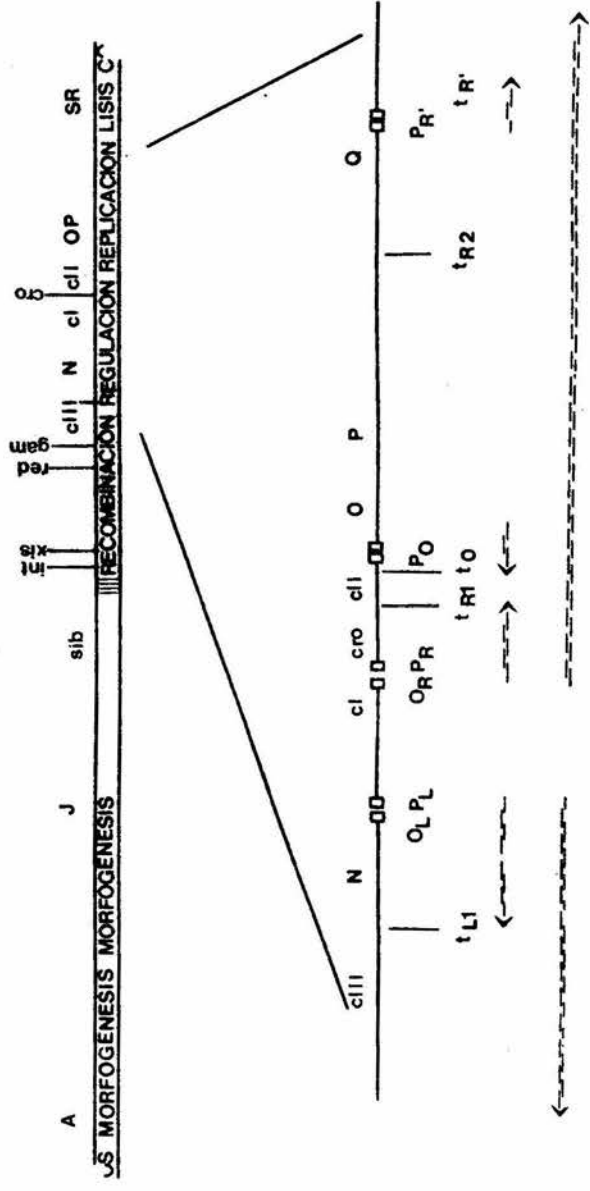
El bacteriófago lambda es un virus que infecta a la bacteria E. coli. Su genoma es una molécula de DNA de doble cadena de aproximadamente 49 Kpb, y que en la partícula viral se encuentra en forma lineal. Pertenece además a los virus llamados temperados, por su capacidad de elegir en su ciclo de vida entre una fase lítica y otra lisogénica. (Herskowitz et al., 1980).

El primer paso en la infección de lambda es su adsorción a su huésped, E. coli, mediante una interacción específica entre el extremo de la cola del fago (proteína J) y su receptor, el producto del gene bacteriano lamB (Murialdo y Siminivitchi, 1972). La proteína lamB forma parte del sistema de transporte para maltosa, por lo que es posible inducir el receptor en presencia de este azúcar.

Habiendo penetrado la molécula de DNA a la célula (la cápsula viral no se introduce), ésta se circulariza, ya que tiene en sus extremos unos segmentos de cadena sencilla complementarios (sitios cos) (Yarmolinsky, 1971).

Tan pronto como ocurre la infección, la RNA polimerasa de E. coli se asocia al DNA de lambda y comienza la transcripción en dos promotores, p_L y p_R . (Figura 2). La transcripción desde p_L va hacia la izquierda y termina en los terminadores t_{L1} y t_{L2} , resultando de este transcrito la proteína N. Al mismo tiempo, la transcripción que se

FIGURA 2. Mapa del genoma de lambda. Posee aproximadamente 50 genes (Szybalsky y Szybalsky, 1979), de los cuales 27 están involucrados en la morfogénesis de la partícula infectiva (genes A a J), cinco más en funciones de recombinación (int, xis, exo, bet y gam), dos en replicación (O y P), dos en lisis (S y R) y seis en procesos regulatorios (cI, cII, cIII, cro, N y O).



inició en p_R en dirección opuesta, termina en un 50% en t_{R1} , mientras que el 50% restante termina en t_{R2} dentro de la región nin. Ambos transcritos dan lugar a la proteína cro, y el segundo a O y P.

Una vez que se alcanza cierto nivel de proteína N, ésta comienza a actuar como antiterminador, de tal modo que los transcritos iniciados en p_L y p_R se alargan y dan lugar a otros productos, como las proteínas cIII y las involucradas en recombinación e integración a partir de p_L y cro, cII, O, P, y Q a partir de p_R . Si se produce suficiente cantidad de cro, ésta proteína actuará como represor sobre los operadores o_L y o_R , apagando la transcripción temprana de p_L y p_R .

Por otra parte, la proteína Q actúa como un regulador positivo, antiterminando tal vez en t_R , a la derecha de p_R , con lo cual comienza la fase tardía, con la producción de RNA mensajero de los genes S, R y todos los genes de la cabeza y la cola.

Sin embargo, la acción de cII y cIII puede conducir a un programa de expresión diferente, ya que son capaces de activar la transcripción de los promotores p_I y p_{RE} y éste es el evento crítico que determinará si el fago continuará hacia una fase vegetativa o bien lisogenizará a su huésped. El transcrito iniciado en p_{RE} hacia la izquierda transcribe el gene cI en la cadena opuesta a cro. Cuando el producto

cI se acumula puede bloquear la replicación del DNA y la expresión de genes tardíos, previniendo la expresión de O, P y Q. El producto de cI es el represor de lambda y, lo mismo que cro, tiene afinidad por o_L y o_R (Gussin, 1983).

En este caso último, la célula sobrevive a la infección por lambda, y el genoma de éste puede insertarse como profago en el cromosoma bacteriano por la acción de la integrasa, producto de int. (Fig. 3). En estas condiciones, cI seguirá produciéndose, pero ahora a partir de otro promotor, P_{RM} y así la bacteria lisógena será inmune a la infección de otros fagos sensibles al represor cI.

Lambda es capaz de formar híbridos estables por recombinación con otros fagos temperados llamados lambdoides (como 434, 21 y Ø80), con los que comparte secuencias homólogas en su DNA (Kaiser y Jacob, 1957). Los híbridos comunmente utilizados son derivados de lambda con la región de inmunidad, en la cual se localizan las funciones reguladoras cI y cro, y los operadores o_L y o_R de los fagos 434 y 21.

III.- Regulación de la Expresión de int.

El producto del gene int cataliza la recombinación sitio específica por la cual el genoma de lambda se integra, durante la vía lisogénica, al cromosoma bacteriano. El proceso inverso, la escisión, requiere nuevamente del producto del gene int, pero además del gene xis (Guarneros y Echols, 1970).

La Figura 3 es un esquema de la integración de lambda según el modelo de Campbell y en ella se muestra el sitio ATT, así como la participación de factores del huésped (IHF) y del fago (Int y Xis) en el evento.

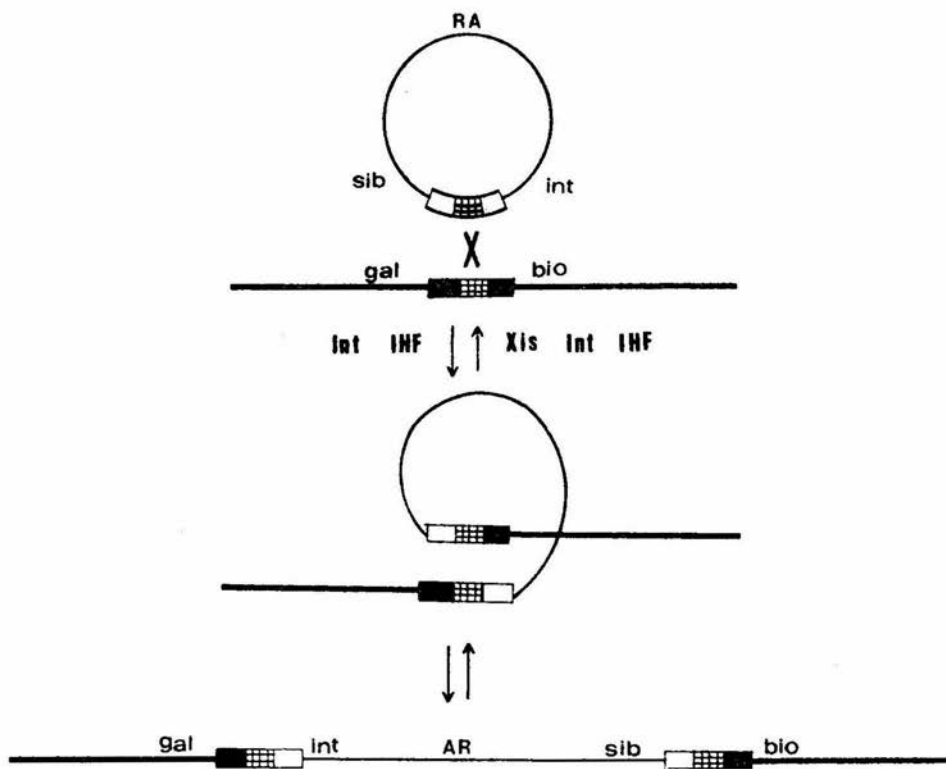
Los genes int y xis se traslapan parcialmente, lo que permite una síntesis diferencial de int sobre xis para llevar a cabo la integración. Esto sucede por la activación del promotor p_I por la proteína cII, cuyo transcrito carece de la secuencia completa de xis. Este transcrito termina en el terminador t_I , dentro de la región b.

Por otro lado, durante la respuesta lítica, no hay necesidad de producir integrasa. En estas condiciones int es transcrito a partir del promotor p_L bajo la regulación positiva de N. Sin embargo, una vez transcrito int, la transcripción continúa, pasando att, dentro de la región b, en donde un elemento regulatorio, conocido como sib, inhibe postranscripcionalmente la expresión del gene int (Guarneros y Galindo, 1979).

El retroregulador sib (por sitio inhibidor en b) se ha delimitado con precisión por el aislamiento de mutantes puntuales (Montañez, 1982) como por deleciones (Court, 1982). Las mutaciones puntuales caen dentro de un segmento que muestra una doble simetría diaxial (Figura 1); tres de ellas están en lo que correspondería al tallo superior de la doble orquílla, y una más en el inferior (Guarneros et al, 1982). Se

FIGURA 3. Reacción de integración y escisión del bacteriófago.λ.

La inserción del profago ocurre por la recombinación integrativa entre el sitio att en el genoma circular de lambda (POP') y el sitio att en el cromosoma de E. coli (BOB'), y es promovida por la proteína Int del fago y una serie de proteínas del huésped, llamadas colectivamente IHF. La recombinación escisiva ocurre mediante los sitios híbridos BOP' y POB' y requiere de la proteína Xis del fago, además de las proteínas Int e IHF. Los sitios att se indican como rectángulos, representando las áreas sombreadas el sitio de homología en donde ocurre el entrecruzamiento (O), y las regiones negra y blanca representan secuencias únicas en la bacteria (B y B') y en el fago (P y P') respectivamente (Weisberg y Landy, 1983).



puede ver que la orquilla superior está seguida por 6 residuos de uridina hacia el extremo 3', lo que hace de esta estructura un típico terminador de transcripción (Rosenberg y Court, 1979).

El modelo de retroregulación (Figura 4) sugiere la formación de una estructura secundaria de doble orquilla en el RNA, al ser esta región transcrita por la RNA polimerasa modificada por N, cuando la transcripción se ha iniciado en p_L . Esta estructura serviría como sustrato para la RNasa III, que dejaría libre un extremo 3', a partir del cual, otra exonucleasa simplemente degradaría el RNA mensajero hacia int (Guarneros et al. 1982).

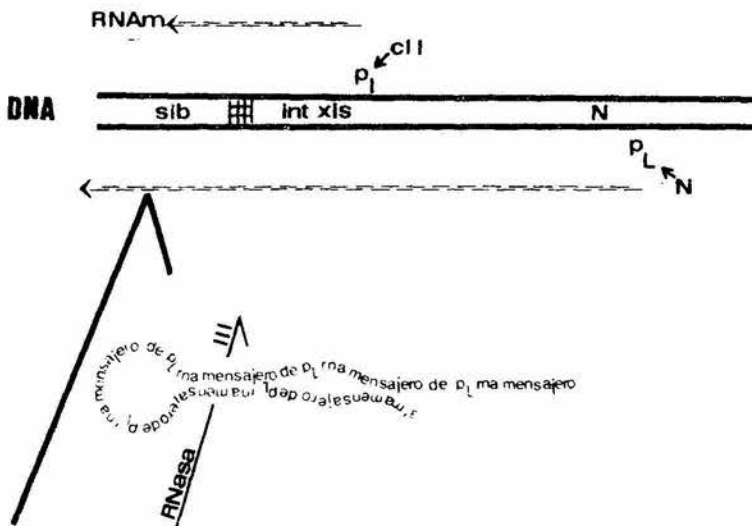
Como ya se mencionó, las mutantes sib⁻ se aislaron por su deficiencia en retroregulación. Estas fueron utilizadas posteriormente para analizar el efecto que tenían sobre la terminación, sin embargo, no pudo detectarse ninguna diferencia significativa entre las mutantes sib⁻ y el terminador t_I silvestre (Bueno, J., 1985) no obstante estar las mutaciones en la estructura del terminador.

A partir de estas observaciones, y con el fin de obtener mayor información acerca de la región que comparten t_I y sib, y definir con mayor precisión los elementos del terminador que determinan su funcionalidad, surgió la idea de aislar mutantes deficientes en terminación.

FIGURA 4. Regulación del gene int de lambda.

La transcripción que se inicia en el promotor p_I requiere del producto del gene c_{II} del fago, y termina en la región sib en el terminado t_I.

La transcripción iniciada en el promotor p_L es modificada por N y se extiende hacia la región b, lo cual resulta en el retroregulación de int, ya que al ser transcrita la región sib el RNAm forma una estructura secundaria de doble tallo y asa, convirtiéndose en blanco para la acción de la RNasa III, la cual corta esta estructura y deja libre un extremo 3'OH a partir del cual el RNAm es degradado hasta int por otra nucleasa (Court et al., 1983).



Para aislar mutantes t_I^- se utilizó el plásmido pKG1800 que fuera construido para el análisis de terminadores (Mc Kenney et al, 1981) y en el cual se tiene clonado un segmento de DNA de lambda con el terminador t_I (Montañez, 1982). Este plásmido fue mutagenizado in vivo y permitió la selección de 5 mutantes con fenotipo t_I^- . Se intentó así mismo, transferir las mutaciones al fago, y ver su efecto sobre el proceso de retroregulación.

En esta tesis se discuten los procedimientos y resultados obtenidos en el aislamiento de mutantes t_I^- .

MATERIAL Y METODOS

Bacterias y virus.

Las cepas de E. coli K-12 utilizadas en este trabajo se enlistan en la tabla 1 . Los bacteriófagos se encuentran en la tabla 2.

Medios de Cultivo.

Medio LB (triptona 10 gr, extracto de levadura 5 gr, NaCl 10 gr, NaOH al 2% 4.8 ml, H₂O 1000 ml); TQ (triptona 10 gr, NaCl 2.5 gr, NaOH al 2% 2 ml, H₂O 1000 ml); TQ suave (igual al TQ excepto que lleva sólo 10 gr de agar); Mac-C (medio Mac-Conkey 40 gr, H₂O 1000 ml, se esteriliza y se agrega D-galactosa al 0.2%); Tet-C (triptona 10 gr, NaCl 5 gr, agar 11 gr, se esteriliza y se añade 2.5 ml D-galactosa al 20%); TQ-XG (al medio TQ se espatulan 100 l de XG (5-bromo-4-cloro-3-indolil- -D-galactósido) 20 mg/ml en N-N-dimetilformamida); SM (NaCl 5.8 gr, gelatina 0.5 gr, H₂O 480.5 ml, ajustar pH a 7.4 con 0.2 ml de HCl 1 N, se esteriliza y se añaden 5 ml de tris pH 7.4 y 2.5 ml de MgSO₄ 1 M); LB sólido (LB más 15 gr de agar); TB (triptona 10 gr, NaCl 5 gr, H₂O 1000 ml); TB-D (TB mas maltosa al 0.2%); 56 mínimo (KH₂PO₄ 13.6 gr, (NH₄)₂SO₄ 2 gr, MgSO₄ · 7H₂O]

0.02 gr, CaCl_2 0.01 gr, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 gr, H_2O 1000 ml, llevar a pH 7.4 con KOH, esterilizar y añadir azúcar al 0.2%); cuando los medios requirieron antibióticos, éstos se adicionaron después de esterilizados los medios utilizando para ello soluciones stock filtradas. Las concentraciones fueron de 25 g/ml de Tetraciclina y 50 g/ml de Ampicilina, 25 g/ml de Cloranfenicol.

Soluciones.

MC (CaCl_2 1 M 0.05 ml., MgSO_4 1 M 1ml, H_2O 0 ml); TE (Tris pH 8 10 mM, EDTA 1 mM); ATP 0.1 M (se disuelven 60 mg de ATP en .8 ml de agua, se ajusta el pH a 7 con NaOH y se ajusta el volumen a 1 ml) Solución I (glucosa 50 mM, tris-HCl pH 8 25 mM y EDTA 10 mM) solución II (NaOH .2 N y SDS al 1%) Acetato de potasio pH 4.8 (a 60 ml de acetato de potasio 5 M se añaden 11.5 ml de ácido acético galacial y 28.5 ml de agua. La solución resultante es 3M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato) RNasa 10 mg/ml (Se disuelve RNasa pancreática (RNasa A) a una concentración de 10 mg/ml en una solución de tris-HCl pH 7.5 y NaCl 15 mM. Se calienta por 15 min a 100 °C. Se permite que alcance la temperatura ambiente y se guarda a -20°C.).

TABLA I
LISTA DE CEPAS UTILIZADAS

No. del cepario	Nombre	Características relevantes	Fuente
81	C600	SuII, supresor de mutaciones ambar; <u>lacY1</u> .	Appleyard, 1954
489	SuIII (λ)	SuIII, supresor de mutaciones ambar; <u>gal</u> ⁻ ; lisógena para lambda.	Este laboratorio
488	SuIII (imm 434)	SuIII, <u>gal</u> ⁻ , lisógena para el fago híbrido <u>imm 434</u>	Este laboratorio
733	SA1943	SuIII, <u>gal</u> ⁻ , lisógena para el fago híbrido <u>imm 21</u> .	Este laboratorio
47	S165	<u>galKam</u>	S. Adhya
460	S165 HF1	<u>lacZ</u> ⁻	S. Adhya
154	S601	<u>lacZ</u> ⁻ ; <u>hfl</u> ⁻ :: Tn 10, la mutación <u>hfl</u> hace turbios a fagos cIII ⁻ , Tn 10 confiere resistencia a tetraciclina	Smith
198	SuIII, <u>recA</u> ⁻	Su ⁺ , carece de supresor de mutaciones ambar; <u>recA</u> ⁻ , deficiente en recombinación generalizada	Smith
293	N5130	SuII, <u>recA</u> ⁻ , <u>gal</u> ⁻	P. Guzmán, 1984
191	191 (P2)	SuII; <u>rap</u> ⁻ , inhibe el crecimiento de fagos silvestres.	Colección NIH
598	SA731 (cII imm21)	<u>recA</u> ⁻ <u>sth</u> ::Tn10, lisógena para PlcIrr100 <u>Cmr</u> ^r . SuIII, <u>lac</u> , <u>gal</u> ⁻ ; lisógena para el fago P1 (inhibe el crecimiento de lambda silvestre (fenotipo spi ⁺). Su ⁺ ; lisógena para el profago <u>int2 redii4cI857cII41 gal8</u>	Guarneros y Galindo, 1979.

TABLA 2
LISTA DE FAGOS UTILIZADOS

Nombre	Características	Fuente
<u>CI857</u>	CI857 es una mutación termosensible en el represor	Sussman y Jacob, 1962
<u>LactrPW205</u>	Sustitución en la región b, abarca la derecha del gene <u>j</u> (<u>plac5</u>) hasta el sitio HindIII, localizado a 250 pb a la izquierda del sitio att	Oppenheim y col., 1982
<u>lactrPW205V53</u>	Delección en <u>sib</u> .	Oppenheim y col., 1982
<u>bio11</u>	Sustitución de la región <u>b2</u> de lambda por el operón bio de <u>E. coli</u> que elimina los genes <u>int</u> , <u>xis</u> , <u>red</u> y <u>gam</u> .	Manley et al, 1969
<u>ga18</u>	Sustitución de la región <u>b2</u> de lambda por el operón gal de <u>E. coli</u> .	Feiss et al, 1972
<u>imm434</u>	Híbrido que lleva la región de inmunidad del fago lambdaoide 434.	Kaiser y Jacob, 1957
<u>imm21</u>	Híbrido que lleva la región de inmunidad del fago lambdaoide 21.	Kaiser y Jacob, 1957
<u>CI141</u>	Mutación ambar suprimible por suIII	Belfort et al, 1975
<u>nutL</u>	Mutación en el sitio de utilización de N que impide la elongación del transcrito de <u>pl</u> a la izquierda de <u>tl1</u> .	Salstrom et al, 1978
<u>Pl C1r100 Cm^r</u>	Fago de transducción generalizada con una mutación termosensible en <u>clr</u> . Es resistente a cloramfenicol.	

Método de propagación y de titulación de bacteriófagos.

A 5 ml de medio LB se adiciona CaCl_2 a una concentración final de 0.01 M y 0.3 ml de un cultivo fresco de la cepa bacteriana adecuada, y a esta mezcla se añade una o dos placas líticas del fago a propagar. Se incuba en agitación a 38°C hasta obtener lisis (3 a 6 horas) y se añaden entonces unas gotas de cloroformo, continuando la agitación 5 ó 10 minutos más. Este lisado se centrifuga a 10 Krpm en un rotor SS34 por 10 min y se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio manteniéndolo a 4°C. Este lisado se titula plaqueando sobre una cepa adecuada crecida en medio TB-D de la siguiente manera: se preparan diluciones 10^{-6} y 10^{-7} del lisado y se toman 0.1 ml de éstas que se mezclan con 0.1 ml de la bacteria y se permite la adsorción por 5 min. Se añade 2.5 ml de TQ suave, licuado previamente a 45°C, y se vacía esta mezcla de inmediato a cajas con medio TQ. Las cajas se incuban a la temperatura adecuada al tipo de fago por toda la noche. Al siguiente día se cuentan las placas y se calcula el número de fagos por ml de lisado.

Ensayo para distinguir entre bacterias con fenotipo gal^+ y gal^- .

Se estrían las cepas SA1943 y SA1943 recA portadoras de los plásmidos pKG1800 y los derivados de éste en cajas con medio Mac-C Amp y se incubaron por 18 horas a 42°C. Las bacterias capaces de degradar galactosa (gal^+) presentan colonias rojas, mientras que las otras (gal^-) permanecen blancas.

Ensayo para distinguir entre bacteriófagos con fenotipo t_I^+ y t_I^- .

A 0.1 ml de la dilución adecuada de los diferentes fagos trp-lac nutL i434 a probar se añadió 0.1 ml de la cepa S165 hfl⁻ crecida en TB-D y se plaqueó con 2.5 ml de TQ suave y 0.1 ml de XG sobre cajas de TQ. Las cajas se incubaron a 34°C por 20 horas.

El XG es un indicador para B-galactocidasa, en el cual, aquellos fagos que permiten la transcripción de lacZ presentan placas muy azules mientras que aquellos en los que no se transcribe lac sólo se colorean ligeramente.

Método de transducción del marcador de recA de E. coli con P1 Cm^R.

Se checó la cepa receptora SA1943 galKam para sensibilidad a tetraciclina en medio L-Tc. Se creció la cepa toda la noche en 5 ml de medio L y al siguiente día se centrifugó a 5 Krpm durante 10 min y se resuspendieron las células en 5 ml de MC. Una alícuota de 1 ml se infectó con .1 ml de diluciones 10^0 a 10^{-2} de un lisado de P1 proveniente de la inducción de una bacteria recA lisógena para P1. Esto se hizo por duplicado y se prepararon así mismo tubos con la bacteria sola y con el fago solo como controles. Se permitió la adsorción a 37°C por 20 min sin agitación. Se agregó .2 ml de Citrato de Sodio y se vaciaron de inmediato a cajas de L-Tc. Las cajas se incubaron a 42°C por 24 hr. Si la cepa es viable a esta temperatura, se puede asegurar que las colonias que crecen no son lisógenas para P1, ya que éste es termoinducible.

Método para checar el marcador recA .

En una caja de Petri con medio Luria se estiraron longitudinalmente las colonias Tc^r obtenidas por la transducción con P1 y bacterias conocidas recA⁺ y recA⁻ como controles. Esta caja se colocó a 40 cm de distancia de una lámpara de

luz UV. Se cubrieron 3/4 partes de cada estría y se expuso por 15 seg a la irradiación. Seguidamente se descubrió otra porción de modo que ahora la mitad de cada estría que quedara expuesta y se expuso nuevamente 15 seg. Se repitió la operación cubriendo esta vez sólo la cuarta parte de la estría e irradiando 15 seg el resto. Así una región quedó sin exponer y regiones expuestas 15, 30 y 45 seg.

La caja se incubó a 34°C por 20 horas y se seleccionaron las bacterias que no crecieron, puesto que las mutaciones en recA previenen la reparación de daños causados por irradiación con UV.

Las bacterias seleccionadas se crecieron en medio líquido y se checkaron con fagos con sustituciones bio, que eliminan los genes red y gam de λ , como el bio II y que no crecen en bacterias con el marcador recA.

Mutagénesis con EMS.

Se crecieron 50 ml de la cepa SA1943 (pKG1800 t_I) en medio mínimo suplementado con glucosa, casaminoácidos y ampicilina hasta una D.O.₅₉₀ = 2. Se centrifugaron por 10 min a 8 Krpm para colectas las células, lavando una vez con medio

mínimo-tris (tris-HCl pH 7.5, 0.2 M final) y resuspendiendo en la mitad del volúmen original con este medio.

La cepa se trató con EMS 0.1, 0.2 y 0.3 M, añadiendo a cada 10 ml de cultivo 0.1, 0.2 y 0.3 ml de EMS. Se incluyó un control al cual no se le adicionó mutágeno. Los cultivos se agitaron en matraces de 125 ml a 37°C tomando previamente una alícuota del control que se utilizó para obtener cuenta viable, y posteriormente a intervalos de 30 min hasta 2 hr, se tomaron muestras de todos los cultivos tratados. Con el objeto de eliminar el EMS, cada alícuota tomada se lavó dos veces con medio mínimo-tris, y se prepararon diluciones desde 10^0 hasta 10^{-5} y se espatularon sobre cajas de Mac-gal-Amp. Las cajas se incubaron a 42°C por 18 horas, a partir de las cuales se comenzó a seleccionar colonias rojas. Esta selección se continuó por 24 horas más, lo cual permitió obtener más candidatos rojos y rosas resultantes de la segregación del plásmido multicopia. Todos los candidatos se purificaron 1 vez, estriando sobre cajas Mac-gal-Amp.

Obtención de fagos que llevan integrado el plásmido (fásmi-
dos).

Se crecieron toda la noche las bacterias que contenían a

los diferentes plásmidos mutagenizados, incluyendo pKg1800 y pKG1800 sib^+ como controles (todos los plásmidos se transformaron previamente a la cepa SA1943 $recA^+$ para permitir recombinación) en L-Ap. Al siguiente día se procedió a infectar con el fago 464 $nutL imm^4$ por el mismo procedimiento de propagación en medio líquido. El lisado resultante se utilizó para obtener lisógenas por el método también descrito, a diferencia de que el centro turbio de la placa lítica se estrió en cajas de L-Ap, ya que un fago portador del plásmido es capaz de conferir resistencia a ampicilina a las lisógenas.

Inducción de fásmidos.

Se tomaron colonias aisladas de las lisógenas Ap^r y se crecieron en medio L hasta una D.O. $590 \approx .2$. Se adicionó $CaCl_2$ al .01 M y Mitomicina C (Laboratorios Sigma) .004 mg/ml. Esto se agitó a 39°C hasta obtener lisis, añadiendo entonces unas gotas de cloroformo y centrifugando para eliminar los restos celulares. El lisado resultante se utilizó para seleccionar los fagos que hubieran rescatado la mutación.

Método de inactivación de bacteriófagos por tratamiento con agentes quelantes para estimar su contenido de DNA.

El lisado obtenido de la inducción del fásmido se diluyó 100 veces en una solución de Citrato de Sodio 10^{-2} M pH 8.5 precalentada a 45°C. Esta mezcla se incubó a 45°C en agitación y se tomaron alícuotas a los 0, 5, 30 y 60 min. La reacción se detuvo diluyendo cada alícuota 10 veces en una solución de tris HCl 10^{-1} M pH 7.4 y $MgSO_4$ 10^{-2} M y se agitando inmediatamente. Los fagos sobrevivientes se titularon en la bacteria S165 hfl⁻ y los datos obtenidos se graficaron para observar la cinética de inactivación (Parkinson y Huskey, J. Mol. Biol. (1971) 56: 369).

Método para cuantificar integrasa. Ensayo de superinfección.

Se creció la bacteria lisógena SA731 toda la noche en TB-D a 32°C. Se inicio un nuevo cultivo tomando .05 ml que se pusieron en 2 ml de TB-D agitando a 32°C hasta una D.O.₅₉₀ = 1. Las mezclas de adsorción se prepararon poniendo en tubos eppendorf los fagos a probar a una moi de 10, $MgSO_4$ a una concentración final de 0.01 M y TB para llevar a volúmenes iguales en todas las mezclas. Se añadió 0.1 ml de

la lisógena y se permitió la adsorción durante 3 min a temperatura ambiente y 15 min en hielo-agua. Se suspendió la mezcla en 1 ml de TB frío y se centrifugó por 5 min en la centrífuga eppendorf. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 5 ml de TB-D frío. Se tomó una alícuota (0.1 ml) y, en hielo-agua, se hicieron diluciones 10^{-3} y 10^{-4} en SM y el resto se incubó a 39°C en matraces de 125 ml. A la dilución 10^{-3} se añadió cloroformo para inactivar las células infectadas, y después, ambas diluciones se plaquearon por duplicado en la cepa suIII (λ) en cajas de TQ. Las placas resultantes se contaron para determinar los centros infectivos reales: centros infectivos (10^{-4}) menos fago residual (10^{-3}).

Padados 85 min de incubación se añadió cloroformo y se prepararon diluciones desde 10^0 hasta 10^{-5} . Esta última se plaqueó en la cepa suIII (λ) en medio TQ para calcular el fago superinfectante replicado. Las diluciones 10^0 a 10^{-3} se plaquearon en la cepa suIII (i^4) en medio tet-C para ver profago gal18 escindido. Las cajas se incubaron a 40°C cerca de 48 horas. Finalmente se calculó la tasa de eclosión dividiendo el número de placas del gago superinfectante entre los centros infectivos reales. El número de placas rojas o blancas obtenidas sobre la cepa suIII (i^4) por

cada centro infectivo, entre la tasa de eclosión nos dá el número de profagos escindidos por recombinación sitio específica y recombinación no específica. Este primero es el índice de la producción de integrasa.

Aislamiento de DNA de plásmido.

Se utilizaron dos métodos para extraer DNA de plásmido; el primero es el descrito por Maniatis (1982) cuando la cantidad de DNA deseado excedía los 100 g, y el segundo, fué tomado de Advanced Bacterial Genetics (Berman, 1982), cuando el DNA se requería en cantidades mínimas, como en el caso de checar un patrón de restricción o retransformar el plásmido a otra bacteria.

- Aislamiento de DNA de plásmido a partir de 500 ml de cultivo

Se inocularon 25 ml de LB con ampicilina en matraces de 100 ml con .1 ml de cultivos frescos de las cepas portadoras de los plásmidos pKG1800 y pKG1800 sib+ y se agitaron a 37°C hasta una $DO_{600} = .6$. Estos cultivos se inocularon en 500 ml de LB-Amp precalentado a 37°C y se agitó en un matraz de 2 lt por 15-20 hr. Las células se colectaron centrifugando en un rotor GSA a 8 krpm por 20 min a 4°C.

Esta pastilla se resuspendió en 10 ml de solución I (ver Medios y Soluciones) a la cual se añadió lisozima (5 mg/ml) y se transfirió en partes iguales a dos tubos corex de 30ml. A cada tubo se añadió 10 ml de solución II y se mezcló por inversión del tubo, previamente tapado con parafilm repetidas veces, incubando entonces en hielo por 10 min. Se añadieron 7.5 ml de acetato de potasio 5 M y nuevamente se mezcló por inversión y se incubó 10 min en hielo. Se centrifugó a 12 Krpm por 35 min a 4°C y el sobrenadante se transfirió a tubos corex de 30ml añadiendo a cada uno .6 volúmenes de isopropanol. Se mezcló bien y se dejó a temperatura ambiente por 15 min y aparte el DNA se recuperó centrifugando a 12,000 Krpm por 30 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70% y después se colocaron los tubos en posición invertida sobre papel absorbente para quitar lo más posible de etanol. La pastilla se secó brevemente en un desecador a vacío y se resuspendió en 4 ml de TE.

Para purificar el plásmido se emplearon 2 métodos, el de centrifugación por equilibrio con cloruro de cesio, y el de columna de sefarosa.

→ Método de aislamiento rápido de DNA de plásmido.

En 5 ml de L-amp se crecieron cada una de las bacterias que contenían a los diferentes plásmidos. Estos cultivos se centrifugaron 4 Krpm por diez min. Se resuspendió la pastilla en 0.2 ml de una solución de glucosa 0.05 M, EDTA 0.01 M, tris-HCl 0.025 M pH 8 y 5 mg de lizozima. Esta mezcla fue transferida a tubos eppendorf estériles e incubada en hielo por 5 min. Se añadieron 0.4 ml de una solución de NaOH 0.2 N y SDS 1%, se mezcló bien y se incubó por otros cinco minutos en hielo. Se añadieron 0.5 ml de KOAc. 5 M, mezclando nuevamente e incubando nuevamente en hielo seco-etanol de 1 a 2 mins. Una vez permitida su des_u congelación a temperatura ambiente se centrifugó durante 15 min en una centrífuga eppendorf.

Se transfirieron 0.75 ml del sobrenadante a tubos eppendorf y se añadieron 0.45 ml de isopropanol, invirtiendo los tubos varias veces para mezclar. Se dejaron los tubos 5 min en hielo seco-etanol y después se centrifugaron cinco minutos. Se desechó el sobrenadante y la pastilla de DNA se la vó con etanol 70%, frío, centrifugando y permitiendo drenar el sobrenadante mediante la inversión de los tubos abiertos sobre papel toalla. La pastilla se secó a vacío por 5 min

resuspendiendo finalmente el DNA en 0.1 ml de una solución de tris HCl 0.01 M pH 8 y EDTA 1 mM.

Método de transformación de bacterias.

Se utilizaron las cepas SA1943 y SA1943 recA y los plásmidos pKG1800, pKG1800 sib+ y pKg1800 candidatos t_I.

A) Obtención de células competentes.

Se creció toda la noche un cultivo inicial en 5 ml de L. Se inoculó un cultivo de 50 ml en medio L con 2 ml de cultivo inicial y se mantuvo en agitación a 37°C hasta una D.O. = 0.4 - 0.8, se enfriaron las células en hielo por 10 min y se colectaron por centrifugación a 10 Krpm durante 10 min a 4°C. Las células se resuspendieron en 25 ml de MgCl₂ 0.1 M frío. Se incubó en hielo 30 min, centrifugando otra vez y resuspendiendo en 2.5 ml de CaCl₂ 0.1 M frío.

Estas células se utilizaron de inmediato, o bien después de un máximo de incubación de 24 hr en refrigeración (con el fin de aumentar la competencia; Dagert, 1979).

Para conservar estas células competentes se añadió glicerol al 10% y se congeló en alícuotas de 0.2 ml en N₂ líquido. Estas células se almacenaron por tiempo indefinido sin observarse pérdida en su eficiencia de transformación.

B) Transformación

Se mezcló el DNA de los plásmidos (0.1 g por reacción aprox.) con 0.2 ml de células competentes, incluyendo un control al cual no se agregó DNA y se incubó a 30°C por 30 min. Se transfirió entonces a 42°C por dos min y se diluyó 1:10 en medio L precalentado, dejando en incubación a 37°C por 90 min. Se prepararon diluciones 10 y 10⁻¹ y se espatularon 0.1 ml en cajas del medio adecuado incubando éstas a 42°C de 16 a 20 hrs.

Obtención de suspensiones concentradas de bacteriófago:

Se mezclan 200 ml de bacteria indicadora crecida durante toda la noche con 0.05 ml del lisado primario del bacteriófago. Corresponde aproximadamente a 5 x 10⁸ fagos por 2.5 x 10¹⁰ bacterias. Se incubó 10-15 min a 32°C. La mezcla

de adsorción se coloca en un litro de LB con 10 mM CaCl_2 en un matraz de 4-6 litros. Se agita vigorosamente a 39°C hasta que la lisis bacteriana sea evidente (5-8 horas). Después que ocurre la lisis se añade NaCl a concentración final de 0.5 M y se agrega 1 ml de CHCl_3 . Se incuba por 10-15 min más. Se centrifuga para eliminar los restos celulares (4000 r.p.m. por 15 min en el rotor GSA). Al sobrenadante se le agrega 10% (peso/volumen) de Polietilenglicol 6000 (PEG). Se disuelve el PEG a temperatura ambiente y luego se coloca en hielo-agua por 1 hr. Se colecta la pastilla de PEG por centrifugación (6000 r.p.m. por 10 min a 4°C en el rotor GSA). Se resuspende la pastilla en 5 ml de regulador TM (50 mM tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgSO_4). Se extrae agitando con un volumen igual de CHCl_3 por un minuto a temperatura ambiente. Se toma la fase acuosa (superior) a la interfase se le agregan 2 ml de regulador TM y se vuelve a extraer. Finalmente se juntan las dos fases acuosas (7 ml) y se titula una alícuota. Obtuvimos generalmente títulos de 2×10^{11} fagos/ml a 2×10^{12} fagos/ml. Se mide exactamente el volumen de la suspensión de fago y se le agrega 0.75 g/ml de cloruro de cesio, se agita suavemente hasta disolver y se transfiere a un tubo de ultracentrífuga (usamos tubos para el rotor 50 Ti). Se centrifuga a 4000

r.p.m. durante 20-24 horas (rotor 50 Ti). Posteriormente se visualiza la banda blanca de bacteriófagos y se recolecta. Se remueve el cloruro de cesio de la preparación de fago mediante diálisis contra el siguiente regulador: 10 mM NaCl, 50 mM tris-HCl (pH 8.0) 10 mM MgCl₂ (Silhavy y col., 1984).

Recombinación entre bacteriófagos:

Se crece el huésped seleccionado para la cruce en medio TB-D hasta que el cultivo llegue a 25 unidades Klett (filtro rojo) ó D.O.590 = 0.4. Se mezclan en tubos Eppendorf 0.1 ml de este cultivo (2×10^7 bacterias) con 2×10^8 de cada uno de los bacteriófagos progenitores de la cruz en presencia de MgSO₄ a una concentración final de 10 mM. Se agrega medio TB a las mezcla para tener un volumen final constante y se permite adsorción por 20 min a temperatura ambiente. Se añade 1 ml de medio TB y se centrifuga durante 5 min (centrífuga Eppendorf). Se descarta el sobrenadante, se resuspende la pastilla y se lleva a 10 ml de medio TB-D en un matraz de 125 ml. Se agita por 80 min a 37°C. Se agregan 5 gotas de CHCl₃ y se deja a temperatura ambiente por 10 min. De esta suspensión se hacen diluciones que se plaquean bajo

las condiciones requeridas.

Inactivación de bacteriófagos con citrato de sodio.

Se diluye la suspensión de fago (título 10^{10}) en una solución 10 mM de citrato de sodio precalentada a 45°C . La mezcla se incuba a 45°C y se toman alícuotas a diferentes tiempos (hasta 60 min). Las diferentes reacciones se detienen diluyendo las alícuotas 10 veces en una solución 100 mM de tris-HCl (pH 7, 4), 10 mM MgSO_4 , agitando inmediatamente. Se hacen diluciones y se titula en una cepa indicadora. Se relaciona la sobrevivencia en cada tiempo con el título del fago a tiempo cero.

Extracción de DNA del bacteriófago lambda.

Se parte de una solución concentrada y purificada de bacteriófago obtenida a partir de un litro de lisado. Se transfiere la suspensión a un tubo Eppendorf, se calcula que ocupe la tercera parte del tubo. Se le agrega EDTA, proteínaasa K, y SDS a concentraciones finales de 20 mM, 50 g/ml y 0.5% respectivamente. Esta mezcla se incuba por 1 hr a 65°C .

Se añade un volumen de fenol saturado, se mezcla por inver
ción durante varios minutos y se separan las fases por cen
trifugación (2-3 min en la centrífuga Eppendor). Se trans
fiere la fase acuosa a otro tubo y se le agrega un volumen
de fenol y uno de cloroformo. Se vuelve a extraer y se to
ma la fase acuosa. Se extrae con un volumen de cloroformo
Finalmente la fase acuosa se precipita a 0.3 M final de a-
cetato de sodio con dos volúmenes de etanol absoluto.

Enzimas y condiciones utilizadas en restricción.

Las enzimas de restricción fueron adquiridas a New England
Biolabs y a Bethesda Research Laboratories. Las digestio-
nes con enzimas de restricción se efectuaron bajo las condi-
ciones sugeridas por los proveedores, usando generalmente
5 veces más de enzima de reacción.

Electroforésis de DNA en geles.

El equipo y los reactivos utilizados se adquirieron a Bio-
Rad Laboratories y a Bethesda Research Laboratories. Emplea-
mos principalmente geles y mini-geles de agarosa al 0.7-1%

y de poliacrilamida al 5 y 10% (Maniatis, 1982). Usamos preferencialmente el regulador de corrida Tris-acetato (TAE,E) (por litro 50 x: 242 g tris-base, 57.1 ml ácido-acético glacial, 100 ml EDTA 0.5 M (pH 8.0). El regulador de muestra empleado lleva: 0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de xileno de cianol, 30% de glicerol en agua, 0.1% SDS, 20 mM EDTA y 50 mM tris-HCl (pH 8.0). Después de la corrida los geles se tiñieron en una solución al 5-0.5 g/ml de bromuro de etidio durante 10-20 min, posteriormente se lavaron por 10 min en agua destilada antes de observarlos en transiluminador.

Para eluir el DNA de geles de agarosa se siguió un método proporcionado por D. Court del NCI-FCRF. Se corta la banda de DNA bajo un transiluminador de luz ultravioleta de longitud de onda larga y se macera a un tubo Eppendorf. Se añade 0.1 ml de fenol y se congela el tubo en hielo seco-acetona por 15 min. Se toma la fase acuosa y se procede a extracción fenólica y precipitación con etanol.

Ensayo de galactocinasa.

Para este ensayo se siguió el método de McKenney et al. (1981), con algunas modificaciones.

Las cepas bacterianas a ensayar se crecieron toda la noche en Luria-Ara, y se tomó una alícuota de para iniciar un cultivo en medio mínimo suplementado con casaminoácidos y fructosa (ver Material y Métodos) el cual se agitó a 42°C hasta alcanzar una D.O.₆₅₀ = 0.4-0.6. Para preparar el extracto celular se transfirió un ml de estos cultivos a tubos de ensayo y se les adicionó 40ul de buffer de lisis (EDTA 100 mM, DTT 100mM, Tris pH 8 50 mM) y 15 ul de tolueno, se agitaron con vórtex y se pusieron en un baño a 37°C en agitación por 20 min.

Se añadieron 20 ul de extracto celular a 80 ul de una mezcla de reacción que consistía de: 20 ul de solución 1 (DTT 5 mM, NaF 16 mM), 50 ul de solución 2 (MgCl₂ 8 mM, Tris-HCl pH7.9 200 mM, ATP 3.2 mM) y 10 ul de galactosa ¹⁴C (20 mM). Se utilizó galactosa D-(1-¹⁴C) de Amersham a 49.4 mCi/mMol diluida a una actividad específica de 4.5 X 10⁶ dpm/mMol. La marca se filtró através dos veces a través de filtro DE81.

Las reacciones se incubaron a 32°C por 10 min, al cabo de los cuales se tomaron alícuotas de 50 ul que se gotearon sobre filtros DE81, previamente marcados con lápiz, sobre los cua-

les se goteó etanol absoluto con el objeto de detener la reacción.

Para el ensayo de pKG1800 el extracto celular se diluyó 5 veces en medio mínimo con buffer de lisis y se utilizaron 20 ul para la reacción, ya que este ensayo es lineal sólo hasta la conversión del 25% de galactosa a galactosa fosfato. En el ensayo se incluyó un blanco al cual se añadió únicamente medio mínimo. Para obtener cuentas totales (C.T.), al final del ensayo se tomaron alícuotas de 25 ul de dos tubos al azar.

Una vez secos los filtros con las muestras, se lavaron juntos (a excepción de los filtros de C.T.) con agua bidestilada, añadiendo 200 ml y dejando 5 min, y cambiando el agua dos veces más, mediante el mismo procedimiento. Los filtros se secaron bajo lámparas de calor y se contaron en 5 ml de Omnifluor-tolueno (4 gr de Omnifluor/1l de tolueno).

El cálculo de las unidades de galactocinasa se hizo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades de Galactocinasa} = \frac{(\text{cpm} - \text{blanco}) \times 5200}{\text{promedio de cuentas totales} \times \text{tiempo de incubación} \times \text{D.O.} \cdot 650}$$

RESULTADOS

1. Selección de mutantes t_I^- en el plásmido.

Siendo el objetivo de este trabajo el aislamiento de mutantes en el terminador t_I del bacteriófago λ , se eligió el sistema del plásmido pKG1800 de McKenney y colaboradores (McKenney *et al*, 1981), el cual permite cuantificar y comparar la fuerza de diferentes señales de terminación por la síntesis de galactocinasa dirigida por el plásmido dentro de una bacteria. En este plásmido se tiene clonado un fragmento de lambda de unos 250 pares de bases que comprende la secuencia de t_I y al cual se designa como pKG1800 sib^+ (Montañez, C., 1982). Este plásmido en la cepa de *E. coli* SA1943 (*galK am*) no produce galactosinasa, por lo que en medio de agar Mac Conkey-galactosa se observan colonias blancas. El fenotipo de las colonias por el contrario, será rojo (en el caso del plásmido pKG1800) por recombinación entre el plásmido y el cromosoma bacteriano en la cual se regenera el gene *galK* en este último y, lo que aquí nos interesa, por una alteración en la señal de terminación (Fig. 13).

- Transducción de la mutación recA bacteriana a la cepa SA1943.

Con el objeto de eliminar las colonias rojas que pudieran surgir de las bacterias galK⁺ producidas por la recombinación entre el plásmido y el cromosoma bacteriano, se transdujo a la cepa SA1943 un gene recA mutante. Se utilizó para ello un lisado del fago P1 obtenido de la inducción de la cepa lisógena N5130 recA :: Tn 10 (este transposón confiere resistencia a tetraciclina) con el cual se infectó a la cepa SA1943, espatulando después a cajas de Luria-tetraciclina. Las cajas se incubaron toda la noche a 42°C para evitar la selección de lisógenos de P1 (éstas son sensibles a ésta temperatura). Se obtuvieron 7 colonias, las cuales se estriaron nuevamente en cajas L-tet y se chequeó para sensibilidad a cloranfenicol (P1 confiere ésta resistencia) y a luz UV, y para la inhibición del crecimiento del fago bio 11. Cinco colonias presentaron el fenotipo deseado (TABLA 3).

- Frecuencia de aparición de colonias rojas por recombinación entre el plásmido y la bacteria.

TABLA 3. Transducción de la mutación recA a la cepa SA1943 por transducción con el fago P1 C1r100 cm^r.

(a) Se checó el fenotipo recA de los siete candidatos tet^r obtenidos de la transducción, por su respuesta a la infección con fagos bio 11 (la sustitución bio elimina los genes red y gam de lambda por lo que éstos no se desarrollan en cepas recA⁻), nutL (al no haber anti terminación en t_L no se expresan los genes red y gam) y silvestre (se utilizó un fago cI⁺ como control positivo de crecimiento). La cepa 191 (P2) se usa como control positivo para fagos red⁻, gam⁻ (fenotipo Spi). Los candidatos 2 y 7 se descartaron por presentar fenotipo recA. (b) Se verificó la resistencia a tetraciclina (tet) conferida por el Tn10 con el cual se contrasdujo recA, la sensibilidad a cloranfenicol (cm) como prueba de la ausencia de P1 y finalmente la sensibilidad a la luz ultra violeta (U.V.) característica de las cepas deficientes en reparación recombinacional. El signo + significa formación de placas en una dilución de 10⁻⁶ con una preparación de al menos 1 X 10⁹ ufm/ml, y el signo - ausencia de placas en diluciones 10⁻⁴ y 10⁻⁶ con la misma preparación .r se refiere a un crecimiento saludable de las cepas, mientras que s quiere decir completa inhibición del crecimiento en los casos de tet y cm, pero disminución del crecimiento proporcional a la exposición a la luz U.V. según se describe en material y métodos.

(a)	Crecimiento de Fagos			Fenotipo
	<u>bio11</u>	<u>nutL</u> ⁻	silvestre	<u>recA</u> ⁻
SA1943	+	+	+	+
198 (<u>recA</u>)	-	-	+	-
191 (P2)	+	+	-	-
SA1943 <u>recA</u> ⁻ 1	-	-	+	-
2	+	+	+	+
3	-	-	+	-
4	-	-	+	-
5	-	-	+	-
6	-	-	+	-
7	+	+	+	+

(b)	tet	U.V.	cm
C600	s	r	s
N5130	r	s	r
SA1943	s	r	s
SA1943 <u>recA</u> ⁻ (1)	r	s	s
SA1943 <u>recA</u> ⁻ (2)	r	s	s

TABLA 3.

La cepa SA1943 se transformó por el método de cloruro de calcio con los plásmidos pKG1800 y pKG1800 sib⁺ seleccionando las transformantes sobre luria-Ap.

Con el propósito de ver con que frecuencia aparecían colonias rojas en la cepa SA1943 lecA (pKG1800 sib⁺) resultantes de la recombinación entre el plásmido y el cromosoma bacteriano, se prepararon diluciones de un cultivo fresco de las cepas SA1943 y SA1943 recA, ambas portadoras del plásmido, y se espatularon sobre cajas de medio Mac-gal-Ap. Las cajas se incubaron a 42°C por 18 hr y se contaron las colonias rojas, cuyo número, dividido entre el número de colonias totales nos da la frecuencia de recombinación que aparece en la tabla 4.

- Fenotipo de las cepas SA1943 y SA1943 recA portadoras de los plásmidos sib⁺, sib 1, sib 2, y sib 3.

En la Tabla 5 se muestra el fenotipo de las cepas SA1943 y SA1943 recA con los plásmidos pKG1800 sib⁺, sib 1, sib 2, y sib 3, obtenido a las 18 hr de incubación de las cajas Mac-gal-Ap en las cuales fueron estriadas. La cepa SA1943 recA incubada a 42°C con todos los plásmidos presentó colonias blancas, por lo que se eligieron estas condiciones para la selección de mutantes.

TABLA 4. Frecuencia de aparición de revertantes gal K⁺
en las cepas SA1943 y SA1943 recA portadoras del plásmido
pKG1800 sib⁺.

CEPA	FRECUENCIA DE APARICION DE RECOMBINANTES <u>galK</u> ⁺
SA 1943 (pKG1800 <u>sib</u> ⁺)	1 X 10 ⁻³
SA1943 <u>recA</u> (pKG1800 <u>sib</u> ⁺)	1 X 10 ⁻⁷

TABLA 4

TABLA 5. Fenotipo de los plásmidos pKG1800 sib⁺, sib2 y sib3 en las cepas SA1943 y SA1943 recA a diferentes temperaturas.

PLASMIDO	SA1943			SA1943 <u>recA</u>		
	30	37	42	30	37	42
SIB ⁺	ROJO	BLANCO	BLANCO	ROJO	BLANCO	BLANCO
SIB 2	ROJO	ROJO	ROSA	ROJO	ROSA	BLANCO
SIB 3	ROJO	ROSA	ROSA	ROJO	BLANCO	BLANCO

TABLA 5

- MUTAGENESIS CON ETIL METANO SULFONATO (EMS).

El EMS es un agente alquilante que causa mutaciones puntuales en el DNA. La mutagénesis de la cepa SA1943 (pKG1800 sib⁺) se llevó a cabo en medio mínimo glucosa con el objeto de que cada colonia que más tarde se obtuviera pudiera tomarse como el resultado de un evento mutacional independiente, puesto que en estas condiciones no hay división bacteriana. Se hizo el tratamiento, a las concentraciones 0, 0.1, 0.2, y 0.3 M de EMS y tiempos 0, 30, 60, 90, y 120 min. El resultado se muestra en la figura 6, en la cual se graficó la frecuencia de sobrevivencia contra el tiempo para cada concentración de EMS.

La frecuencia de mutación, tomada como el número de colonias cuyo fenotipo iba desde el color rosa hasta el rojo, entre el número de colonias total, se muestra en la Figura 5.

Se seleccionaron en total 46 colonias con los fenotipos mencionados y se estriaron nuevamente en MacKonkey-gal con el objeto de permitir la segregación de este plásmido multi copia.

- SELECCION DE MUTANTES EN EL PLASMIDO.

Para seleccionar las mutaciones que hubieran ocurrido en el plásmido de aquellas sufridas por la cepa, se procedió a aislar el DNA de plásmido de cada una de las 46 colonias obtenidas de la mutagénesis, incluyéndose un control posi-

FIGURA 5. Frecuencia de aparición de mutantes en la cepa SA1943 recA (pKG1800 sib⁺) tratada con E.M.S. La cepa SA1943 recA portadora del plásmido pKG1800 sib⁺ se trató con E.M.S. por tiempos de 30, 60, 90 y 120 min y utilizando diferentes concentraciones del mutágeno, como se explica en Material y Métodos. Las concentraciones de E.M.S. empleadas fueron .1M (x), .2 M (■) y .3 M (o). La frecuencia de mutación se graficó en escala logarítmica, y se consideraron mutantes todas las colonias cuyo fenotipom en Macgal iba desde el rosa hasta el rojo a las 24 horas de incubación a 42°C.

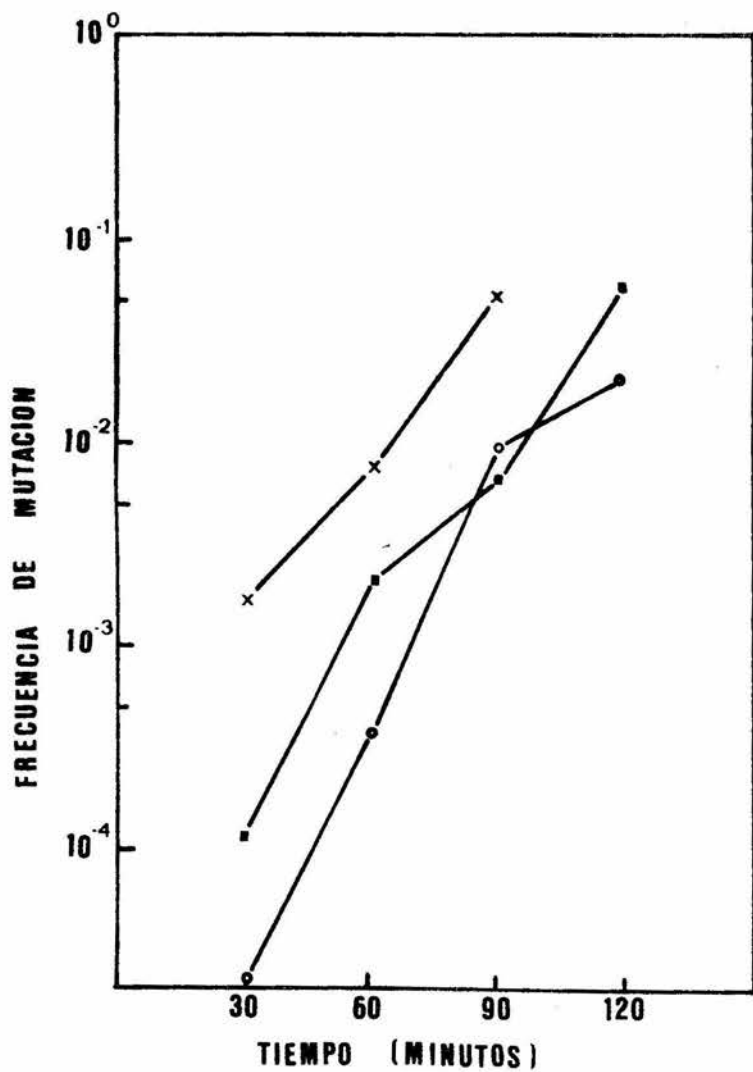


FIGURA 5

FIGURA 6. Frecuencia de sobrevivencia de la cepa SA1943 recA (pKG1800 sib⁺) tratada con E.M.S.

La cepa SA1943 recA (pKG1800 sib⁺) se trató con diferentes concentraciones de E.M.S. y por tiempos de 30, 60, 90 y 120 min como se describió en Material y Métodos.

Se graficó la frecuencia de sobrevivencia, para cada concentración de mutágeno empleada, contra el tiempo. Los símbolos son (x) .1 M, (■) .2 M, y (o) .3 M de E.M.S.

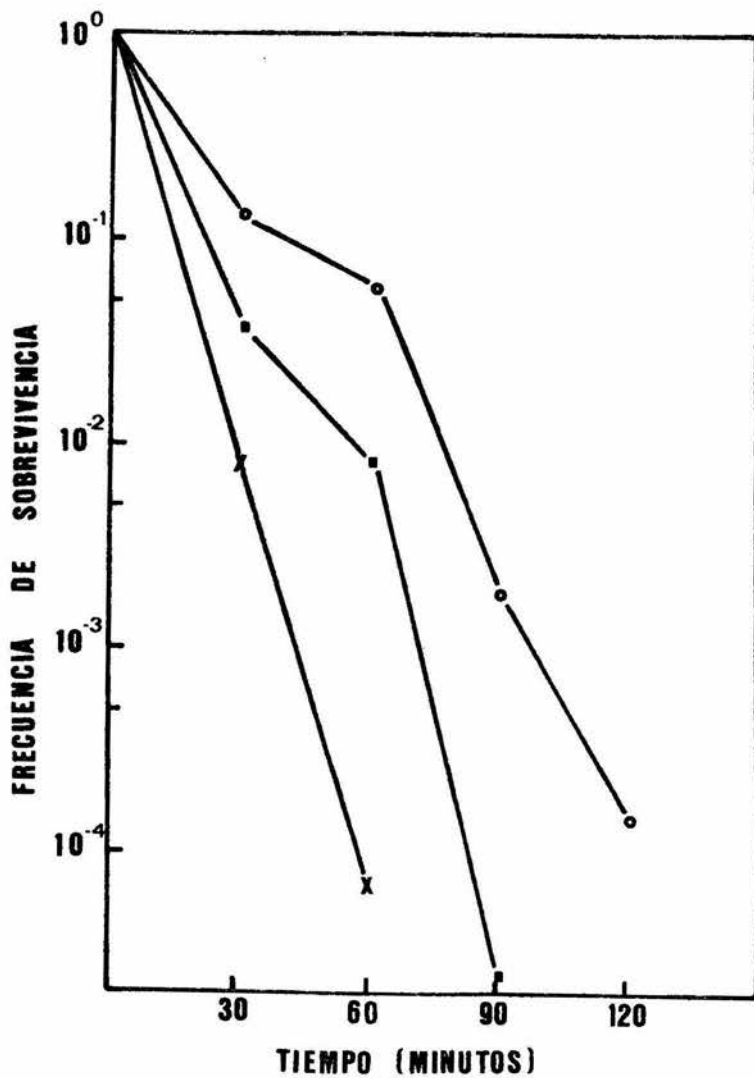


FIGURA 6

tivo. El siguiente paso fue la transformación de bacterias competentes nuevamente SA1943 recA⁻ - las cuales se espatularon en cajas de medio MacKonkey-gal-amp. Un 30% de los candidatos transformados presentaron el fenotipo deseado. El resto de los candidatos se descartaron y con estos 14 se continuó a la segunda parte del trabajo. (Tabla 6).

2.- TRANSFERENCIA DE LA MUTACION DEL PLASMIDO AL FAGO.

El transferir la mutación del plásmido al fago tenía varios objetivos, el primero de ellos era que al rescatar la mutación mediante un proceso de recombinación por homología, si la mutación en el plásmido estaba fuera del terminador o bien se trataba de una delección, no podría transferirse y quedaría descartada; por otra parte, el tener la mutación en el fago permitía ver su efecto in situ y más tarde ensayarse el efecto de dicha mutación sobre el proceso de retro regulación.

- TRANSFORMACION DE LOS PLASMIDOS CANDIDATOS t_I⁻ A LA CEPA SA1943.

Como se pretendía efectuar el rescate de las mutaciones mediante una recombinación por homología mediada por el sistema recA bacteriano, se aisló el DNA de plásmido de los candidatos t_I⁻ y se transformó a la cepa SA1943. Una vez obtenidas las colonias transformantes, según se describe en Material y Métodos, se procedió al rescate.

- ENSAYO PARA DISTINGUIR ENTRE FAGOS t_{I}^{+} y FAGOS t_{I}^{-} .

Se utilizaron los fagos 464 nutL i_4 y 465 nutL i_4 , los cuales llevan una fusión trpAlacZ que remueve el promotor de lac (Reznikoff et al, 1974) y que fuera fusionado al sitio HindIII en lambda (Gottesman et al, 1980) de modo tal que queda lac a la izquierda del terminador t_{I} y bajo el control de promotores de lambda, como se muestra en la figura 8. En el caso de 464 se tiene un terminador silvestre, mientras que 465 representa una delección que elimina del todo a t_{I} . nut L representa una mutación del sitio de utilización de la proteína N de lambda (ver introducción), con lo cual no se lleva a cabo la antiterminación del transcrito comenzado en P_L ; de este modo es posible observar la transcripción que iniciada en P_I se detendrá el t_{I} en el caso del fago 464, pero que transcribirá dentro de lac en el caso del fago 465, en un medio indicador adecuado. El medio indicador X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido) el cual es un compuesto incoloro muy sensible a la presencia de la β -galactocidasa y que al ser hidrolizado forma un color azul.

Se plaquearon los fagos 464 y 465 en medio T \emptyset -X-GAL en la cepa S165 lac Hfl^{-} (los fagos nutL son turbios en una cepa Hfl^{-}) en donde el primero presentaba placas blancas y el segundo placas azules.

FIGURA 7. Sistema de transferencia de la mutación del plásmido a lambda.

La única región de homología entre los plásmidos pKG1800 t_I y el fago λ 464 es la región del terminador, por lo que al infectar la cepa SA1943 (pKG1800 t_I), con el fago, con cierta frecuencia recombinarán plásmido y fago, dando lugar a la formación de fásmidos; como el plásmido contiene el gene de Ampicilina, esta resistencia se utiliza como marcador para aislar cepas que lleven al fásmido. Al resolverse la estructura del fásmido y dar lugar a fagos, se obtendrán dos poblaciones, una que lleve un terminador silvestre, y otra que haya rescatado la mutación del plásmido.

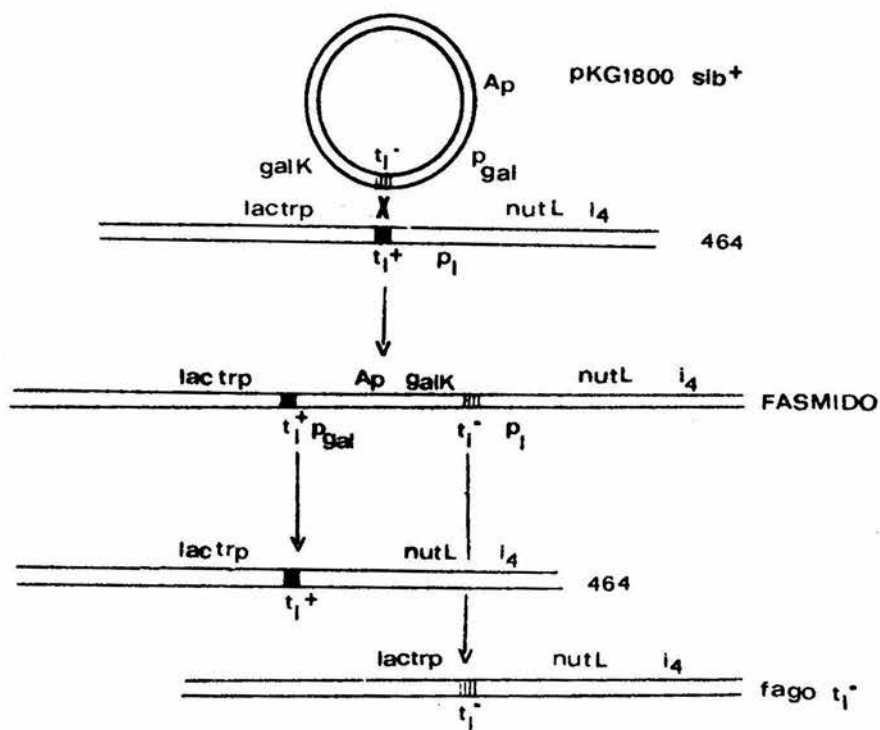


FIGURA 7

FIGURA 8 . Ensayo para distinguir fagos t_I^+ y t_I^- .
Los fagos 464 (lactrpW205 nutL imm 434) y 465 (lactrp
W205 ∇ 53 nutL imm 434) se plaquean en la cepa S165 Hf1⁻
lac⁻ sobre medio TØ-X-G. En estas condiciones λ 465 pre-
senta placas azules mientras que las placas de λ 464 per-
manecen blancas.

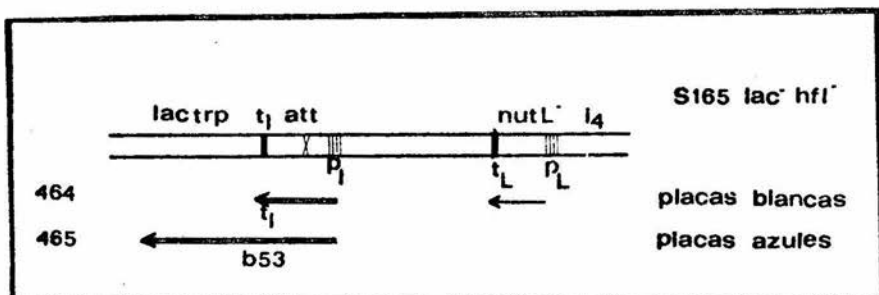


FIGURA 8

- OBTENCION DE FASMIDOS.

Para pasar la mutación del plásmido al fago el primer paso es la formación de recombinantes entre éstos, a los cuales se les llama fásmidos. La recombinación se dá por la homología entre los terminadores, y lo esperado era que al "resolverse" esta estructura pudiera rescatarse un fago con el terminador mutado del plásmido (ver figura 7).

Se procedió a infectar con los fagos 464 nutL i_4 y 465 nutL i_4 (este último como control negativo) a las cepas SA1943 (pKG1800 sib^+), SA1943 (candidatos t_I⁻) y SA1943 (pKG1800) como control negativo) y a obtener un lisado tal como se describe en Material y Métodos, y éste se goteó sobre la cepa S165 Hfl^- para el siguiente día proceder a estriar el centro turbio a cajas de L-amp, ya que es de esperar que aquellos fásmidos presentes en el lisado y ahora en la bacteria, confieran resistencia a ampicilina. Los controles funcionaron correctamente, y en todos los casos de los candidatos pudieron obtenerse colonias amp^R (TABLA 6).

- INDUCCION DE LOS FASMIDOS CON MITOMICINA.

Las colonias amp^R se indujeron con mitomicina según se describe en Material y Métodos para obtener los recombinantes fágicos deseados; este lisado contendría tanto fago silvestre como aquel que rescató la mutación, así como fásmidos que no hubieran sido inducidos.

Se plaqueó este lisado sobre la cepa S165 Hfl⁻ y se esperaba que en el caso del control 464 que hubiera recombinado con el plásmido pKG1800 sib⁺ se encontraran únicamente placas blancas, y placas azules para el caso de los recombinantes con los plásmidos que llevaran la mutación. El resultado, sin embargo, presentó de un 30 a un 50% de placas claras azules incluyendo al control positivo. Este resultado podría explicarse si dichas placas claras azules representaran la población de fásmidos.

- INACTIVACION DEL FASMIDO CON CITRATO DE SODIO.

Lambda es capaz de encapsidar moléculas de DNA si éstas no sobrepasan un tamaño de 50 Kpb; el DNA está fuertemente compactado y puede desactivarse fácilmente con agentes quelantes (Parkinson and Huskey, 1971). Así, es posible elegir mediante condiciones controladas de agentes quelantes un cierto tamaño de moléculas de DNA. Si las placas claras azules representaban fásmidos, estos deben tener un tamaño mayor que el del fago 464 nutL i₄ (el plásmido pKG1800 sib⁺ es de 5 Kpb) y debía ser posible eliminarlos con Citrato de Sodio.

Se trataron los lisados, que contenían los fásmidos así como fagos silvestres y recombinantes, según está en Material y Métodos, incluyendo como control un fago ϕ₁₈₅₇ (4.9 Kpb). En la figura⁹ se muestra la gráfica que representa el número de fagos sobrevivientes como porcentaje, con

FIGURA 9. Frecuencia de sobrevivencia de fagos y fás-
midos a tratamiento con citrato de sodio.

Los fagos CI857, λ 464 (lactrpW205) nutL imm434 y los
lisados obtenidos de la inducción de fásmidos, se tra-
taron con citrato de sodio 10 mM pH 8.5 por tiempos de
5, 30, y 60 min como se indica en Material y Métodos.
Los fagos se plaquearon en la cepa S165 lac⁻hfl⁻ para
obtener la frecuencia de inactivación.

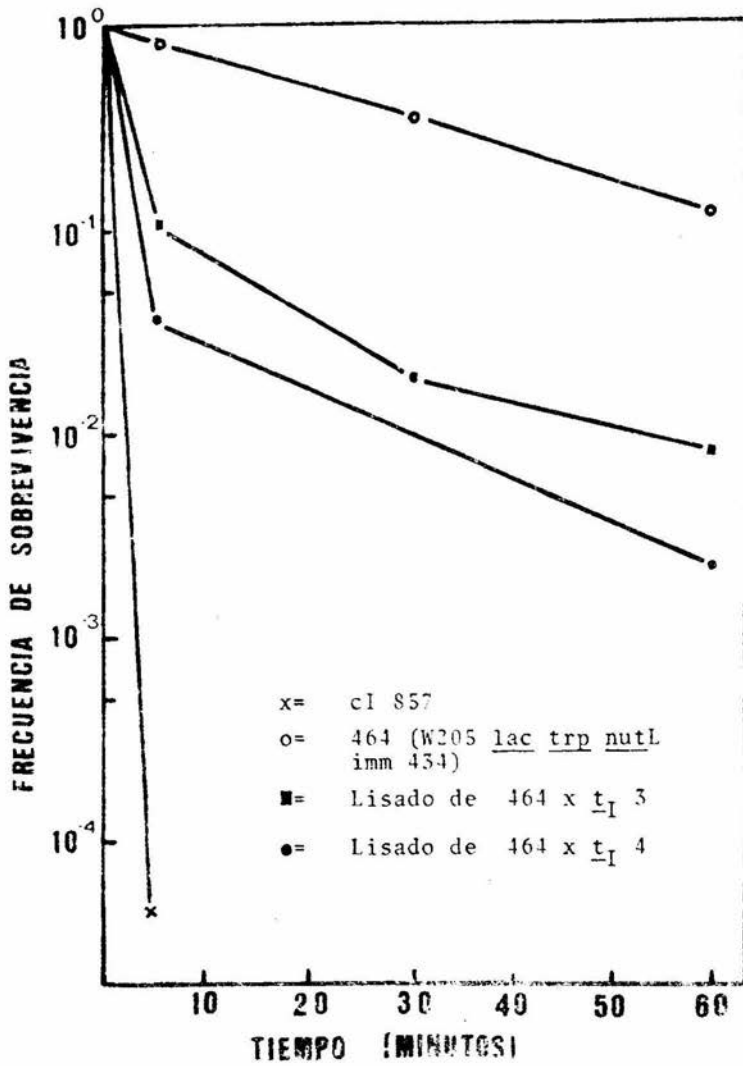


FIGURA 9

tra el tiempo de tratamiento. Como era de esperar el fago λ CI₈₅₇ quedó inactivado a los cinco minutos de tratamiento; el control del fago 464 nutL i_4 presenta poca inactivación (los fagos i_4 son más pequeños, y además la fusión de lac involucra también una delección), y los lisados conteniendo al fásmido presentan una inactivación importante los primeros cinco minutos, pero las pendientes se igualan después a aquella del control 464 nutL i_4 . Para el conteo de placas sobrevivientes al citrato de sodio se utilizó la cepa S165 Hf1⁻ y el medio TØ - X-GAL, por lo que pudo observarse que a los cinco minutos de tratamiento el control 464 nutL i_4 presentaba placas blancas, y lo más importante, el lisado control que llevaba plásmido y fago silvestre no presentaba ya placas claras azules, sino que se mostraba como el control. En el caso de los lisados recombinantes de los plásmidos presuntos t_I^- también se eliminó casi totalmente el número de placas azules. (TABLA 6).

SELECCION DE FAGOS 464 t_I^- nutL i_4 .

Se utilizaron los lisados de inducción de las colonias amp^r que fueron tratados con citrato de sodio por 5 mins. para la selección de los candidatos t_I^- . Estos se plaquearon en la cepa S165 Hf1⁻ en cajas TØ -X-GAL. Como ya se mencionó, el lisado control silvestre no presentaba placas azules, pero en cambio en seis de los lisados deseados pudieron aislarse placas azules turbias. En los otros 8 lisados no pudieron detectarse placas turbias azules. (TABLA 6).

TABLA 6 . Selección de fagos candidatos t_I^- .

En esta tabla se resumen los pasos seguidos y los resultados obtenidos desde la selección de los 14 plásmidos hasta finalizar con 5 -agos con fenotipo t_I^- . (a) fenotipo de los plásmidos seleccionados como t_I^- en la cepa SA1943 recA, sobre Mac-C a las 18 hr de incubación a 42°C; (b) + significa que se obtuvieron colonias Ap^R a partir del lisado resultante de infectar con λ 464 las cepas SA1943 con los diferentes plásmidos. - indica ausencia de crecimiento; (c) los lisados presentaron placas azules después del tratamiento con citrato se muestran con un signo + y con signo - aquellos en los que no se encontraron placas azules; (d) se verificaron los marcadores lacZ, nutL e imm434 de los fagos elegidos candidatos t_I^- . + significa que no se observaron cambios en los marcadores. Se encontró que uno de los fagos era nutL⁺ y este se indica con un signo -.

PLASMIDO FENOTIPO EN^a OBTENCION^b PLACAS AZULES, DES^c CONSERVACION DE^d
 SA1943 reca DE FASMIDO PUES DE CITRATO MARCADORES INIC.

pKG1800	sib ⁺	-			
pKG1800	tI3	+	-		+
pKG1800	tI1b	+	-		
pKG1800	tI1d	+	-		
pKG1800	tI3d	+	+		+
pKG1800	tI4d	+	+		+
pKG1800	tI5a	+	-		
pKG1800	tI5b	+	-		
pKG1800	tI7a	+	-		
pKG1800	tI8b	+	+		+
pKG1800	tI8ch	+	+		-
pKG1800	tI9c	+	+		+
pKG1800	tI10ch	+	+		+
pKG1800	tI11b	+	-		

TABLA 6

Las placas azules aisladas se resuspendieron en medio SM con el fin de plaquearlas nuevamente y purificarlas antes de proceder a hacer un stock con esos fagos.

Al checar los marcadores de los fagos aislados, se encontró que uno de ellos no era nutL (un fago nutL es red⁻ fenotípicamente, y por tanto no crece en cepas recA⁻) y eso explicaba que fuera azul, por lo cual fue descartado.

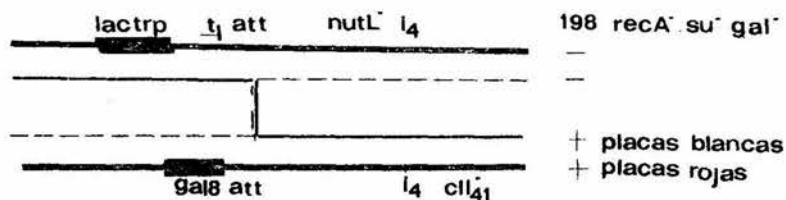
- CONSTRUCCION DE LOS FAGOS lac i₄ cII₄₁ POR RECOMBINACION.

Los fagos 464 i₄ cII₄₁, 465 i₄ cII₄₁ y los cinco candidatos lac t_I⁻ i₄ cII₄₁ utilizados en el experimento de superinfección que a continuación se describe, se construyeron por recombinación entre los fagos 464-, 465-, t_I⁻ nutL i₄ y el fago gal⁸ i₄ cII₄₁ (Figura 10), en la cepa S601 a una multiplicidad de infección de 10. Los fagos recombinantes se seleccionaron sobre la cepa 198 (SU⁺; gal⁻, recA⁻) como placas blancas turbias en medio Tet-GAL. Estos fagos se purificaron y se probaron para la formación de placas claras azules en la cepa S165 así como ausencia de crecimiento en la cepa SUIII (i₄).

- ENSAYO DE SUPERINFECCION CON LOS FAGOS lac t_I⁻ i₄ cII₄₁.

Se llevó a cabo el ensayo de superinfección con los fagos lac t_I⁻ i₄ cII₄₁ con el objeto de observar de un modo indirecto si la selección de placas azules en el rescate de la

FIGURA 10. Construcción de los bacteriófagos lactrp W205 red114 cIIam41. La recombinaciones se realizaron en la cepa S601 recA SU° a 34° . Se seleccionaron los bacteriófagos recombinantes lactrpW205 red114 cIIam41 como aquellos que forman placas blancas en la cepa 198 recA su⁻ gal⁻ en medio indicador Tet-gal. Su fenotipo fue verificado (Ver Tabla Inferior): placas claras azules en S165 su⁺ lac⁻ sobre medio X-G (lac), ausencia de crecimiento en la cepa suIII (i434), formación de placas turbias en la cepa 198 recA su (es CIIam41). T y C se refieren a si las placas son turbias o claras, respectivamente. - significa ausencia de crecimiento, y + crecimiento normal; a, b y r se refiere al color azul, blanco y rojo de las placas en los diferentes medios.



	S165 <i>hf1</i> ⁻ /X-G	198 /Tet-C	<i>suIII</i> (<i>imm434</i>) /TQ
<i>lactrp</i> W205 <i>imm434 cII41</i>	c a	t b	-
<i>lactrp</i> W205 53 <i>imm434 cII41</i>	c a	t b	-
<i>lactrp</i> W205 <i>t_I3 imm434 cII41</i>	c a	t b	-
<i>lactrp</i> W205 <i>t_I4 imm434 cII41</i>	c a	t b	-
<i>lactrp</i> W205 <i>t_I8 imm434 cII41</i>	c a	t b	-
<i>lactrp</i> W205 <i>t_I9 imm434 cII41</i>	c a	t b	-
<i>lactrp</i> W205 <i>t_I10 imm434 cII41</i>	c a	t b	-
c1857	c b	c b	+
<i>lactrp</i> W205 <i>nutL imm434</i>	t a	-	-
<i>gal8 imm434 cII41</i>	c b	t r	-

FIGURA 10

mutación del plásmido reportaba resultados reales y no era algo artefactual, bajo la suposición de que un cambio en el terminador podría modificar así mismo al retroregulador-nada podía concluirse, pero de ser positivo el resultado, estaría indicando que el sistema de rescate había funcionado, y tendríamos datos cuantitativos sobre el efecto de dichas mutaciones sobre el proceso de retroregulación.

El experimento de superinfección fue descrito por Guarneros y Galindo (1979) y el protocolo se explica en Material y Métodos. Se utilizó la cepa SA731 (int₂ red₁₁₄ cI₈₅₇ cII₄₁ gal₈) la cual lleva un profago flanqueado por los sitios P.P' y B.B' (específicos para recombinación integrativa), que se escinde exclusivamente por acción de la integrasa de lambda, y que puede seguirse por que forma placas rojas en una cepa gal⁻ en medio Tet-GAL.

Los resultados de este ensayo se encuentran en la Tabla 7. Los resultados indican que el control 465 cII₄₁ i₄ es más eficiente en promover recombinación integrativa que el fago 464 cII₄₁ i₄ por dos órdenes de magnitud. Un resultado similar se obtiene con el fago lac t₁⁸ cII₄₁ i₄, mientras que para los fagos t₁⁹ y t₁¹⁰ los resultados obtenidos son los de un fago silvestre como 464. Por otra parte, los fagos t₁³ y t₁⁴ presentan valores intermedios.

TABLA 7. Cuantificación de integrasa en los fagos candidatos \underline{t}_I^- por el ensayo de superinfección.

El ensayo de superinfección se utiliza para cuantificar la integrasa (Guarneros y Galindo, 1980). Se utilizó la cepa SA731 ($\underline{int}_2\underline{red}_{114}\underline{cI}_{857}\underline{cII}_{41}\underline{ga18}$), la cual lleva un profago flanqueado por los sitios P.P' y B.B', específicos para recombinación integrativa. Este profago es \underline{int}^- por lo que puede escindirse únicamente si otro fago lo complementa para la función de la integrasa. El fago escindido se cuantifica fácilmente por la formación de placas rojas en cajas tet-gal, pues lleva el marcador $\underline{ga18}$. Los fagos utilizados son \underline{cII}^- (son fenotípicamente \underline{p}_I^-), y en estas condiciones sólo se observa la transcripción de \underline{p}_L .

BACTERIOFAGO PROBADO	BACTERIOFAGO ESCINDIDO POR RECOMBINACION	
	INTEGRATIVA	NO ESPECIFICA
<u>lactrp</u> W205 imm434 <u>c</u> II41	2.0×10^{-4}	2.0×10^{-1}
<u>lactrp</u> W205 53 imm434 <u>c</u> II41	2.1×10^{-2}	4.3×10^{-1}
<u>lactrp</u> W205 <u>t</u> _I 3 imm434 <u>c</u> II41	3.0×10^{-3}	3.1×10^{-1}
<u>lactrp</u> W205 <u>t</u> _I 4 imm434 <u>c</u> II41	2.8×10^{-3}	1.9×10^{-1}
<u>lactrp</u> W205 <u>t</u> _I 8 imm434 <u>c</u> II41	3.5×10^{-2}	6.6×10^{-1}
<u>lactrp</u> W205 <u>t</u> _I 10 imm434 <u>c</u> II41	9.3×10^{-5}	2.4×10^{-1}
<u>lactrp</u> W205 <u>t</u> _I 9 imm434 <u>c</u> II41	2.1×10^{-4}	1.8×10^{-1}

TABLA 7

- Crecimiento de los fagos t_I^- en la cena C600 ran^- .

Se prepararon diluciones 10^{-2} , 10^{-4} , y 10^{-6} de los fagos a probar, y se plaquearon por gota en las cepas C600 y C600 ran^- , como se explica en Material y Métodos, sobre cajas con medio T0 que se incubaron a 42° toda la noche. El crecimiento de los fagos se indica mediante un signo + para la formación de placas en la dilución 10^{-2} , ++ para 10^{-4} , y +++ para 10^{-6} . (TABLA 8). - denota ausencia de crecimiento. Los fagos gal8 intC imm21 y W205 red114 imm434 se usaron como controles negativos de crecimiento, y los fagos gal8 barI intC imm434 y W205 barI red114 imm21 como controles positivos. barI es una mutante de lambda capaz de crecer en la cena ran^- , en la cual los fagos silvestres son excluidos.

Se encontró que el fago W205 t_I^3 nutL es totalmente excluido, lo cual no ocurre con los otros fagos. Se vio también que el fago t_I^8 cII41 crecía menos que los otros fagos isogénicos. Este resultado sugiere una alteración en la expresión para estos fagos.

- Patrón de restricción con HindIII y BamHI de los fagos lac trpW205 t_I^- cII41.

Se extrajo el DNA de los fagos partiendo de un stock concentrado, como se explica en Material y Métodos. Este DNA se trató con HindIII y BamHI y se corrió en un gel de agarosa al 1% por 2 hr a 100 v. En la figura 11 se muestra una fotografía de este gel, junto con un esquema que indica los

TABLA 8. Crecimiento de los fagos candidatos \underline{t}_I^- en la cepa C600 \underline{rap}^- .

Se plaquearon por gota diluciones de los fagos candidatos \underline{t}_I^- en las cepas O600 y O600 \underline{rap}^- . + significa crecimiento de los fagos: una cruz para la dilución 10^{-2} , dos para 10^{-4} , y tres para 10^{-6} ; - significa ausencia de placas, y N.P. no probado.

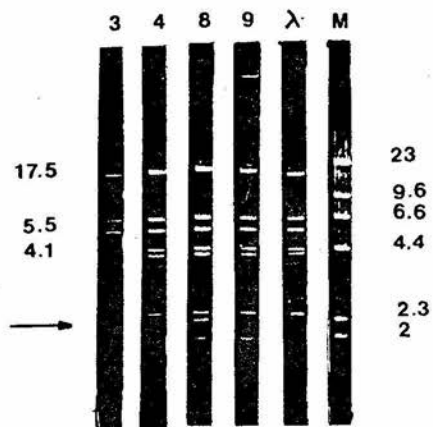
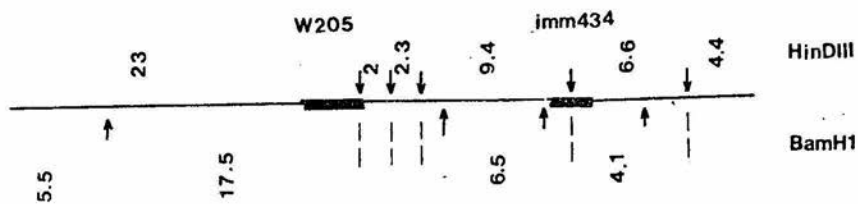
TABLA 8 . Comportamiento de los fagos candidatos t_I^- en la cepa C600 rap^- .

	C600	C600 rap^-
<u>gal8</u> <u>intC</u> <u>imm21</u>	+++	+
<u>gal8</u> <u>barI</u> <u>intC</u> <u>imm21</u>	+++	+++
W205 <u>nutL</u> <u>imm434</u>	+++	+++
W205 ∇ 53 <u>nutL</u> <u>imm434</u>	+++	+++
W205 t_I 3 <u>nutL</u> <u>imm434</u>	+++	-
W205 t_I 4 <u>nutL</u> <u>imm434</u>	+++	+++
W205 t_I 8 <u>nutL</u> <u>imm434</u>	+++	+++
W205 t_I 9 <u>nutL</u> <u>imm434</u>	+++	+++
W205 t_I 10 <u>nutL</u> <u>imm434</u>	+++	+++
W205 <u>imm434</u> <u>cII41</u>	+++	+++
W205 ∇ 53 <u>imm434</u> <u>cII41</u>	+++	+++
W205 t_I 3 <u>imm434</u> <u>cII41</u>	NP	NP
W205 t_I 4 <u>imm434</u> <u>cII41</u>	+++	+++
W205 t_I 8 <u>imm434</u> <u>cII41</u>	+++	+
W205 t_I 9 <u>imm434</u> <u>cII41</u>	+++	+++
W205 t_I 10 <u>imm434</u> <u>cII41</u>	+++	+++
W205 <u>red114</u> <u>imm434</u>	+++	++
W205 <u>barI</u> <u>red114</u> <u>imm434</u>	+++	+++

FIGURA 11. Patrón de restricción del DNA de los fagos lactrpW205 t_I⁻ imm 434 cII41 con HindIII y BamHI.

Esquema del mapa de los fagos lactrpW205 imm434. Las flechas indican el sitio de corte de las enzimas. Los números que se encuentran en la parte superior del mapa se refieren al tamaño de cada fragmento (en pares de bases) que se obtiene del corte con HindIII, y los de la parte inferior los de una restricción doble con HindIII y BamHI.

El DNA de los fagos lactrpW205 imm434 restringidos con HindIII y BamHI se corrieron en un gel de agarosa al 1% por 2 hr a 100 v; 3, 4, 8, y 9 se refieren a los diferentes candidatos t_I⁻, λ es una DNA comercial que se restringió como control, y M es λ HindIII comercial usado como marcador de peso molecular.



sitios de corte de HinDIII y BamHI para los fagos con sustitución lactrpW205 y de inmunidad 434.

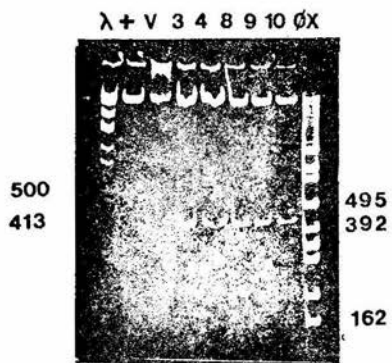
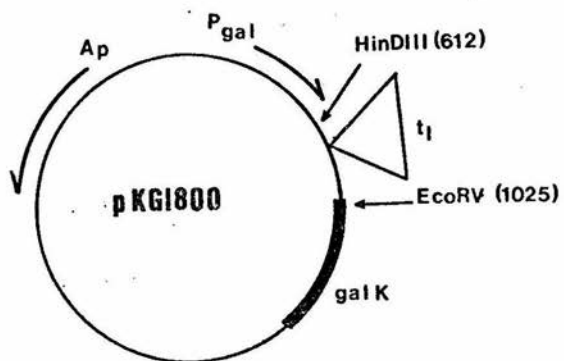
Se utilizó también un DNA comercial de lambda que fué igualmente restringido y cuyo patrón se muestra en el penúltimo carril (λ); se incluyó un DNA de λ cortado con HinDIII comercial, como marcador de peso molecular (M): el tamaño de cada fragmento en pares de bases se indica a la derecha de la fotografía.

Para el DNA del fago t_I8 se encontró que el patrón de restricción no correspondía al esperado, ya que aparece una banda de mas, que en la fotografía se señala con una flecha. Ningún cambio se encontró en el DNA de los otros fagos.

- Patrón de restricción con HinDIII y EcoRV de los plásmidos candidatos t_I.

El DNA de los plásmidos pKG1800, pKG1800 sib⁺, y pKG1800 t_I, se trató con las enzimas de restricción HinDIII y EcoRV y se corrió en un minigel de acrilamida al 5% a 250 v por 35 min. Como marcadores de peso molecular se utilizaron DNA de lambda comercial cortado con HinDIII y EcoRI, y de ϕ X174 cortado con HaeIII. El plásmido pKG1800 cortado con HinDIII y EcoRV da un fragmento de 168 pb, y otro de 4.1Kpb. De todos los otros plásmidos se esperaba un fragmento de 413 pb correspondiente al fragmento conteniendo al terminador t_I.

FIGURA 12. Patrón de restricción con HinDIII y EcoRV de los plásmidos pKG1800 sib⁺ con fenotipo \underline{t}_I^- . En el esquema del plásmido se señalan los sitios de corte de las enzimas empleadas; los plásmidos restringidos se corrieron en un ninigel de acrilamida al 5% a 250 y por 35 min. Los carriles, de izquierda a derecha, son: (λ) cortado con HinDIII y EcoR1. (estandar comercial de Boeringer M.); Los siguientes fueron todos cortados con HinDIII y EcoRV: (+) pKG1800 sib⁺ (v) vector pKG1800, (3) pKG1800 \underline{t}_I^3 , (4) pKG1800 \underline{t}_I^4 , (8) pKG1800 \underline{t}_I^8 , (9) pKG1800 \underline{t}_I^9 , (10); (ØX) ØX174 cortado con HinCII (Biolabs).



El rango efectivo de separación de un gel de acrilamida al 5% es de 80 a 500 pb (Maniatis, 1982), por lo cual, al menos dentro de este rango, se puede tener la seguridad de que estos plásmidos no tienen alteraciones importantes en su DNA (FIGURA 12).

- Ensayo de galactocinasa de los plásmidos candidatos \underline{t}_I^- .

La tabla 9 presenta los resultados obtenidos para el ensayo de galactocinasa de los plásmidos pKG1800, pKG1800 sib⁺ y pKG1800 \underline{t}_I^- en la cepa SA1943, crecida a 42° en medio mínimo, y cuyo extracto se utilizó para medir la actividad de la galactocinasa por la conversión de galactosa ¹⁴C a galactosa(¹⁴C)-fosfato, la cual se une específicamente a filtros DE81 (intercambio aniónico). Los detalles de este experimento se encuentran en Material y Métodos.

TABLA 9 . Unidades de galactocinasa de los plásmidos candidatos t_1^- en la cepa SA1943 recA.

La reacción para el ensayo de la galactocinasa se efectuó a 32°C por 10 min según se describe en Material y Métodos . Una unidad de galK se expresa como nanomoles de galactosa fosforilada por minuto por ml de células a una D.O.650 de 1.0.

Todos los plásmidos se ensayaron en la cepa SA1943 recA.

PLASMIDO	UNIDADES DE <u>galK</u>
pKG1800	433
pKG1800 <i>sib</i> ⁺	3.5
pKG1800 <u>t</u> _I ³	19.4
pKG1800 <u>t</u> _I ⁴	17.1
pKG1800 <u>t</u> _I ⁸	13.9
pKG1800 <u>t</u> _I ⁹	12.7
pKG1800 <u>t</u> _I ¹⁰	19.18

TABLA 9

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El terminador t_I de lambda bloquea el transcrito que, iniciado en p_I, da lugar a la síntesis de la integrasa (Schmeissner et al., 1984). Esta proteína cataliza la integración del fago al cromosoma bacteriano durante la lisogenia. t_I se localiza en la región b, unos 190 pb a la izquierda de att, en el mismo sitio que otro elemento, sib, que tiene que ver también con la transcripción de int. sib (sitio inhibidor de int) es una estructura con una función sui generis: regula la expresión del gene int, cuando éste ya ha sido transcrito por la polimerasa que inició la transcripción en p_I, es decir, lo "retroregula" (Figura 4).

La ubicación de sib está bien delimitada, tanto por deleciones (Court, 1983) como por mutaciones puntuales (Montañez, 1982). Analizando su secuencia de bases (Figura 1) podemos distinguir dos segmentos palindrómicos que podrían, en el RNA, aparearse y formar una estructura secundaria de doble orquilla. Pues bien, la orquilla superior, que se ve es seguida por seis uridinas hacia el extremo 3', corresponde al terminador t_I, el cual pertenece al tipo de los terminadores simples (Platt, 1983).

En otros terminadores simples se ha observado que mutaciones puntuales en la región palindrómica generalmente afectan

la terminación, mientras que las que fortalecen la potencial orquilla en el RNA la incrementan (Rosenberg y Court, 1979; Zurawsky y Yanofsky, 1980). Mutaciones que reducen el número de uridinas debilitan también la terminación (Bertrand et al., 1977); Zurawsky y Yanofsky, 1980). Las mutaciones sib 1, sib 2, y hef 13 (Figura 1) se localizan dentro del tailo de la orquilla (Montañez, 1982) de t_I , lo cual no obsta para que el terminador sea, hasta donde pudo detectarse, tan eficiente como el silvestre (Bueno, 1985).

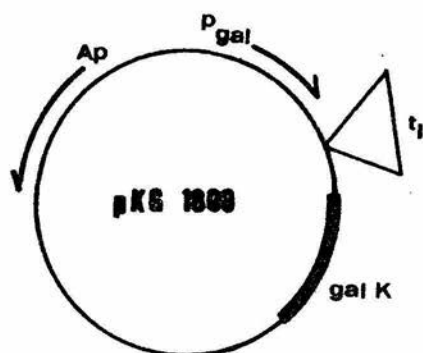
De estas observaciones surge el interés por determinar cuales son los elementos que determinan la funcionalidad de t_I , y si tiene alguna particularidad con respecto a otros terminadores por su condición bifuncional (como terminador y parte del retrorregulador).

Para abordar este problema se recurrió al clásico procedimiento genético: el aislamiento de mutantes.

El plásmido pKG1800, en el cual está inserto el terminador t_I se desarrolló especialmente para examinar in vivo la eficiencia de una señal de terminación clonada en él (McKenney et al., 1981). Este vector utiliza dos componentes del operón de galactosa, el promotor (p_{gal}) y el gene estructural de la galactocinasa (galK). Cuando un fragmento de DNA que lleva una señal de terminación, se inserta en el plásmido pKG1800, entre p_{gal} y galK, el nivel de galactocinasa disminuye, y esta reducción de galK refleja la eficiencia de terminación de la transcripción. (Figura 13).

FIGURA . Plásmido pKG1800.

El plásmido pKG1800 fue construído por McKenney y colaboradores (McKenney et al., 1981) como un sistema de estudio de terminadores de la transcripción. Este plásmido lleva el promotor de galactosa y el gene galK de E. coli, y dentro de una bacteria galK⁻, Este plásmido multicopia se transcribe, expresándose la galactosidasa y resultando un fenotipo gal⁺ que puede observarse fácilmente por la formación de colonias rojas en medio Maconkey-gal. Este plásmido lleva además el gene bla que confiere resistencia a ampicilina (Ap). Al insertarse un terminador de la transcripción entre pgal y galK, se interrumpe la transcripción de éste último, y el fenotipo de las colonias será blanco en maconkey-gal. En este plásmido se clonó el terminador t_I de lambda (Montañez, 1982). Este plásmido se utilizó como sistema para el aislamiento de mutantes t_I⁻.



CEPA	FENOTIPO DE LAS COLONIAS EN MAC-C A 42°C
SA1943	BLANCAS
SA1943 (pKG1800)	ROJAS
SA1943 (pKG1800 \underline{t}_I)	BLANCAS
SA1943 (pKG1800 \underline{t}_I^-)	ROJAS Y/O ROSAS

En el plásmido pKG1800 sib^+ , t_I está entre p_{gal} y $galK$, y su eficiencia de terminación en la cepa SA1943 es del 98% (Schmeisner et al., 1984).

Además de estas características, el usar este sistema tiene otras ventajas, primero, que el método de selección resulta sencillo, ya que se trata de elegir colonias rojas (t_I^-) entre blancas (plásmido silvestre); y segundo, se trata de dirigir la mutación a un fragmento de solo 250 pb (¡contra 49Kpb de lambda!), con lo que al obtener mutantes, quedan localizadas en este segmento.

El único inconveniente que presentaba el sistema, era la alta frecuencia de aparición de colonias rojas debido a la recombinación entre el cromosoma bacteriano y el plásmido, por la cual se regeneraba el genotipo $galK^+$ de la bacteria. Sin embargo, dicha frecuencia disminuyó desde 10^{-3} hasta 10^{-7} en la cepa SA1943 $recA^-$, construida por transducción con el fago P1. Además, al transformar la cepa con los plásmidos sib^+ $sib 2$, y $sib 3$ y checar el fenotipo de las colonias a diferentes temperaturas, se observó que a 42° las colonias eran blancas en todos los casos, lo cual no ocurría a otras temperaturas-aparentemente la terminación es más eficiente a 42° - y se decidió utilizar estas condiciones para la selección de mutantes deficientes en terminación.

Para llevar a cabo la mutagénesis se eligió el E.M.S. Es éste un agente alquilante que ha sido ampliamente utilizado en

sistemas bacterianos y cuyo mecanismo de acción se conoce; se sabe que causa mutaciones puntuales del tipo G:C → A:T (Drake, 1970). El tratamiento con E.M.S. se realizó en medio mínimo, por lo que puede asumirse que cada colonia mutante aislada se produjo por un evento mutacional independiente. La Figura presenta la frecuencia de sobrevivencia al tratamiento con tres concentraciones de E.M.S. a 4 tiempos. Se observa que la letalidad es alta, lo cual se explica por el hecho de ser la cepa utilizada, deficiente en reparación recombinacional (recA⁻) (Kondo, 1970).

Al transformar el DNA de las 46 colonias seleccionadas a otra cepa que no hubiera recibido tratamiento, con el fin de descartar las mutantes bacterianas y elegir las mutaciones ocurridas en el plásmido, 35 resultaron ser mutaciones bacterianas, y por tanto, al retransformar el plásmido sólo se observaron colonias blancas, mientras que las once restantes presentaban una mezcla de colonias rojas y blancas. Este fenómeno resulta de la segregación de plásmidos, ya que el plásmido es multicopia y en la colonia seleccionada en un principio, la población de éstos es heterogénea. Las colonias rojas se purificaron y se utilizaron en la siguiente parte del trabajo.

El método para la transferencia de la mutación del plásmido al fago se explica en la Figura 7. Uno de los objetivos de llevar a cabo la transferencia era el descartar aquellas mutaciones que hubieran ocurrido fuera del terminador (un ejemplo

sería un promotor más fuerte) lo mismo que deleciones, ya que el método requiere de recombinación por homología, y la única región que el plásmido comparte con el fago es la del terminador (no se encontraron colonias Ap^R al infectar la cepa con el plásmido pKG1800). Además el tener la mutación en el fago permitiría ver su efecto in situ, así como probar si afectaba al retroregulador.

Al efectuar el rescate de la mutación se esperaba que el control presentara únicamente placas blancas, pero en cambio se encontraron además de éstas, gran cantidad de placas claras azules y algunas claras blancas (recuérdese que en la cepa S165 Hfl^- los fagos nutL son turbios). Esto representaba un problema para la selección de fagos recombinantes, por lo que había que analizar su origen y cómo eliminarlos para poder realizar el rescate.

Lambda es capaz de encapsidar moléculas de DNA si éstas no sobrepasan un tamaño de 50 Kpb; el DNA está fuertemente compactado y puede desactivarse fácilmente con agentes quelantes (Parkinson and Huskey, 1971). Así, es posible elegir mediante condiciones controladas de agentes quelantes un cierto tamaño de moléculas de DNA. Si las placas claras azules representaban fasmidos, éstos deben tener un tamaño mayor que el del fago 464 nutL i_4 (el plásmido pKG1800 sib^+ es de 5 Kpb) y debía ser posible eliminarlos con Citrato de Sodio.

Siguiendo la inactivación por citrato (Figura 9) a la par que el fenotipo de los fagos sobrevivientes en medio X-GAL, se probó que las placas eran efectivamente fásmidos y que con 5 minutos de tratamiento podían eliminarse. Aun no se comprende el porqué los fásmidos daban ese fenotipo, pero otras personas con resultados similares coinciden en que en este tipo de recombinantes la transcripción se ve aumentada (Berman, comunicación personal).

Así pues, la selección de las placas se hizo a partir de lisados que fueran tratados previamente con Citrato de Sodio por 5 minutos. Este procedimiento no resulta muy adecuado, ya que se sabe que el uso de agentes quelantes selecciona delecciones (Parkinson y Huskey, 1971). En seis de los lisados probados no se pudo detectar ningún fago que presentara placas azules. Estos cinco fagos se purificaron y se utilizaron en lo que siguió del trabajo.

Como el procedimiento de rescate no resultara muy claro, y se deseaba probar que los fagos obtenidos no eran artefactuales, se decidió determinar si había algún cambio en el terminador, bajo la suposición de que una mutación en t_I podía afectar la retroregulación. De no encontrarse nada afectado en la regulación de int, habría que buscar otro medio de hacerlo, pero de ser el resultado positivo, sería esto una prueba del rescate.

Para medir la eficiencia de sib de los supuestos fagos t_I^- , se utilizó el ensayo de superinfección, que se explica en la Figura 7. Se observó que el fago lac $t_I^8 i_4 cII_4$ se comportaba como un fago sib, los fagos lac t_I^3 y 4, presentaban valores intermedios, y los fagos lac t_I^9 y 10 presentaban valores iguales a los del control sib⁺. Estos valores nos condujeron a pensar que se trataba de al menos tres tipos de mutantes t_I^- .

Con el propósito de determinar si estos presuntos fagos t_I^- tenían realmente afectado el terminador, o si se trataba de un fenómeno de aumento en la transcripción, se probó el comportamiento de estos fagos en la cepa C600 rap⁻ (TABLA 8).

La cepa C600 rap⁻ es una mutante de E. coli que inhibe el crecimiento del bacteriófago lambda. Aquellos fagos mutantes capaces de crecer en esta cepa, se denominan bar⁻. Este fenómeno de exclusión se debe a la activación transcripcional de sitios bar en el genoma de lambda (guzmán, P., 1984). Se conocen 4 regiones bar en lambda, dos de las cuales, barI y bar II, se localizan a la izquierda y derecha de att respectivamente. Bacteriófagos que llevan la mutación intC226, que hace constitutiva la transcripción a partir de P_I, son excluidos más severamente en la cepa rap⁻ (TABLA 8), sin embargo, la mutación barI permite que el fago se desarrolle

normalmente. Estos dos fagos se utilizaron como controles negativo y positivo, , y se encontró que el fago lactrpW205 t_I³ nutL, a diferencia del fago lactrpW205 nutL silvestre, la exclusión era total. Este resultado era inesperado, ya que en los fagos nutL, el transcrito que se inicia en P_L termina en t_{L1} (ver FIGURA 2), con lo que al no transcribirse las regiones bar el fago crece normalmente. Esto se vio también con el fago lactrpW205 t_I⁸ cII41. Estos resultados sugieren un aumento en la expresión, que podría explicar el fenotipo azul de las placas de estos fagos en medio X-G.

Utilizando una construcción semejante a la del plásmido pKG1800, P. Guzmán mostró la actividad in vivo de un promotor en la región de barI, lo cual coincide con su observación de dos promotores in vitro (P.Guzmán, 1984). Estos promotores podrían ser los responsables del aumento transcripcional que se observa en los fagos con fenotipo t_I⁻.

Por otra parte, el patrón de restricción del DNA de estos fagos con las enzimas HinDIII y BamHI, reveló una alteración en el DNA del fago t_I⁸, resultado tal vez del tratamiento del fósforo con Citrato de Sodio, ya que el patrón de restricción realizado con el DNA del plásmido, con HinDIII y EcoRV, no mostró ninguna anomalía.

Los resultados del ensayo de la enzima galactocinasa resultaron ser de 4 a 6 veces mayores que los observados para t_I⁺, sin embargo, si se comparan con las 200 veces de aumento en la galactocinasa en el pKG1800, más parecería que se deben a modificaciones de expresión en el plásmido -como

por ejemplo, un aumento en el número de copias del plásmido-que a un terminador no funcional, en cuyo caso, se esperarían valores de galK muy superiores.

Aún en el caso de que las mutaciones en el plásmido se debieran al terminador, mutaciones tan débiles quizá no pudieran distinguirse en el ensayo de fagos empleado para el rescate, ya que la delección 53 abarca al terminador enteramente, y se requerirían mutaciones que emularan en fenotipo a esta delección.

Convendría delimitarse la región del terminador hacia att con el fin de analizar exclusivamente la actividad del terminador en ausencia de otros factores, como los promotores mencionados, que pudieran causar interferencia. Para ello, podría utilizarse la delección 56 que, siendo mayor que la 53, deja el terminador intacto pero remueve ambos promotores. Hay que tomar en cuenta además, que en esa región de sib, inmediatamente a la derecha hacia att, existen otras secuencias palindrómicas en el DNA las cuales sirven para el reconocimiento de Int, Xis y IHF (Weisberg, et al., 1983).

La delimitación funcional de t_I hacia att resultaría de gran interés, ya que pudiera ser que los dominios del terminador sean más amplios que la estructura secundaria que conocemos, e involucren regiones adyacentes a la secuencia repetida e invertida que, contenida en sib, forma una estructura de terminación.

BIBLIOGRAFIA

- Adhya, S. y Gottesman, M., 1978. Control of transcription termination. *Ann. Rev. Biochem.* 47:967.
- Appleyard, R.L., 1954. Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from E. coli K12. *Genetics* 39:440.
- Bauer C.E., Carey, J., et al., 1983. Attenuation in bacterial operons. En *Gene Function in Prokaryotes*, editado por Beckwith, et al., Cold Spring Harbor, pp.
- Belfort, M, Wulff, D., y Oppenheim, A.B., 1975, Isolation, characterization and deletion mapping of amber mutations in the cII gene of phage lambda. *Virology* 63:147.
- Berman, M., Enquist, L., y Silhavy, T., 1982. *Advanced Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Bueno J., 1985. Tesis profesional, Universidad de Veracruz, México.
- Court D., Huang, T.F., y Oppenheim, A., 1983. Deletion analysis of the retroregulatory site for the int gene. *J. Mol. Biol.* 166:233-240.
- Court, D., Schmeissner, U., et al., 1983. Control of int gene expression by RNA processing. En *Gene Expression*, Alan R. Liss, Inc., N.Y. pp. 311-326.
- Court, D., et. al., 1983. Processing of int RNA: Mechanism for Gene Control pp. 78-81. En *Microbiology -1983*. Editado por D. Shlessinger, American Society for Microbiology, E.U. 1983.
- Dagert, M. y Erlich, S.D., 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of E. coli cells. *Gene*, 6:23-28.
- Davies, R.W., 1980. DNA sequence of the int-xis-P_I region of bacteriophage lambda: Overlap of the int and xis genes. *Nucleic Acids Research* 8:1765.
- Drake, J.W., 1970 *The Molecular basis of Mutation* Capítulo 13. *Mutagénesis Química* pp. 146-159. Holden-Day, U.S.A.

- Farnham, P.J. y Platt, T., 1980. A model for transcription termination suggested by studies on the trp attenuator in vitro using base analogs. Cell, 20:739.
- Feiss, M., Adhya, S., y Court, D., 1972. Isolation of a plaque forming, galactose transducing strain of phage λ_B. Genetics, 71:189.
- Guarneros, G. y Galindo, J.M. 1979. The regulation of integrative recombination by the b2 region and the cII gene of bacteriophage λ. Virology 95:119-126.
- Guarneros, G., et al., 1982. Postranscriptional control of bacteriophage λ int gene expression from a site distal to the gene. PNAS 79:238-242.
- Guzmán, P.A., 1984. Una nueva interacción del bacteriofago λ con su huésped. Tesis Doctoral, CIEA, IPN.
- Gottesman, M., Oppenheim, A., y Court, D., 1982. Retroregulation: control of gene expression from sites distal to the gene. Cell, 29:727-2482-86.
- Herskowitz, I. y Hagen, D., 1980. The lysis-lysogeny decision of phage λ: explicit programming and responsiveness. ANN. Rev. Genet. 14:399.
- Hoess, R., et al., 1980. Site-specific recombination functions of bacteriophage λ: DNA sequence of regulatory regions and overlapping structural genes for Int and Xis. Proc. Natl. Acad. Sci., 77:5:2482-86.
- Kaiser, A.D. y Jacob, F., 1957. Recombination between related temperate bacteriophages and the genetic control of immunity and prophage localization. Virology, 4:509.
- Kondo, Sohei et al. 1970. Base-change Mutagenesis and Prophage induction in strains of E. coli with different DNA repair capacities. Genetics 66:187-217.
- Maniatis, T., et al., 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. N.Y.
- Manly, K.F. Sanger, E.R., y Radding, C.M., 1969. Non essential functions of bacteriophage λ. Virology 37:177.
- McKenney, K., Shimatake, H., et al., 1981. A system to study Promoter and terminator signals recognized by E. coli RNA polymerase. En Gene amplification and analysis, Vol. 2, Editado por Chirikjian y Papas, Ed. Elsevier, North Holland. pp. 384-408.

- Miller, H.I., Abraham, J., Benedik M., Campbell, A., et al., 1981. Regulation of the integration-excision reaction by bacteriophage . CSH Symp. Quant. Biol., Vol. XLV., pp. 439-445.
- Montañez, C. 1982. Aislamiento y caracterización de mutantes del bacteriófago lambda que carecen del retroinhibidor sib. Tesis Doctoral. I.P.N.
- Murialdo, H. Siminovitchi, L., 1972. The morphogenesis of bacteriophage lambda. IV. Identification of gene products and control of the expression of the morphogenetic information. Virology, 48:785.
- Oppenheim, A.B., Gottesman, S. y Gottesman, M., 1982. Regulation of bacteriophage lambda int gene expression. J. Mol. Biol. 158:327-346.
- Parkinson, J.S. y Huskey, R.F., 1971. Deletion mutants of bacteriophage lambda. Isolation and initial characterization. J. Mol. Biol. 56:369.
- Platt, T. y Bear, D., 1983. Role of RNA polymerase, Rho factor, and ribosomes in transcription termination. En Gene Function en Prokaryotes, Editado por Beckwith, J., et al., Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., pp. 126-161.
- Reznikoff, W.S., Michels, C.A., Cooper, T.G. et al., 1974. J. Mol. Biol. 117:1231-1239. Titub.
- Rosenber, M. y Court, D., 1979. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription, ANN. Rev. Genet., 13:319-353.
- Salstrom, J.S., y Szybalski, W., 1978. Coliphage nutL⁻: a unique class of mutants defective in the site of N utilization for anti termination of leftward transcription. J. Mol. Biol., 195:221.
- Schmeissner, U., McKenney, K., et al., 1984. Transcription terminator involved in the expression of the int gene of phage lambda. Gene 28:343-350.
- Smith, G.R., 1983. General recombination. En Lambda II. Ed. por Hendrix. R., et al., Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., pp. 175-210.
- Sussman, R. y Jacob, F., 1962. Sur un systeme de repression thermosensible chez le bacteriophage lambda d'E. coli. Compt. Rend. Acad. Sci. 254:1517.

Szybalski, E.H. y Szybalski W., 1979. A comprehensive molecular map of bacteriophage lambda. *Gene*, 7:215.

Weisber, R. y Landy A. 1983. Site specific recombination in phage lambda pp. 211-250 en *Lambda II*. Editado por Hendrix y Roberts, Cold Spring Harbor, N.Y. 1983.

Yarmolinski. M.B., 1971. Making and joining DNA ends. *The bacteriophage lambda*.