

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA

79



LA RECOMBINACION IN VITRO DE ACIDOS NUCLEICOS  
EN LA CONSTRUCCION DE VEHICULOS MOLECULARES  
PARA CLONACION

T E S I S  
QUE PARA OBTENER  
EL TITULO DE  
QUIMICO  
PRESENTA  
LUIS FERNANDO COVARRUBIAS ROBLES

M-42447



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.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE: Carlos del Río Estrada  
VOCAL: Francisco G. Bolívar Zapata  
SECRETARIO: Manuel Luis Robert Díaz  
1er. SUPLENTE: Gerardo Kono Yaiko  
2do. SUPLENTE: Marisol López López

SITIO DONDE SE  
DESARROLLO EL TEMA

Departamento de Biología Molecular,  
Instituto de Investigaciones  
Biomédicas, U.N.A.M.

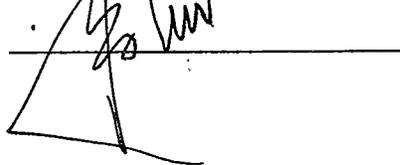
SUSTENTANTE:

Luis Fernando Covarrubias Robles

  
\_\_\_\_\_

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Francisco G. Bolívar Zapata

  
\_\_\_\_\_

Unas veces veo la vida  
como es  
otras  
como parece ser,  
muchas más  
como quiero que sea  
y la mayoría  
como no es.

A mis padres,

con el más profundo cariño y  
agradecimiento

A mis hermanos

A quien se considere mi amigo,

A mis padrinos:

Alfonso y Ana Lucía

A tí

Agradezco muy especialmente a Xavier Soberón  
su amplia colaboración en este trabajo.

Agradezco al Dr. Francisco Bolívar sus oportunos consejos y gran ayuda.

## INDICE

	Página
GENERALIDADES	1
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	25
MATERIALES Y METODOS	30
RESULTADOS	50
A. Construcción del pBR326 y el pBR327	50
B. Caracterización con endonucleasas de restricción del pBR326 y el pBR327	52
C. Secuencia nucleotídica de pBR327	58
D. Construcción del pBR328	58
E. El mapa de restricción del pBR328	69
F. Propiedades del pBR326, pBR327 y pBR328 como vehículo molecular para clonación de DNA	73
DISCUSION	76
BIBLIOGRAFIA	83

## GENERALIDADES

La Ingeniería Genética, también llamada Manipulación Genética y Clonación Molecular del DNA, se puede definir como el conjunto de técnicas que permiten introducir un segmento de DNA específico de cualquier -- origen en una bacteria, asegurando su permanencia dentro de ella a través de integrarlo a un vehículo molecular (molécula de DNA extracromosomal -- que se replica independientemente del cromosoma) (1).

Los avances en la clonación molecular del DNA recombinante -- proporciona un importante arsenal de herramientas para el estudio molecular de los genes, tanto de células procariotes como eucariotes.

El desarrollo de las técnicas empleadas para la clonación -- molecular del DNA fué iniciada en 1928 con el descubrimiento del fenómeno de transformación por Griffith (2) y su posterior conceptualización por -- Avery y colaboradores en 1948-9 (3). Posteriores descubrimientos en los últimos 30 años fueron importantes para el manejo eficiente y específico del DNA. Entre estos descubrimientos se encuentran: la identificación y caracterización de enzimas cuyo sustrato es el DNA tales como las endonucleasas de restricción, enzimas responsables de la fragmentación del DNA en sitios específicos, así como las ligasas, polimerasas y fosfatasa del DNA; el desarrollo de los vectores moleculares: plásmidos y bacteriófagos requeridos para la estabilización y replicación de fragmentos de DNA de diferente origen; y las condiciones para la mejor transformación de --

Escherichia coli (célula receptora).

Los primeros experimentos en este campo fueron hechos en 1973 por Cohen y colaboradores (4), los cuales consistieron en la unión de -- fragmentos de DNA generados con una endonucleasa de restricción a un plásmido bacteriano (replicón) y la subsecuente introducción de la molécula -- de DNA recombinante (quimera) a E. coli por el fenómeno de transformación.

En esencia, el procedimiento consiste de cuatro elementos que incluyen manipulaciones bioquímica y biológica. Estos son:

- 1) Un método que permite romper y unir los enlaces fosfodiéster de -- moléculas de DNA de diferente origen.
- 2) Una molécula de DNA capaz de replicarse por ella misma y al fragmento(s) unido(s) covalentemente a ella. Esta molécula recibe el nombre de vehículo molecular del DNA.
- 3) Una manera de introducir la molécula recombinante a una célula -- bacteriana.
- 4) Un método que permita seleccionar de un gran número de células -- aquellas que han adquirido la molécula de DNA recombinante.

A esta serie de metodologías, encaminadas a aislar y propagar molecularmente una secuencia específica de DNA, es a lo que se ha llamado "Ingeniería Genética Molecular" debido a la potencialidad de crear una -- amplia variedad de combinaciones genéticas.

## INTRODUCCION

El gran tamaño del genoma, en contraste con su relativamente sencilla estructura molecular, no permite un fácil análisis de secuencias específicas. Por otro lado, el aislamiento de genes o regiones específicas de DNA que fueran fácilmente manejables y permitieran un exhaustivo estudio (en lo posible) del fragmento de genoma, raramente había sido posible. La ingeniería genética molecular ha venido a ayudar a resolver -- estos problemas, primero, fragmentando el genoma para disminuir su complejidad, y luego propagando fragmentos específicos a través de la multiplicación celular. El conjunto de células resultantes constituye una clona molecular de DNA a semejanza de una clona celular (una población de células las cuales han descendido por una secuencia de división celular a partir de una célula original (5)).

A continuación se describen brevemente los elementos esenciales de esta metodología.

### Generación de fragmentos

La forma más comúnmente usada para fragmentar el DNA es por medio de las llamadas endonucleasa de restricción, enzimas que cortan las uniones internas (enlaces covalentes fosfodiéster) del DNA. Las primeras que se descubrieron fueron las que cortan inespecíficamente al DNA, las cuales, no fueron útiles para el análisis del DNA. No fue hasta 1970 --- cuando se descubrió la primera endonucleasa específica, HindII, la cual -

mostró cortar la misma secuencia nucleotídica que reconoce (6). A partir del descubrimiento de esta endonucleasa específica se descubrieron otras endonucleasas de este tipo y su aplicación fue inmediata.

Estas enzimas, de acuerdo a su forma de actuar al cortar, se han clasificado en tres clases: I, II y III (7). Las primeras son aquellas que cortan inespecíficamente, aunque podrían reconocer una secuencia específica. Las endonucleasas de la clase II, en cambio, reconocen secuencias específicas y cortan dentro de esa misma secuencia. Las de la clase III, propuesta recientemente, reconocen una secuencia específica y cortan un cierto número de nucleótidos después de esta secuencia.

Evidentemente, las más útiles son las de la clase II, las cuales pueden reconocer regiones específicas de 4, 5, 6, 7 u 8 pares de bases (p.b.). Estas secuencias de nucleótidos pueden formar generalmente un "palíndromo", es decir, una secuencia de doble hebra con simetría rotacional donde la secuencia nucleotídica se lee igual en ambas hebras en la dirección 5' a 3'.

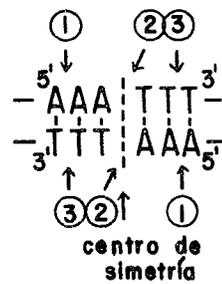
En la Tabla I se da una lista de algunas endonucleasas de la clase II con la secuencia que reconocen.

Estas endonucleasas de la clase II se pueden subclasificar de acuerdo a su forma de corte. Algunas cortan formando extremos cohesivos (helice sencilla) que pueden ser 5'P salientes o 3'OH salientes, y otras cortan formando extremos rasos (doble helice) (Fig. 1).

TABLA 1. Endonucleasas específicas y las secuencias que reconocen

Tetranucleótido		Pentanucleótido		Hexanucleótido	
<u>Alu</u> I	AG↓CT	<u>Eco</u> RII	↓CC( <sup>A</sup> <sub>T</sub> )GG	<u>Ava</u> I	C↓PiCGPuG
<u>Hae</u> III	GG↓CC			<u>Bam</u> I	G↓GATCC
<u>Hha</u> I	GCG↓C			<u>Bgl</u> II	A↓GATCT
<u>Hpa</u> II	C↓CGG			<u>Bal</u> I	TGG↓CCA
<u>Mbo</u> I	↓GATC			<u>Eco</u> RI	G↓AATTC
<u>Taq</u> I	T↓CGA	<u>Hph</u> I	GGTGA → 8p.b.	<u>Hind</u> III	A↓AGCTT
		<u>Mbo</u> II	GAAGA → 8p.b.	<u>Hpa</u> I	GTT↓AAC
				<u>Pst</u> I	CTGCA↓G
<u>Hinf</u> I	G↓ANTC			<u>Xma</u> I	C↓CCGGG
<u>Dpn</u> I	↓GATC cuando está modificado			<u>Hae</u> I	( <sup>A</sup> <sub>T</sub> )GG↓CC( <sup>T</sup> <sub>A</sub> )
				<u>Hae</u> II	PuGCGC↓Pi
				<u>Hinc</u> II	GTPi↓PuAC

Roberts, R. (1976).



corte	moléculas resultantes	denominación de los extremos
①	$  \begin{array}{l}  -A-OH \\  -\underset{\text{3}'}{\text{T}}\text{T}\text{T}\text{AA}-\underset{\text{5}'}{\text{O}}(\text{P})  \end{array}  \quad  \begin{array}{l}  (\text{P})\text{O}-\underset{\text{5}'}{\text{A}}\text{T}\text{T}\text{T}-\underset{\text{3}'}{\text{O}} \\  \text{HO}-\underset{\text{3}'}{\text{A}}  \end{array}  $	5' salientes
②	$  \begin{array}{l}  -\text{AAA}-\underset{\text{3}'}{\text{OH}} \\  -\underset{\text{3}'}{\text{T}}\text{T}\text{T}-\underset{\text{5}'}{\text{O}}(\text{P})  \end{array}  \quad  \begin{array}{l}  (\text{P})\text{O}-\underset{\text{5}'}{\text{T}}\text{T}\text{T}- \\  \text{HO}-\underset{\text{3}'}{\text{A}}\text{A}\text{A}-  \end{array}  $	rasos
③	$  \begin{array}{l}  -\text{AAAT}\text{T}-\underset{\text{3}'}{\text{OH}} \\  -\underset{\text{3}'}{\text{T}}-\text{O}-\underset{\text{5}'}{\text{O}}(\text{P})  \end{array}  \quad  \begin{array}{l}  (\text{P})\text{O}-\text{O}-\text{T}- \\  \text{HO}-\underset{\text{3}'}{\text{T}}\text{TAA}\text{A}-  \end{array}  $	3' salientes

Figura 1. Clasificación general del tipo de extremos generados por las endonucleasas de restricción según la forma de corte.

La búsqueda de nuevas endonucleasas se hace ensayando el extracto semipurificado del lisado de diferentes cepas para la actividad de endonucleasa. La posterior purificación de ésta se lleva a cabo pasando el extracto por varias columnas (DEAE, fosfocelulosa, hidroxihapatita, etc.) que separan cromatográficamente hasta que la endonucleasa -- por purificar queda libre de exonucleasas y otras endonucleasas, ya que, el interés en estas enzimas no son sus propiedades biológicas o bioquímicas, sino su utilidad en el análisis del DNA.

El papel in vivo de las endonucleasas de restricción está -- intimamente ligado al fenómeno de variación (7,8). Parece probable que la célula usa estas enzimas para protegerse de DNAs extraños (e.g. virus) que logren entrar en ésta, para lo cual, la célula requiere proteger su DNA contra su propia endonucleasa de tal manera que este no sea destruido. La célula logra proteger su DNA usando una segunda enzima, enzima de modificación, la cual se encarga de "modificar" la secuencia nucleotídica que es sustrato de la endonucleasa de restricción; esta modificación significa metilar la secuencia específica de la endonucleasa (modelo de restricción-modificación) (7).

Ya que las endonucleasas tienen la propiedad de reconocer secuencias de 6, 5 y 4 p.b. principalmente, lo cual corresponde probabilísticamente acortar el DNA cada 4096, 1024 y 256 p.b. respectivamente, el uso de estas enzimas se vuelve muy útil para caracterizar un fragmento de DNA dado. Cuando un DNA es hidrolizado con una endonucleasa de restric--

ción éste es roto en varios fragmentos los cuales, al ser separados en geles de agarosa o poliacrilamida, según su tamaño, forman una serie de bandas (patrón de restricción), el cual, es característico de cada DNA tratado con esa endonucleasa. De esta manera se puede obtener el mapa físico de un DNA, cuando no es muy grande, es decir, la posición relativa de los diferentes sitios de restricción\* en ese DNA.

Otra posibilidad de formar fragmentos es por rompimiento mecánico del DNA, donde el problema que surge es la unión de éstos (ver -- después).

Fragmentos más específicos pueden ser generados cuando se -- dispone de un RNA mensajero específico haciendo uso de la transcriptasa reversa, la cual, forma un DNA "complementario" a partir de ese RNA (9). También fragmentos con una secuencia nucleotídica específica pueden ser logrados por síntesis química de una región de DNA cuando se dispone de la secuencia de amino-ácidos del producto proteico, como en el caso de somatostatina e insulina (10,11) o la secuencia nucleotídica de una región similar a la que se desea sintetizar. Sin embargo, estos métodos -- actualmente tienen algunas limitaciones, en cuanto a lo que se requiere para que estos fragmentos sean generados.

#### El DNA recombinante

Una vez fragmentado el DNA ¿cómo se pueden unir fragmentos de DNA para formar moléculas híbridas?. En 1967 fueron descubiertas las li-

---

\* Sitio se usa en este trabajo para describir una región de DNA cuya secuencia de pares de bases es específicamente reconocido por las endonucleasas de restricción.

gasas del DNA (12) las cuales son enzimas capaces de formar enlaces fosfodiéster entre dos terminales de DNA (3'-OH con 5'-P). En 1970 se encontró que la ligasa codificada por el virus bacteriano T4 podían catalizar la formación de la unión fosfodiéster entre moléculas de DNA separadas (13) y además éstas podían tener extremos rasos. De esta manera se logró construir moléculas híbridas de DNA (Fig. 2).

Cuando los fragmentos que se desean unir son generados mecánicamente, o se quiere facilitar y hacer más específica la unión, la transferasa terminal suele ser muy útil. La transferasa terminal cataliza la adición de una serie de nucleótidos en el extremo 3'OH de la hélice de DNA. De esta manera puede ser añadido a una población de moléculas de DNA una "cola" de nucleótidos, y a otra población de moléculas, "colas" de nucleótidos complementarios, de tal forma que los extremos entre las dos poblaciones ahora son cohesivos y pueden unirse fácilmente. De esta manera Clarke y Carbon construyeron el "banco de genes" de E. coli (14) (Fig. 3).

Otras enzimas que ayudan a la construcción de moléculas híbridas de DNA son las polimerasas de DNA, la nucleasa S1, la fosfatasa alcalina, la cinasa, etc. (Fig. 4).

#### Vehículos para clonación molecular del DNA.

A fines de 1972 existían varios métodos por los cuales se podían unir fragmentos de DNA, lo cual, fué un gran avance en la manipulación de segmentos específicos de DNA. Sin embargo era necesario un pa

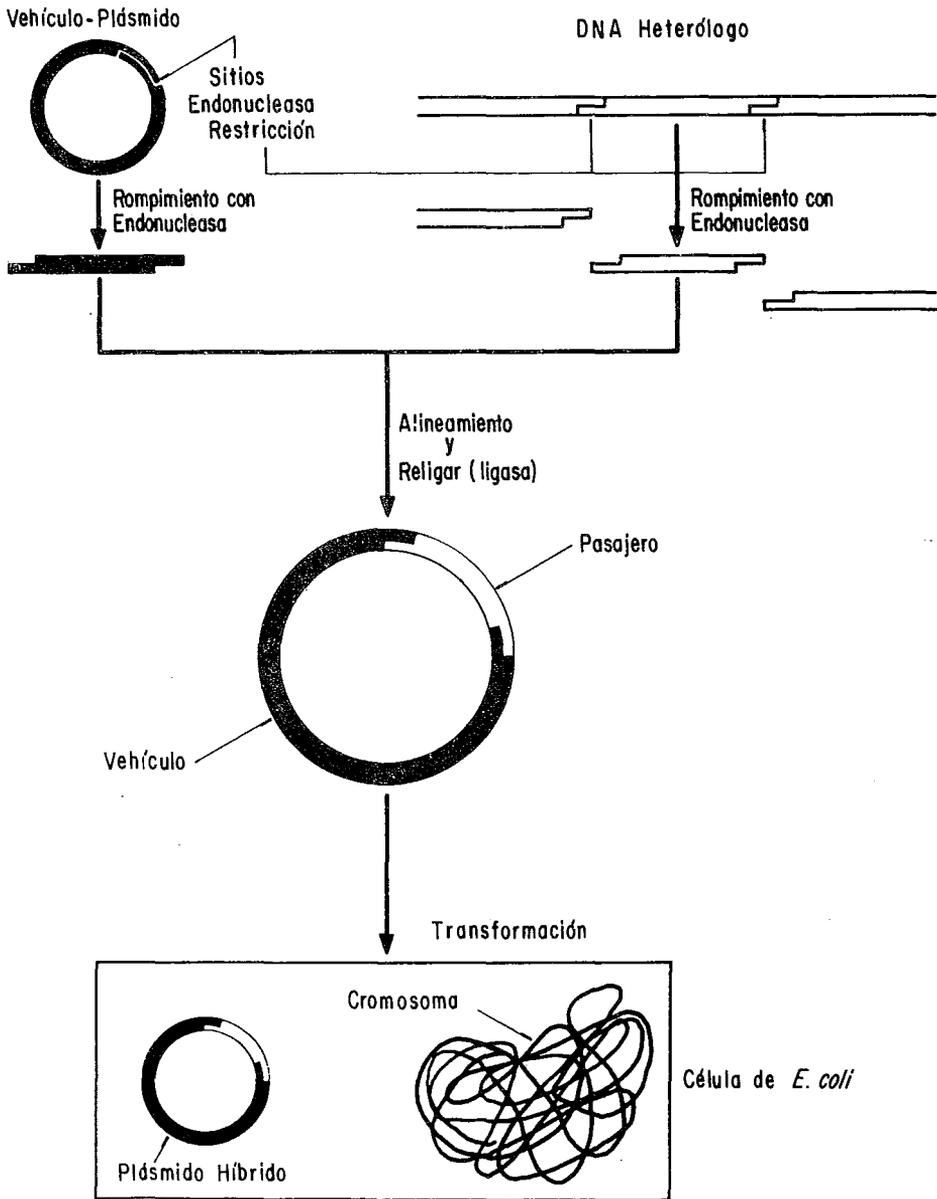


Figura 2. Esquema de la construcción y propagación de moléculas híbridas de DNA (clonación molecular).

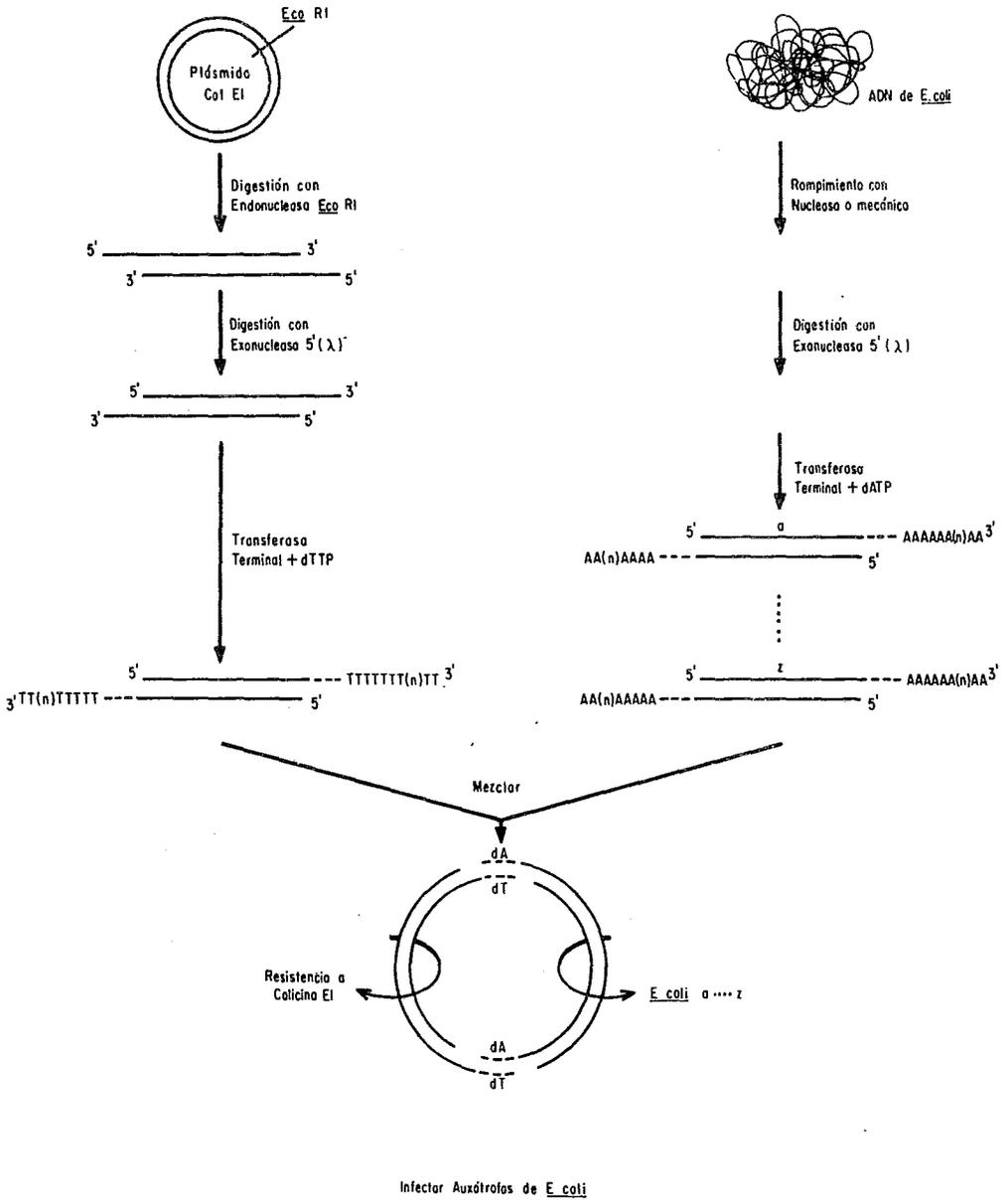


Figura 3. Esquema de la construcción del banco de genes de *E. coli* por Clarke y Carbon.

Fragmento de ADN digerido con EcoRI

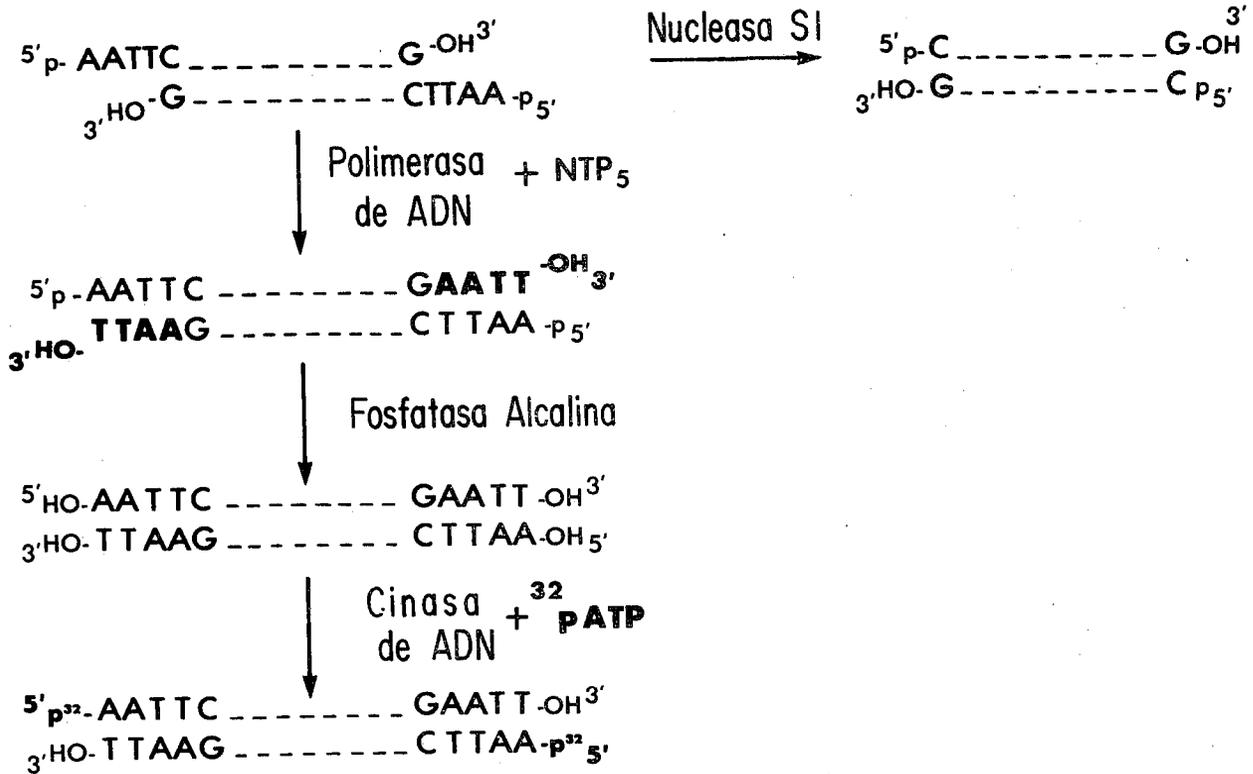


Figura 4. Representación esquemática de la acción de algunas enzimas - sobre el DNA que ayudan a la construcción de moléculas híbridas de DNA.

so más. ¿Cómo podría lograrse la replicación y por ende la multiplicación de estos fragmentos si la gran mayoría no tenían esa capacidad? (no todos los fragmentos de DNA tienen la región necesaria para su autorreplicación). Para esto fué necesario incorporarlo dentro de moléculas de DNA que se pudieran replicar en un sistema particular. De esta manera surgieron los vectores o vehículos moleculares, los cuales son necesarios para que un DNA específico de cualquier origen pueda estabilizarse dentro de una bacteria y propagarse a las células hijas.

Estos vectores para que sean útiles en la clonación de fragmentos de DNA deben cumplir con los siguientes requisitos (15):

- a) Ser replicones autónomos bien definidos que pueden ser purificados fácilmente en grandes cantidades.
- b) Deben ser pequeños, genéticamente y físicamente.
- c) Deben codificar para una o varias propiedades que permitan la selección de la bacteria que lleva este DNA de una población de células.
- d) El vector debe contener un sitio único de corte para tantas endonucleasas de restricción como sea posible. Estos sitios no deben residir en la región de DNA que codifica para la propiedad seleccionable (ver inciso c) y cuando se inserta un fragmento de DNA en estos sitios las funciones de replicación del vector no deben ser inactivadas.
- e) Debe tener propiedades que permitan la detección de las moléculas recombinantes.
- f) Debe ser baja la probabilidad de que la molécula recombinante pueda ser transferida a otra bacteria.

Se conocen dos sistemas bacterianos que pueden satisfacer estos - requisitos: los bacteriófagos y los plásmidos.

El fago  $\lambda$  ha sido modificado, por mutaciones o construcción in vitro, de tal manera que sea útil como vehículo molecular. Los fagos disponibles para clonación han sido modificados de tal manera que su habilidad para crecer líticamente no se altere y al ser digerido con alguna endonucleasa de restricción (e.g. EcoRI) los fragmentos de DNA no esenciales (parte media del genoma de  $\lambda$ ), puedan ser substituidos por el -- DNA que se desea clonar (16). Una característica del sistema de  $\lambda$  es - que solo moléculas de DNA dentro de un cierto rango de tamaño pueden ser empacadas en las partículas de fago, lo cual constituye una poderosa pro propiedad para la selección de la molécula recombinante (este tamaño depende del tipo de fago empleado). Sin embargo, estos vehículos tienen pocos sitios de restricción para clonación y además, los fragmentos clonados difícilmente se pueden caracterizar físicamente en ellos.

Un plásmido es una molécula de DNA que se replica y existe - separadamente del DNA cromosomal. Generalmente, codifica para una o varias propiedades no esenciales es decir, la célula es independiente de - estos elementos "de replicación autónoma", de tal manera que en condiciones normales la célula huésped puede crecer sin él. Sin embargo, el -- plásmido puede dar ciertas ventajas selectivas. La naturaleza física de los plásmidos fué determinada en gradientes de cloruro de cesio-bromuro de etidio y por fotografías al microscopio electrónico, donde se encontró que son moléculas de DNA cerradas covalentemente y de estructura su-

perenrollada.

El rango de tamaño de los plásmidos va de 1 a 100 megadaltones y están presentes en la bacteria de 1 a 30 copias por cromosoma (e.g. el plásmido ColE1 que se encuentra en un número de 20 - 30 copias por cromosoma). Algunos plásmidos pequeños tienen la propiedad de seguirse replicando en la ausencia de síntesis de proteínas (e.g. en presencia de clo--ranfenicol), o sea, cuando no hay replicación celular. Esta propiedad --permite la purificación de estos plásmidos en grandes cantidades. Cuando un plásmido existe en un alto número de copias su modo de replicación es relajado, en contraste con los que existen en bajo número de copias donde su modo de replicación es no relajado (17). Plásmidos con mecanismos de replicación idénticos son incompatibles, es decir, no pueden coexistir en la misma célula (aunque puede forzarse). De acuerdo a ésto, se han clasi--ficado los plásmidos en 24 grupos (grupos de incompatibilidad), de tal --manera, que plásmidos en un mismo grupo son incompatibles (1).

El tamaño pequeño del plásmido ha demostrado tener grandes --ventajas en la clonación molecular. Mientras el plásmido sea más pequeño la probabilidad de que existan menor número de sitios de restricción es --mayor, y por ende existen más sitios únicos favoreciendo la incorporación del DNA extraño y la caracterización del fragmento clonado.

Por otro lado, hay evidencia de que mientras menor sea el --plásmido la frecuencia de transformación (ver después) aumenta y el núme--ro de copias que tolera la célula receptora es mayor, lo cual está rela--cionado por la cantidad que de ésta puede purificarse para el análisis --

posterior.

Intimamente relacionado al tamaño del plásmido está la complejidad genética del mismo, lo cual es importante, ya que, mientras más grande es el vehículo se complica más el análisis funcional del plásmido recombinante (ver después).

Es de esperarse que naturalmente no exista un plásmido con todas las características teóricas que un vehículo requiere, por lo que, recientemente, se han empezado a construir vehículos in vitro usando segmentos de DNA de diferentes orígenes. La construcción de estos vehículos tiene por objeto facilitar la clonación de un fragmento de DNA y su posterior manipulación, lo cual se logra si el vehículo cumple en lo más posible con los requisitos teóricos (18).

En algunos casos, la construcción puede ser más específica. Esto sucede cuando se desea que el plásmido tenga algunas propiedades -- particulares requeridas para un propósito especial. Por ejemplo, cuando se quiere estudiar la interacción entre los fragmentos clonados, los -- vehículos deben pertenecer a una variedad de grupos de incompatibilidad que permitan la coexistencia de ellos en una célula. Cuando se quiere -- una baja dosis de gene del DNA insertado, entonces el plásmido debe tener un bajo número de copias (17).

El primer plásmido usado como vector fué el pSC101 (4), que contiene el material genético que permite a la célula que lo lleva con--

vertirse en resistente a tetraciclina. El segundo plásmido que se utilizó fué ColeI, que produce inmunidad a colicina (19). De estos dos plásmidos, ambos de origen natural, ha sido utilizado preferentemente ColeI porque contiene un mayor número de copias que pSC101, facilitando la purificación en cantidades considerables del fragmento de DNA clonado que, -- como ya se dijo, es muy importante para su posterior caracterización.

A partir de estos plásmidos y otros de origen natural se construyeron otros tratando de mejorar a los anteriores en cuanto a sus propiedades como vehículos de clonación de DNA. Entre los plásmidos construidos más utilizados están el pBR322 y el pBR325 (20,21). El primero confiere resistencia a ampicilina y tetraciclina y permite insertar fragmentos de DNA en varios sitios únicos para endonucleasas de restricción (Fig. 5). El otro, pBR325, tiene las mismas ventajas que el pBR322 pero, además, confiere resistencia a cloranfenicol que contiene también sitios únicos para endonucleasas de restricción (Fig. 6).

Todos los plásmidos pequeños que han sido construidos para -- clonación molecular de DNA han perdido gran parte o todas las regiones de DNA que les permiten ser movilizadas por conjugación (plásmido no conjugativo). Como se dijo, un vehículo molecular de DNA no debe autotransferirse, ya que así se evita una posible contaminación biológica que en algunos casos puede ser potencialmente peligrosa.

#### Introducción del DNA a la bacteria receptora

El proceso de introducción de la molécula de DNA recombinante

Figura 5. Mapa de restricción del pBR322.

Los sitios de restricción fueron determinados a partir de la secuencia nucleotídica del plásmido reportada por Sutcliffe (41). La posición "0" fue elegida arbitrariamente a la mitad del sitio de corte de la endonucleasa EcoRI.

La figura muestra los sitios de restricción para las endonucleasas HnaI, HaeIII, ThaI, HpaII, MboI, AluI, TaqI, HinfI, HaeII y EcoRII; también se muestran los sitios de restricción únicos EcoRI, HindIII, BamHI, SphI, SalI, AvaI, BalI, PvuII, PstI y PvuI.

Figura 6. Mapa de restricción del pBR325.

La figura muestra los sitios unicos de restricción. En el --  
circulo exterior la escala esta en Megadaltons y en el inte--  
rior en kilobases.

formada por un replicón y el fragmento de DNA heterólogo, a una bacteria es la base de la propagación y clonación de la molécula recombinante.

Existen tres mecanismos por medio de los cuales un DNA puede ser introducido a una bacteria receptora: la conjugación, la transfección, y la transformación. Por medio de la conjugación DNA de una bacteria -- (Hfr, bacteria con el factor F integrado en el cromosoma) puede ser transferido a otra (F<sup>-</sup>, bacteria receptora que carece del factor F), el cual, por recombinación, lo integra a su cromosoma (23). La transfección es la forma característica por la que algunos fagos son introducidos a una bacteria. La transformación en cambio, es más general y permite la intro--ducción de DNA de cualquier origen, y por tanto es de principal interés.

El procedimiento de transformación comunmente empleado depende de la capacidad de cationes divalentes, tales como calcio o bario, para alterar la permeabilidad de la membrana de bacterias, permitiendo así la absorción del DNA circular, lineal y de hélice sencilla (23).

Hay algunos aspectos importantes que deben ser tomados en -- cuenta durante el fenómeno de transformación. Primero, la frecuencia de transformación del DNA circular es mayor que la de un DNA lineal, el cual está expuesto a la acción de exonucleasas y requiere recombinar con el -- cromosoma para que permanezca dentro de la bacteria (la frecuencia de -- transformación de un DNA superenrollado es aún mayor). En segundo lugar, las posibilidades de recombinación en una bacteria suelen disminuir la -- frecuencia de transformación, por lo que se requiere que la receptora es-

té mutada en algunos de los genes incluidos en este fenómeno (e.g. recBC sbcB o sbcA). Por último, en muchos organismos existe el mecanismo de - restricción-modificación antes mencionado, por lo que siempre que se -- transforma un DNA que proviene de un organismo diferente a la receptora este mecanismo debe modificarse.

E. coli ha sido considerada hasta el momento como la mejor - receptora y estabilizadora de material genético heterólogo, ya que es el microorganismo mejor conocido tanto bioquímica como genéticamente, lo -- cual ayuda mucho en el análisis del DNA clonado.

Esta cepa bacteriana debe tener ciertas características que le permitan tanto mejor transformabilidad como mayor seguridad biológica. - Algunas de estas características son las siguientes (24):

- a) La cepa debe tener algunas mutaciones que nulifiquen la acción de la endonucleasa de restricción.
- b) No debe codificar para propiedades o funciones seleccionables (ya sea por el vehículo o el fragmento clonado).
- c) Debe ser deficiente en recombinación
- d) Debe tener algunas mutaciones que no permitan su sobrevivencia en ambientes ajenos a las condiciones experimentales (e.g. dapD8, thyA (24)).
- e) Debe tener disminuido su eficiencia como receptora de la mayoría de los plásmidos sexuales.

Estas dos últimas propiedades aunadas a la no-transferibilidad del vehículo proporciona una mayor contención del material genético recom

binado, lo cual es importante en los experimentos de clonación molecular de DNA.

### Detección y caracterización

El objetivo en los experimentos de clonación molecular de DNA es generalmente obtener moléculas híbridas de DNA que consisten del vector y un fragmento de DNA heterólogo. La ligasa de DNA une fragmentos de DNA al azar, así que solo cierta proporción de las moléculas recombinantes llevarán el fragmento deseado unido al vector.

Muchas veces la detección de la clona deseada es directa, ya que, el fragmento codifica para una propiedad seleccionable (e.g. un antibiótico o requerimiento nutricional). Por lo tanto, un análisis genético de las funciones codificadas por las moléculas recombinantes, por medio de pruebas de complementación en bacterias, permite la selección de la clona deseada y una caracterización a nivel genético (25). Posteriormente, se puede hacer un análisis funcional de la clona, caracterizando el producto génico y la regulación de su síntesis en minicélulas o sistemas de síntesis de proteínas in vitro.

Normalmente un gran número de las bacterias transformantes solo llevan el DNA del vehículo, lo cual, hace más difícil la búsqueda de la clona específica. Una manera, por la cual se pueden detectar entre las bacterias transformantes las que lleven moléculas recombinantes de DNA, es mediante la inactivación de un gene del vector que codifi

ca para un marcador nutricional o para resistencia a un antibiótico (diferente al utilizado para detectar la bacteria transformante), mediante -- la inserción de DNA. Este proceso, conocido como inactivación insercio-- nal (26), es principalmente utilizada en genes para resistencia a antibió-- ticos del vehículo, insertando DNA en uno de sus sitios únicos.

Otra manera de detectar una molécula de DNA recombinante es -- comparando el patrón de restricción del vector con el de la molécula hí-- brida lo cual conduce, además, a una caracterización física del fragmento de DNA clonado. Principalmente, por esta razón es importante que un vehí-- culo para clonación esté bien caracterizado. Este método resulta, gene-- ralmente, ser muy tedioso por lo que se han desarrollado procedimientos -- de aislamiento del DNA de plásmido que permiten su caracterización rápida-- mente.

Cuando se dispone de un RNA o un DNA radioactivo que contenga secuencias complementarias a algunas de las presentes en el fragmento de DNA que se desea clonar, la identificación de la clona es directa. En -- estos casos, el DNA de las clonas transformantes es desnaturalizado y fi-- jado a filtros de nitrocelulosa, donde por hibridización in situ con el -- ácido nucléico radioactivo, se determinan las colonias de interés (27). La cinética de asociación del DNA insertado con el DNA del organismo origi-- nal permite también una detección de la molécula recombinante (17).

La forma más directa de conocer la naturaleza del DNA que se ha insertado en el vehículo, es determinando la secuencia nucleotídica de

éste. Se han diseñado dos métodos que permiten conocer rápidamente la -  
secuencia del DNA. Uno de ellos, desarrollado por F. Sanger y colabora-  
dores (28), se basa en la síntesis y degradación controlada del DNA a --  
partir de un templado (DNA por secuenciar), un "prímero" (un fragmento -  
del DNA por secuenciar) y la polimerasa I de E. coli, donde se agrega o  
se elimina sólo un nucleótido. Un segundo método, reportado por Maxam y  
Gilbert (29), se basa en la especificidad de ciertos reactivos químicos,  
en condiciones que modifican los nucleótidos diferencialmente (hidrazina  
y metilsulfóxido) y cortan el enlace fosfodiéster en el nucleótido modi-  
ficado (piperidina y ácido clorhídrico), partiendo de un fragmento de --  
DNA marcado radioactivamente con <sup>32</sup>P en el extremo 5' con cinasa de DNA.

## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.

Como se mencionó anteriormente, la recombinación in vitro de DNA ha permitido la construcción de mejores vehículos para clonación. A continuación se describe una breve historia de la construcción de los -- vehículos que en este trabajo son de interés (Fig. 7).

La translocación accidental del transposón que lleva el gene de resistencia a ampicilina (Tn3) en el pMB1, un plásmido de origen natural (aislado clínico) cuyo modo de replicación es semejante al de ColE1 (30), originó el pMB3 que confiere inmunidad a colicina y resistencia a ampicilina.

Con el objeto de construir un plásmido más pequeño que conservara las características del pMB3, se digirió éste con la endonucleasa EcoRI en condiciones de EcoRI\* (endonucleasa EcoRI con su especificidad disminuida (31)) y los fragmentos resultantes se ligaron al azar. -- Se aisló un plásmido, el pMB8, que confería inmunidad a colicina, el cual desafortunadamente, no confería resistencia a ampicilina.

Aunque el pMB8 tiene algunas ventajas como vehículo para clonación, su marcador selectivo no es bueno (la acción de la colicina El -- es extremadamente dependiente del estado fisiológico de la célula y es -- acompañado por un alta frecuencia de mutantes espontáneas tolerantes a -- colicina) además de que no tiene sitios únicos para otras endonucleasas de restricción diferentes a EcoRI. Para tratar de resolver estos proble

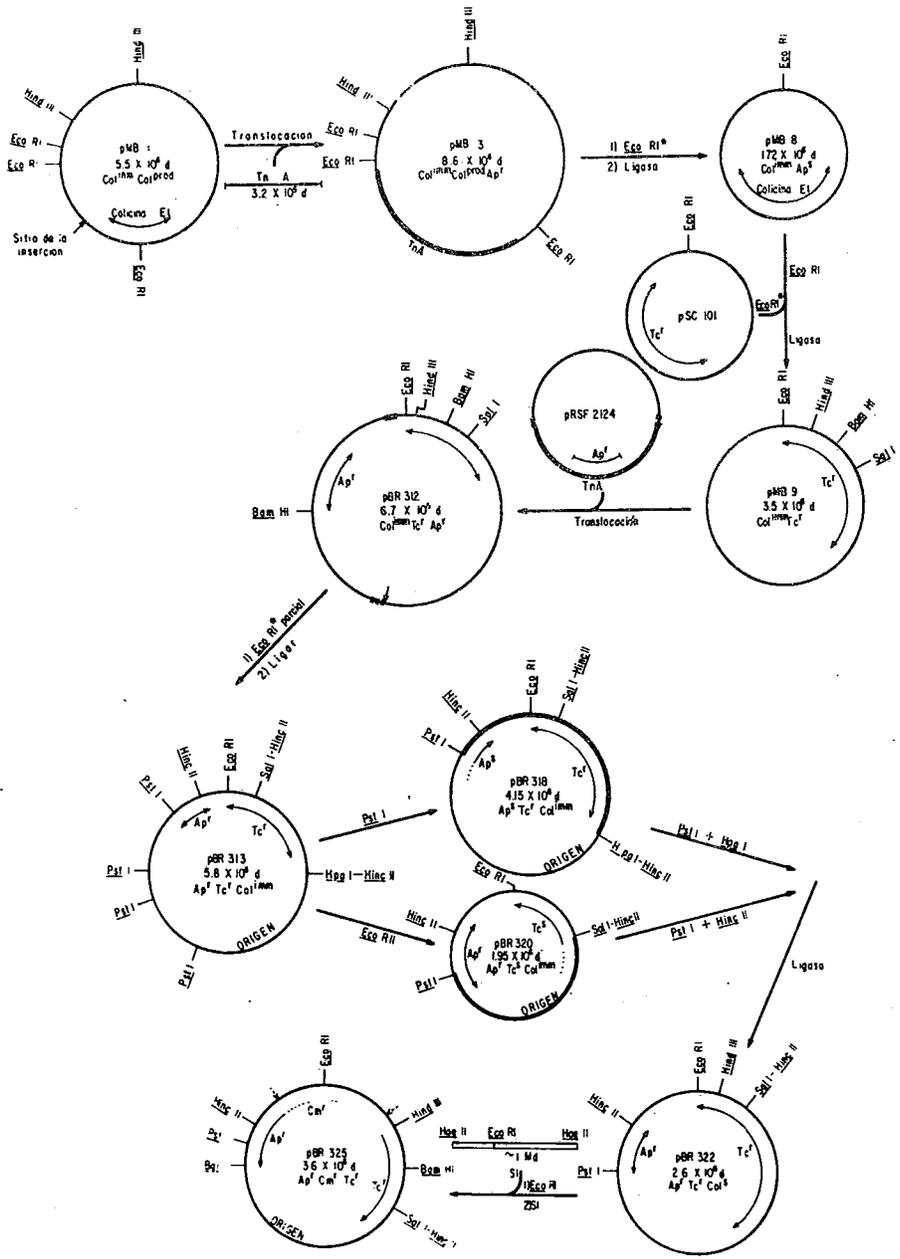


Figura 7. Diagrama general de la construcción de los vehículos para clonación pBR322 y pBR325.

mas, se incorporó en este vector otro marcador de resistencia, tetraci--  
clina, que lleva sitios para las endonucleasas de restricción HindIII, -  
SallI BamHI. Esto se logró mediante la digestión del pMB8 con EcoRI y -  
la digestión con EcoRI\* del plásmido natural pSC101. Se ligaron los ---  
fragmentos resultantes de estas digestiones y se obtuvo un plásmido al -  
que se le denominó pMB9, el cual regeneró un sitio para la endonucleasa  
EcoRI (31).

Sin embargo el pMB9 no permite la selección segura de los --  
fragmentos insertados en los sitios que inactivan tetraciclina por el --  
problema, anteriormente mencionado, de la colicina E1, por lo que se hi-  
zo necesario la presencia de otro marcador de selección "fuerte". La --  
translocación del Tn3 del pRSF2124 (32) al pMB9 fué la solución. Esta -  
translocación se logró contrtransformando ambos plásmidos (pMB9 y pRSF2124)  
y seleccionando bacterias transformantes resistentes a ampicilina y te--  
traciclina que contubieron un solo plásmido. Uno de los plásmidos con -  
la inserción de Tn3 en el pMB9 fué el pBR312. Sin embargo, este plásmi-  
do tiene dos sitios para la endonucleasa BamHI (uno se encuentra dentro  
del Tn3 y el otro en el gene que confiere resistencia a tetraciclina) y  
su peso molecular es mayor al del pMB9, lo cual disminuye su capacidad -  
como vehículo para clonación (37).

El pBR313, una reducción del pBR312 por la digestión parcial  
con EcoRI\* que eliminó el sitio de BamHI presente en el Tn3, tiene dos -  
marcadores selectivos "fuertes", ampicilina y tetraciclina (además de --  
inmunidad a colicina E1), y varios sitios únicos para endonucleasa de --

restricción (HindIII, SallI, BamHI, EcoRI, HpaI y SmaI), sin embargo, el pBR313 contiene tres sitios para la endonucleasa PstI uno de los cuales se encuentra en el gene de resistencia ampicilina (33).

Con el objeto de tener un vehículo con un sitio para la endonucleasa PstI, localizado en el gene de resistencia a ampicilina, además de los otros sitios únicos que contiene el pBR313, se construyó el vehículo pBR322. Este plásmido fué el resultado de tres experimentos de recombinación in vitro. El primero, consistió en la digestión total del pBR313 con la endonucleasa PstI, ligando todos los fragmentos de DNA generados y seleccionando las transformantes por el fenotipo  $Tc^R$  (resistencia a tetraciclina). Un plásmido  $Ap^S Tc^R Col^{imm}$  (pBR318) que contenía un solo sitio para la endonucleasa PstI fué elegido. El segundo experimento consistió en la digestión total con la endonucleasa EcoRI del pBR313 ligando los fragmentos de DNA y seleccionando transformantes por el fenotipo  $Ap^R$  (resistencia a ampicilina). Un plásmido  $Ap^R Tc^S$  (pBR320) fué -- elegido para posteriores experimentos. El tercer experimento fué la -- unión de un fragmento PstI - HpaI que lleva el gene de resistencia a tetraciclina del pBR318 al fragmento PstI - HincII del pBR320 que lleva el origen de replicación y la porción de DNA del gene de resistencia a ampicilina que le falta al pBR318. Los plásmidos resultantes fueron seleccionados por el fenotipo  $Ap^R Tc^R$ , los cuales fueron numerosos y correspondían a la unión de los dos fragmentos mezclados. Además de entre estos plásmidos se encontró un plásmido  $Ap^R Tc^R$  aún más pequeño, seguramente -- resultado de un fenómeno de recombinación in vivo, este plásmido fué de-

nominado pBR322. El pBR322 contiene un sitio único en el gene de resistencia a ampicilina (PstI), tres sitios únicos en el gene de resistencia a tetraciclina (HindIII, SalI, BamHI) y un sitio único para la endonucleasa EcoRI (20).

Debido a la gran cantidad que puede purificarse de la endonucleasa EcoRI, un vehículo para clonación que permitiera la fácil selección de moléculas recombinantes de DNA por inserción de fragmentos generados por la endonucleasa EcoRI sería muy útil. El gene de resistencia a cloranfenicol contenido por el fago PlCm contiene un sitio para la endonucleasa EcoRI, y este puede ser aislado en un fragmento después de la digestión con la endonucleasa HaeII del fago PlCm. Usando este fragmento de DNA tratado con nucleasa S1, y ligándolo al pBR322 que previamente había sido digerido con EcoRI y tratado con nucleasa S1, se construyó el pBR325, el cual presenta el fenotipo  $Ap^r Tc^r Cm^r$ . Este plásmido contiene un sitio único para la endonucleasa EcoRI en el gene de resistencia a cloranfenicol además de los otros sitios únicos que contiene el pBR322 (21).

Principalmente, son dos los objetivos de este trabajo:

- 1) Reducción de tamaño de los plásmidos pBR322 y pBR325 de tal manera que conserven sus propiedades como vehículos moleculares para clonación.
- 2) Construcción de un vehículo molecular para clonación con sitios únicos para las endonucleasas PvuII y BalI.

## MATERIALES Y METODOS

a) Cepas bacterianas

Las células receptoras usadas en los experimentos de transformación fueron dos cepas de Escherichia coli K-12:

RRL, que es una derivada Rec<sup>+</sup> de HB101 (F<sup>-</sup> pro leu thi lacY rpsL20 hsdR hsdM ara-14 galK-2 xyl-5 mtl-1 supE44 Str<sup>r</sup> EndoI<sup>-</sup> RecA<sup>-</sup>) -- (Boyer & Roulland-Doussoix, 1969) y, cuando se requirió DNA no metilado -- en 5' citosina para realizar digestiones con la endonucleasa EcoRII, la cepa GM31 (dcm-6 thr-1 leu-6 thi-1 his lacY galK-2 galT-22 ara-14 tonA31 tsx78 supE44 Str<sup>r</sup> hsdR hsdM mec<sup>-</sup>).

b) Medios de cultivo

Los inóculos se hicieron en caldo Luria (LB), el cual contiene: Bacto-Triptona (Difco) al 1.0%, extracto de levadura (Difco) al 0.5%, NaCl al 1.0% y NaOH 2.5 mM. Cuando se deseó aislar alguna cepa se usó -- caldo Luria sólido, el cual contiene: agar (Difco) al 2.0% y ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol, cuando fue necesario, en una concentración de 30 mg/l.

El medio mínimo M9 usado para la purificación de plásmido, -- está constituido por: 20 ml de glucosa al 20%, 4 gr de casaminoácidos -- (Difco), 10 ml de MgSO<sub>4</sub> 0.1 M, 10 ml CaCl<sub>2</sub> 0.01 M, 100 ml de sales 10X -- (por litro: 132 gr de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 30 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 gr de NaCl, 10 gr de NH<sub>4</sub>Cl), los requerimientos de cada cepa (4 ml de: prolina al 4%, leucina

al 1%, histidina al 1%, treonina al 2%; 0.2 ml de vitamina B1 al 0.1%) y 860 ml de agua destilada. Los requerimientos fueron esterilizados por filtración y la glucosa y las sales 10X esterilizados por separado en el autoclave.

c) Purificación de DNA de plásmido

El DNA de los plásmidos pBR322 y pBR327 fué preparado amplificando cultivos en crecimiento en fase exponencial por la adición de 170 mg/l de cloranfenicol (34). Para la amplificación de células que llevan los plásmidos pBR325 y pBR328 (resistentes al cloranfenicol) se usó espectinomycin (300 mg/l).

La extracción y purificación del DNA de plásmido se hizo conforme al método de lisado claro, descrito por Betlach et al (1976) (30), el cual consta de los siguientes pasos:

1. Incubar 5-10 ml de cultivo en LB toda la noche.
2. Agregar 5 ml de este cultivo a un litro de medio mínimo M9.
3. El cultivo es incubado a 37°C con aireación a una densidad celular de  $4-5 \times 10^8$  células/ml (35-50 unidades Klett, filtro rojo) tiempo en el cual se añade cloranfenicol o espectinomycin (si la cepa es resistente al cloranfenicol) y la aireación se continúa por 16<sup>+</sup>2 horas. (Este paso debe usarse para plásmidos relajados. Es importante añadir el cloranfenicol o espectinomycin antes de que el cultivo llega a fase estacionaria).
4. En este punto los cultivos pueden ser almacenados en frío por varias horas si es necesario.

5. Centrifugar: rotor GSA (Sorvall), 7000 r.p.m., 10 min, 4°C.
6. Lavar las células con NaCl al 0.85% (solución isotónica) y centrifugar nuevamente: rotor GSA (Sorvall), 7000 r.p.m., 10 min, 4°C.
7. Congelar las pastillas de células (hielo seco/EtOH se puede -- usar para el congelamiento rápido y completo).
8. Resuspender las células en un total de 10 ml/litro de cultivo de sacarosa al 25% en Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8. Mantener en hielo. (los agregados celulares deben ser separados -- mezclando pero con precaución para no lisar las células en este momento).
9. Añadir, lo siguiente por litro en el orden dado (en hielo):
  - 3 ml de EDTA 0.25 M pH 8.
  - 1 ml de lisozima (5 mg/ml en Tris-HCl 0.025 M, pH 8)
  - 0.1 ml de RNAasa (10 mg/ml en acetato de sodio 0.1 M, EDTA 3.3 x 10<sup>-5</sup> M, pH 5, precalentando durante 10 min a 85°C para eli-- minar la DNAasa. (las soluciones de lisozima y RNAasa deben -- ser almacenadas congelandolas a -20°C en pequeñas alícuotas de 2-5 ml).
10. Mezclar suavemente y dejar en hielo 15 min. (las células se -- convierten en esferoplastos).
11. Añadir 3 ml de mezcla lítica de Tritón 3X (3 ml de Tritón X-100 al 10%, 75 ml de EDTA 0.25 M, 15 ml de Tris-HCl 1 M, pH 8, 7 ml de H<sub>2</sub>O), mezclar suavemente y dejar en hielo 15 min. (Los esferoplastos se lisan).
12. Centrifugar en tubos de polipropileno de 50 ml: rotor SS34 -- (sorvall), 18000 r.p.m., 40 min, 4°C.
13. Decantar el sobrenadante en una probeta graduada de plástico - (el DNA se pega al vidrio) inmediatamente después de sacar los tubos del rotor. Anotar el volumen y vaciar en botellas de plás tico de 250 ml.

14. Añadir un volumen de agua bidestilada (esto hace la sacarosa menos densa que el fenol.
15. Añadir un volumen (respecto al total) de fenol saturado frío (fenol saturado con amortiguador: una mezcla 1:1 de fenol -- destilado sobre zinc, y Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5. Equilibrar toda la noche con agitación), mezclar suavemente - y añadir un volumen de cloroformo igual al de fenol, mezclar.
16. Centrifugar: rotor HS-4 (Sorvall), 6500 r.p.m., 10 min, 4°C.
17. Pasar la fase superior (acuosa) a otra botella de 250 ml -- (evitar la película de proteína en la interfase).
18. Añadir 1/30 del volumen de NaCl 5 M a la fase acuosa. Luego añadir dos volúmenes de etanol a -20°C. Dejar a -20°C una -- hora o más. (Esto precipita el DNA).
19. Centrifugar: rotor HS-4 (Sorvall), 6500 r.p.m., 60 min, -5°C. Descartar el sobrenadante y secar el exceso de líquido en la botella con un "kleenex" y luego con aire.
20. Resuspender el precipitado en 5 ml de agua. Añadir 1 ml de - glicerol estéril y mezclar suavemente. (El glicerol hace la solución más densa, de tal manera que el DNA baja en la superficie de la columna).
21. Colocar la suspensión en una columna de A50 (partículas de -- gel de agarosa para cromatografía por filtración; Bio-Rad) de 2 x 35 cm corrida con amortiguador A50 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM,  $\text{NaN}_3$  1 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Colectar fracciones de 4 ml.
22. Determinar la densidad óptica (O.D.) a 260 nm de cada frac--- ción. El DNA debe encontrarse en los primeros 40 tubos (4 -- ml/tubo); generalmente entre los tubos 15-25. (Una O.D. de - 1.0 equivale a 50  $\mu\text{gr}$  de DNA/ml).

23. Juntar las fracciones que contienen el DNA de plásmido. Añadir dos volúmenes de etanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ , congelar por una hora o más. Centrifugar: rotor HS-4 (Sorvall), 6500 r.p.m., 60 min,  $-5^{\circ}\text{C}$ .
24. Secar el precipitado con aire.
25. Resuspender el precipitado en 2.1 ml de amortiguador TEN (Tris-HCl 10 mM, NaCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.6) por cada 500  $\mu\text{gr}$  de DNA.
26. Gradiente isopícnico a equilibrio de cloruro de cesio-yoduro de propidio (PdI).

(El yoduro de propidio se intercala en el DNA de doble cadena, prefiriendo el DNA lineal y circular relajado (con rupturas en una sola cadena o "nicks") sobre el superenrollado. El PdI es menos denso que el DNA, entonces las formas lineales adquieren una más baja densidad, relativa al DNA de plásmido covalentemente cerrado (superenrollado) en presencia del compuesto. Sin PdI se obtendrían dos bandas de DNA muy poco separadas, ya que el DNA superenrollado es más denso que la forma lineal o relajada. El PdI aumenta la separación de estas bandas).

#### Preparación del gradiente:

- a) 2.2 gr de CsCl (sólido)
- b) 2.1 ml de DNA en TEN (cada tubo no debe contener más de 500  $\mu\text{gr}$  de DNA)

El trabajo, desde este punto, debe hacerse en la obscuridad (el PdI reacciona con la luz visible).

- c) 150  $\mu\text{l}$  de una solución de 2 mg/ml de PdI
- d) Cubrir con 2.3 ml de aceite mineral. Se balancean los tubos, dentro de las camisas, con aceite mineral.

27. Centrifugar: rotor SW50.1 (Beckman), 38000 r.p.m., 20 hrs, - 20°C.
28. El DNA en el gradiente será visible con luz ultravioleta (UV), ya que el PdI fluoresce. Se observarán dos bandas: la superior, formada por DNA bacteriano y plásmido roto; y la inferior, formada por el plásmido superenrollado (los intermediarios de replicación del plásmido producen un tenue barrido entre las dos bandas).
29. En la obscuridad y bajo luz UV: picar el fondo de los tubos y coleccionar, lentamente, el DNA de plásmido en un tubo de plástico.
30. Usar una columna de intercambio iónico (Dowex 50W-X8, Bio-Rad; tratada con ácido y luego con base, 1 N cada uno, neutralizada y almacenada en Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 8) para eliminar el PdI. Se colocan 2-3 ml de resina en una pequeña columna, y se equilibran con 10 ml de amortiguador de resina Dowex (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 1 M, EDTA 1 mM) por cada ml de resina.
31. En la obscuridad, colocar la muestra diluída 1:1 con amortiguador Dowex (si no se diluye el CsCl, el complejo DNA-PdI se mueve demasiado rápido a través de la columna), eluir lentamente y añadir, por lo menos, un volumen de columna de amortiguador Dowex para lavar el DNA remanente. Revisar con luz UV si todo el PdI se ha eliminado; si algo se salió, correr el eluato a través de otra columna.
32. Dializar el DNA contra 2-4 litros de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8, por 6-8 hrs a 4°C. Repetir la operación una o dos veces más.
33. Sacar el DNA de la bolsa de diálisis, y precipitar añadiendo 1/25 del volumen de NaCl 5 M y dos volúmenes de etanol a -20°C. Dejar a -20°C por una hora o más.

34. Centrifugar: rotor HS-4 (Sorvall), 6500 r.p.m., 60 min, -5°C.
35. Resuspender en 0.5-1 ml de amortiguador TEN. Medir la densidad óptica a 260 nm para determinar la concentración de DNA -- (generalmente de 0.5-1 mg/ml).
36. Almacenar a -20°C.

d) ENZIMAS

a. Endonucleasas de restricción

Con excepción de BalI, PvuI, PvuII y AvaI (P.L. biochemicals), las otras enzimas de restricción usadas en este trabajo fueron purificadas de acuerdo al procedimiento de Greene et al (1978) ( 35). Las condiciones fueron como siguen (Bolívar et al, 1977):

Se adicionó a la mezcla de reacción 1/10 del volumen de amortiguador 10X de la enzima usada; nunca se usó un volumen de enzima mayor que el de la solución amortiguadora 10X.

Amortiguadores 10X:

EcoRI:

Tris-HCl (pH 7.5) 1 M

MgCl<sub>2</sub> 0.05 M

NaCl 1.0 M

HindIII:

Tris-HCl (pH 7.5) 66 mM

MgCl<sub>2</sub> 66 mM

$\beta$ -mercaptoetanol 70 mM

NaCl 0.5 M

PstI, BamHI y EcoRI:

Tris-HCl (pH 7.5) 1 M

MgCl<sub>2</sub> 0.05 M

HpaII y HaeIII:

Tris-HCl (pH 7.5) 60 mM

MgCl<sub>2</sub> 60 mM

$\beta$ -mercaptoetanol 60 mM

AluI:

Tris-HCl (pH 7.0) 60 mM (El NaCl en una concen--

MgCl<sub>2</sub> 60 mM tración mayor de 30 mM

$\beta$ -mercaptoetanol 60 mM inhibe AluI)

HhaI:

Tris-HCl (pH 7.4) 0.5 M

MgCl<sub>2</sub> 0.05 M

ditiotreitól 0.005 M

PvuII:

Tris-HCl (pH 7.4) 60 mM

MgCl<sub>2</sub> 60 mM

$\beta$ -mercaptoetanol 60 mM

NaCl 60 mM

BSA 1 mg/ml

SallI:

Tris-HCl (pH 7.6) 80 mM

MgCl<sub>2</sub> 60 mM

EDTA 2 mM

NaCl 1.5 M

BSA 0.5 mg/ml

HinFI:

Tris-HCl (pH 7.5) 60 mM

MgCl<sub>2</sub> 60 mM

$\beta$ -mercaptoetanol 60 mM

NaCl 1.0 M

AvaI:

Tris-HCl (pH 7.4) 80 mM

MgCl<sub>2</sub> 100 mM

NaCl 300 mM

SphI:

Tris-HCl (pH 7.5) 60 mM

MgCl<sub>2</sub> 60 mM

$\beta$ -mercaptoetanol 160 mM

NaCl 500 mM

Las reacciones con endonucleasas fueron incubadas a 37°C, -- durante el tiempo requerido de acuerdo con la actividad de cada enzima, y después detenidas mediante calentamiento a 65°C durante 10 min, o adicionando 1/3-1/5 del volumen de "mezcla inactivadora" ( urea 10 M, cianol

de xileno 0.05%, azul de bromofenol 0.05%, en agua).

Cuando se hizo necesario, las muestras fueron extraídas con un volumen de fenol saturado y un volumen de cloroformo (éste tratamiento elimina la proteína adicionada) y precipitadas con dos volúmenes de etanol.

b. Nucleasa S1

La reacción con nucleasa S1 (un obsequio de P. Seeburg) fué realizada variando la temperatura de reacción (20° a 65°C) el tiempo de reacción y la cantidad de enzima utilizada.

c. Ligación del DNA

La ligasa de DNA del fago T4 (un obsequio de H. Heyneker) fué purificada de acuerdo al procedimiento descrito por Panet et al (1973) (36).

Las ligaciones se hicieron en Tris-HCl 66 mM, pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 6.6 mM, ditiotreitól 10 mM y ATP 0.5 mM a 12°C por 12 horas o más. La concentración de la ligasa de DNA del T4 y la de las terminales del DNA fueron variadas para promover polimerización o circularización. Cuando se ligaron fragmentos de DNA con extremos "rasos", la concentración de las terminales fué al menos 0.2  $\mu$ M y aproximadamente se añadieron 5 unidades de ligasa de DNA del T4 por ml a la mezcla de reacción (Heyneker et al, 1976) (37). Para fragmentos de DNA con extremos cohesivos, una

unidad de ligasa de DNA del T4 por ml fué suficiente y la concentración de las terminales fué ajustada de tal manera que se favorecieran las moléculas lineales (Dugaiczky et al, 1975) (38).

e) ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA Y ACRILAMIDA

La electroforesis se llevó a cabo en placas conforme a las condiciones descritas por Bolívar et al (1977). Agarosa (Bio-Rad) al 1% se disolvió mediante ebullición en amortiguador Tris-Boratos-EDTA (Trizma Base -- (Sigma) 90 mM, EDTA 2.5 mM,  $H_3BO_3$  90 mM, pH 8.2), posteriormente se vació y se deja gelificando. Las muestras, con un contenido de 0.2 - 1.0  $\mu$ gr - de DNA, se colocaron en los carriles en 15 - 30  $\mu$ l cada una. La electroforesis se llevó a cabo a 150 - 180 V a temperatura ambiente durante una hora. Este tipo de gel fué usado cuando se trató de fragmentos de peso molecular alto (1 - 4 Md).

Los geles de poliacrilamida se prepararon mezclando 3 ml de amortiguador Tris-Boratos-EDTA 10X, 7.5 ml (para acrilamida al 7.5%) de solución de acrilamida-bisacrilamida (Bio-Rad) al 28% y 0.6% respectivamente, 150  $\mu$ l de  $(NH_4)_2S_2O_8$ . Después de desgasificar al vacío, se adicionaron 15  $\mu$ l de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina) (Bio-Rad) y se vació en el molde. La electroforesis en estos geles se llevó a cabo a -- 200 V durante una hora. Se uso este tipo de gel para DNA de tamaño pequeño (0.015-1 Md).

Después de terminada la electroforesis, los geles se sumergieron en una solución de bromuro de etidio (4 mg/ml) (Calbiochem) y se iluminaron -

con una lámpara UV de onda corta (Ultraviolet Products, San Gabriel, Cal., U.S.A.).

Para fotografiar los geles se usó un filtro de gelatina amarilla No. 9 Kodak Wratten y película Polaroid NP tipo SS con una cámara MP-5 Polaroid.

Los fragmentos fueron aislados de geles de-agarosa al 1% usando agarosa de Calbiochem. (Cat. N°. 121811) como describen Finkenstein y Round (1978) (39). Los pasos son los siguientes:

1. Visualizar el gel por iluminación con una lámpara de ultravioleta y cortar la banda por purificar con una navaja. (Pueden cortarse varias bandas de diferentes geles que pesen de 0.05 - 0.1 gr cada una, las cuales, pueden procesarse simultáneamente).
2. Colocar las bandas de gel en Tris-HCl 0.1 M, pH 5.95 (0.1 ml por banda de gel) y aplastarlas comprimiéndolas tres veces con una jeringa de plástico de 1 ml (sin aguja). Recibir el homogeneizado en un tubo Pyrex para centrifugar.
3. Añadir agarosa (50  $\mu$ gr/banda de gel) (Calbiochem, Cat. N°. 121811), disuelto a 1 mg/ml en Tris-NCl 0.1 M, pH 5.95, al homogeneizado.
4. Incubar el tubo con el homogeneizado a 37°C por dos horas (Ocasionalmente el homogeneizado se incubaba, además, 2-4 horas a 4°C).
5. Eliminar el agarosa por centrifugación a 4°C durante 30 min a 19000 r.p.m. en una centrífuga Sorvall (rotor SS34). El sobrenadante contiene el DNA.
6. El DNA usado en experimentos de clonación debe purificarse más,

pasando el sobrenadante a través de un filtro Swinnex 0.45  $\mu$ m - (Millipore).

7. El sobrenadante puede concentrarse más por precipitación con -- dos volúmenes de etanol o dializando contra glicol de polietileno.

f) TRANSFORMACION DE ESCHERICHIA COLI K-12

Las células de E. coli de las cepas RRL y GM31 fueron preparadas para la transformación por el método descrito por Cohen et al (1972) (40). El procedimiento fué el siguiente:

1. Inocular 30 ml de caldo Luria con un cultivo de las cepas (RRL o GM31) crecido toda la noche, dejando crecer hasta una densidad celular de  $5 \times 10^8$  células/ml (30 unidades Klett, filtro -- rojo).
2. Pasar el cultivo a un tubo estéril y centrifugar: rotor HB-4 - (Sorvall), 10000 r.p.m., 2-5 min, 4°C. Decantar.
3. Resuspender las células en 15 ml de NaCl 10 mM frío y centrifugar nuevamente: rotor HB-4 (Sorvall), 10000 r.p.m., 2-5 min, - 4°C. Decantar.
4. Resuspender las células 15 ml de  $\text{CaCl}_2$  30 mM frío y dejar en -- hielo durante 20 - 30 min. (Esto permeabiliza la membrana).
5. Centrifugar: rotor HB-4 (Sorvall), 5000 r.p.m., 5 min, 4°C. -- Decantar.
6. Resuspender las células cuidadosamente en 3 ml de  $\text{CaCl}_2$  30 mM -- frío. Inmediatamente añadir 0.2 ml de esta suspensión a cada -- uno de los tubos, preparados previamente, que contienen 0.2 - 2  $\mu$ gr de DNA en 100  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  30 mM.

7. Dejar los tubos en hielo durante una hora.
8. Colocar los tubos a 42°C durante 70 seg y luego dejar 5 min. a 4°C.
9. Añadir a cada tubo 3 ml de caldo Luria y luego incubar durante dos horas a 37°C (Esto permite recuperar la membrana y estabilizar los plásmidos dentro de la célula).
10. Platear 0.1 - 0.2 ml de cada tubo en el medio adecuado y dejar creciendo toda la noche.

g) MICROENSAYO DEL DNA DE PLASMIDO

Este método consiste en la semipurificación de pequeñas cantidades del DNA de plásmido con el fin de caracterizarlo parcialmente. -  
Los pasos son los siguientes:

1. Cultivar 3 ml de células toda la noche en caldo Luria.
2. Transferir 1.5 ml del cultivo a un tubo "Eppendorf" y centrifugar 2 - 4 min en la microcentrifuga (Brinkman; 15000 r.p.m.).
3. Decantar, agregar los 1.5 ml restantes y volver a centrifugar.
4. Lavar las células con 1 ml de NaCl 10 mM. Centrifugar, decantar y congelar en etanol-hielo seco (30 min).
5. Resuspender en 100  $\mu$ l de sacarosa al 25% en Tris-HCl 50 mM, -- pH 8.
6. Añadir 40  $\mu$ l de EDTA 0.25 M, pH 8, mezclar.
7. Añadir 80  $\mu$ l de lisozima 5 mg/ml, mezclar. Dejar 10 min. en -- hielo.
8. Añadir 1  $\mu$ l de RNAasa 10 mg/ml, mezclar. Dejar 5 min en hielo.

9. Añadir 150  $\mu$ l de mezcla lítica de Tritón 3X, mezclar. Dejar - 10 min en hielo.
10. Añadir 200  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, mezclar y centrifugar 3-5 min.
11. Sacar cuidadosamente el precipitado mucoso con una pipeta -- Pasteur y guardar el sobrenadante.
12. Añadir al sobrenadante 400  $\mu$ l de fenol saturado, agitar. Añadir 300  $\mu$ l de CHCl<sub>3</sub> y agitar nuevamente.
13. Centrifugar 1 - 2 min y sacar cuidadosamente la fase acuosa -- colocándola en un tubo "Eppendorf" nuevo.
14. Añadir 300  $\mu$ l de CHCl<sub>3</sub>, agitar y centrifugar 30 seg.
15. Descartar la fase inferior (clorofórmica).
16. Añadir 1/25 del volumen de NaCl 5 M y 1 ml de etanol. Dejar - en etanol-hielo seco 20 - 60 min.
17. Centrifugar 2 - 5 min, decantar y resuspender en 100  $\mu$ l de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8). Dializar contra 2 litros de TE durante 2 - 4 hrs.
18. Añadir 1/25 del volumen de NaCl 5 M y dos volúmenes de etanol.
19. Centrifugar 2 - 5 min, decantar y resuspender en 15 - 30  $\mu$ l de agua. (La cantidad de DNA de plásmido recuperada es de 1 - 2  $\mu$ gr).

#### h) SECUENCIA NUCLEOTIDICA

La determinación de la secuencia nucleotídica se hizo de -- acuerdo al procedimiento descrito por Maxam y Gilbert (1977), que brevemente es el siguiente:

1. Digerir el DNA de plásmido con la endonucleasa de restricción

conveniente (de acuerdo a la región de DNA que se desea secuenciar).

2. Someter el DNA a la acción de la fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim) (2 unidades) en 300  $\mu$ l de TE. Después de 30 - 45 min extraer con fenol-cloroformo, precipitar y centrifugar.
3. Marcado de extremos 5':

Resuspender el precipitado en agua y añadir: amortiguador 10X (Tris-HCl 500 mM, pH 9.5,  $MgCl_2$  100 mM, ditiotreititol 50 mM, EDTA 1 mM) (de acuerdo con el volumen de reacción):  $\gamma$ <sup>32</sup>P-ATP (20  $\mu$ l; > 1000 Ci/mmol) (New England Nuclear) cinasa de T4 (4 - 6  $\mu$ l; purificada conforme describen Panet *et al* (1973) (36), y; completar al volumen de reacción con agua. Incubar a 37°C durante una hora.

4. Extraer y precipitar la muestra, y someterla a la acción de una segunda endonucleasa conveniente (con el objeto de separar los extremos marcados).
5. Separar en un gel de poliacrilamida los fragmentos de DNA generados por las endonucleasas. Cubrir el gel con una película de Sarán (Kleen Pack) y, sobre ésta, colocar una placa fotográfica (Kodak No-Screen Film, NS-2T). Exponer la placa durante 0.5 -- 2 hrs.
6. Usando las placas reveladas detectar las posiciones de los fragmentos marcados radioactivamente en el gel. Cortar la banda -- deseada.
7. Elución del gel de poliacrilamida:

Colocar el segmento de gel en una punta de pipeta de plástico - desechable de 1000  $\mu$ l, cuya punta ha sido sellada con calor y - colocado dentro de ésta un pequeño tapón de lana de vidrio. -- Reducir el segmento de gel a una pasta con una varilla de vidrio, cubrir la pasta con amortiguador de elución (acetato de amonio 0.5 M, acetato de magnesio 0.01 M, SDS al 0.1%, EDTA 0.1 mM) y

añadir 50  $\mu$ gr de tRNA como acarreador; sellar con "Parafilm", colocar la punta en un tubo de ensayo y mantener a 37°C por 10 hrs o más. Cortar el extremo de la punta y centrifugar dentro del tubo en una centrífuga clínica durante unos minutos; coleccionar el eluato del fondo del tubo y lavar con 0.2 ml de amortiguador, repitiendo la centrifugación. Precipitar con dos volúmenes de etanol a -20°C.

8. Resuspender el DNA eluido en 20  $\mu$ l de agua y dividir en 4 alícuotas: 6  $\mu$ l para reacciones de adenina (A) > guanina (G), 4  $\mu$ l para guanina, 5  $\mu$ l para citosina (C) y 5  $\mu$ l para citosina + timina (T).

9. Reacciones químicas:

Metilación parcial de purinas. Combinar 1  $\mu$ l de DNA acarreador sonificado (DNA de pollo, 1 mg/ml) con 5  $\mu$ l de DNA marcado con 200  $\mu$ l de cacodilato de sodio 50 mM, pH 8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, -- EDTA 0.1 mM. Mezclar y enfriar en hielo. Añadir 1  $\mu$ l de sulfato de dimetilo al 99% (10.7 M), mezclar y calentar a 20°C -- por 15 min. Parar la reacción añadiendo 50  $\mu$ l de una solución inactivadora (2-mercaptoetanol 1 M, Tris-acetato 1 M, pH 7.5, acetato de sodio 1.5 M, acetato de magnesio 0.05 M, EDTA --- 0.001 M, tRNA 0.1 mg/ml y mezclando. Añadir 750  $\mu$ l (3 volúmenes de etanol), congelar y centrifugar. Reprecipitar de 250  $\mu$ l de acetato de sodio 0.3 M, enjuagar con etanol y secar al vacío.

Rompimiento en guanina. Disolver el DNA metilado en una solución de piperidina 1 M recién diluida. Calentar a 90°C por -- 30 min en un capilar sellado. (Esta reacción abre 7-MeG cerca del enlace glicosídico, se desprende el anillo abierto del -- azúcar y se eliminan ambos fosfatos para romper el DNA donde se metiló la G). Vaciar el contenido del capilar en un tubo, liofilizar, humedecer el residuo y liofilizar nuevamente. Fi-

nalmente, disolver el residuo en 10  $\mu$ l de NaOH 0.1 M, EDTA 1 mM y añadir 10  $\mu$ l de mezcla urea-colorantes (urea 10 M, cianol de xileno 0.05%, azul de bromofenol 0.05%).

Rompimiento preferencial en adenina. Disolver el DNA metilado en 20  $\mu$ l de agua destilada. Enfriar a 0°C en hielo, añadir -- 5  $\mu$ l de HCl 0.5 M, mezclar y mantener la muestra a 0°C en hielo, mezclando ocasionalmente. Después de 2 hrs, añadir 200  $\mu$ l de acetato de sodio 0.3 M y 750  $\mu$ l de etanol, congelar, centrifugar, enjuagar y secar, luego disolver en 10  $\mu$ l de NaOH 0.1 M, EDTA 1 mM y calentar a 90°C por 30 min en un capilar sellado. (Estas reacciones desprenden, primero, con el HCl el 3-MeA preferencialmente, rompiendo el enlace glicosídico, y posterior -- tratamiento con álcali rompe el DNA, eliminando ambos fosfatos, donde se metilo la A). Vaciar el contenido en un tubo con 20  $\mu$ l de mezcla urea colorantes.

Rompimiento en citosina y timina. Combinar 20  $\mu$ l de agua destilada, 1  $\mu$ l de DNA acarreador sonificado (1 mg/ml) y 5  $\mu$ l de DNA - marcado. Mezclar y enfriar a 0°C. Añadir 30  $\mu$ l de Hidrazina - al 95% (30 M), mezclar bien y mantener a 0°C por varios minutos. Tapar los tubos y calentar a 20°C por 15 min. Añadir 200  $\mu$ l de solución inactivadora de hidrazina (acetato de sodio 0.3 M, acetato de magnesio 0.01 M, EDTA 0.1 mM, tRNA 0.25 mg/ml, mezclar y adicionar 750  $\mu$ l de etanol, congelar, centrifugar, disolver - el precipitado en 250  $\mu$ l de acetato de sodio 0.3 M, añadir -- 750  $\mu$ l de etanol, congelar, centrifugar, enjuagar con etanol y secar. Disolver el precipitado y lavar las paredes del tubo -- con 20  $\mu$ l de piperidina 0.5 M recién diluida. Calentar por 30 min a 90°C en un capilar sellado. Liofilizar dos veces, disolver el residuo en 10  $\mu$ l de NaOH 0.1 M, EDTA 1 mM y añadir 20  $\mu$ l de mezcla urea-colorantes.

Rompimiento en citosina. Reemplazar el agua en la mezcla de -- Hidrazinólisis con 20  $\mu$ l de NaCl 4 M y aumentar el tiempo de --

reacción a 20 min. La pureza y la concentración de la hidrazina son críticos para la especificidad en las bases.

10. Preparación de las muestras:

Calentar las muestras a 90°C por 15 seg antes de colocarlas en el gel.

11. Geles de secuencia:

Los usados en este trabajo fueron geles en placa de 1.5 mm x -- 33 cm x 40 cm con 18 carriles para muestras de 10 mm de profundidad y 13 mm de ancho separados por 3 mm (adecuados para película de rayos X de 35.5 x 43.0 cm). Los geles se prepararon -- con: acrilamida (Bio-Rad) al 20% (peso/volumen, metilenbisacrilamida al 0.67% (peso/volumen), urea 7 M, Tris-Boratos 50 mM, - pH 8.3, EDTA 1 mM, persulfato de amonio 3 mM; 300 ml de solución de gel se polimeriza con TEMED en 30 min (generalmente con 30 - 50 ul de TEMED). Los geles se prepararon por lo menos -- 10 hrs antes de usarlos y se sometieron a electroforesis, sin - muestras, varias horas. La electroforesis se llevó a cabo, permitiendo cierto calentamiento (30° - 40°C) para ayudar a desnaturalizar el DNA, entre 800 y 1200 V. El azul de bromofenol -- corre con fragmentos de 10 nucleótidos y el cianol de xileno -- con 28.

12. Autorradiografía:

Cubrir el gel con una película de Sarán y marcar las posiciones de los colorantes con tinta radioactiva. Poner el gel en contacto con la película de rayos X (Kodak X-Omat) y colocarlo en un sobre (para protegerlo de la luz). Dejar exponer durante -- 2 - 3 días a -20°C.

Las reacciones se llevaron a cabo en tubos "Eppendorf" de polipropileno de 1.5 ml cubiertos con silicón. Se usó una microcenu

trifuga Eppendorf 3200/30 (Brinkman) para todas las centrifugaciones (1500 r.p.m. 120000Xg). Se utilizó sulfato de metilo - Aldrich Chemical Company, hidrazina de Eastman Organic --- Chemicals y piperidina de Fisher Scientific.

## RESULTADOS

### A. Construcción del pBR326 y el pBR327

Con el objeto de deletar un fragmento de DNA que no fuera -- esencial para la replicación o la resistencia a antibióticos del vehículo pBR322, se diseñaron dos experimentos de recombinación de DNA in vitro. Como se observa en la figura 5, existe una región del DNA localizada en tre el origen de replicación y el gene que confiere resistencia a tetraciclina ( $Tc^r$ ), que no tiene un papel indispensable en el plásmido como vehículo, y que, por lo tanto puede ser eliminada. Para esto, puede dele tarse, el fragmento de DNA en esta región generado por las endonucleasas PvuII - AvaI, o uno generado por la endonucleasa EcoRI.

Para deletar el fragmento generado por la doble digestión -- con las endonucleasas PvuII - AvaI, 10  $\mu$ g de DNA de plásmido se digirieron con la endonucleasa AvaI. Posteriormente, el producto resultante, - se digirió con la nucleasa S1 para eliminar los extremos de hélice sen- cilla generados por la endonucleasa. El DNA se digirió con la endonuclea sa PvuII y se corrió un gel de agarosa al 1%. El fragmento de DNA de ma yor peso molecular aproximadamente 3730 (54)). Se aisló del gel, se preci-- pitó con etanol y se ligó con ligasa de DNA de T4. El DNA ligado se usó para transformar la cepa de E. coli RR1: Las transformantes  $Ap^r Tc^r$  ob-- tenida se ensallaron para detectar DNA lineal de plásmido menor que el - DNA lineal de pBR322, cuando se digirieron con la endonucleasa EcoRI. A uno de los plásmidos resultantes se le denominó pBR326 (Fig. 8).

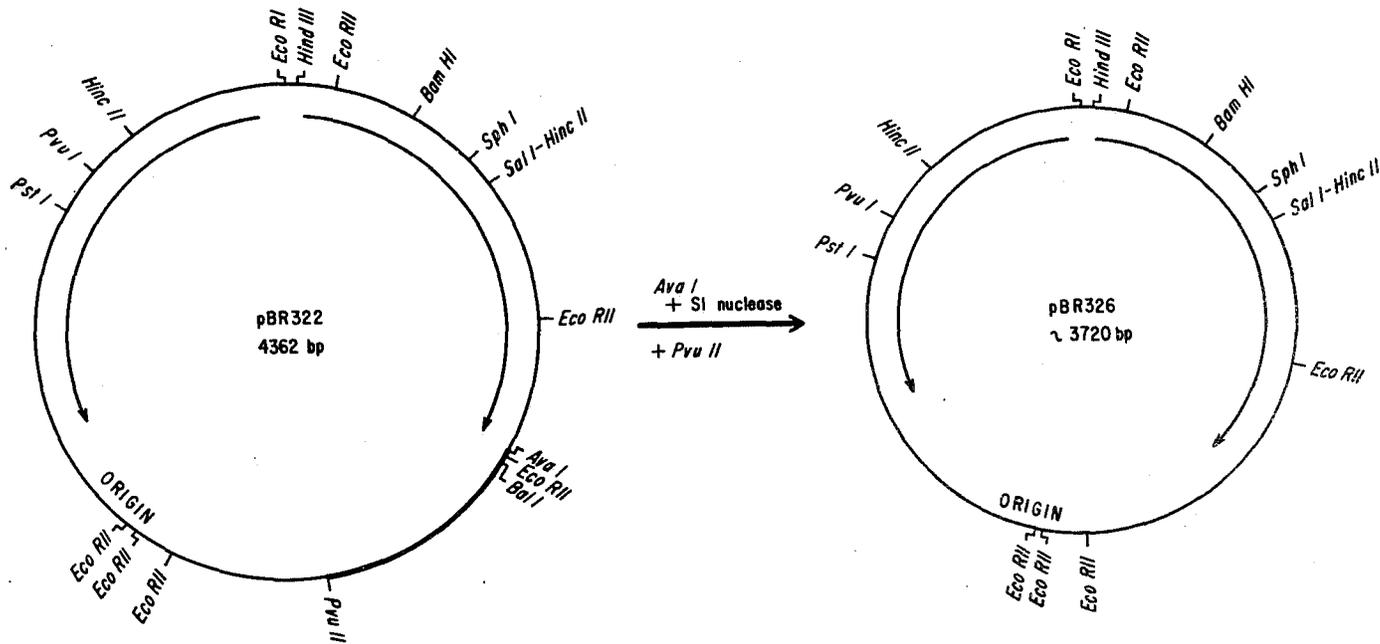


Figura 8. Diagrama de la construcción del pBR326.

El plásmido pBR322 fue primero digerido con la endonucleasa AvaI luego tratado con nucleasa S1 para eliminar los extremos 5' salientes. Posteriormente se redigirió con la endonucleasa PvuII. Esta mezcla de DNA fue tratada con ligasa de DNA de T4 y la mezcla ligada se usó para transformar la cepa de E. coli RRL.

Por otro lado, para eliminar el fragmento de DNA N°. 2 (45) generado por la endonucleasa EcoRII, 20  $\mu$ g de DNA de plásmido se digirieron parcialmente con la endonucleasa EcoRII. Los productos resultantes se trataron posteriormente con la nucleasa S1 para eliminar los extremos no complementarios generados por EcoRII en las posiciones 1440 (CCTGG) y 2500 (CCAGG) en pBR322 (41). El DNA fue corrido en un gel de agarosa al 1% y se aislaron del gel fragmentos de DNA con peso molecular de aproximadamente 3300 pares de bases (p.b.). El DNA se precipitó con etanol y se ligó con ligasa de DNA de T4. La mezcla de DNA ligado se transformó en la cepa de E. coli GM31. Las transformantes  $Ap^r Tc^r$  se ensallaron para detectar DNA lineal de plásmido menor que el DNA lineal de pBR322 cuando se digirieron con la endonucleasa EcoRI. A uno de los plásmidos resultantes se le denominó pBR327 (Fig. 9).

B. Caracterización con endonucleasas de restricción del pBR326 y el pBR327.

El mapa de restricción del pBR326 y el pBR327 se determinó usando varias endonucleasas de restricción y el mapa de restricción del pBR322 como referencia (20, 41).

a) Caracterización del pBR326

En el pBR326 se encontraron sitios únicos para las endonucleasas de restricción EcoRI, HindIII, BamHI, SphI, SalI y PstI y, tal y como se esperaría si se deletó el fragmento de PvuII - AvaI de 630 p.b.,

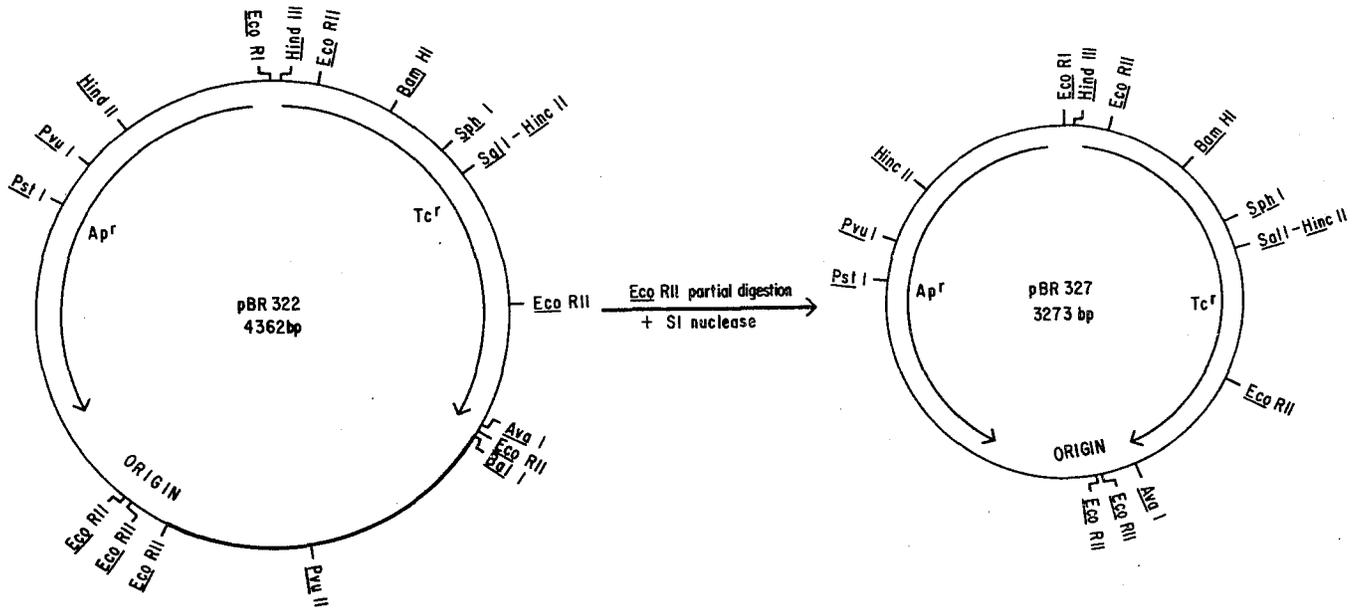


Figura 9. Diagrama de la construcción del pBR327.

El plásmido pBR322 fue digerido parcialmente con la endonucleasa EcoRI y el DNA resultante se trató con nucleasa S1 para formar extremos rasos. Esta mezcla de DNA fue -- tratada con ligasa de DNA de T4 y la mezcla ligada se uso para transformar la cepa de E. coli GM31.

no hay sitios para las endonucleasas AvaI, PvuII y BalI (datos no mostrados).

Usando otras endonucleasas se caracterizó más el pBR326. -- Así, por ejemplo, en la Figura 10 (carriles c y d) se observa que los -- fragmentos N°. 4, 8, 10 y 12A generados por HpaII del pBR322 no se encuentran en el pBR326. Sin embargo, un nuevo fragmento de HpaII es generado, el cual resultó de la fusión entre los fragmentos de HpaII N°. 4 y N°. 8 del pBR322. Similarmente, los fragmentos de HaeIII N°. 2, 3 y 10 del pBR322, no se encuentran en el pBR326, pero aparece un nuevo fragmento de HaeIII (Fig. 10, carriles a y b). Se determinó el mapa de restricción del pBR326 con varias endonucleasas usando esta estrategia (Fig. 11) y todo está de acuerdo con la delección del fragmento de PvuII - AvaI.

b) Caracterización del pBR327

El pBR327 mostró llevar sitios únicos para las endonucleasas EcoRI, HindIII, BamHI, SphI, SalI, PstI y AvaI y no llevar sitios para las endonucleasas PvuII y BalI (datos no mostrados) como se esperaría si se deletó el fragmento de EcoRII de 1060 p.b. del pBR322.

Como se muestra en la Figura 12 (carril g) el pBR322 produce seis fragmentos cuando es digerido con endonucleasa EcoRII: 1857, 1060, 928, 383, 121 y 13 p.b. (41) y el pBR327 solo produce cuatro fragmentos - (Fig. 12, carril h). Como se esperaba, el fragmento N°. 2 (1060 p.b.) -- del pBR322 desapareció en el pBR327, y los fragmentos N°. 4 y 5 se fundieron

Figura 10. Electroforesis en gel de acrilamida del DNA de los plásmidos pBR322 y pBR326 cortados con varias endonucleasas de restricción.

Los carriles a y b muestran el patrón de restricción de HaeIII de los plásmidos pBR326 y pBR322, respectivamente. Como se observa, las bandas 2, 3 y 10 del pBR322 no están presentes en el patrón del pBR326. En su lugar hay una nueva banda -- (2a banda). Los carriles c y d muestran el patrón de restricción HpaII del pBR326 y pBR322, respectivamente. Notar que las bandas 4, 8, 10 y 12A del pBR322 han desaparecido en el pBR326 y en su lugar hay una banda que corre exactamente con la banda 9 del pBR322. El patrón de restricción de AluI del pBR326 y del pBR322 se muestra en los carriles e y f, respectivamente.



Figura 12. Electroforesis en gel de acrilamida del DNA de los plásmidos pBR322 y pBR327 cortados con varias endonucleasas de restricción.

Los carriles a y b muestran el patrón de restricción HaeIII de los plásmidos pBR322 y pBR327, respectivamente. Notar que las bandas 2, 3, 10 y 18 (la última no se observa en el gel) del pBR322 no están presentes en el patrón del pBR327. En su lugar hay una nueva banda de 146 p.b. en el pBR327. Los carriles c y d muestran el patrón de restricción de HhaI del pBR322 y pBR327 respectivamente. Las bandas 2, 5, 8, 11, 14, 17, 24, 25 y 26 desaparecieron del pBR322 y nueva banda, que corre como la banda 10 del pBR322, aparece en el pBR327. Los patrones de restricción de HpaI del pBR322 y pBR327 se muestran en los carriles e y f, respectivamente, notar que han desaparecido seis bandas en el patrón del pBR327 cuando se compara con el del pBR322. Una nueva banda, que corre en la misma posición de la banda 4 del pBR322, está presente en el pBR327. Los carriles g y h muestran el patrón de restricción de EcoRI del pBR327 y pBR322 respectivamente. Las bandas 2, 4 y 5 (la banda arriba de la banda 5 es una parcial), presentes en el pBR322 desaparecieron en el pBR327. Una nueva banda de 475 p.b., resultado de la fusión de las banda 4 y 5, -

en un nuevo segmento de EcoRII. Al igual que con el pBR326, se usaron - otras endonucleasas para caracterizar mejor el pBR327 (Fig. 12, carriles a, b, c, d, e, f, i, j) y todo el mapa de restricción está de acuerdo - con una delección aproximada de 1090 p.b.

#### C. Secuencia nucleotídica del pBR327

Para caracterizar completamente el plásmido pBR327 se determinó la secuencia nucleotídica para la región de DNA donde se habían fun dido los sitios de EcoRII tratados con nucleasa S1 del pBR322.

Se digirió el plásmido pBR327 con la endonucleasa AvaI, el - DNA resultante se marcó con  $\gamma^{32}$ P-ATP y cinasa de DNA de T4 y se redigi- rió con HinfI. La Figura 13 muestra la secuencia nucleotídica desde el sitio de AvaI en el sentido de las manecillas del reloj. Usando la se- cuencia nucleotídica del pBR322 (41), se puede concluir que la delección que dió lugar al pBR327 comprende exactamente 1089 p.b. Ya que, el aná- lisis con endonucleasas de restricción de pBR327 indica que no hubo nin- gún otro cambio durante su construcción, se puede asumir que la secuen- cia nucleotídica de este vehículo para clonación se conoce completamente (Fig. 14). En base a esta suposición y a digestiones con varias endo- nucleasas de restricción se derivó el mapa de restricción del pBR327 --- (Fig. 15).

#### D. Construcción del pBR328.

Con el fin de construir un vehículo para clonación con si---

a

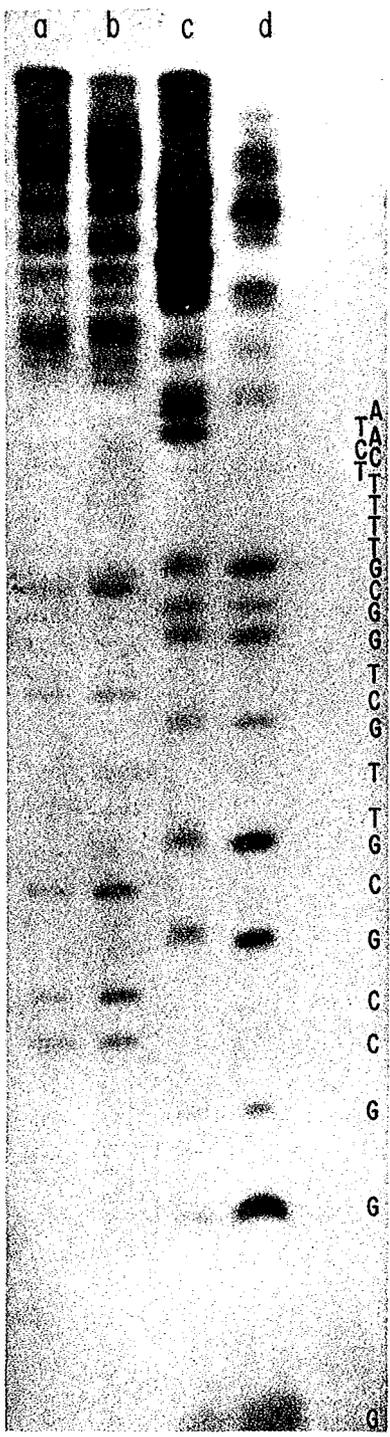


Figura 13. La secuencia nucleotídica en la región donde ocurrió la dele-  
ción durante la construcción del plásmido pBR327.

- a) El plásmido pBR327 fue obtenido del pBR322 después de una  
digestión parcial de EcoRI seguida por un tratamiento con  
nucleasa S1. Para determinar la secuencia nucleotídica en  
la unión del pBR327, el DNA de este plásmido fue digerido  
con la endonucleasa AvaI. El DNA linealizado fue marcado  
 $\gamma^{32}$ -P ATP y cinasa T4 de DNA y finalmente digerido con la  
endonucleasa HinfI. La secuencia nucleotídica resultante  
desde el sitio de AvaI (en el sentido de las manecillas --  
del reloj), en la unión se determinó y se muestra en la --  
figura.
- b) La región subrayada en la secuencia del pBR322 se conservo  
en el pBR327. La secuencia GGC de las posiciones 1428 a -  
1430, en el pBR327, podrían provenir de cualquier lado --  
(mostrando por las líneas discontinuas) en la unión.

Figura 14. La secuencia nucleotídica completa del pBR327.

Ya que el análisis de los sitios de restricción del pBR327 - indica que excepto la delección, ningún otro cambio ocurrió - durante la construcción de este vector a partir del pBR322, y debido a que la fuente del DNA de pBR322 que se usó está - muy relacionada a la usada por Sutcliffe para la determina-- ción de la secuencia nucleotídica original del pBR322, asumi mos que la secuencia nucleotídica del pBR327 es idéntica a - la del pBR322 (41) menos la delección de 1089 p.b. La secuen cia es presentada en forma de doble cadena. La cadena de -- arriba es 5' → 3'. La secuencia esta numerada consideran do que 0 es la mitad del sitio único EcoRI y la numeración - aumenta en el sentido de las manecillas del reloj primero a través del gene  $Tc^R$ , luego por la región de replicación y -- finalmente a través del gene  $Ap^R$ .

(GAA) TTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTAT  
50  
AAGAGTACAAACTGTCGAATAGTAGCTATTCGAAATTACGCCATCAAATA

CACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGGCCACCGTGTATGAAATCTAAACAAT  
100  
GTGTCAATTTAACGATTGCGTCAGTCCGTGGCACATACTTTAGATTGTTA

GCGCTCATCGTCATCCTCGGCACCGTCACCCCTGGATGCTGTAGGCATAGG  
150  
CGCGAGTAGCAGTAGGAGCCGTGGCAGTGGGACCTACGACATCCGTATCC

CTTGTTATGCCGGTACTGCCGGCCTCTTGCGGGATATCGTCCATTCCG  
200  
GAACCAATAACGGCCATGACGGCCCGGAGAACGCCCTATAGCAGGTAAGGC

ACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGCTGCTAGCGCTATATGCGTTGATG  
250  
TGTCGTAGCAGGTCAGTGATACCGCACGACGATCGCGATATACGCAACTAC

CAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTTTGGCCG  
300  
GTTAAAGATACGCGTGGGCAAGAGCCTCGTGACAGGCTGGCGAAACCGGC

CCGCCAGTCCTGCTCGCTTCGCTACTTGGAGCCACTATCGACTACGCGA  
350  
GGCGGGTCAGGACGAGCGAAGCGATGAACCTCGGTGATAGCTGATGCGCT

TCATGGCGACCACACCCGTCTGTGGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTG  
400  
AGTACCGCTGGTGTGGGCAGGACACCTAGGAGATGCGGCCTGCGTAGCAC

GCCGGCATCACCGGCCACAGGTGCGGTGCTGGCGCCTATATCGCCGA  
450  
CGGCCGTAGTGGCCGCGGTGTCCACGCCAACGACCGCGGATATAGCGGCT

CATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTT  
500  
GTAGTGGCTACCCCTTCTAGCCCGAGCGGTGAAGCCCGAGTACTCGCGAA

GTTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGACTGTTGGGCG  
550  
CAAAGCCGCACCCATACCAACCGTCCGGGCACCGGCCCCCTGACAACCCGC

CCATCTCCTTGCATGCACCATTCCTTGCGGCGGGCGGTGCTCAACGGCCTC  
 GGTAGAGGAACGTACGTGGTAAGGAACGCCGCCACGAGTTGCCGGAG 600

AACCTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCG  
 TTGGATGATGACCCGACGAAGGATTACGTCTCAGCGTATTCCCTCTCGC 650

TCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGG  
 AGCTGGCTACGGGAACCTCTCGGAAGTTGGGTCAGTCGAGGAAGGCCACCC 700

CGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCACTTATGACTGTCTTCTTTATCATG  
 GCGCCCCGTACTGATAGCAGCGCGTGAATACTGACAGAAGAAATAGTAC 750

CAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCATTTTCGGCAGGA  
 GTTGAGCATCCTGTCCACGGCCGTCGCGAGACCCAGTAAAAGCCGCTCCT 800

CCGCTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCTGTCGCTTGGCGTATTCCG  
 GGCGAAAGCGACCTCGCGCTGCTACTAGCCGGACAGCGAAACGCCATAAGC 850

GAATCTTGCACGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACTGGTCCCGCCACCAAA  
 CTTAGAACGTGCGGGAGCGAGTTCGGAAGCAGTGACCAGGGCGGTGGTTT 900

CGTTTCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGCGGCCGACCGCT  
 GCAAAGCCGCTCTTCGTCCGGTAATAGCGGCCGTACCGCCGGCTGCGCGA 950

GGGCTACGTCTTGCTGGCGTTTCGCGACGCGAGGCTGGATGGCCTTCCCCA  
 CCCGATGCAGAACGACCGCAAGCGCTGCGCTCCGACCTACCGGAAGGGGT 1000

TTATGATTCTTCTCGCTTCCGGCGGCATCGGGATGCCCGCGTTGCAGGCC  
 AATACTAAGAAAGAGCGAAGGCCCGCTAGCCCTACGGGCGCAACGTCCGG 1050

ATGCTGTCCAGGCAGGTAGATGACGACCATCAGGGACAGCTTCAAGGATC  
 TACGACAGGTCCGTCCATCTACTGCTGGTAGTCCCTGTCGAAGTTCCTAG 1100

GCTCGGGCTCTTACCAGCCTAACTTCGATCACTGGACCGCTGATCGTCA  
CGAGCGCCGAGAATGGTCGGATTGAAGCTAGTGACCTGGCGACTAGCAGT  
1150

CGGCGATTTATGCCGCCCTCGGCGAGCACATGGAACGGGTTGGCATGGATT  
GCCGCTAAATACGGCGGAGCCGCTCGTGTACCTTGCCCAACCGTACCTAA  
1200

GTAGGCGCCGCCCTATACCTTGTCTGCCTCCCCGCGTTGCGTCGCGGTGC  
CATCCGCGGCGGGATATGGAACAGACGGAGGGGCGCAACGCAGCGCCACG  
1250

ATGGAGCCGGGCCACCTCGACCTGAATGGAAGCCGGCGGCACCTCGCTAA  
TACCTCGGCCCGGTGGAGCTGGACTTACCTTCGGCCGCCGTGGAGCGATT  
1300

CGGATTCACCACTCCAAGAATTGGAGCCAATCAATTCTTGCGGAGAACTG  
GCC'TAAGTGGTGAGGTTCTTAACCTCGGTTAGTTAAGAACGCCTCTTGAC  
1350

TGAATGCGCAAACCAACCCTTGGCAGAACATATCCATCGCGTCCGCCATC  
ACTTACGCGTTTGGTTGGGAACCGTCTTGTATAGGTAGCGCAGGCGGTAG  
1400

TCCAGCAGCCGCACGCGGCGCATCTCGGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCC  
AGGTGCTCGGCGTGCGCCGCGTAGAGCCC GGCGCAACGACCGCAAAAAGG  
1450

ATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAG  
TATCCGAGGCGGGGGGACTGCTCGTAGTGTTTTTAGCTGCGAGTTCAGTC  
1500

AGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGG  
TCCACCGCTTTGGGCTGTCCTGATATTTCTATGGTCCGCAAAGGGGGACC  
1550

AAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACC  
TTCGAGGGAGCACGCGAGAGGACAAGGCTGGGACGGCGAATGGCCTATGG  
1600

TGTCGCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGC  
ACAGGCGGAAAGAGGGAAGCCCTTCGCACCGCGAAAGAGTTACGAGTGCG  
1650

TGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGT  
ACATCCATAGAGTCAAGCCACATCCAGCAAGCGAGGTTTCGACCCGACACA 1700

GCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATC  
CGTGCTTGGGGGCAAGTCGGGCTGGCGACGCGGAATAGGCCATTGATAG 1750

GTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCC  
CAGAACTCAGGTTGGGCCATTCTGTGCTGAATAGCGGTGACCGTCTCGG 1800

ACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTT  
TGACCATTGTCCTAATCGTCTCGCTCCATACATCCGCCACGATGTCTCAA 1850

CTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTA  
GAACTTCACCACCGGATTGATGCCGATGTGATCTTCTTGTCATAAACCAT 1900

TCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCT  
AGACGCGAGACGACTTCGGTCAATGGAAGCCTTTTTCTCAACCATCGAGA 1950

TGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAA  
ACTAGGCCGTTTTGTTGGTGGCGACCATCGCCACCAAAAAACAAACGTT 2000

GCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCT  
CGTCGTCTAATGCGCGTCTTTTTTTCCTAGAGTTCTTCTAGGAACTAGA 2050

TTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATT  
AAAGATGCCCCAGACTGCGAGTCACCTTGCTTTTGAGTGCAATTCCCTAA 2100

TTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA  
AACCAGTACTCTAATAGTTTTTTCCTAGAAGTGGATCTAGGAAAATTTAAT 2150

AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTG  
TTTACTTCAAAATTTAGTTAGATTCATATATACTCATTTGAACCAGAC 2200

ACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTA  
TGTCAATGGTTACGAATTAGTCACTCCGTGGATAGAGTCGCTAGACAGAT  
2250

TTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCTGTAGATAACTACGAT  
AAAGCAAGTÄGGTATCAACGGACTGAGGGGÄCAGCACATCTÄTTGATGCTA  
2300

ACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACC  
TGCCCTCCCGAATGGTAGÄCCGGGGTÄCÄGÄCGTÄACTÄTÄGGCÄGCTÄCTÄGG  
2350

CACGCTCÄCCGGCTCCAGÄTTTÄTÄCÄGÄCÄAÄTÄAÄCCÄGÄCCÄGÄCCÄGÄAÄGG  
GTGCGAGTGGCCGAGGTCTÄÄÄTÄGÄTÄCGTÄTÄTTÄGGTÄCGGTÄCGGCCTTCC  
2400

GCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTÄTÄCCGCTCCATCCAGTCTÄTÄ  
CGGCTCGGCTCTTÄCÄCCÄGÄGÄCÄGTTÄGÄÄÄTÄGGCÄGÄGGTÄGGTÄCÄGÄTÄ  
2450

TAÄTTGTTGCCGGÄAGCTÄGÄGÄTÄAGTÄGTTÄCGCCÄGTTÄÄTÄGTTTÄGC  
ÄTTÄÄCÄÄCÄGGCCCTTÄCÄGÄTCTÄTÄCÄTÄCÄÄGÄCGGTÄCÄÄTTÄTÄCÄÄÄCÄG  
2500

GCAÄCÄGTTGTTGCCÄTTGCTGÄCÄGGCÄTÄCGTGGTÄGTCÄCÄGCTÄCGTÄCGTTT  
CGTTGÄCÄÄCÄÄCÄGGTÄÄCÄGÄCÄGTTCCGTÄGÄCÄCCÄCÄGÄTÄGÄCÄGÄCÄGÄCÄÄÄÄ  
2550

GGTÄTGGCTTÄCÄTÄCÄGCTCCGGTÄTCCÄÄCÄGÄTÄCÄÄGGCÄGÄTÄCÄTÄG  
CCÄTÄCCGÄÄGÄTÄÄGÄTÄCÄGÄGGCÄÄGGGTÄGCTÄGÄTÄCCGCTÄÄTÄGÄTÄC  
2600

ÄTÄCCCCÄTÄGTTGÄCÄÄÄÄÄÄÄGÄCGGTÄGÄCTÄCCTÄTÄCGGTÄCCTÄCCGÄTÄCG  
TÄGGGGTÄCÄÄCÄCÄGTTTÄTTTÄCGCÄÄTÄCÄGÄGÄÄGÄCCÄGÄGÄGGTÄGÄC  
2650

TTGÄCÄGÄÄGÄTÄÄGTTGGCCGÄGTTÄTÄCÄTÄCÄTÄGÄTÄTÄGÄCÄGÄCÄ  
ÄÄCÄGÄTCTTÄCÄTÄCÄÄCCGGCTÄCÄÄÄTÄGÄTÄGÄTÄCÄÄÄTÄCÄCCGÄTÄCGT  
2700

CTGÄCÄTÄÄTÄTCTTÄCTÄGÄTÄGÄCÄTÄCCGÄTÄÄGÄTÄGCTTTTÄCTÄGÄTÄGÄC  
GÄCÄGÄTÄTÄÄGÄGÄÄTÄGÄCÄGÄTÄCÄGGTÄGGCÄTÄTCTÄCÄGÄÄÄÄGÄCÄCTÄG  
2750

TGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGGGACCGA  
2800  
ACCACTCATGAGTTGGTTCAGTAAGACTCTTATCACATACGCCGCTGGCT

GTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGA  
2850  
CAACGAGAAACGGGCCGCAGTTGTGCCCTATTATGGCGGGTGTATCGTCT

ACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTC  
2900  
TGAAATTTTACGAGTAGTAACTTTTGCAGAAGCCCCGCTTTTGAGAG

AAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCAC  
2950  
TTCCTAGAATGGGCGACAACCTCTAGGTCAAGCTACATTGGGTGAGCACGTG

CCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCA  
3000  
GGTTGACTAGAAGTCGTAGAAAATGAAAGTGGTCGCAAAGACCCACTCGT

AAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAA  
3050  
TTTTGTCTTCCGTTTTACGGCGTTTTTTCCCFIATTCGCGCTGTGCCTT

ATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATC  
3100  
TACAACTTATGAGTATGAGAAGGAAAAAGTTATAATAACTTCGTAATAG

AGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAAT  
3150  
TCCAATAACAGAGTACTCGCCTATGTATAAACTTACATAAATCTTTTTA

AAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGT  
3200  
TTTGTTTATCCCCAAGGCGCGTGTAAGGGGCTTTTCACGGTGGACTGCA

CTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCA  
3250  
GATTCTTTGGTAATAATAGTACTGTAATTGGATATTTTTATCCGCATAGT

CGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAA (TTC)

GCTCCGGGAAAGCAGAAGTTCTT

Figura 15. Mapa de restricción del pBR327.

El mapa de los fragmentos del plásmido pBR327 fue determinado de los datos de secuencia del pBR322 (41), y la secuencia nucleotídica en la unión donde ocurrió la delección durante la construcción del pBR327 (ver Fig. 13). La longitud total es de 3273 pares de nucleotidos. La posición de "O" se ha elegido arbitrariamente a la mitad del sitio único de corte de EcoRI. La figura muestra los mapas de restricción para las endonucleasas HaeIII, AluI, HpaI, HhaI, Hinfl, SalI y MboI los cuales se indican en los círculos concéntricos. Los fragmentos están numerados por tamaños y esos tamaños se enlistan en la Tabla II. Las coordenadas exactas de los cortes de restricción se enlistan en la Tabla III. Alrededor del perímetro del mapa circular aparecen los sitios para las enzimas que cortan infrecuentemente incluyendo aquellas con sitios únicos de restricción.

tios únicos para las endonucleasas PvuII y BalI localizados en el gene de resistencia a cloranfenicol ( $Cm^r$ ) se diseñó un experimento de recombinación de DNA in vitro usando el pBR327 y el pBR325. El DNA de pBR325 se digirió con las endonucleasas PstI y BamHI, dando por resultado dos fragmentos de DNA. Como se muestra en la Figura 16, el fragmento de DNA más pequeño lleva el gene de  $Cm^r$  (21) y parte de los genes de  $Ap^r$  y  $Tc^r$ . Este fragmento fué aislado de un gel de agarosa al 1%. El plásmido pBR327 se digirió con las mismas dos endonucleasas y el fragmento más grande, que lleva el origen de replicación y las porciones remanentes de los genes de  $Ap^r$  y  $Tc^r$ , también se aisló de un gel de agarosa al 1%.

Los DNAs purificados se mezclaron, se ligaron in vitro y se transformaron en la cepa de E. coli RRL. Se seleccionaron transformantes para  $Ap^r$   $Tc^r$   $Cm^r$ . Cuatro transformantes se obtuvieron y todas mostraron contener un plásmido de peso molecular menor al del pBR325 (aproximadamente  $3.1 \times 10^6$  daltons) uno de los cuales fué el pBR328.

#### E. El mapa de restricción del pBR328

Los patrones de electroforesis en gel del DNA digerido, muestran que el pBR328 lleva sitios únicos para las endonucleasas: EcoRI, -- HindIII, BamHI, SphI, SalI, PstI, PvuI, PvuII, BalI y AvaI. Dobles digestiones del DNA de plásmidos (Fig. 17) permiten localizar las posiciones relativas de estos sitios en el pBR328, tomando en cuenta que es un derivado del pBR327 y el pBR328. De estos datos y de los patrones producidos por otras endonucleasas de restricción (Fig. 18), se construyó el mapa de

Figura 16. Diagrama de la construcción del pBR328.

El plásmido pBR325 y pBR327 se digirieron por separado con -- las endonucleasas de restricción PstI y BamHI. Los fragmentos generados se aislaron de un gel de agarosa al 1%. Las regio-- nes oscuras representan los dos fragmentos de DNA que se mez-- claron y ligaron entre sí para generar el pBR328.

Figura 17. Análisis de simples y dobles digestiones del pBR328 y pBR325 usando electroforesis en gel de agarosa.

Los estimadores de peso molecular se basaron en los seis -- fragmentos de  $\lambda$  generados por EcoRI (carriles d y l). El carril a muestra la doble digestión EcoRI - BalI del pBR328; dos fragmentos se generaron, el mas pequeño no se muestra en el gel. Los carriles b y c muestran las dobles digestiones EcoRI - PstI del pBR325 y pBR328, respectivamente. Las dobles digestiones SalI - EcoRI del pBR325 y pBR328 se muestran en los carriles e y j respectivamente. Los carriles g y h -- muestran la digestión de PvuII del pBR325 y pBR328, respectivamente. Las dobles digestiones PstI - PvuII de los plásmidos pBR325 y pBR328 se muestran en i y j, respectivamente. -- El carril k muestra la doble digestión PvuII - SalI del -- pBR328. Los carriles m y n muestran respectivamente las dobles digestiones HindIII - PstI del pBR325 (parcial) y -- pBR328 en la cual las dos bandas generadas corren en la misma posición. El carril o muestra la molécula de DNA lineal del pBR328 generada después de la digestión con BalI.

Figura 18. Electroforesis en gel de acrilamida de los fragmentos de DNA obtenidos por digestión con las endonucleasas HpaII, AluI, HinfI, EcoRII y HhaI de los plásmidos pBR328, pBR327 y pBR325.

Las digestiones con la enzima de restricción fueron como sigue: carriles a, b y c muestran las digestiones con HpaII del pBR327, pBR328 y pBR325, respectivamente. Los carriles d, e y f muestran las digestiones con AluI de los tres plásmidos en el mismo orden relativo. Las digestiones con HinfI del pBR327, pBR328 y pBR325 se muestran en los carriles g, h, i, respectivamente. Las digestiones con EcoRII del pBR327, pBR325 y pBR328 aparecen en los carriles j, k y l, respectivamente. El carril m muestra una digestión parcial con HhaI del pBR325 y los carriles n y o muestran el patrón de restricción producido por la endonucleasa HhaI del pBR328 y pBR327, respectivamente.

restricción para varias endonucleasas (Fig. 19).

F. Propiedades del pBR326, pBR327 y pBR328 como vehículo molecular para clonación de DNA

a) Clonación en el gen de  $Tc^R$ . Debido a que los sitios de restricción para las endonucleasas HindIII, BamHI, SphI y SalI están presentes en el pBR326, pBR327 y pBR328 en las mismas posiciones relativas - que en el pBR322, se asumió que éstos también están en el gene de  $Tc^R$ . -- Para verificar esta suposición, se digirió DNA de Neurospora crassa, por separado, con las endonucleasas mencionadas anteriormente, y se inserto - en los respectivos sitios de cada uno de los nuevos vehículos. Se aislaron transformantes  $Tc^S$  (sensibles a tetraciclina) que llevaran plásmidos (seleccionando por  $Ap^R$ ). Digiriendo estos plásmidos recombinantes con la endonucleasa de restricción respectiva, se encontró que contenían fragmentos de DNA de diferentes tamaños, insertados en los sitios HindIII, BamHI, SphI y SalI (datos no mostrados).

b) Clonación en el gene de  $Ap^R$ . Como en el caso anterior, - se asumió que los sitios únicos reconocidos por las endonucleasas PvuI y PstI estaban asociados con el gene de  $Ap^R$  llevado por estos plásmidos. -- Clonando DNA en estos sitios se inactivó el gene de  $Ap^R$ , y como arriba, - todos los plásmidos recombinantes contenían fragmentos de DNA de tamaño - variable insertado en los dos sitios.

c) Clonación en el gene de  $Cm^R$  del pBR328. DNA de N. crassa digerido con EcoRI se ligó al pBR328 linealizado previamente por la diges



ción con la misma endonucleasa. De igual manera, fragmentos de DNA de N. crassa generados por las endonucleasas PvuII y BalI fueron ligados, - respectivamente, al pBR328 linealizado por la digestión con PvuII o BalI. En los tres casos, las transformantes con el plásmido recombinante dieron el fenotipo  $Ap^r Tc^r Cm^s$ .

## DISCUSION

Dos nuevos vehículos moleculares para clonación, resultado de deletar regiones de DNA no esenciales para el vector pBR322, se construyeron por recombinación in vitro del DNA. Uno de ellos, el pBR326, es 630 p.b, más pequeño que su ancestro, mientras que el otro, el pBR327, resultó ser aún más pequeño (3273 p.b.). Ambos plásmidos, por ser más pequeños que el pBR322, presentan un patrón de restricción más sencillo para varias endonucleasas, por lo que son vehículos más útiles en el análisis de sitios de restricción de fragmentos de DNA clonados.

Debido a que la información genética que perdió el pBR326 -- prácticamente está incluida en el fragmento de DNA deletado al pBR327, se eligió a éste como mejor vehículo para clonación (el pBR327, además, conservó el sitio único para AvaI). Además, se ha descrito una región de -- DNA en el pBR322 ( 20, 44 ), la cual ha perdido el pBR327 pero no el -- pBR326, que está relacionada con la movilización de éste vector en presencia de los plásmidos R64drd11 y ColK en la misma célula (42). Por lo tanto, el pBR326 debería ser todavía movilizable, mientras que, el pBR327 y el pBR328 no, por lo que, estos últimos mejorarían, de manera importante, la seguridad biológica en los experimentos de clonación donde éstos se -- utilicen. Esta suposición debe, todavía, ser verificada.

Ya que, aparentemente, no ocurrieron cambios en el DNA durante la construcción del pBR327 y que el pBR322 usado para la construcción

del vehículo está muy relacionado con el usado por Sutcliffe para determinar la secuencia nucleotídica del pBR322, se asumió que la secuencia nucleotídica del pBR327, común al pBR322, es idéntica. Suponiendo esto, y para mejor uso del vehículo, se presentan los tamaños exactos de los fragmentos de restricción y sus posiciones relativas en el DNA del pBR327, así como la secuencia nucleotídica total del vector (Tabla II y III, Fig. 14).

Usando el pBR327, se construyó un vehículo semejante al pBR325, denominado pBR328. Este nuevo vehículo presenta dos ventajas sobre el pBR325. Una de ellas es su tamaño, el cual es 1089 p.b. más pequeño que el pBR325 y la otra es que permite clonar fragmentos en los sitios de restricción PvuII y BalI por inactivación insercional en el gene de  $Cm^r$ .

Estos nuevos vectores permiten la clonación directa, fácil recuperación y selección por inactivación insercional de moléculas de DNA recombinantes generadas por las endonucleasas de restricción: PstI, PvuI, PvuII, BamHI, SalI, HindIII, EcoRI, BalI y SphI (43).

TABLE II

<u>HaeIII</u>		<u>HpaII</u>		<u>AluI</u>		<u>HinfI</u>	
pBR322	Size	pBR322	Size	pBR322	Size	pBR322	Size
fragment #		fragment #		fragment #		fragment #	
1	587	1	622	1	<u>910</u>	1	1631
2	<u>540</u>	2	<u>527</u>	2	659	2	517
3	<u>504</u>	3	404	3	655	3	<u>506</u>
4	458	4	<u>309</u>	4	521	3	452
5	434	5	242	4	<u>464</u>	4	<u>396</u>
6	261	6	238	5	403	5	<u>344</u>
7	234	7	217	6	<u>281</u>	6	298
8	213	8	<u>201</u>	7	257	7A	221
9	192	9	190	8	<u>226</u>	7B	<u>220</u>
10	<u>184</u>	10	<u>180</u>	9	136	8	154
	<u>168</u>	11A	160	10	100	9	<u>73</u>
11A	124	11B	160	11	63		
11B	123	12A	<u>147</u>	12	<u>57</u>		
12	104	12B	147	13	<u>49</u>		
13	89	13	122	14	<u>19</u>		
14	80	14	110	15	15	10	
15	64	15	90	16	<u>11</u>		
16	57	16	76				
17	51	17	<u>67</u>				
18	21	18A	34				
19	<u>18</u>	18B	<u>34</u>				
20	<u>11</u>	19A	26	16A			
21	7	19B	26	16B			
		20	15	17			
		21A	9	18A			
		21B	9	18B			

pBR322 fragment #	TaqI Size	pBR327 fragment#
1	1444	1
2	<u>1307</u>	
3	475	2
4	368	3
5	315	4
6	312	5
	<u>218</u>	6
7	141	7

pBR322 fragment #	ThaI Size	pBR327 fragment #
1	581	1
2	493	2
3	452	3
4	<u>372</u>	
5	355	4
6	<u>341</u>	
7	332	5
8	330	6
9	145	7
10A	129	8A
10B	129	8B
11	<u>122</u>	
12	115	9
13	<u>104</u>	
14	<u>97</u>	
15	<u>68</u>	
16	66	10
17	61	11
18	27	12
19	26	13
	<u>17</u>	14
20	10	15
21	5	16
22	<u>2</u>	



pBR322 fragment #	HhaI Size	pBR327 fragment #
1	393	1
2	<u>347</u>	
3	337	2
4	332	3
5	<u>270</u>	
6	259	4
7	206	5
8	<u>190</u>	
9	174	6
10A	153	7A
10B	152	7B
10C	151	7C
	<u>145</u>	7D
11	<u>141</u>	
12A	132	8A
12B	131	8B
13	109	9
14	<u>104</u>	
15	100	10
16	93	11
17	<u>83</u>	
18	75	12
19	67	13
20	62	14
21	60	15
22	53	16
23	40	17
24	<u>36</u>	
25	<u>33</u>	
26	<u>30</u>	
27	28	18
28	21	19

pBR322 fragment #	HaeII Size	pBR327 fragment #
1	1876	1
2	<u>622</u>	
3	<u>439</u>	
4	430	2A
	425	2B
5	<u>370</u>	
6	227	3
7	181	4
8	<u>83</u>	
9	60	5
10	53	6
11	21	7

MboI		
Size		
PBR322		pBR327
fragment #		fragment #
1	<u>1374</u>	
	<u>809</u>	1
2	665	2
3	358	3
4	341	4
5	<u>317</u>	
6	272	5
7	258	6
8	<u>207</u>	
9	105	7
10	91	8
11	78	9
12	75	10
13	46	11
14	36	12
15	31	13
16	27	14
17	18	15
18	17	16
19	15	17
20	12	18
21	11	19
22	8	20

TABLA II

El tamaño de los fragmentos de DNA generados por las endonucleasas de restricción del pBR322 y pBR327.

Notar que para cada enzima de restricción los fragmentos deletados, -- presentes originalmente en el pBR322 (encerrados en un cuadro, 41), no están presentes en el pBR327. Sin embargo, un nuevo fragmento está -- presente en el pBR327 (subrayado) que no está en el pBR322. En el -- caso de la endonucleasa HpaII, un fragmento de 309 p.b. desaparece y -- uno nuevo exactamente del mismo tamaño aparece.

TABLA III

<u>HaeIII</u>	<u>HpaII</u>	<u>AluI</u>	<u>HinfI</u>	<u>TaqI</u>	<u>ThaI</u>	<u>HhaI</u>	<u>HaeII</u>	<u>MboI</u>	<u>EcoRII</u>
174	161	16	631	23	347	103	235	348	129
297	170	31	851	338	702	235	416	375	1057
401	387	686	1005	650	817	263	437	466	1532
525	402	1089	1303	1125	946	416	497	824	1545
532	411	1553	1756	1266	973	437	550	1096	
596	533	1689	2272	2928	978	497	777	1127	
830	693	1946			1039	550	1207	1142	
919	769	2467			1105	702	1632	1951	
940	929	2567			1234	777		2026	
991	1019	2630			1244	817		2037	
1048	1257				1389	948		2045	
1261	1283				1415	1207		2123	
1429	1592				1432	1358		2135	
1863	1739				2013	1420		2240	
2321	1765				2343	1565		2581	
2401	1955				2835	1632		2599	
2668	2359				3168	1732		2645	
3255	2393					1906		2903	
	2460					2015		2920	
	2570					2408		2956	
	2812					2501			
						2838			
						3170			

EcoRI (-2) 3271

SalI 650

HindIII 29

AvaI 1424

BamHI 375

PstI 2523

SphI 565

PvuI 2726

TABLA III

Las coordenadas del sitio de corte para las enzimas que cortan el --  
pBR327.

Los números corresponden al sitio donde la enzima de restricción corta  
la cadena 5' a 3' en el sentido de las manecillas del reloj.

BIBLIOGRAFIA

1. Collins, J.. Current Topics in Microbiology and Immunology, 78, 121 - 170 (1977).
2. Griffith, F.. J. Hyg., Cambridge, Eng., 27, 113 (1928).
3. Avery, O., MacLead, C., McCarthy, M.. J. Experimental Medicine, 79, 137 (1944).
4. Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W., Helling, P.B.. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 70, 3240 - 3244 (1973).
5. Stent, G.S., Calendar, R.: Molecular Genetics. An Introductory Narrative. Second edition. W.H. Freeman and Company. San Francisco, U.S.A. ( 1978).
6. Smith, H.O., Wilcox, K.W.. J. Mol. Biol., 51, 379 (1970).
7. Roberts, R.J.. Critical Rev. Biochem., 4, 123-164 (1976).
8. Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H., Ginsberg, H.S., Barry Wood, W. Microbiology. Second edition. Harper International. Edition. Maryland, U.S.A. (1973).
9. Nakanishi, S., Inove, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N., Numa, S.. Nature, 278, 423-427 (1979).
10. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A., Heyneker, H.L., Bolivar, F., Boyer, H.W.. Science, 198, 1056-1063 (1977).
11. Goeddel, D.V., Kleid, D.G. Bolivar, F., Heyneker, H.L., Yansura, D.G. Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., Riggs, A.R., Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.), 76, 106-110 (1979).

12. Sgarmella, V., Van de Sande, J.H., Khorana, H.G.. Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.), 67, 1468-1475 (1970).
13. Sgarmella, V., Bursztyn - Pettegrew, H., Ehrlich, S.D. Recombinant Molecules: Impact on Science and Society (57 - 68). Eds. E.F. Beers, Jr and G. Bassett. Raven Press, New York (1977).
14. Clarke, L., Carbon, J.. Cell, 9, 91-99 (1976).
15. Helinski, D.R.. Basic Life Sci., 9, 19-49 (1977).
16. Blattner, F.R., Williams, B.G., Blechl, A.E., Denniston, Thomson, K., Faber, H.E., Furlong, L., Grunwald, D.J., Kiefer, D.O., Moore, D.D., Schumm, J. W., Sheldon, E.L., Smithies, O.. Science, 196, 161-169 (1977).
17. Timmis, K.N., Cohen, S.N., Cabello, F.C.. Progress in Molecular and Subcellular Biology, Vol. 6 (1-58). Ed. Fred E. Hahn. Springer-Verlag, Berlin (1978).
18. Bolivar, F.. Life Sciences, 25, 807-818 (1979).
19. Hershfield, V., Boyer, H.W., Yanofsky, C., Lovett, M.A., Helinski, D.R.. Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.), 71, 3455-3459 (1974).
20. Bolivar, F., Rodriguez, R., Green, P., Betlach, M.C., Heyneker, H., Boyer, A., Crosa, J., Falkow, S.. Gene, 3, 95-113 (1977).
21. Bolivar, F.. Gene, 4, 121 (1978).
22. Watson, J.D.. Molecular Biology of the Gene. Third edition. W.A. Benjamin, Inc., U.S.A. (1977).
23. Cohen, S.N.. Recombinant DNA (113-121). Scientific American, W.H. Freeman and Company, San Francisco (1978).

24. Curtis, R., Pereira, D.A., Hsu, J.C., Hull, S.C., Clark, J.E., Maturin, L.J., Goldschmidt, R., Moody, R., Inoue, M. Alexander, L.. Recombinant Molecules: Impact on Science and Society (45-56). Eds. E.F. Beers Jr. and G. Bassett. Raven Press, New York (1977).
25. Covarrubias, A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolivar, F., Bastarrachea, F.. Plasmid (sometido a publicación).
26. Timmis, K., Cabello, F., Onen, S.N.. Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.), 71, 4556-4560 (1974).
27. Grunstein, M., Hogness, D.S.. Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.), 72, 3961-3965 (1975).
28. Sanger, F., Air, G., Barrell, B., Brown, N., Coulson, A., Fiddes, J., Hutchison III, C., Slocombe, P., Smith, M.. Nature, 265, 687-695 (1977).
29. Maxam, A., Gilbert, W.. Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.), 74, 560-564 (1977).
30. Betlach, M.C., Hershfield, V., Chow, L., Brown, W., Goodman, H.M., Boyer, H.W.. Fed. Proc. 35, 2037-2043 (1976).
31. Polsky, B., Greene, P.J., Garfin, D.E., McCarthy, B.J., Goodman, H.M., Boyer, H.W.. Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.). 72, 3310-3314 (1975).
32. So, M., Gill, P., Falkow, S.. Mol. Gen. Genet., 124, 239-249 (1975).
33. Bolivar, F., Rodríguez, R., Betlach, M.C., Boyer, H.W.. Gene, 2, 75-93 (1977).
34. Clewell, D.B.. J. Bacteriol., 110, 667-676 (1972).
35. Greene, P.J., Heyneker, H.L., Betlach, M., Bolivar, F., Rodríguez, R., Covarrubias, A., Fodor, I., Backman, K., Boyer, H.W.. Nucl. Acid. Res., 5, 2773-2780 (1978).

36. Panet, A., Van de Sande, J.H., Loewen, P.C., Khorana, H.G., Raae, A. J., Lillehang, J.R., Kleeppe, K.. *Biochemistry*, 12, 5045-5050 (1973).
37. Heyneker, H.L., Shine, J., Goodman, H.M., Boyer, H.W., Rosenberg, J., Dickerson, R.E., Narang, S.A., Itakura, K., Liu, S., Riggs, A.D... *Nature*, 263, 748-752 (1976).
38. Dugaiczky, A., Boyer, H.W., Goodman, A.M.. *J. Mol. Biol.*, 96, 171-195 (1975).
39. Finkelstein, M., Rownd, R.H.. *Plasmid*, 1, 557-562 (1978).
40. Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, C.L.. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.)* 69, 2110-2114 (1972).
41. Sutcliffe, J.G.. *Nucl. Acid. Res.*, 5, 2721-2728 (1978).
42. Young, I.G., Poulis, M.I.. *Gene*, 4, 175-179 (1978).
43. Fuchs, L.Y., Covarrubias, L., Escalante, L., Sánchez, S., Bolivar, F.. *Gene* (sometido a publicación).