

137
Rej.



**Universidad Nacional Autónoma
de México**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIOS SOBRE ESTABILIDAD Y REPLICACION
INDUCIBLE EN PLASMIDOS TIPO COL EI**

T E S I S

Que para obtener el grado de

B I O L O G O

p r e s e n t a

MARIA ELENA MUNGUIA ZAMUDIO

Asesor

DR. XAVIER SOBERON MAINERO

1 9 8 7



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

INTRODUCCION.

-Aspectos generales de Ing. Genética.....	1
-Aspectos generales y características de los vehiculos moleculares.....	1
-Generalidades de la replicación de los plásmidos tipo Col EI.....	6
-Estabilidad de los plásmidos tipo Col EI.....	10

ANTECEDENTES.....	13
-------------------	----

JUSTIFICACION Y OBJETIVO.....	15
-------------------------------	----

ESTRATEGIA GENERAL.....	17
-------------------------	----

MATERIAL Y METODOS

-Cepas y plásmidos.....	19
-Medios de cultivo.....	21
-Reactivos.....	22
-Purificación de DNA de plásmido.....	24
-Titulación de Bam HI con el DNA de pBR435.....	26
-Microensayos de DNA de plásmidos.....	27

-Paquete de análisis de secuencias nucleótidas de la U. de Cornell.....	29
-Transformación.....	30
-Electroforesis.....	31
-Determinación del número de copias.....	31
-Determinación de la estabilidad del plásmido.....	32
RESULTADOS.....	33
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	45
ABREVIACIONES.....	48
BIBLIOGRAFIA.....	49

ESTUDIOS SOBRE ESTABILIDAD Y REPLICACION INDUCIBLE EN PLASMIDOS TIPO COL EI.

INTRODUCCION

A principios de la decada de los 70s, como consecuencia de una serie de descubrimientos previos, como la identificación y caracterización de enzimas cuyo sustrato es el DNA (1), se empezó a desarrollar la técnica conocida como Ingeniería Genética Molecular o Recombinación "in vitro" de Acidos Nucléicos (2). Esta técnica permitió que el genoma pueda ser fragmentado y que los fragmentos sean aislados y propagados a través de multiplicación celular o clona molecular de DNA (2).

La Ingeniería Genética Molecular puede ser descrita como sigue: dos o más fragmentos de DNA son recombinados "in vitro" mediante el uso de una serie de enzimas; uno de los fragmentos, llamado vector o vehículo molecular es capaz de replicarse en la célula huésped y el otro, el fragmento clonado, es replicado en la célula por estar unido covalentemente al vehículo, por lo tanto es obvia la importancia de éste en las técnicas de DNA recombinante.

Desde 1976 a la fecha, se han diseñado una serie de vehículos moleculares que pueden ser introducidos en diferentes especies, los cuales presentan características particulares dependiendo del organismo en el que son introducidos. Se han construido vehículos moleculares para bacterias, hongos, células vegetales y células de vertebrados (3). Cabe señalar que los vehículos moleculares más utilizados son aquellos que presentan como célula receptora a

Escherichia coli, dado que a nivel genético y molecular es el organismo mejor comprendido y permite una selección fácil de moléculas recombinantes.

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

- Que sea un replicón autónomo.
- Que pueda ser purificado en gran cantidad para su caracterización física
- Que su tamaño sea pequeño.
- Que presente sitios únicos de restricción preferiblemente localizados en genes estructurales de marcadores genéticos.
- Que presenten características que permitan una fácil detección de moléculas recombinantes
- Que se conozca la secuencia nucleotídica completa del vehículo.

Hasta ahora existen 4 tipos de vehículos moleculares usados para clonar fragmentos de DNA heterólogo: plásmidos, bacteriofago λ , cosmidos y bacteriofago M13, (4). Por interés de este trabajo sólo mencionaremos las características de los plásmidos.

Los plásmidos son moléculas de DNA circular, extracromosomales, de duplicación autónoma y generalmente dispensables para la célula. Se ha trabajado principalmente con dos tipos de vectores, los cuales se distinguen por sus propiedades de replicación. Unos son los de "control estricto" lo cual significa que su replicación está acoplada a la del hospedero y que solamente una o pocas copias de el plásmido pueden estar presentes en la bacteria (5). Estos vectores son utilizados para un propósito específico como; vectores de expresión, vectores de amplio espectro de replicación, etc., entre estos se puede citar pSC101 y algunos derivados de RI (6). El otro tipo de

vector son los plásmidos de "control relajado" o multicopia, su replicación no está acoplada a la del hospedero por lo que puede presentar 15 o más copias dentro de la bacteria por ejemplo: Col EI, los de la serie de pBRs o pACYC184, de los que se han obtenido derivados de uso múltiple, y lo más importante es que se puede incrementar a un mayor número de copias por célula (amplificación) inhibiendo con antibióticos específicos la síntesis de proteínas del huésped (4) Tabla I.

Bajo condiciones naturales, el intercambio de información genética entre bacterias, se da por los procesos de transducción, conjugación y transformación. En los sistemas de transformación naturales, la bacteria entra en una etapa de crecimiento conocido como competencia, durante la cual es capaz de tomar DNA exogeno. Se ha encontrado que la competencia puede ser inducida artificialmente, exponiendo a las células a una solución cationica divalente a baja temperatura, lo cual causa que se formen esferoplastos. El DNA añadido a la mezcla de transformación forma un complejo resistente a DNAsas, que se adhiere a la superficie celular. Este complejo puede ser tomado por la célula durante la exposición a un breve pulso térmico, generalmente a, (42°C), permitiendo así el establecimiento de DNA circular (8).

En la mayoría de los casos la replicación del DNA plásmidico hace uso del conjunto de enzimas utilizadas para duplicar el cromosoma huésped. Actualmente se conocen 15 proteínas asociadas al complejo multienzimático replicativo.

Hasta ahora los plásmidos multicopia con origen de replicación tipo Col EI son los mejor conocidos en cuanto a su replicación.

Tabla I. Tabla de Replicones.

a) VECTORES DE USO MULTIPLE:

NOMBRE	SITIOS DE CLONACION	COMENTARIOS
pBR322	varios	El vector de clonación más utilizado en la actualidad; totalmente secuenciado
pBR325	varios	Derivado del pBR322, con el gen de resistencia a cloramfenicol
pBR327	varios	Derivado del pBR322, no movilizable; totalmente secuenciado
pBR329	varios	Derivado del pBR327, con el gen de resistencia a cloramfenicol, totalmente secuenciado

b) VECTORES DE EXPRESION:

PBR540	Bam HI	Utiliza como promotor de expresión el promotor lac.
pHUB	EcoRI, BamHI, Sal I, Hpa I	El promotor de expresión es lambda pL.

c) PLASMIDOS DE AMPLIO ESPECTRO DE REPLICACION:

pSG11	EcoRI, XhoI, SalI, SphI, SmaI, XmaI	Origenes de replicación del pBR322 y de pUH24.
PF67	SalI, BamHI, SmaI EcoRI	Origenes de replicación del pBR322 y del RI.

Esta tabla está basada en la que es reportada por Balbás et al. (7).

Dentro de este grupo de plásmidos se encuentran, el pBR322 y sus derivados, pISA, RSF1030, Clo DF13 y el mismo Col EI (9, 10, 11). Las señales de inicio y regulación del proceso de replicación, se encuentran en una región de aproximadamente 600 pb, la cual codifica para dos moléculas de RNA que son transcritas en forma opuesta. Una de ellas es de 550 nucleótidos, llamado primero o RNA II, el cual provee el extremo 3' OH necesario para la incorporación del primer dNTP. Después de ser transcrito a lo largo de la zona del origen, forma un híbrido RNA-DNA susceptible a un corte endonucleotídico específico, por la RNasa H, produciendo así el extremo 3' OH y un templado de DNA, elementos genéticos indispensables para que se dé el inicio de la replicación, (9, 11, 12, 13). La regulación del proceso de inicio está dado por un transcrito de 108 nucleótidos, llamado RNA I; su zona codificadora está incluida en la región que codifica para el RNA primero pero sobre la cadena opuesta. Actúa como inhibidor de la replicación evitando la formación o funcionalidad del primero (14, 15, 16). Esto es porque el RNA I es capaz de establecer interacciones con el RNA II ocasionando que éste último no sea procesado para formar un extremo 3' funcional. La especificidad y equilibrio de este proceso de interacción determinarán, respectivamente, las propiedades de incompatibilidad y el número de plásmidos por célula (15, 17, 18).

Varias líneas de evidencia sugieren que el RNA II debe adquirir una conformación particular durante la transcripción que le permite formar un primero funcional, es decir, que las estructuras secundarias que se establecen a lo largo del RNA II juegan un papel importante en los eventos del procesamiento del origen. Recientemente se han encontrado mutaciones puntuales en la región entre el promotor

TABLA II. EFECTO QUE CAUSAN LAS MUTACIONES pri Y spr EN LA FORMACION DEL PRIMER.

MUTACION	POSICION	CAMBIO DE BASES	SINTESIS DEL RNA II	FORMACION DEL HIBRIDO	SITIO DE CORTE RNAsa H	ESTABILIDAD DEL HIBRIDO RNA-DNA	SINTESIS DE DNA.
pri 1	-308	G - A	No afecta	Bloquea	----	----	----
pri 2	-268	G - A	No afecta	Bloquea	----	----	----
pri 3	-265	G - A	No afecta	Reduce	No afecta	No afecta	No afecta
pri 4	-264	G - A	No afecta	Reduce	No afecta	No afecta	No afecta
pri 5	-10	C - U	No afecta	No afecta	Altera	Altera	No afecta
pri 6	-188, -186	G-A,G-A	No afecta	No afecta	No afecta	No afecta	Inhibe
pri 10	-582, -576	T:A inserción	Bloquea	----	----	----	----
spr 41	-19	G - A	Aumenta la formación del híbrido en una pri 4 y decrementa éste en una silvestre o pri 3.				
spr 42	-18	G - A	Lo mismo que en spr 41.				
spr 61	-161	C - U	Incrementa la actividad del primer de una mutación pri 6.				

Las posiciones de las mutaciones se presentan como números negativos, que indican el número de pares de bases hacia atrás del origen. Los cambios de bases en el -RNA II son presentados excepto para pri 10, que tiene una inserción de un par de bases T:A en un trecho de siete T:A pares de bases aproximadamente a 30 pares de bases hacia arriba del sitio de inicio del RNA II. El signo ---- indica que el en sayo no es aplicable. Los plásmidos Col Ei mutantes, de replicación deficiente se aislaron en replicones bifuncionales. El análisis de la capacidad de formación del primero se hizo in vitro. En todos los casos la transcripción se abortó en un sitio a +220 pb del origen, con la inserción en ese lugar del terminador del gene recA de E. coli. Se denominaron mutaciones pri aquellas afectadas en la formación del primero, y spr (supresoras) aquellas que suprimen efectos de las mutaciones -pri. Tabla tomada de la ref. (19).

del RNA II y el origen que pueden afectar pasos específicos en el proceso de formación del primero (19,17) (tabla II). Otra evidencia involucra al RNA I, transcrito complementario a la región 5' terminal del RNA primero. El análisis estructural del RNA I indica que esta molécula asume una conformación que comprende tres estructuras de tipo tallo-asa y una cola de cadena sencilla sobre el extremo 5' características tales que cualquier alteración produce una disminución en la actividad del RNA I (20,21,22). Por otro lado datos bioquímicos sugieren que el RNA I ejerce su control negativo sobre la replicación del plásmido a través de su interacción con el RNA primero naciente y su efecto sobre la susceptibilidad de éste a un procesamiento por la RNasa H (15,17).

Se considera que los plásmidos Col EI, pBR322 y Clo DF13, expresan adicionalmente el gen ROP, el cual codifica para una proteína de 62 aminoácidos y se ha demostrado que la forma en que actúa "in vitro" es, estabilizando la interacción RNA I con el RNA II, por lo tanto abortando la transcripción de éste último, funcionando como un mecanismo más de control del inicio de la replicación, (23,24) y por lo tanto del número de copias. Se ha visto que en plásmidos a los cuales se les ha deletado el gen ROP el número de copias aumenta, (24), (fig. 1).

Cuando un plásmido es replicado dentro de la bacteria, por lo general es mantenido con un número de copias promedio uniforme y estable dentro de la población. Este fenómeno en células bacterianas en división requiere de sistemas controlados que aseguren la duplicación del replicón y su repartición a las células hijas. Por ejemplo, si el promedio de la población es de 10 copias por

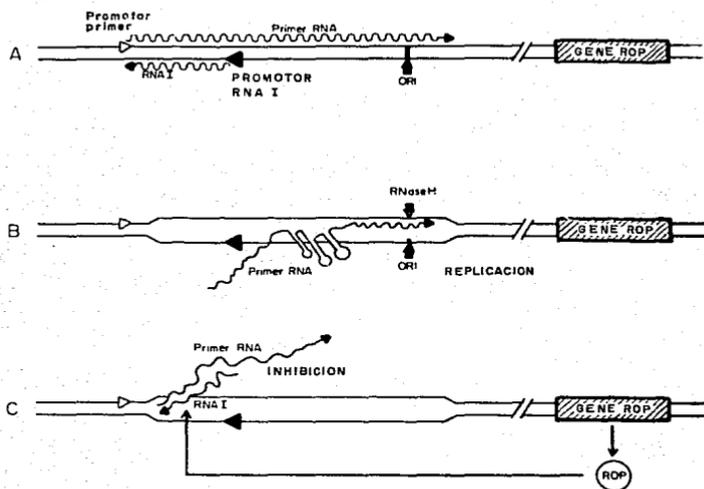


Fig.-1. Mecanismos de replicación de plásmidos tipo Col EI.

A) La replicación de estos plásmidos es controlada principalmente por 3 elementos genéticos: una molécula RNA primero, - una pequeña molécula de RNA mediadora de incompatibilidad e-inhibición adicional.

B) La molécula precursora del RNA primero forma un híbrido - con DNA, este híbrido, es procesado por RNAasa H para formar un primero para la DNA polimerasa I. Este proceso es afectado por la estructura secundaria del RNA.

c) La inhibición por el RNA pequeño (RNA I) está mediado por la interacción con el RNA primero complementario. La eficiencia de esta interacción es aumentada por la proteína ROP.

(figura tomada de la ref. (25)).

cromosoma, en el momento de la división celular existirían alrededor de 25-30 copias por célula por lo que al distribuirse el plásmido en forma binomial, la probabilidad de que una célula herede menos de una copia es infinitesimal, pero esto sólo es cumplido si el mecanismo de control del número de copias opera en forma uniforme, es decir, que las células hijas hereden aproximadamente el mismo número de plásmidos, en el caso de que la distribución del número de copias fuera muy dispersa, en el momento de la división celular, existirían en la población células con menos copias que el promedio. Esto podría ocasionar que el plásmido fuese menos estable, (26).

Se ha observado sin embargo, que el mecanismo de estabilidad aparentemente ha sido seleccionado en forma diferente para plásmidos de alto y bajo número de copias. En plásmidos de bajo número de copias como el pSC101, se ha descrito una región de DNA de aproximadamente 400pb, llamada PAR (por partición), (fig. 2), que es esencial para que el plásmido sea mantenido establemente en la población (27). Esta región actúa en cis y parece no ser importante su posición y orientación con respecto al origen para su funcionamiento (28), puede estabilizar plásmidos no relacionados que contengan este segmento (29). En el caso de ser deletado éste segmento se presenta el fenotipo PAR- que no se elimina aunque se aumente el número de copias. La dinámica de esta segregación se comporta de acuerdo a una distribución binomial (31). Hay evidencias que sugieren que dichas regiones (PAR) interaccionan con proteínas de la membrana externa de la bacteria (32), permitiendo que, al dividirse la célula, los plásmidos sean distribuidos en las células hijas.

Locus PAR pSC101.

100
 GGCGCATCTGGGATCCCGTCAGCCTGGGACAGTAAGACGGGTAAGCCTGTTGATGATACCGCTGCCTTACTGGGTGCATTAGCCAGTCTGAATGACCTGT
 CCGCGTAGAGCCCTAGGCAAGTCGAACCCCTGTCACTTCGCCATTGGCAAACTACTATGGCGACGGAATGACCCACGTAATCGGTGAGACTTACTGGACA
 pSC101
 200
 CACGGGATAAATCCGAAGTGGTCACACTGSAAAATCAACAGGGCCAGGAAGCTGCTGAACAGCAAAAAGCTCAGATAGCACCCACATAGCAGACCCGCCATAAAA
 GTGCCCTATTAGGCTTCACCACTCTGACCTTTAGTTCTCCGCTCTTGACGACTTGTGCTTTTCAGCTATCGTGGTATCGCTGGGGCGTAATTC
 300
 CGCCCTGAGAGCCCGTGAACGGCCITTTCTGTATTA TGGGTACTTTCCTTGCATGAA TCCATAAAAAGCCCGCTGTA GTGCCA TTTACCCCCATTCACTG
 GCGGGACTCTTCGGGCACTGGCCGAAAAGAACATAATACCCATCAAAGGAAAGTACTTAAAGTAATTTCCCGGGACATCACGGTAATGGGGTAAAGTGAC
 400
 CCAGAGCCGTGAGCCAGCGAACTCAATGTCAAGAAAAGACAGGACTTCAGGTGCTGATGGTCGGGAGCAAAAAGGAATATTCAGCGAATTGCCGGAAC
 GGTCTCGGCACCTCGCGTGCCTTACAGTGTCTTTCTGTGCGGTGACTCACGGACTACAGCCCTCTGTTTTCCTTATAAGTCGCTAAACGGGCTTC
 pSC101
 500
 CGATCTGGG
 CCTAGACCC
 pSC101

Fig.-2. Secuencia nucleotídica del locus PAR del plásmido pSC101, tomada de la ref. (30).

Para el caso de los plásmidos multicopia se han seleccionado mecanismos de estabilidad diferente, ya que éstos poseen número de copias elevado y su segregación parece estar determinada por una distribución al azar. Los parametros más relevantes parecen ser; el número de copias promedio en la célula, el grado de multímeros concatenados y la finura de la distribución del número de copias en la población (25,33,34). Se ha observado que cuando la distribución entre el monómero y formas multiméricas está desplazado hacia la formación de multímeros el plásmido es menos estable (35). Sherrat ha localizado una región de DNA en el plásmido Col EI llamada CER que favorece la resolución de multímeros. Este transcrito actúa en cis y participa en el evento de recombinación independiente con recA, recE y recF el cual convierte multímeros a monómeros. Así mismo el plásmido Col EI es, per se, más estable que algunos derivados en los que la replicación puede estar menos finamente regulada (36). Se considera que dicha región tiene propiedades similares a una región de DNA (par B) presente en el plásmido CloDF 13 (35).

Los plásmidos de la serie pBR, son los más utilizados en experimentos de Ingeniería Genética, esto debido a que cumplen los requisitos necesarios para ser considerados como un buen vector molecular, sin embargo, existen aún características importantes que se pueden pedir a éstos plásmidos. Dentro de éstas características han sido estudiadas en este trabajo las relativas al mantenimiento de vectores moleculares de clonación durante el crecimiento de una población bacteriana y a la manipulación de la replicación de dichos plásmidos para controlar el número de copias.

ANTECEDENTES:

Una de las líneas de investigación del laboratorio, en el cual se realizó el presente trabajo de tesis, es el desarrollo de vehículos de clonación. Ante la necesidad de obtener vectores estables y regulables en su número de copias, para las aplicaciones mencionadas en la Justificación, surgieron algunos proyectos para la construcción de vectores que cumplieran éstas características .

Lomeli (37) construyó un plásmido tipo Col EI que se mantuvo en bajo número de copias. Esto se logró controlando la frecuencia de síntesis del RNA primero introduciendo un promotor sintético consenso y dos copias en tandem del operador de lactosa. Se utilizaron cepas con mutación en el gene I (I^q) del operon lac (38) la cual sobreproduce 10 veces el represor de lac. El promotor de éste operon puede ser inducido por IPTG (inductor gratuito del operon lac), al ser agregado al medio de cultivo. Se observó que al disminuir el número de copias, el plásmido fué menos estable y que a pesar de que estuvo en presencia del inductor gratuito y el número de copias fué mayor éste se mantenía inestable, sugiriendo que otros factores tales como la distribución de plásmidos en la población y el grado de multimerización pudieran estar influyendo en la inestabilidad del plásmido (39).

Posteriormente, Zurita (25) introdujo los loci PAR, CER y ROP para aportar ciertas propiedades de estabilidad y regulación más fina del número de copias (ver introducción). Durante las construcciones fueron obtenidos varios plásmidos que contuvieron una o dos copias del loci PAR, así como una o ninguna copia de los loci CER y ROP,

(figura 3). Se observó que los plásmidos que presentan una sola copia del locus PAR cuando están en bajo número de copias (sin inducir) son más estables así como también aquellos plásmidos que presentan adicionalmente a este locus, una copia de los loci CER o ROP.

JUSTIFICACION Y OBJETIVO.

Los plásmidos multicopia, por las ventajas mencionadas en la introducción, pueden ser los más adecuados como vehículos moleculares. Sin embargo, para algunos experimentos el alto número de copias de estos plásmidos es una desventaja. Por ejemplo, cuando se realizan experimentos fisiológicos de un gen clonado, o cuando esté gen en abundancia resulta letal para la célula. Por otro lado, los plásmidos de bajo número de copias utilizados como vectores moleculares, son difíciles de manipular y caracterizar, además de tener generalmente un tamaño grande. En la actualidad existen plásmidos de bajo número de copias que han sido utilizados como vectores, por ejemplo, R1, R6K, pSC101, etc., pero su uso es restringido.

Se pensó en plásmidos derivados de pBR322 que cubrieran ambas características, o sea, que tengan los requerimientos necesarios para considerarlos como buenos vectores moleculares y que su número de copias pueda ser regulable. Sin embargo, el pBR322 y sus derivados, así como otros vectores moleculares multicopia que han sido construídos, no son 100% estables, es decir, al cabo de varios subcultivos, se pueden identificar células que no contienen plásmido. Esto se presenta como una desventaja para cierto tipo de experimentos, por ejemplo, cuando son utilizados en la producción de proteína o en el caso de que el plásmido se utilice como un vector de expresión. Así mismo, se ha observado que la inestabilidad de estos vectores se ve aumentada cuando el gen clonado, en el plásmido, tiene un efecto negativo en el metabolismo de la célula o cuando ciertas condiciones del medio de cultivo son utilizadas (40,41). El locus de

estabilidad de plásmidos aislados de otras moléculas de DNA, genera una alternativa interesante para el mejoramiento de vectores moleculares. Por otro lado el hecho de que todos los plásmidos usados como vehículos de clonación que cumplen con los requisitos antes mencionados sean multicopia y amplificables, presenta la gran ventaja de que pueden ser purificados en grandes cantidades. Varios plásmidos que Zurita (25) y Lomeli (37) construyeron, cumplen parcialmente las características de regulación en el número de copias y estabilidad durante el crecimiento bacteriano. Al caracterizar esta última, en algunos de los plásmidos obtenidos que presentan el locus PAR, en una, dos y ninguna copia, se observó, por los resultados obtenidos, la posibilidad de mejorar la estabilidad haciendo pocas modificaciones en la construcción del plásmido. Se planteó la hipótesis de que un plásmido que presente una sola copia, de los loci que le aportan características de estabilidad, ésta se verá mejorada, además de que se seguirán conservando las propiedades de clonación. Por lo anterior, el objetivo de éste trabajo fué el de construir y caracterizar un vector molecular en el cual se pudiera regular el número de copias, que fuera estable y manejable para experimentos de DNA recombinante.

ESTRATEGIA GENERAL.

I.- Se determinó la estabilidad en los plásmidos pBR431, sin copia del locus PAR; pBR432, dos copias del locus PAR; pBR433, una copia del locus PAR, para lo cual:

- Se realizaron las pruebas por triplicado en la cepa D1210 en condiciones de inducción y sin inducción.
- En razón a los resultados obtenidos, se buscó un plásmido que tuviera los loci PAR, CER y ROP, dentro de los derivados construídos anteriormente.
- Se decidió utilizar el pBR435 que contiene dos loci PAR, un CER y ROP, al cual se le deletaría una de las copias del locus PAR.

II.- Construcción del plásmido pBR437.

- Se purificó el DNA del pBR435.
- Se generó un patrón de restricción con varias enzimas, variando la orientación de los fragmentos clonados utilizando un paquete de programas para computadora de la Universidad de Cornell.
- Se compararon los patrones predichos por el programa "Bachrest" con los obtenidos por las enzimas "in vivo" con el DNA puro.
- Se utilizó la enzima Bam HI ya que sus sitios de reconocimiento flanquean una de las copias del locus PAR, pero tiene dos sitios adicionales por lo que se recurrió a una digestión parcial.
- Se tituló la enzima Bam HI con el DNA del pBR435 para obtener una muestra que presente el 20% en forma líneal.
- La forma líneal se recircularizó.

-Posteriormente se transformó a la cepa B1210.

-Se buscó la clona deseada por Microensayos de DNA, comparando el patrón de restricción generado por una digestión total con la enzima Bam HI del pBR435 con el de las clonas, seleccionando aquellas en la que desaparezca la banda perteneciente al fragmento PAR.

-La clona seleccionada se transformó a las cepas RRI y JN101.

III.- Determinación del número de copias y la estabilidad del plásmido pBR437.

-Se realizaron pruebas, por triplicado, para determinar el número de copias en condiciones de inducción y sin inducción, en las cepas B1210, RRI y JN101 de los plásmidos; pBR437, una copia de los loci PAR, CER y ROP; el pBR327, como control del efecto del inductor en el metabolismo de la célula; el pBR435, dos copias del locus PAR, una copia del locus CER y una copia del gene ROP; el pACY184, como control de número de copias.

-Posteriormente se realizaron las pruebas de estabilidad, por duplicado, en condiciones de inducción y sin inducción durante 100 generaciones en la cepa B1210 de los mismos plásmidos.

MATERIAL Y METODOS

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se mencionan enseguida:

Tabla III. Cepas Bacterianas y Plásmidos:

Designación	Genotipo	Referencia
Cepa hospedera		
D1210	$r_K^-, m_K^-, recA13, ara-14,$ $proA2, lacY1, galK2, lacI^q$ $xyl-5, mtl-1, supE44.$	Goeddel et al. 1979.
RRI	$recA^+$ derivada de HB101.	Bolivar et al. 1979.
JM101	$supE, thi, (lac-proAB), [P', traD36,$ $proAB, lacI^q, \lambda\Delta M15], recA^+.$	Messing et al. 1981.

Plásmidos

pBR322	Ap, Tc	Bolivar et al. 1977
ColE1	Inmunidad a Colicin EI	Clewell, 1972
pACYC184	Cm, Tc	Chang et al., 1978
pBR431	Cm, Tc; IPTG mod-rep	Zurita tesis 1985
pBR432	Cm, Tc; IPTG mod-rep; 2 copias de par	Zurita tesis 1985
pBR433	Cm, Tc; IPTG mod-rep; 1 copia de par	Zurita tesis 1985.
pBR435	Cm, Tc; IPTG mod-rep; 2 copias de par; una copia de rop; una copia de cer.	Zurita tesis 1985

par, locus par de pSC101; IPTG mod-rep, replicación modulada por IPTG,
rop, gene rop de pBR322; cer, locus cer de el plásmido ColE1.

MEDIOS DE CULTIVOS.

Medio de Cultivo M-9

CaCl 0.01M-----	10 ml
Sales 10x-----	100 ml
Luria-----	10 ml
Glucosa al 20%-----	5 ml
MgSO ₄ 0.1M-----	10 ml
CASaa 20%-----	5 ml
H ₂ O esterilizada-----	860 ml

Medio Luria

Triptona-----	10 gr
Extracto de lev.-----	5 gr
NaCl-----	10 gr
H ₂ O-----	1000 ml.

Sales 10x del Medio M-9:

Na ₂ HP0 ₄ -----	70 gr
KH ₂ PO ₄ -----	30 gr
NaCl-----	5 gr
NH ₄ Cl-----	10 gr
H ₂ O-----	1000 ml

Amortiguador TE

Tris-HCl-----	10mM pH8
EDTA-----	1mM pH 8

Medio YT

Triptona-----	8 gr
Extracto de levadura-----	5 gr
NaCl-----	5 gr
H ₂ O-----	1000 ml

MEDIOS DE CULTIVOS.

Medio de Cultivo M-9

CaCl 0.01M-----	10 ml
Sales 10x-----	100 ml
Luria-----	10 ml
Glucosa al 20%-----	5 ml
HgSO ₄ 0.1M-----	10 ml
CASaa 20%-----	5 ml
H ₂ O esterilizada-----	860 ml

Medio Luria

Triptona-----	10 gr
Extracto de lev.-----	5 gr
NaCl-----	10 gr
H ₂ O-----	1000 ml.

Sales 10x del Medio M-9:

Na ₂ HPO ₄ -----	70 gr
KH ₂ PO ₄ -----	30 gr
NaCl-----	5 gr
NH ₄ Cl-----	10 gr
H ₂ O-----	1000 ml

Amortiguador TE

Tris-HCl-----	10mM pH8
EDTA-----	1mM pH 8

Medio YT

Triptona-----	8 gr
Extracto de levadura-----	5 gr
NaCl-----	5 gr
H ₂ O-----	1000 ml

Reactivos:

Las endonucleasas de restricción fueron obtenidas de P.L. Biochemicals, New England Biolabs y Promega Biotec, excepto Bam HI, la cual fué preparada en la Unidad de Reactivos y Contención Biológica del Centro de Investigaciones sobre Ingeniería Genética y Biotecnología según el método de Green,(43) las condiciones de reacción para cada una de las endonucleasas de restricción se describen a continuación:

- Bam HI 150mM NaCl
 6 mM Tris-HCl pH 7.9
 6 mM MgCl₂
 100 ug/ml BSA.

- Hae III 6 mM MgCl₂
 6 mM Tris-HCl pH 7.5
 6 mM β-mercaptoetanol
 50 mM NaCl
 100 ug/ml BSA.

- Hind III 50 mM Tris-HCl pH 8
 50 mM NaCl
 10 mM MgCl₂
 100 ug/ml BSA

-Hinf I 100 mM NaCl
6 mM Tris-HCl pH 7.4
6 mM MgCl₂
6 mM β-mercaptoetanol
100 ug/ml BSA.

-Hha I 50 mM Tris-HCl pH 8
5 mM MgCl₂
0.5 mM ditiotretitol
100 ug/ml BSA.

-Ligasa T4 50mM Tris-HCl pH 7.8
6 mM MgCl₂
20 mM ditiotretitol
1 mM ATP

Las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C excepto para la endonucleasa ligasa T4 que fué a 16°C.

-RNAasa A 10mg/ml de enzima liofilizada.
10 mM Tris-HCl pH 7.5
15 mM NaCl

Se calentó a 100°C por 15 min y después se mantuvo a temperatura ambiente.

Purificación de DNA de plásmido.

Se hizo de acuerdo al método de lisado claro descrito por Betlach, (44). Se decantó el sobrenadante y se mezcló con un volumen de fenol y un volumen de cloroformo. Se centrifugó en un rotor JS-13 a 8000 rpm durante 10 min. Se extrajo la fase superior. Se agregó 1/20 de volumen de NaCl 5M y se agregaron 2.5 volúmenes iniciales de etanol absoluto, se puso a -20°C una hora y media para que el DNA precipite. Se centrifugó en el rotor JS-13 a 8000 rpm por 45 min. Se decantó el sobrenadante y se secó el precipitado en un desecador conectado a una bomba de vacío. Se resuspendió el precipitado en 2-4ml de buffer TE. Se colocó la suspensión en una columna de ASO (partículas de gel de agarosa para cromatografía por filtración; Bio-Rad) de 2 x 35cm. Se equilibró y corrió con el amortiguador (Tris-HCl 50mM, NaCl 0.5M, pH8; NaN 1mM; EDTA 1mM pH8). Se colectaron fracciones de 4ml. Se determinó la densidad óptica (D.O.) a 260nm para, cada fracción. Se encontró el DNA del plásmido entre las fracciones 12 y 18. (A 260 nm una unidad de D.O. equivale a 50ug de DNA/ml). Se reunieron las fracciones que contuvieron el DNA y se agregaron 2.5 volúmenes (respecto al total) de etanol absoluto frío. Se mantuvo a -20°C por un mínimo de 1.5 hrs. Se centrifugó en el rotor JS-13 a 8000 rpm durante 45 min. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se secó en un desecador conectado a una bomba de vacío. Se resuspendió el precipitado en 2.1 ml de amortiguador TEN: (Tris- HCl 10mM, pH 7.6; NaCl 10mM; EDTA 1mM). Se preparó un gradiente isopícnico a equilibrio en cloruro de cesio y yoduro de propidio. De la siguiente manera: Se Agregó en tubos de 5 ml de nitrato de celulosa (1/2 x 2"), 2.2 g de CsCl sólido, 2.1 ml de DNA en TEN, 0.150 ml de PDI (solución de 2mg/ml), 2.3 ml de aceite

mineral para equilibrar los tubos. Se centrifugó en el rotor S450.1 (Beckman) a 38 000 rpm por 20 hrs a 20 C. Se pudo visualizar el DNA con luz ultravioleta (UV) dado que el PdI fluoresce al iluminarse con ella. Se observaron dos bandas; la superior que correspondió al DNA bacteriano y de plásmido roto; y la inferior a plásmido superenrollado, covalentemente cerrado. Bajo la luz UV se picó el fondo de los tubos y se colectó lentamente el DNA de la banda inferior. Se pasó el DNA a través de una columna de intercambio iónico (Dowex 50W-X8, Bio-Rad; neutralizada y almacenada en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8; NaCl 0.5 M). Se colocaron de 2-3ml de resina en una columna, y se equilibró con 10 ml de amortiguador de resina Dowex, (Tris- HCl 50 mM pH 8; NaCl 1M; EDTA 1mM) por cada ml de resina. La solución de DNA se diluyó 1:1 en amortiguador de Dowex, se agregó a la columna y se eluyó con otro volumen de amortiguador.

Se colocó la muestra que contiene el DNA, en una bolsa de diálisis. Se dejó dializando la muestra en 4 litros de amortiguador (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM pH 8), por un mínimo de 2 hrs a 4°C. Se cambió el amortiguador y se repitió la operación dejándolo 6 hrs a 4°C. Se sacó de la bolsa de diálisis y se precipitó como anteriormente se mencionó. Se decantó el sobrenadante y se agregó un volumen inicial de etanol al 70% frío, se agitó rápidamente y se centrifugó en iguales condiciones durante 15 min. El precipitado se secó en iguales condiciones a las antes mencionadas. Posteriormente se resuspendió en 0.5ml de amortiguador TE. Se tomaron 50 ul de la solución y se llevó a 1ml con H₂O. Se obtuvo la densidad óptica a 260nm y se cuantificó la concentración de DNA.

Titulación de Bam HI con el DNA de pBR435.

Se utilizaron 3 ug de DNA puro del pBR435, para ser digerido parcialmente con 1.5 ul de la endonucleasa de restricción Bam HI, con una actividad de (3 U/ul, purificada en la Unidad de Contención y Reactivos Biológicos de CEINGEBI), a 37 °C. Se tomaron 0.5 ug de muestra para cada tiempo estimado. La reacción fué la siguiente:

DNA de pBR435 (0.3 ug/ul)-----10 ul
 Buffer de Bam HI 10x-----3 ul
 Bam HI (3U/ul)-----1.5 ul
 H₂O estéril y destilada-----15.5 ul

Los tiempos muestreados fueron:

t(min)	vol.(ul)	DNA [Jug
20	5	0.5
40	5	0.5
90	5	0.5
100	5	0.5
150	5	0.5
180	5	0.5

Se inactivó cada muestra agregando un volumen de fenol y uno de cloroformo, se agitó y se extrajo la fase superior, posteriormente se agregaron 1/20 del volumen total de NaCl 5 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, se dejó 2 hrs a -20°C. Se centrifugó a 12 000 rpm en una microfuga Beckman durante 15 min. Se secó en un

lío-filizador y se resuspendió en 20 ul de H_2O . El 50% de cada muestra fué agregado a un gel de agarosa al 0.7% y se desarrollo una electroforesis, aplicando un voltaje constante de 90 V a temperatura ambiente por 3 hrs. Esto fué para poder seleccionar aquella muestra que presente el 20 % del DNA total aplicado linearizado. El resto de la muestra seleccionada se llevó a un volumen de 100 ul, se tomó lo equivalente a 50ng y se realizó una reacción de ligasa:

DNA de pBR435 digerido-----20 ul
 Buffer de ligasa T4 10x-----3 ul
 ATP 5mM-----3 ul
 Ligasa T4 (400U/ul)-----0.1 ul
 H_2O estéril y destilada-----4 ul

Se incubo a $16^{\circ}C$ durante 12 hrs. Se llevó a un volumen de 200 ul y se repitió el paso de extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol absoluto. El DNA se resuspendió en 10 ul de H_2O , para posteriormente ser transformado en varias cepas.

Microensayos de DNA de plásmidos.

El método se llevó a cabo conforme a las indicaciones descritas por Rodríguez (48). Se creció a fase estacionaria el cultivo. Se transfirió el cultivo a tubos de microfugas de 1.5ml y se centrifugó a 12 000 rpm durante 2min. Se resuspendió el precipitado en 1ml de amortiguador SET (20% de sacarosa, 50mM de Tris-HCl pH 7.6, 50mM EDTA.) Se centrifugaron las células durante 1 minuto, se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 150 ul de amortiguador SET. Se agregó 5 ul de amortiguador de RNasa (Ribonucleasa Pancreática A, 10mg/ml con Tris-HCl 5mM pH 8 la mezcla

se puso en un baño de agua a ebullición por 10 min, posteriormente se fraccionó y se guardó a -20°C). Se agregó 350 μl de mezcla lítica (1% SDS, 0.2N NaOH) a temperatura ambiente, se agitó levemente. Se dejó en hielo durante 10 min. Se agregó 250 μl de amortiguador de acetato de sodio (3M pH 4.8) y se invirtió el tubo varias veces. Se incubó 30 min en hielo. Se centrifugó a 12 000 rpm la solución durante 5 minutos a 4°C . Se pipeteó el sobrenadante a otro tubo de microfuga. Se agregó un volumen igual de Isopropanol. Se invirtió varias veces y se centrifugó durante 5 min a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante. Se lavó el precipitado de DNA con 1 ml de etanol al 70%. Se secó el precipitado y después se resuspendió en 20 μl de H_2O . Se tomó de 0.4-1.0 μg del DNA obtenido, y se puso en una reacción de digestión con alguna enzima de restricción. Se verificó el patrón de bandas generado desarrollando una electroforesis en un gel de agarosa al 1% de la muestra digerida.

Paquete de análisis de secuencias nucleótídicas de la Universidad de Cornell.

Es un paquete de programas para análisis de secuencias de DNA y RNA para computadoras utilizando el editor de "Pascal", (42).

Estos programas son aplicables en aquellos vectores que se conozca su secuencia nucleótídica.

La serie de programas que contiene son los NUMSEQ, FUNNEL, INTREST, BACHREST, DIGEST, LINEPLOT y MAP.

Los programas utilizados en éste trabajo son el NUMSEQ, BACHREST y DIGEST.

NUMSEQ. Ordena secuencias nucleótídicas, esto es, agrupa nucleótidos numerandoles arriba de cada grupo; coloca una serie de éstos grupos en cada línea, de acuerdo a la decisión del usuario y esto lo hace en una hebra o en ambas de DNA. El programa BACHREST, busca sitios de reconocimiento para enzimas de restricción en secuencias de DNA. DIGEST calcula los fragmentos resultantes dados por ésta serie de enzimas presentándolos como un listado de fragmentos generados de acuerdo a su peso molecular. También nos da el número relativo de los nucleótidos que quedan en los extremos de tales fragmentos.

Transformación.

La transformación se llevó a cabo en las cepas; D1210, JH101 y RRI siguiendo el método de Cohen (45), con ciertas modificaciones: Se crecieron las células en 30 ml de medio Luria a una densidad óptica de 0.5 a 550 nm (aproximadamente 5×10^7 cel/ml). Se dejó reposando 10 min en hielo. Se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min en el rotor JA20. Se resuspendió el precipitado en 1/2 volumen inicial de $MgCl_2$ 50mM frío. Se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min en el mismo rotor. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 1/2 volumen inicial de $CaCl_2$ 100mM frío, se dejó en hielo de 30-40 min. Se centrifugó 5000 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante (el precipitado adquiere la forma de un halo). Se resuspendió en 1/10 de volumen inicial de $CaCl_2$ 100 mM y glicerol al 15%. Se tomaron 0.2 ml de células (aproximadamente 10×10^7) por cada muestra de DNA de plásmido. El volumen restante se fraccionó y guardó a $-20^\circ C$ o $-70^\circ C$. En un tubo estéril se colocaron 50 ul de $CaCl_2$ 100mM frío, se añadió de 1-10 ng de DNA de plásmido y se agregaron 0.2 ml de las células preparadas anteriormente. Se dejó en hielo durante 1 hr posteriormente se dió un pulso térmico a $42^\circ C$ por 90 seg y se pasó a hielo durante 5 min. Se añadieron 3 ml de medio Luria y se incubó a $37^\circ C$ con agitación a 200 rpm durante 30 min. Se sembró (en cajas con medio Luria sólido y con los antibióticos correspondientes, para éste caso son, Tc 15ug/ml y Cm 30ug/ml.) de 0.2 a 0.3 ml de la mezcla de transformación y se incubó de 12-24 hrs a $37^\circ C$.

Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

La electroforesis se llevó a cabo en cámaras horizontales, conforme a las condiciones descritas por Bolívar (46). Agarosa al 1% se disolvió por ebullición durante 1-2 min en solución Tris-boratos-EDTA como sigue (Tris-Base 90mM, EDTA 2.5mM, H₃BO 90mM pH 8.2). Se vació la solución y se dejó solidificar. Se tomaron muestras de 0.3 a 1.0 ug de DNA y se les agregó 1/2 volumen de mezcla inactivadora, (Urea 10mM, Azul de bromofenol al 0.5%, Xilencianol al 0.5%). La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 40 V a temperatura ambiente de 4-16 hrs.

Se fotografiaron los geles utilizando un filtro de gelatina amarillo No. 9 Kodak-Wratten y película Polaroid NPTipo 55 con una cámara MP-5 Polaroid.

Determinación de número de copias.

La determinación del número de copias de los plásmidos fué de acuerdo al método descrito por Mosser y Campbell (47). La cepa fué crecida en 20 ml de medio Luria con y sin IPTG, (Isopropil B-D tiogalactopiranosido; Sigma) 0.1 mM concentración final y 15 ug/ml de Tetraciclina a una densidad óptica de 0.6-0.8 D.O. a 550nm, (aprox. de $4-7 \times 10^7$ cel/ml). Se dejó en hielo, hasta que el cultivo con el plásmido control llegue a la misma densidad óptica. Se diluyó el cultivo de tal forma que se conserve la misma densidad óptica, por lo que se mezcló un volumen del cultivo de la cepa con un volumen de la

cepa que contenía PACYC184 (plásmido control) crecido en iguales condiciones, como un control interno, del número de copias. Las células fueron lisadas por el método de Rodríguez (48). Se linearizó el DNA con la endonucleasa Hind III, para eliminar formas multiméricas. Se desarrolló una electroforesis de acuerdo al método descrito por Bolívar, (46). La cantidad relativa de DNA de plásmido fue cuantificada por análisis densitométrico de fotografías de los geles en un espectrofotómetro modelo DU-8.

Determinación de estabilidad de plásmidos.

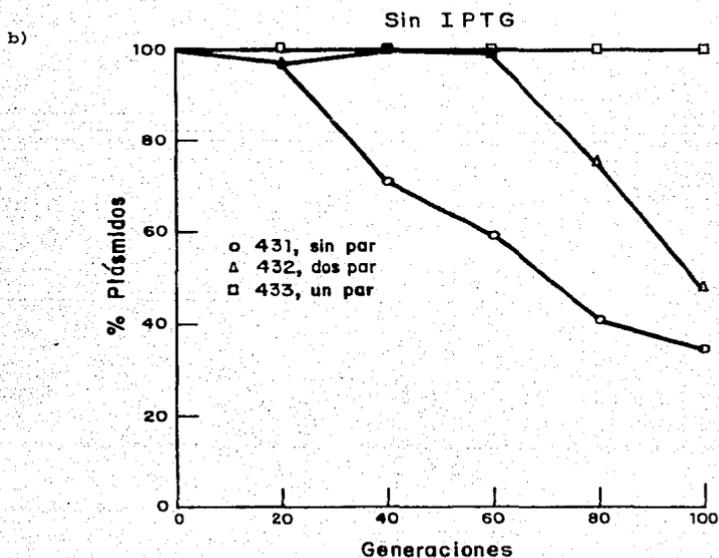
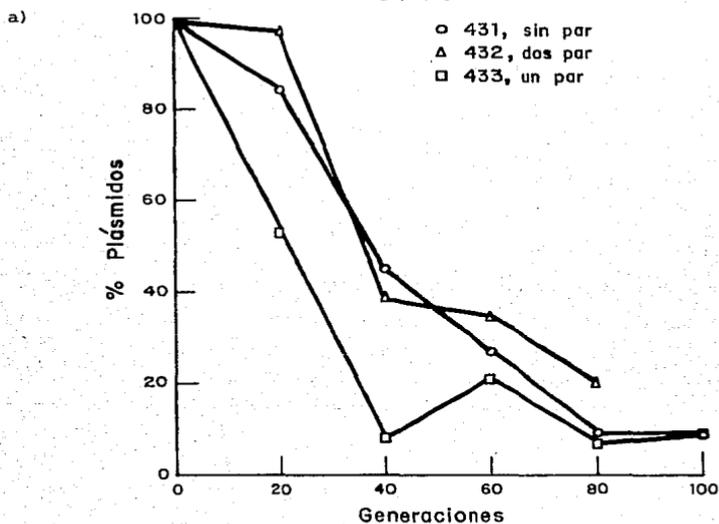
La determinación de estabilidad de los plásmidos fue probada en condiciones sin y con inducción con IPTG, como describen Meacock y Cohen (27). La cepa que contiene el plásmido a probar, para mantenimiento de estabilidad, fue inoculado en medio selectivo, (Tc 15 ug/ml) hasta alcanzar una densidad de $(5 \times 10^9 \text{ cel/ml})$. El cultivo fue diluido a $(5 \times 10^3 \text{ cel/ml})$ en medio Luria no selectivo, con y sin inductor (IPTG 0.1M) a 37 °C. Después de cada 20 generaciones de crecimiento (12 hr), el cultivo fue subcultivado a $(5 \times 10^3 \text{ cel/ml})$ a medio fresco no selectivo con y sin inductor. Este procedimiento fue continuado por un mínimo de 100 generaciones de crecimiento en medio no selectivo. De cada dilución fue sembrado un promedio de $(0.5-1.0 \times 10^2 \text{ cel/ml})$, en cajas Petri con medio Luria sólido no selectivo. Para la determinación de células viables, fueron probadas 100 colonias de cada caja de Petri para la presencia del plásmido por transferencia a medio sólido selectivo (Tc 15 g/ml).

RESULTADOS

Zurita (25) construyó una serie de plásmidos derivados del pBR327 que presentan sus mismas propiedades de clonación, con número de copias regulable y la presencia de los loci PAR y CER que les da cierta estabilidad. Al tratar de corroborar las pruebas de estabilidad de algunos de los plásmidos que contienen el loci PAR (pBR431, sin copia del locus PAR; pBR432, dos copias del locus PAR; pBR433, una copia del locus PAR), esto es, verificar si la presencia de este segmento en una o dos copias aporta estabilidad al plásmido se observó que aquellos plásmidos que contienen dos copias del locus PAR o ninguno de ellos son más inestables que los que tienen una sola copia, en condiciones de inducción, gráfica 1; a) y b).

Obtenidos estos resultados, se pensó, que existían varias alternativas de mejorar las características de estabilidad, haciendo el mínimo de modificaciones, para no alterar sus propiedades de replicación. El objetivo era construir un plásmido que tuviera una copia de cada uno de los loci PAR, CER y ROP. Se contaba con dos plásmidos a los cuales se les podían realizar ciertas modificaciones: uno era el pBR436, al cual se le podía clonar el gene ROP, o el plásmido pBR435 que presenta dos copias del locus PAR por lo que se le podría deletar uno de éstos, (figura 3). Se decidió utilizar éste último ya que uno de los loci PAR, el cercano al gene de Tetraciclina, se encuentra flanqueado por sitios de reconocimiento de la endonucleasa Bam HI y se puede recurrir a una operación muy simple de digestión y recircularización. Para contender con la presencia de sitios Bam HI adicionales, (figura 3), se recurrió a digestiones

IPTG



Gráfica.-1. Pruebas de estabilidad de los plásmidos. a) Con inducción (IPTG)

b) Sin inducción (Sin IPTG). pBR431, sin PAR; pBR432, dos PAR; pBR433, un PAR.

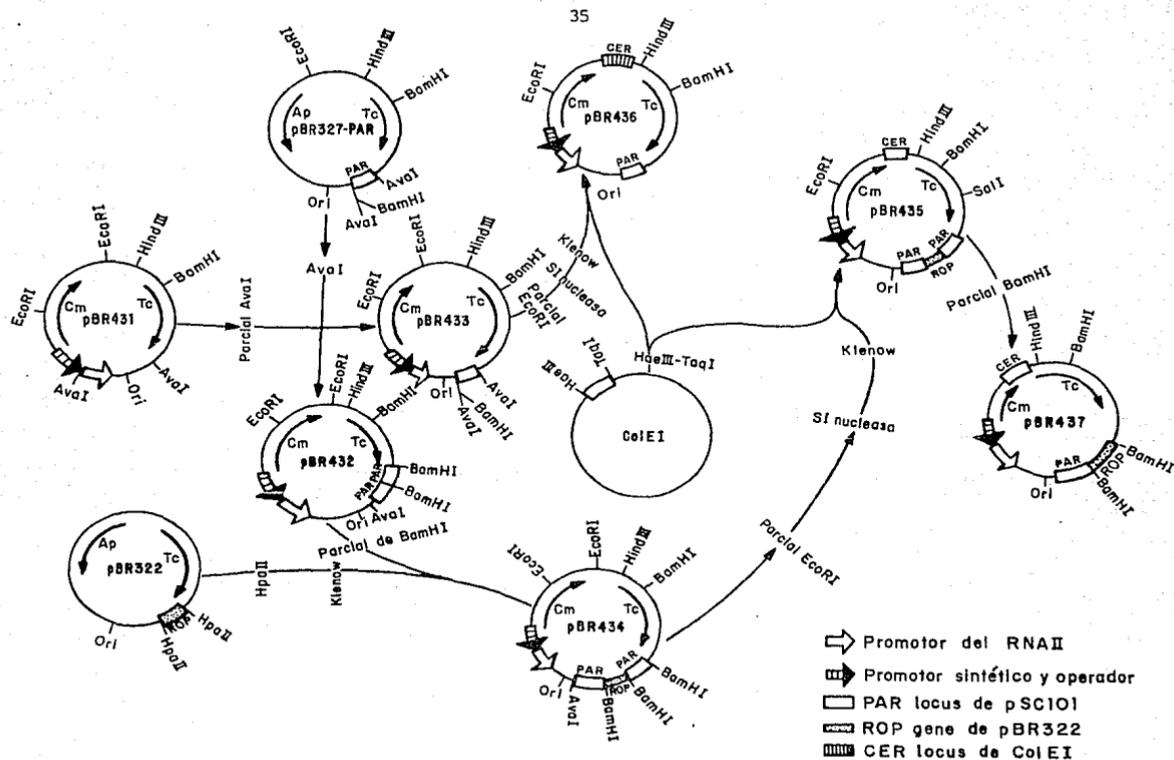


Fig. 3. Representación diagramática de la construcción de los plásmidos del pBR431 al pBR436 (25), y la posterior construcción del pBR437 a partir del pBR435.

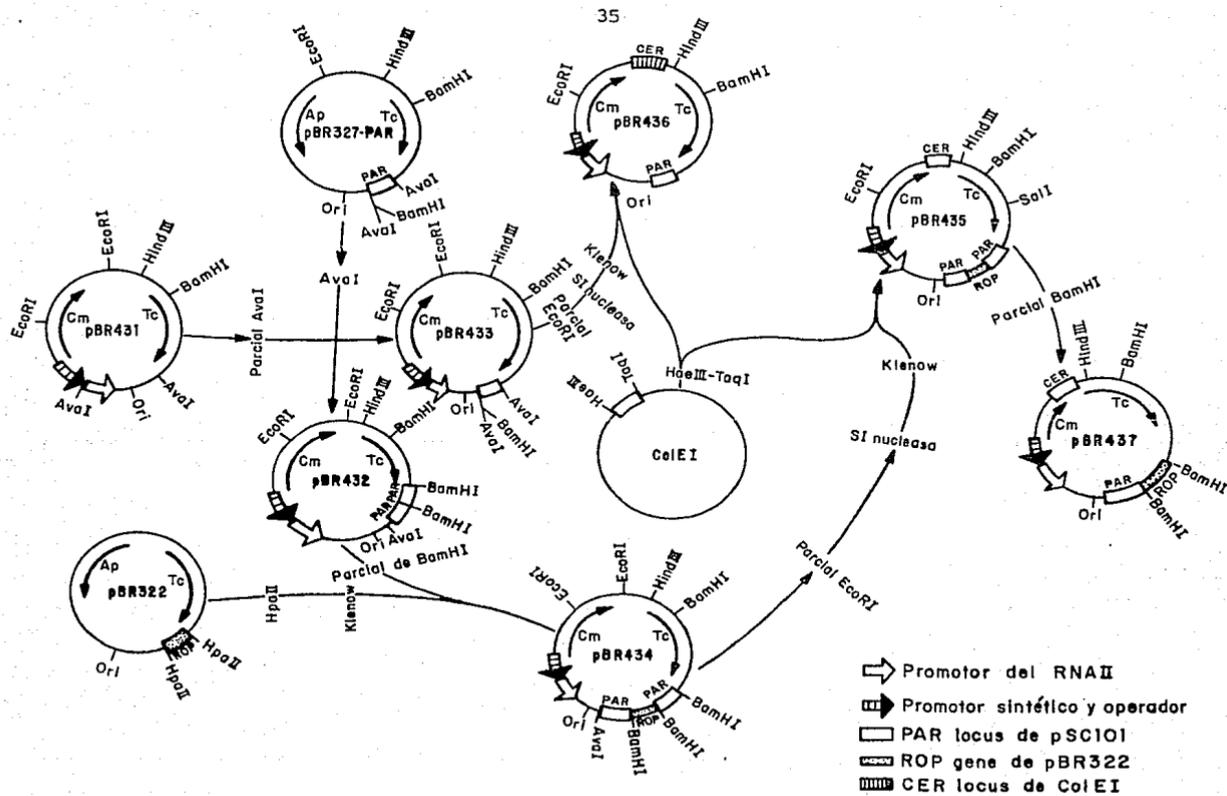


Fig. 3. Representación diagramática de la construcción de los plásmidos del pBR431 al pBR436 (25), y la posterior construcción del pBR437 a partir del pBR435.

parciales con esta enzima (ver métodos).

Debido a que se ignoraba la orientación de los loci clonados en el pBR435 y a la importancia de su conocimiento para la manipulación de las futuras construcciones se recurrió a un análisis de la secuencia nucleotídica del plásmido pBR435 obtenida al variar las orientaciones de los fragmentos CER, PAR y ROP para ello se aplicó el paquete de análisis de secuencias nucleotídicas de la Universidad de Cornell para computadoras Apple (42).

Se aplicó éste paquete para generar el patrón de restricción esperado de sitios reconocidos por diferentes endonucleasas que mapearan dentro de los fragmentos clonados y por comparación de éste patrón con el obtenido por manipulación "in vitro" del DNA del plásmido con las mismas enzimas de restricción, se pudo deducir en qué orientación se clonaron tales fragmentos, (figura 4).

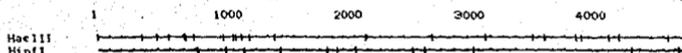
Se utilizaron las endonucleasa Bha I, Hinf I, HaeIII y Bam HI y de acuerdo con la secuencia nucleotídica del locus PAR reportada por Churchward (30) se logró identificar que los loci PAR se encuentran clonados en la misma orientación relativa. De manera similar se llegó a la determinación de la orientación del locus CER y el gene ROP. Observándose que el locus CER tiene en la posición 719 un sitio de restricción, para la enzima Hae III, y éste se encuentra cercano a la terminación del gen de Cloramfenicol. Uno de los loci PAR presenta en la posición 1859 un sitio de restricción, para la enzima HinfI, cercano al inicio del gen de Tetraciclina, posteriormente el gen ROP, tiene en la posición 2105, un sitio para ésta misma enzima, por lo que de acuerdo a la secuencia reportada por Balbas et al. (7), se

DATOS:pBR435 Configuration: CIRCULAR Longitud: 4625 pb

a)

Enzima	Secuencia	Cortes	# de		Inicio	Terminación
			Sitios	Frag.		
HaeIII	GGCC	2	1	741	1448	2188
			360	536	2169	2724
			483	434	2725	3158
			567	392	4250	4641
			711	390	3159	3548
			719	359	1	359
			783	255	3641	3895
			1017	234	763	1016
			1106	222	3941	4162
			1127	213	1235	1447
			1179	130	4642	4771
			1235	124	587	710
			1448	123	360	482
			2189	104	483	586
			2725	92	3549	3640
			3159	89	1017	1105
			3849	87	4163	4249
			3641	64	719	782
			3896	57	1178	1234
			3941	54	4772	4825
4163	51	1127	1177			
4250	45	3896	3940			
4642	21	1106	1126			
4772	8	711	718			
HinfI	GANTC	1	12	818	1281	3052
			1038	916	4727	817
			1192	466	2105	2570
			1490	384	4333	4726
			1859	391	2661	3051
			1949	369	1490	1858
			2105	298	1192	1489
			2871	220	818	1037
			2641	156	1949	2104
			3052	154	1038	1191
			4333	90	1859	1948
			4727	90	2571	2660

b)



c)



Fig. 4. a) Obtención de sitios de corte, # de sitios, tamaño de los fragmentos, así como, inicio y terminación de estos con las enzimas Hae III y Hinf I en el plásmido pBR435, utilizando el programa BACHREST (42).

b) Mapa lineal del plásmido a escala indicando sitios de corte con líneas verticales.

c) La predicción del patrón de bandas obtenido en una electroforesis, utilizando el programa MAP, para las mismas enzimas.

deduce que es transcrito en orientación opuesta al sentido de lectura del origen de replicación del plásmido. La otra copia del locus PAR contiene en la posición 2661 otro sitio, cercano al origen de replicación del plásmido. Era de importancia conocer las orientaciones de los fragmentos del pBR435, para dar una posible explicación a los resultados obtenidos por Zurita (25) y además facilitar la caracterización del plásmido derivado de éste.

Con el fin de generar un plásmido que tuviera una copia de cada uno de los loci se llevaron a cabo, en el pBR435, digestiones parciales con la endonucleasa Bam HI, (ver métodos), el plásmido en forma líneal se recircularizó y se usó para ser transformado a diferentes cepas de E. coli, (figura 5). La búsqueda de la clona deseada se realizó por el método de Microensayos de DNA según Rodríguez (ver métodos), comparando el patrón de bandas generado por una digestión total del pBR435 con la endonucleasa Bam HI y el de las clonas probadas. Todas aquellas clonas que habían perdido el fragmento de PAR fueron seleccionadas, (figura 6), para su posterior caracterización. Esto se llevó a cabo utilizando las endonucleasa de restricción Hae III y Hinf I, los patrones generados se compararon con el del pBR435, observando que para la enzima Hae III, el fragmento que va del nucleótido 1448 al 2188, el cual incluye la secuencia de un locus PAR, desaparece para generar un fragmento de 300pb, (figura 7).

El plásmido obtenido se le llamó pBR437. Se determinó su número de copias en las cepas RRI, D1210 y JH101 (ver métodos), se utilizaron, como control interno de número de copias, el plásmido pACYC184 que presenta 18 copias por cromosoma (49) y el pBR327, como

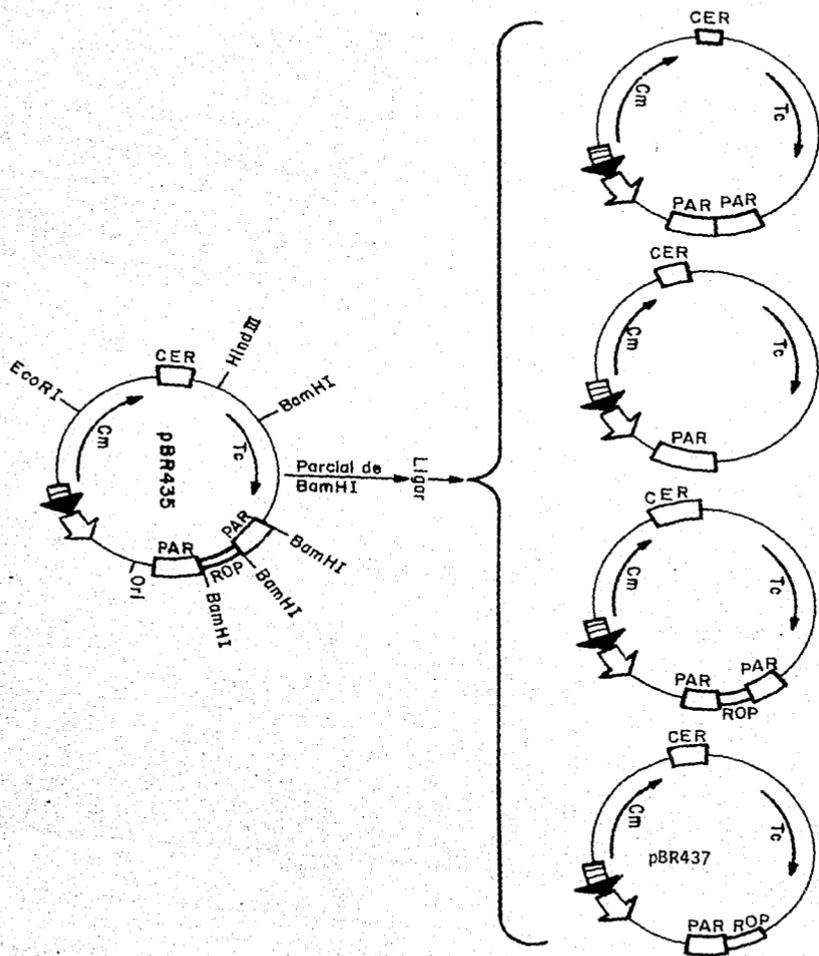


Fig. 5. Alternativas de formación de derivados del plásmido pBR435 obtenidos con una digestión parcial de la enzima BamHI y su posterior recircularización.

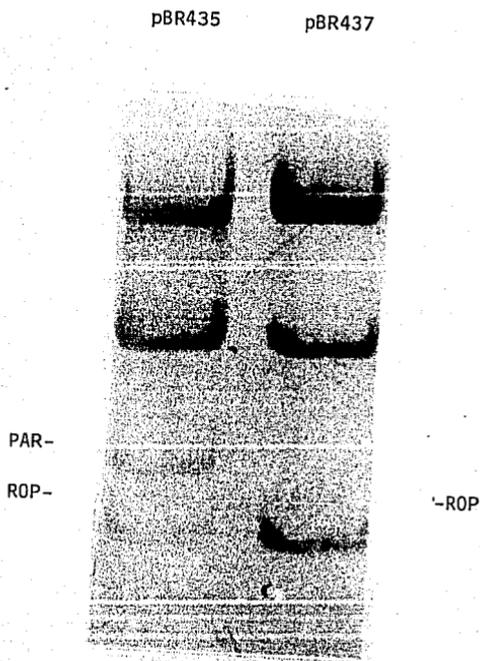


Fig. 6. Electroforesis de una digestión total con la enzima Bam HI de los plásmidos pBR435 y pBR437, señalando las bandas que corresponden a los fragmentos PAR y ROP.

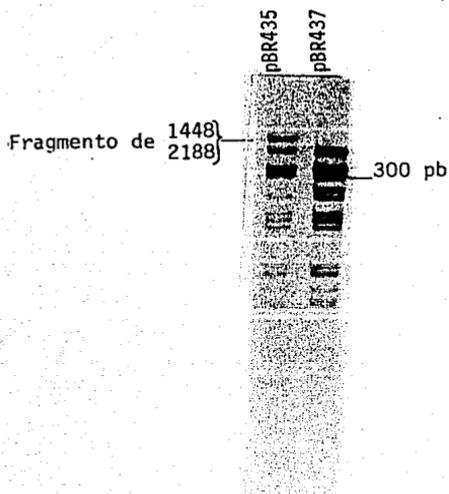


Fig. 7. Caracterización del plásmido pBR437 con la enzima Hae III, señalando el fragmento que desaparece y el que aparece con la -delección de PAR.

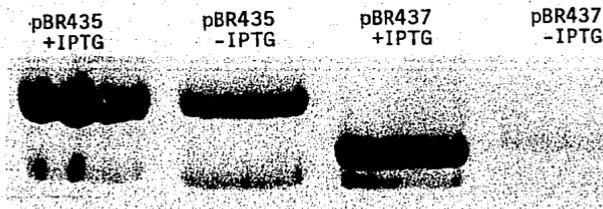


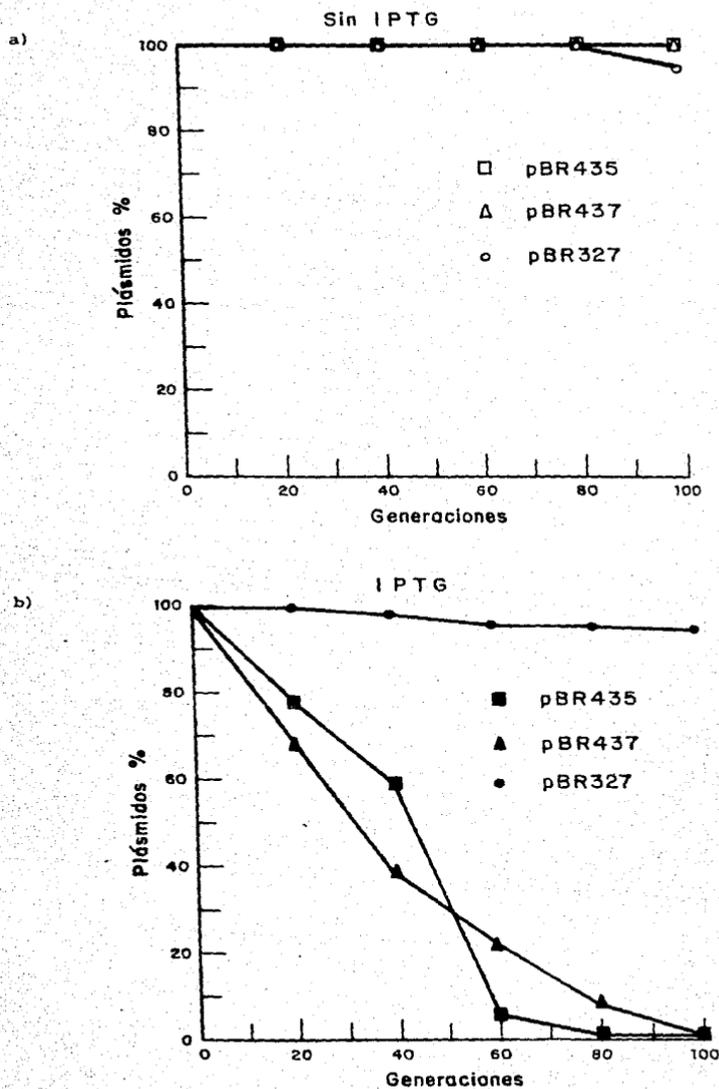
Fig. 8. Electroferograma de la determinación del número de copias de los plásmidos en condiciones sin inducción (-IPTG) y con inducción (+IPTG).

control de efecto del inductor en las condiciones metabólicas de la célula. Se decidió probar en una cepa que no sobreprodujera el represor de lac, como RRI, y en otra cepa que también presentara la mutación lac ($I^{\#}$), como JH101, y observar el comportamiento de los plásmidos. En la (tabla IV), se reportan los resultados obtenidos para la determinación del número de copias en las diferentes cepas y también se muestra un electroferograma del pBR435 y el pBR437 en condiciones con y sin inducción, (figura 8), realizadas en la cepa D1210. Se observó un elevado número de copias de los plásmidos pBR437, 327, y 435 aún en condiciones sin inducción en la cepa RRI a diferencia del comportamiento, de éstos, en las cepas JH101 y D1210 bajo las mismas condiciones. Aunque de acuerdo a estos resultados existe una mayor regulación del número de copias en la cepa JH101 que en la D1210. Las pruebas para la determinación de estabilidad se realizaron en ésta última cepa igualmente en condiciones de inducción y sin inducción. Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica 2; a) y b). Se decidió hacerlo en la D1210 porque las pruebas antes reportadas por Zurita (25), fueron hechas en esta cepa.

Tabla IV. NUMERO DE COPIAS DE LOS PLASMIDOS EN DIFERENTES CEPAS.

Cepa	Plásmido	Tamaño(Kb)	No. de copias por cromosoma	
			-IPTG	+IPTG
RR I	pACYC184	4.0	18.0	18.0
	pBR437	4.1	52.5	94
	pBR327	3.3	48.3	23.5
	pBR435	4.8	41.8	197.3
D1210	pACYC184	4.0	18.0	18.0
	pBR437	4.1	27.3	98.3
	pBR327	3.3	32.3	68.5
	pBR435	4.8	42.5	111.5
JM101	pACYC184	4.0	18.0	18.0
	pBR437	4.1	20.8	90.17
	pBR327	3.3	30.8	18.6
	pBR435	4.8	20.3	47.3

pACYC184, control de número de copias; pBR437, una copia de cada uno de los loci: PAR, ROP y CER; pBR327, control del efecto del IPTG en el metabolismo de la célula; pBR435, dos copias del locus PAR, una copia del locus CER y una copia del gene ROP. (-IPTG sin inductor, +IPTG con inductor).



Gráfica.-2. Determinación de la estabilidad de los plásmidos pBR435, pBR437, pBR327 en condiciones: a) Sin inducción; b) Con inducción (IPTG).

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Según los datos reportados por Zurita et. al (50), el locus PAR, le confiere mayor estabilidad al plásmido pBR327. Sin embargo en plásmidos con número de copias regulable y en condiciones de inducción, o sea, alto número de copias, la presencia del locus PAR en una o dos copias no confiere estabilidad. Para evitar este fenómeno se introdujeron otros loci que aumentaran el efecto de estabilidad y regulación de los plásmidos. Al realizar la caracterización de uno de estos plásmidos se observó que la estabilidad aún no es adecuada además de que no fueron reproducibles los datos antes reportados de el número de copias del plásmido pBR435 en condiciones sin inducción, en ninguna de las cepas probadas. Por lo anterior, se pensó, que existe un comportamiento anormal en la regulación del número de copias en las cepas a las cuales se introdujo el plásmido pBR437 obteniendo un alto número de copias, aún en condiciones sin inducción. Para el caso de la cepa RR1 el efecto se puede explicar porque no sobreproduce el represor, y no puede regular finamente el promotor, por lo tanto, existe abundante replicación del plásmido en esta cepa. En las cepas JM101 y D1210 que si presentan la mutación (I^+) (38), no se pudo obtener menos de 20 copias por cromosoma. El comportamiento anterior contrasta con los resultados obtenidos por Zurita (25), pero es esperable dada la estructura del plásmido construido, ya que los plásmidos control si conservan su número de copias normal. Es importante aclarar que no se pudo recuperar la cepa D1210 en la cual se hicieron las

caracterizaciones de los plásmidos construidos por Zurita (25), por lo que se recurrió a utilizar otros stocks de esta misma cepa sin lograr obtener resultados cercanos a los reportados anteriormente.

De la gráfica 2; a) y b), obtenidas en las pruebas de estabilidad con los plásmidos pBR435 y pBR437 en condiciones sin y con inducción, se observó que los plásmidos en bajo número de copias son todos estables, sin embargo en condiciones de inducción esta característica se pierde, aunque se obtiene una cinética de pérdida menor en el pBR437 en comparación al pBR435. Este fenómeno es difícil de explicar. No es claro porque dos copias de PAR pueden hacer que disminuya la estabilidad, ni porque aún en un número sustancialmente mayor de copias se observa una cinética de pérdida más pronunciada.

La observación de éstos fenómenos sugiere que la construcción de un plásmido tipo Col E I con un número de copias realmente bajo, y suficientemente estable requiere una mayor comprensión del comportamiento de los elementos genéticos implicados.

Finalmente para lograr acercarse más al objetivo deseado, se pueden sugerir algunas alternativas.

Idealmente, se aspiraría a tener un primero de replicación idéntico al original, ya que, nuestras construcciones involucran un promotor original parcialmente activo y uno regulable que transcribe unos 40 nucleótidos adicionales en el primero. Se ha descrito que la regulación fina del número de copias debe tener un efecto positivo sobre el grado de estabilidad relativo al número de copias (26).

Por otra parte, el comportamiento de los loci de estabilidad está sujeto a variables que no están bien entendidas. Por ejemplo, se

ha reportado que el locus CER debe ser transcrito para funcionar (36). El locus PAR presenta el fenómeno super PAR-, y contiene un terminador de transcripción, sin embargo, no se sabe de qué manera operan estos fenómenos o cual es su significado. Se podría evaluar la funcionalidad de los loci en diversas orientaciones, localizaciones y con diversos grados de transcripción, para lograr el mejor efecto.

Existen por otro lado una serie de alternativas de manipulación para graduar el número de copias. Esencialmente puede graduarse la fuerza del promotor regulable introduciéndole mutaciones que lo desvíen del consenso, pero sin inducir pérdida de actividad. También se puede introducir una copia adicional del segmento que codifica para el RNA I. Finalmente, se pueden manejar mutaciones puntuales en el DNA que codifica para el primero, disminuyendo su actividad.

En conclusión, el presente trabajo es un acercamiento adicional al objetivo de conocer y manipular los mecanismos de replicación y estabilidad en plásmidos de E. Coli. Se requiere un mayor conocimiento del sistema y una mayor cantidad de experimentos, pero se puede proponer que el objetivo planteado se puede lograr con los elementos ahora disponibles.

ABREVIACIONES.

Amp - Resistencia a ampicilina.

BSA - Seroalbumina Bovina.

CER - Determinante para la conversión de plásmidos multímeros en monómeros.

Cm - Resistencia a Cloramfenicol.

DNA - Acido desoxiribonucleico.

EDTA- Etilendinitrilotetracetato disódico.

IPTG- Isopropil B-D-tiogalactopiranosol.

ug - Microgramo.

ul - Microlitro.

ng - Nanogramo.

nm - Nanometro.

O.D.- Densidad óptica.

PAR - Partición.

pb - Pares de bases.

RNA - Acido ribonucleico.

ROP - Proteína reguladora.

rpm - Revoluciones por minuto.

Tc - Resistencia a Tetraciclina.

V - Volts.

REFERENCIAS:

- 1.- Adams, et al. The Biochemistry of Nucleic Acids. Academic Press. New York. 1979.
- 2.- Bolívar, et al. 1979. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 21:37-55.
- 3.- Stein, et al. 1982. Clonal inheritance of the pattern of DNA methylation in mouse cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 1:61-65
- 4.- Manniatis, et al. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 1982.
- 5.- Novick, et al. 1976. Uniform Nomenclature for bacterial plasmids. Bacterial rev. 40:168-184.
- 6.- Cabello, et al. 1976. Replication control in a composite plasmid constructed by *in vitro* linkage of two distinct replicons. Nature, 259:285-290.
- 7.- Balbas, et al. 1986. Plasmid vector pBR322: a review. Gene, 50:3-40.
- 8.- Hanahan, et al. 1983. Studies on transformation of Escherichia Coli with Plasmids. J. Mol. Biol., 166:557-580.
- 9.- Selzer, et al. 1983. The origin of replication of plasmid p15A and comparative studies on the nucleotide sequences around the origin of related plasmid. Cell, 32:119-129.
- 10.-Tomizawa, et al. 1977. Origin of replication of Colicin EI plasmid DNA. Proc. Natl. Acad. Sci., 74:1865-1869.
- 11.-Som, et al. 1982. Replication origin of plasmid RSF1030. Mol. Gen. Genet., 182:375-383.
- 12.-Itoh, et al. 1980. Formation of a RNA primer for initiation of replication of Col EI DNA by ribonuclease H. Proc. Natl. Acad. Sci., 77:2450-2454.

- 13.-Bolivar, et al. 1977. Origin of replication of pBR325 plasmid DNA. Proc. Natl. Acad. Sci., 74:5265-5269.
- 14.-Davidson, J. 1984. Mechanism of control of DNA replication and incompatibility in Col EI -type plasmid- review. Gene, 28:11-15.
- 15.-Tomizawa, et al. 1981. Inhibition of Col EI RNA primer formation by a plasmid -specific RNA small. Proc. Natl. Acad. Sci., 78:1421-1425.
- 16.-Wong, et al. 1982. Temperature sensitive copy number mutants of Col EI are located in an untranslated region of the plasmid genome. Proc. Natl. Acad. Sci., 79: 3570-3574.
- 17.-Tomizawa, et al. 1981. Plasmid Col EI incompatibility determined by interaction of RNA I with primer transcript. Proc. Natl. Acad. Sci., 78:6096-6100.
- 18.-Lacatena, et al. 1981. Base pairing of RNA I with its complementary sequence in the primer transcript inhibits Col EI replication. Nature, 294:623-626
- 19.-Masukata, et al. 1984. Effects of point mutations on formation and structure of the RNA primer for Col EI replication. Cell, 36:513-522.
- 20.-Lacatena, et al. 1983. Interaction between RNA I and the primer precursor in the regulation of Col EI replication. J. Mol. Biol., 170:635-650
- 21.-Polisky, T. 1983. Structural analysis of RNA molecules involved in plasmid copy number control. Nucl. Acids. Res., 11:6381-6397.
- 22.-Tomizawa, et al. 1984. Control of Col EI plasmid replication: the process of binding of RNA I to the primer transcript. Cell, 38:861-870.
- 23.-Lacatena, et al. 1984. Control of initiation of pMB1 replication: Purified Rop protein and RNA I affect primer formation in vitro. Cell, 37:1009-1014.

- 24.-Tomizawa, et al. 1984. Control of Col EI plasmid replication: enhancement of binding of RNA I to the primer transcript by the Rom Protein. *Cell*, 38:871-878.
- 25.-Zurita, H. Tesis de Maestría en I.B.B. U.N.A.M. Modificación del origen de replicación de plásmidos tipo Col EI, y utilización de loci de estabilidad. 1985.
- 26.-Somers, et al. 1984. Multimerization of high copy number plasmids causes instability: Col EI encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell*, 36:1097-1103.
- 27.-Meacock, et al. 1980. Partitioning of bacterial plasmids during cell division: A cis-acting locus that accomplishes stable plasmid inheritance. *Cell*, 20:529-542.
- 28.-Tucker, et al. 1984. Structural and functional analysis of the par region of the pSC101 plasmid. *Cell*, 38:191-201.
- 29.-Helinski, et al. Plasmid in bacteria. Ed. Plenum Press. New York and London. 1985.
- 30.-Churchward, et al. 1983. The nucleotide sequence of replication and maintenance functions encoded by plasmid pSC101. *Nucl. Acids. Res.*, 11:5645-5658.
- 71.-Nordstrom, et al. 1980. Partitioning of plasmid RI in Escherichia Coli. I. Kinetics of loss of plasmid derivatives deleted of the par region. *Plasmid.*, 4:215-227.
- 32.-Gustafsson, et al. 1983. Binding between the par region of plasmids RI and pSC101 and the outer membrane fraction of the host bacteria. *EMBO Journal*, 2:27-32.
- 33.-Hakkart, et al. 1982. Protein H encoded by plasmid Clo BF13 involved in lysis of the bacterial host:II. Functions and regulation of synthesis of the gene H products. *Mol.Gen. Gent.*, 183:322-326.

- 34.-Hakkart, et al. 1982. Maintenance of the bacteria plasmid Clo DF13 in Escherichia Coli cells. II. Specific recombination functions involved in plasmid maintenance. Mol. Gen. Genet., 198:338-344.
- 35.-Hakkart, et al. 1984. Maintenance of multicopy plasmid Clo DF13 in Escherichia coli cells:II. evidence for site-specific recombination at par B. Cell, 36:203-209.
- 36.-Chan, et al. 1985. Nucleotide sequence and gene organization of Col EI DNA. J. Biol. Chem., 260:8925-8935.
- 37.-Lomeli, et al. 1985. Construction of plasmid vectors with inducible copy number and the effects stability loci in pBR322 derived. Plasmid, in press.
- 38.-Muller, et al. 1968. Mutants that make more lac repressor. Proc. Natl. Acad. Sci., 59:1259.
- 39.-Reznikoff, et al. The Operon. 2^{ed}. Cold Spring Harbor Laboratory. USA. 1980.
- 40.-Skogman, et al. 1983. The use of the partition locus to increase stability of thryptophan-operon-receiving plasmid in Escherichia Coli. Gene, 23:105-115.
- 41.-Hoack, et al. 1981. Maintenance and genetic stability of vector plasmids pBR322 and pBR325 in Escherichia coli K12 strains grown in a chemostat. Mol. Gen. Genet., 184:121-124.
- 42.-Fristersky, et al. 1982. Portable microcomputer software for nucleotide sequence analysis. Nucl. Acids. Res., 10:6451-6463.
- 43.-Greene, et al. 1978. General Method for Restriction Endonucleasa Purification. Nucl. Acids. Res., 5:2773-2780.
- 44.-Bellach, et al. 1976. A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the Eco RI restriction and modification of DNA. Fed. Proc., 35:2037-2043.

- 45.-Cohen, et al. 1973. Construction of a biologically functional bacterial plasmids "in vitro". Proc. Natl. Acad. Sci., 70:3240-3243.
- 46.-Bolivar, et al. 1977b. Construction and characterization of cloning new vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene, 2:95-113.
- 47.-Moser, et al. 1983. Characterization and complementation of pMB1 copy number mutant. Effect of RNA I gene dosage on plasmid copy number and incompatibility. J. Bacteriol., 154:809-818.
- 48.-Rodríguez, et al. Introducción. Técnicas de DNA Recombinante. Addison-Wesley USA, 1983.
- 49.-Chang, et al. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from p15A cryptic miniplasmid. J. Bacteriol., 134:1141-1156.
- 50.-Zurita, et al. 1984. Construction and characterization of new cloning vehicles. VII. Construction of plasmid pBR327par a completely sequenced, stable derivative of pBR327 containing the par locus of pSC101. Gene, 28:119-122.