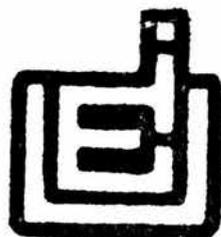




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES
IZTACALA**



DISEÑO Y CONSTRUCCION DE UN
PLASMIDO CON EL GEN DE
 β - GALACTOSIDASA PARA LA
TRANSFORMACION DE K. FRAGILES

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

MARIA MERCEDES GONZALEZ ENRIQUEZ

ASESOR.

M. EN C.

LIDIA T. CASAS

MEXICO, D. F.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A don Ino y dona Elfega (mis padres):

Por su espíritu de lucha que siempre han tenido, por todo lo que nos han dadoy porque los ADORO.

A mis hermanos:

Alfonso, Regulo, Roberto y Concepción porque de una u otra forma contribuyeron y contribuyen a mi realización personal y profesional. Gracias por los momentos compartidos y por sus estímulos.

De forma especial al tío Jaime, por el apoyo que me brindó durante mi carrera profesional.

A todo lo que amo y amaré.

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Lidia T. Casas.

Por haberme dado la oportunidad de ingresar a su grupo de trabajo, por el apoyo que me ha brindado y por la confianza que tiene en mí.

Al M. en C. Guillermo Ramírez A.

Por el interés que mostró y por su colaboración en la realización de este trabajo.

A todas las personas que contribuyeron de una u otra forma a la realización de este trabajo.

INDICE

1.- INTRODUCCION	1
2.- METODOLOGIAS DE LA INGENIERIA GENETICA	
2.1. Generación de fragmentos de ADN.	6
2.2. Establecimiento del enlace covalente de los ADNs.	8
2.3. Construcción de vehículos moleculares.	11
2.4. Introducción de la molécula híbrida hacia el huésped deseado.	13
2.5. Definición y caracterización del fragmento clonado.	15
3.- PANORAMA DE LA INGENIERIA GENETICA EN LEVADURAS	
Características del sistema de transformación de levadura (<i>S. cerevisiae</i>).	16
Historia.	20
Clases de plásmidos.	21
Marcadores usados en levadura.	23
Aplicaciones de la transformación.	24
4.- TRANSFORMACION EN KLUYVEROMYCES	
Estado actual del sistema de transformación de <i>Kluyveromyces</i> .	29
Genética de asimilación de la lactosa en <i>Kluyveromyces</i> .	32
Transformación de levaduras con el gen LAC 4 de <i>K. lactis</i> .	33
5.- PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO Y DISEÑO DEL PLASMIDO	
Selección del sistema de transformación.	36
Objetivo general.	39
Diseño del plásmido.	39
Objetivos parciales.	42

Construcción del plásmido.	
I. Construcción del pMG 1.	42
II. Construcción del pMG 2.	47
6.- MATERIALES Y METODOS	
6.1. Generales.	51
6.1.1. Reactivos.	51
6.1.2. Cepas y plásmidos.	51
6.1.3. Medios de cultivo.	52
6.1.4. Enzimas.	55
6.2. Técnicas.	56
6.2.1. Purificación de plásmidos.	56
6.2.2. Centrifugación en cloruro de cesio.	58
6.2.3. Eliminación de ARN centrifugando a través de una solución de NaCl.	59
6.2.4. Precipitación del plásmido con PEG.	60
6.2.5. Digestiones del ADN.	61
6.2.6. Electroforesis en gel de agarosa.	62
6.2.7. Aislamiento de segmentos de ADN mediante electroforesis preparativa.	62
6.2.8. Preparación y transformación de células competentes.	63
7.- RESULTADOS	
Construcción y caracterización del pMG1.	66
Construcción y caracterización del pMG2 .	70
8.- DISCUSION Y PERSPECTIVAS	81
9.- BIBLIOGRAFIA	88

INDICE DE FIGURAS

2.1. Metodologías de la ingeniería genética.	7
2.2. Algunas enzimas específicas y secuencias que reconocen.	9
2.3. Tipos de extremos con las enzimas de restricción	10
3.1. Expulsión de un gen	25
3.2. Sustitución de un gen.	26
3.3. Inactivación insercional de un gen.	28
5.1. Mapa del YIp 5.	41
5.2. Mapa del pMJ05.	44
5.3. Mapa del Tn 5.	45
5.4. Mapa del pK16 (Dikson R. C.)	49
7.1. Posibles insercciones del gen LAC 4 en la construcción del pMG 2.	74
8.1. Construcción del pMG2.	82
6.2. Mapa del PK16 (Breuning K. D. <u>et. al.</u> 1984).	84

INDICE DE FOTOS

7.1. Caracterización del YIp 5.	67
7.2. Construcción del pMG 1.	68
7.3. Caracterización del pMG 1.	71
7.4. Digestión parcial del pK16 con Eco R1.	72
7.5. Digestión parcial del pK16 con Bam H1.	75
7.6. Caracterización del pMG 2A.	79

ABREVIATURAS

μ g	Microgramo
μ l	Microlitro
D 0	Densidad óptica
n m	Nanómetros
Md	Megadalton
Kb	Kilobase
X-gal	5 bromo, 4 cloro, 3 indol β -D-galactosido
DTT	Ditiotreitol
PEG	Polietilen glicol
Amp	Ampicilina
Km	Kanamicina
Tc	Tetraciclina
R	(exponente) resistencia
S	(exponente) sensibilidad
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno

1 par de bases = 660 daltons.

RESUMEN

Con el objetivo de construir una cepa sobreproductora de α -galactosidasa de K. fragilis se construyó un plásmido (pMG 2), el cual se caracteriza por estar constituido por el YIp 5, el gen neo del Tn 5 y el gen LAC 4 de K. lactis.

El YIp 5 es un plásmido integrativo de levadura constituido del pBR322 (un plásmido bacteriano) y el gen URA 3, el cual codifica para una enzima de la vía biosintética del uracilo. A este plásmido se le clonó el gen neo porque no se tiene una cepa auxótrofa de URA 3 y por lo tanto no se puede usar este gen como marcador. Debido a que el gen neo da resistencia a las bacterias hacia la kanamicina (Km) y a las levaduras hacia el G418, puede ser usado como un marcador.

La clonación del fragmento de ADN que contiene el gen neo (1.8 Kb) se hizo entre los sitios Hind III / Bam HI del YIp 5 (pMG 1). La clonación del gen LAC 4 6.2 (Kb), gen estructural de la α -galactosidasa de K. lactis se hizo en el sitio Bam HI del plásmido pMG 1.

INTRODUCCION

En 1973 con el descubrimiento de las enzimas de restricción se inicia una etapa en el desarrollo de la biología molecular: nace la Ingeniería Genética.

Las técnicas de ADN Recombinante (nombre que también se le da a la ingeniería genética) consisten en la unión covalente in vitro de un fragmento ADN de origen diverso con el ADN de un vehículo molecular capaz de replicarse autónomamente o de integrarse al cromosoma cuando se introduce a un huésped.

La principal contribución de la ingeniería genética a la biología molecular es el aislamiento y el análisis estructural detallado de un gran número de genes con lo cual se ha logrado un gran avance en el entendimiento de la organización, regulación y expresión genética tanto de procariotes como de eucariotes. (Churchward G. y Chandler M. 1985).

La ingeniería genética es una herramienta útil para la adquisición de información básica pero además tiene un gran potencial industrial debido a que puede lograr el mejoramiento genético de cepas que producen algún metabolito por fermentación, incluso puede diseñar cepas que hagan nuevos metabolitos (Hopwood D. A. 1981).

En E. coli, por ejemplo se ha logrado la producción de varias proteínas extrañas a la bacteria. Estos compuestos van desde enzimas útiles a la biología molecular como la ligasa de ADN, la endonucleasa Pst I, hasta proteínas con aplicaciones terapéuticas

como es el caso de hormonas humanas, inmunoglobulinas, enzimas involucradas en la coagulación sanguínea y en la producción de antígenos de virus, bacterias y parásitos.

Una de las proteínas de interés actual es la β -galactosidasa (lactasa) tanto de hongos como de levaduras, la cual se utiliza para la hidrólisis de la lactosa en la leche y en subproductos de leche, principalmente suero. Las razones de este interés son básicamente nutricionales e industriales.

Se sabe que la leche (por su alto contenido de lactosa; 4.8 %) no puede ser consumida por cierto grupo de personas debido a que les ocasiona trastornos digestivos. Esto es consecuencia de que no sintetizan β -galactosidasa, enzima intestinal que hidroliza la lactosa en sus monómeros glucosa y galactosa para que éstos puedan ser asimilados.

Por otra parte, en el área industrial los problemas ocasionados por la lactosa están relacionados a la utilización del suero de leche y a la manufactura de productos de leche.

El suero de leche normalmente es un subproducto en la manufactura de quesos que se desperdicia. En México por ejemplo, se producen alrededor de un millón de toneladas de suero al año, que al vertirse a las cañerías provoca graves problemas de contaminación por su alto valor de DBO. (Castillo R. E. 1986). El principal obstáculo de su utilización es el contenido relativamente alto de lactosa (4-5 %) comparado al de proteína (.6 a .8 %).

En la manufactura de productos lácteos concentrados, el principal problema es la cristalización de la lactosa, lo cual le da

una textura desagradable a dichos productos. La cristalización se debe a la baja solubilidad y al alto contenido del disacárido.

Existen varios métodos físicos, químicos y biológicos para reducir el contenido de lactosa en leche y productos de leche, uno de los más prometedores es la hidrólisis enzimática (Gekas V. & López-Leiva H. 1985).

Con la hidrólisis de la lactosa se logra una mayor accesibilidad a la leche de personas intolerantes a la lactosa, un mayor poder edulcorante de los productos de leche hidrolizados y una reducción de la arenosidad de helados y otros productos, puesto que se previene la cristalización de la lactosa.

Actualmente en el Depto. de Biotecnología del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología se está trabajando en la elaboración de un catalizador con la enzima β -galactosidasa de *K. fragilis*. EL objetivo central del proyecto es el de obtener un producto que hidrolize a la lactosa presente en la leche y en el suero dulce de leche.

En este proyecto se han explorado varias estrategias para la elaboración del producto como: la utilización de células completas de levadura secas y permeabilizadas con actividad de β -galactosidasa, la utilización de un extracto enzimático semipurificado y la utilización de células inmovilizadas en acetato de celulosa. Independientemente del mecanismo que lleve al objetivo, existen ciertos parámetros y/o procesos que son fundamentales para el éxito del proyecto.

Uno de estos procesos es la obtención de una gran cantidad de células para hacer el catalizador, es decir la obtención de biomasa.

Para cubrir este punto es necesario que las condiciones de fermentación (pH, temperatura, composición del medio y otras) sean las óptimas. Sin embargo no basta con obtener una gran biomasa sino que además las células produzcan una buena cantidad de enzima.

La forma en que este trabajo contempla apoyar al proyecto es iniciando nuevos estudios, cuyo objetivo general es la obtención de una cepa sobreproductora de β -galactosidasa por medio de la ingeniería genética.

El primer paso para lograr este objetivo es diseñar y construir el plásmido con el cual se va a transformar la cepa de levadura de nuestro interés: K. fragilis, objeto de estudio del presente trabajo de tesis.

Una segunda parte del proyecto sera la transformación de K. fragilis y la caracterización de las transformantes que sobreproduzcan la enzima.

En la sección siguiente se dá un resumen de las principales técnicas de ingeniería genética con el objetivo de que el lector tenga una idea general de la misma, seguido de un panorama del estado actual de la ingeniería genética en S. cerevisiae, porque es la levadura en donde se ha desarrollado más, para posteriormente abordar temas más enfocados a la presente tesis como son: el estado actual de la transformación en Kluyveromyces, conocimientos genéticos relacionados a la asimilación de lactosa y algunas transformaciones realizadas en levadura con el gen que codifica para la β -galactosidasa de K. lactis (gen LAC 4).

Con estas herramientas se plantea el proyecto de: "Construcción de una cepa sobreproductora de β -galactosidasa" y se analizan sus posibles ventajas y desventajas en cuanto a la estrategia tomada. Por último se presenta el diseño experimental para la construcción del plásmido.

METODOLOGIAS DE LA INGENIERIA GENETICA

Las metodologías que requiere la ingeniería genética para lograr su objetivo están orientadas a: (figura 2.1)

- 2.1.- La obtención del fragmento de ADN a clonar.
- 2.2.- El establecimiento del enlace covalente de los ADNs.
- 2.3.- La construcción de vehículos moleculares.
- 2.4.- La introducción de la molécula híbrida hacia el huésped deseado.
- 2.5.- La detección y caracterización del fragmento clonado.

2.1.- GENERACION DE FRAGMENTOS DE ADN.

El primer paso en la obtención de un gen es la separación de éste del resto del genoma. La fragmentación del ADN con endonucleasas de restricción, la síntesis de cADN a partir de un mRNA utilizando la enzima transcriptasa inversa, la síntesis química de ADN y los fragmentación mecánica son métodos con los cuales se puede realizar este paso.

La elección del método a utilizar depende en gran parte del objetivo del trabajo, por ejemplo el cADN es adecuado para aislar genes de eucariotes porque a menudo estos tienen intrones los cuales impiden su expresión en bacterias, por lo tanto no es posible un aislamiento directo de dichos genes. El ADN sintetizado químicamente es usado en el aislamiento de genes específicos en la mutagénesis

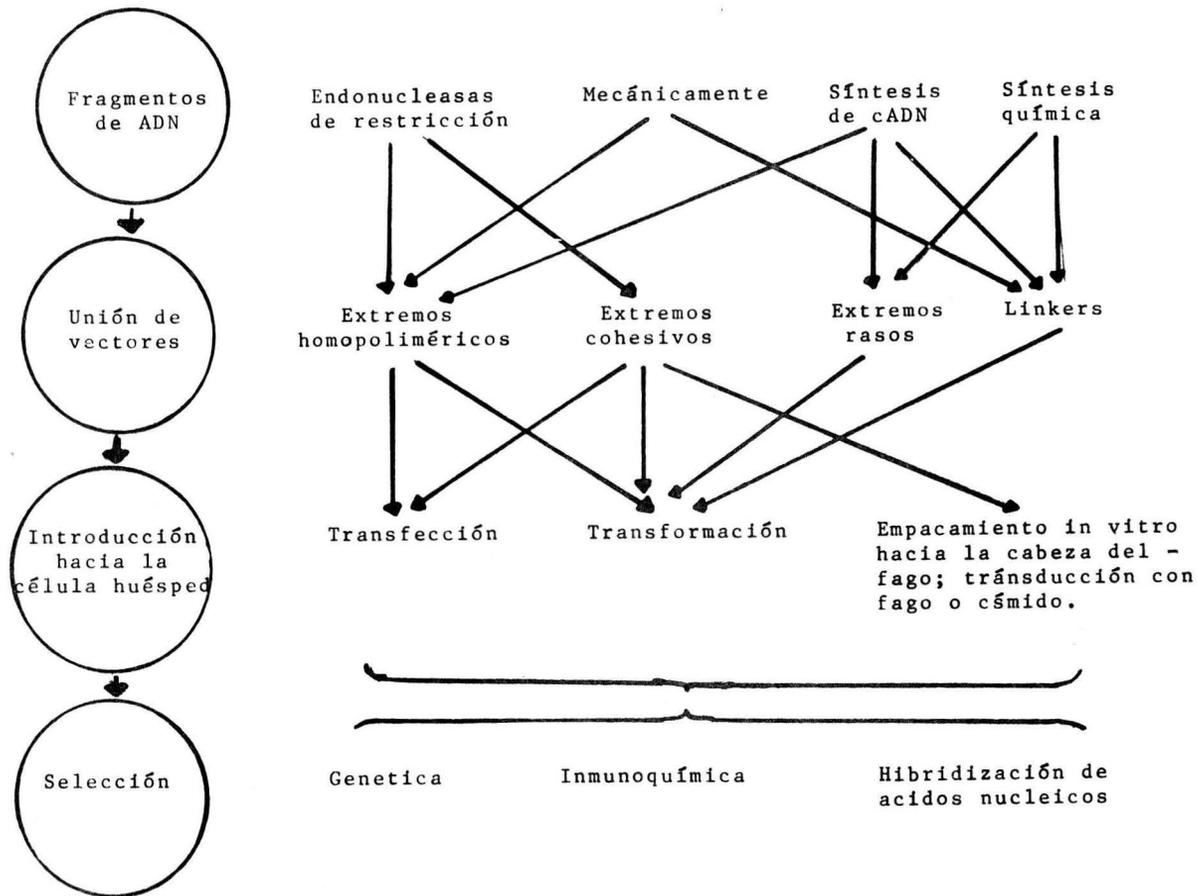


Figura 2.1. Esquema que muestra las diferentes metodologías involucradas en la ingeniería genética (Old R. W. & Primiose S. B. 1982).

sitio específica, en la construcción de genes de difícil aislamiento, etc. (Lomeli B. H. 1984)

Pero la forma más común de generar los fragmentos de ADN es por medio de endonucleasas de restricción. Estas enzimas se caracterizan porque reconocen diferentes secuencias de 4, 5 ó 6 pares de bases y cortan al azar después de dicha secuencia (enzimas de tipo I) o bien dentro de la secuencia formando extremos definidos (enzimas del tipo II) (figura 2.2).

Una característica de las secuencias de reconocimiento es que son palíndromes, es decir que la secuencia nucleotídica de las dos cadenas es la misma, cuando cada una se lee en el sentido 5' a 3'. En base a la forma que corte la enzima con respecto al eje de simetría de la secuencia palíndrome se obtienen fragmentos cohesivos 5', 3' o extremos rasos (figura 2.3) (Maniatis T. et. al. 1982).

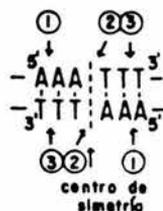
2.2.- ENLACE COVALENTE DE FRAGMENTOS DE ADN.

En la construcción de moléculas recombinantes, un paso importante es la unión covalente del vector y el ADN que se quiere clonar. Para unir los fragmentos de ADN con extremos cohesivos, estos se incuban con la enzima ADN ligasa del fago T4 o de E. coli, las cuales forman un enlace fosfodiéster entre los extremos 5' fosfato y 3' hidroxilo. Los fragmentos de ADN que tienen extremos rasados sólo pueden ser unidos con la ADN ligasa de T4.

Un procedimiento muy versátil para unir fragmentos con extremos rasados es emplear un conector sintetizado químicamente. La unión de dos fragmentos de ADN por medio de dicho conector crea sitios para enzimas de restricción a cada lado del ADN extraño facilitando que

Tetranucleótido		Pentanucleótido		Hexanucleótido	
<u>AluI</u>	AG [↓] CT	<u>Eco</u> RII	↓CC(^A / _T)GG	<u>AvaI</u>	C [↓] PiCGPuG
<u>HaeIII</u>	GG [↓] CC			<u>BamI</u>	G [↓] GATCC
<u>HhaI</u>	GCG [↓] C			<u>BglII</u>	A [↓] GATCT
<u>HpaII</u>	C [↓] CGG			<u>BalI</u>	TGG [↓] CCA
<u>MboI</u>	[↓] GATC			<u>EcoRI</u>	G [↓] AATTC
<u>TaqI</u>	T [↓] CGA	<u>HphI</u>	GGTGA → 8p.b.	<u>HindIII</u>	A [↓] AGCTT
		<u>MboII</u>	GAAGA → 8p.b.	<u>HpaI</u>	GTT [↓] AAC
				<u>PstI</u>	CTGCA [↓] G
<u>HinfI</u>	G [↓] ANTC			<u>XmaI</u>	C [↓] CCGGG
<u>DpnI</u>	[↓] GATC cuando está modificado			<u>HaeI</u>	(^A / _T)GG [↓] CC(^T / _A)
				<u>HaeII</u>	PuGCGC [↓] Pi
				<u>HincII</u>	GTPi [↓] PuAC

Figura 2.2. Endonucleasas específicas y las secuencias que reconocen
(Roberts, R. 1976).



corte	moléculas resultantes	denominación de los extremos
①	$\begin{array}{l} -A-OH \\ -\underset{3'}{\text{T}}\text{TAA}_5'-O-P \end{array} \quad \begin{array}{l} P-O-5'-AATTT-3' \\ HO-\underset{3'}{\text{A}} \end{array}$	5' salientes
②	$\begin{array}{l} -AAA-3'-OH \\ -\underset{3'}{\text{T}}\text{T}_5'-O(P) \end{array} \quad \begin{array}{l} P-O-5'-TTT- \\ HO-\underset{3'}{\text{A}}\text{AA}- \end{array}$	rasos
③	$\begin{array}{l} -AAATT-3'-OH \\ -\underset{3'}{\text{T}}-O-P \end{array} \quad \begin{array}{l} P-O-T- \\ HO-\underset{3'}{\text{T}}\text{TAAA}- \end{array}$	3' salientes

Figura 2.3. Clasificación general del tipo de extremos generados por las endonucleasas de restricción según la forma de corte (Lomeli Buyoli H. M. - 1984).

dicha molécula pueda ser cortada y recuperada después de la clonación y amplificación del gen deseado.

Los ADN recombinantes también pueden ser construídos in vitro usando la enzima terminal deoxinucleotidil transferasa. Esta enzima adiciona repetidamente nucleótidos al extremo 3-OH, formando extremos homopoliméricos cuando se incuban con un solo deoxinucleótido trifosfato. De esta forma extremos de residuos deoxiadencilato y deoxitimidilato (alternativamente deoxiguanocina y deoxicitocina) son adicionados a los ADNs que se desean unir covalentemente. Las dos moléculas diferentes pueden entonces ser anilladas y selladas covalentemente por la acción de exonucleasa III, ADN polimerasa I y ADN ligasa o simplemente anillada e introducida directamente a la bacteria. Debido a que la molécula vector no puede reformar un círculo sin la presencia del fragmento del ADN extraño con extremos homopoliméricos complementarios, este procedimiento da una producción alta de círculos de ADN recombinante in vitro. Una desventaja de esta técnica es que una vez que un gen ha sido clonado, no puede ser separada directamente para la transferencia a otro vector (Old R. W. & Primiose S. B. 1982).

2.3.- CONSTRUCCION DE VEHICULOS MOLECULARES.

La elección del vector es una consideración importante en las estrategias del diseño experimental para clonación. Existe una gran variedad de vectores disponibles con diferentes características pero en general los vectores de clonación deben ser replicones autónomos relativamente pequeños, estar bien caracterizados física y genéticamente, llevar un marcador genético fácilmente seleccionable y ser fácilmente purificados en grandes cantidades. Como

características adicionales deseables pero no necesarias podemos mencionar la presencia de sitios únicos de restricción, la disponibilidad de un medio para identificar las moléculas recombinantes y la presencia de promotores asociados adecuados con el vector en casos donde el promotor endógeno no es reconocido por el huésped o donde ha sido separado del gen clonado.

Los plásmidos y los fagos son las clases de moléculas vector que han sido usadas como vehículos para el aislamiento y expresión de genes.

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosomales que normalmente existen como moléculas de ADN circular y que confieren alguna característica especial a su huésped. La resistencia a un antibiótico, a metales pesados, la producción de un antibiótico, de enterotoxinas, de ácido sulfhídrico, de bacteriocina son algunos ejemplos de las características que puede conferir un plásmido.

Los plásmidos más ampliamente usados en E. coli son derivados de plásmidos pequeños, multicopia como: pMB9, p15A y Col E1, pero también son usados los plásmidos de control restringido (bajo número de copias) como el pSC 101. Esta última clase de plásmidos son útiles en el caso donde el producto del gen deseado es perjudicial para la célula huésped.

Los fagos son elementos genéticos constituidos por un núcleo de ADN o ARN (dependiendo de la clase de fago) y por una cubierta de proteínas, en algunas ocasiones también presenta una cola, son incapaces de replicarse autónomamente por lo que infectan a células para poderse perpetuar. Dentro de los fagos más ampliamente usados

como vehículos moleculares encontramos a los sus derivados.

La utilización de los fagos como vehículos moleculares resulta atractiva porque se pueden clonar fragmentos grandes de ADN, además las partículas del fago reconstituidas pueden ser preparadas eficientemente in vitro y una vez formadas las moléculas recombinantes, estas pueden ser propagadas eficientemente in vitro (Churchward G. y Chandler M. 1985).

Los vectores de inserción y los vectores de reemplazo son las dos clases de vectores que se han desarrollado con los fagos. Los primeros llevan una deleción en el genoma del fago permitiendo la inserción de ADN extraño en un sitio único de restricción sin concomitante eliminación del ADN del fago, mientras que en los de reemplazo una región no esencial del genoma del fago puede ser reemplazada por el ADN extraño (Churchward G. y Chandler M. 1985).

2.4.- INTRODUCCION DE LA MOLECULA HIBRIDA AL HUESPED DESEADO.

Después de la ligación, las moléculas híbridas deben de ser purificadas de la mezcla de ligación y propagadas. Esto se logra introduciendo el ADN ligado hacia un huésped adecuado. Debido a que la introducción y el mantenimiento de una molécula determinada en un huésped requiere que ésta sea capaz de replicarse, únicamente aquellas moléculas que contienen el vector pueden ser aisladas.

La forma de introducir el ADN ligado hacia un huésped puede ser utilizando los mecanismos naturales de intercambio genético (de bacterias) es decir por transformación y transducción o bien por empacamiento in vitro del ADN hacia virus maduros para posteriormente infectar a la célula huésped (Churchward G. y Chandler M. 1985).

La transformación es un fenómeno que ocurre naturalmente, es decir no es fenómeno restringido al laboratorio. La liberación de fragmentos de ADN que acompaña la muerte y lisis de una célula, da una fuente de material genético para la recombinación durante el crecimiento de microorganismos en el medio ambiente natural. Este fenómeno ha sido observado en una gran variedad de bacterias como Streptococcus pneumoniae, Bacillus subtilis, B. stearothermophilus, Haemophilus influenzae y Acinetobacter sp. (Rodríguez R. L. y Tart R. C. 1983).

Una gran variedad de protocolos han sido desarrollados para inducir la transformación en microorganismos que no la experimentan naturalmente pero que tienen importancia genética. El mecanismo general consiste en formar protoplastos del huésped deseado para después mezclarlos con el ADN deseado y que se efectúe la transformación.

El método para formar los protoplastos así como los métodos para fomentar la incorporación del ADN varían dependiendo del tipo de microorganismo usado, así por ejemplo para bacterias Gram negativas el método para formar protoplastos es utilizando cloruro de calcio. En levaduras el acetato de litio y el cloruro de cesio tienen un papel similar al del cloruro de calcio en bacterias. En cambio para bacterias gram positivas, hongos y plantas los protoplastos o esferoplastos son formados con enzimas tales como lisozima, zimolasa o helicasa.

La producción de transformantes de E. coli es incrementada con un pulso corto de calor, en ciertos casos la adición de cloruro de rubidio tiene el mismo efecto. Para bacterias Gram positivas, hongos

y plantas la exposición de las células a PEG promueve la toma del ADN, de aquí que el tiempo de exposición, concentración y peso molecular del PEG sean críticos para optimizar las frecuencias de transformación (o transfección) (Hopwood D. A. 1981). Para las células de tejido de mamífero el Dextran-DEAE estimula la toma del ADN (Churchward G. y Chandler M. 1985).

Un método alternativo para introducir ADN extraño hacia células, ha sido desarrollado en base a la capacidad de un bacteriófago para inyectar eficientemente ADN hacia una célula bacterial. Los precursores de la cabeza del fago son llenados con el ADN extraño y convertidos a cabezas de fago funcionales. Estas partículas son entonces capaces de inyectar su contenido a través de los sitios receptores sobre la bacteria receptora con alta eficiencia (Rodríguez R. L. & Tart R. C. 1983).

El procedimiento para introducir ADN extraño a un huésped por empacamiento in vitro está fundamentado en el uso de cósmidos y vehículos basados sobre el bacteriófago. Este procedimiento consiste en cubrir el ADN recombinante con la cubierta del fago, permitiendo introducirse hacia la bacteria huésped por el proceso normal de infección del fago. Para esto el ADN recombinante es mezclado con una concentración alta de precursores de cabeza de fago y colas de fago.

2.5.- DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN CLONADO.

La detección y caracterización de la molécula híbrida en la población de células transformadas o transfectadas es la última etapa a realizar en un experimento de clonación.

Esta detección puede ser realizada por selección o proyección de los clones, ya sea por métodos físicos, químicos y/o biológicos. La forma más simple de identificar una clona es por selección directa, la cual debe estar fundamentada en alguna propiedad que le confiera el vector o la secuencia insertada a la célula huésped, como pudiera ser complementación a una auxotrofia o resistencia a un antibiótico.

La detección inmunoquímica de clones que sintetizan una proteína extraña es otro método útil para casos donde el gen clonado se expresa pero no confiere alguna propiedad selectiva a la célula huésped.

Cuando la secuencia clonada no se expresa, la vía más adecuada para aislar la clona de interés es por una prueba de hibridización utilizando una sonda radioactiva de ADN específica.

La caracterización del ADN de la clona obtenida es adecuada para confirmar que el ADN requerido ha sido verdaderamente clonado. El paso inicial más importante para la caracterización es la obtención de un mapa de restricción del fragmento clonado, esto da las bases para un análisis posterior. El mapa puede ser obtenido cortando el ADN con enzimas de 6 pares de bases (sitios de corte poco frecuentes) para generar fragmentos relativamente grandes, y después cortar cada subfragmento con enzimas de 4 pares de bases (sitios más comunes). La principal dificultad de este procedimiento es el error en determinar exactamente el tamaño de cada subfragmento.

El mapa de restricción también puede ser suplementado por el uso de la técnica de hibridización, en la cual los fragmentos del ADN fraccionados sobre un gel de agarosa o acrilamida son

desnaturalizados y transferidos directamente a un filtro de nitrocelulosa e hibridizados con fragmentos individuales marcados que han sido generados por una segunda enzima de restricción.

La última meta para la caracterización física es obtener su secuencia polinucleotídica, debido a que ésta da información indispensable acerca de la organización del gen relacionada a posibles regiones control como operadores y señales de terminación e inicio para la transcripción y traducción. También se obtiene la posible secuencia de aminoácidos del producto génico, si es que este es traducido a proteína.

PANORAMA DE LA INGENIERIA GENETICA EN LEVADURAS

CARACTERISTICAS DEL SISTEMA DE TRANSFORMACION DE LEVADURAS:

Las estrategias para la clonación y expresión de segmentos de ADN en E. coli empleando plásmidos o bacteriófagos están bien establecidas y han sido usadas para aislar secuencias de ADN de procariotes y eucariotes.

Sin embargo los sistemas de procariotes no siempre son adecuados para el estudio de los genes eucariotes puesto que existen secuencias involucradas en la regulación que solo pueden ser estudiadas adecuadamente en el mismo sistema genético o porque muchos genes eucariotes no tienen equivalencia en bacterias y por lo tanto no pueden ser aislados por una complementación de una deficiencia bacterial. Además de que no todos los genes eucariotes son expresados eficientemente en un sistema bacteriano.

Sin duda estos problemas han influido enormemente en el desarrollo de los sistemas de eucariotes modificados por la ingeniería genética. Dentro de los eucariotes, el organismo pionero en la expresión de genes fue S. cerevisiae y en la actualidad es uno de los sistemas mejor conocidos.

Las ventajas que presenta el trabajar con este sistema son:

- La levadura puede ser manipulada fácilmente (como los procariotes) por el tamaño pequeño de su genoma (4 veces el de E. coli) y su tiempo de generación corto.

- En las levaduras se pueden usar las técnicas desarrolladas para sistemas bacterianos por las similitudes bioquímicas y fisiológicas que tiene ésta con respecto a las bacterias.

- La bioquímica y genética de levaduras ha sido estudiada extensamente. Se han obtenido mutantes en diferentes requerimientos nutricionales, cruzamiento, división celular, sensibilidad a radiación y otras características útiles y deseables.

- Se pueden estudiar fenómenos extremadamente complejos específicos de eucariotes como: estructura de cromosomas, división celular mitótica y meiótica etc.

- Debido a que se mantienen en estado haploide o diploide, la complementación entre marcadores genéticos puede ser fácilmente probada en cepas haploides que se entrecruzan, (cada una de las cuales lleva un marcador), lo cual simplifica grandemente el análisis de enlace y recombinación.

- Otra ventaja de usar la levadura como un huésped de clonación es que la secreción de sustancias sigue el mismo sistema general que el involucrado en células animales. En los eucariotes superiores la secreción involucra la participación del complejo de Golgi, donde la modificación post-traducional ocurre. Aunque actualmente un aparato de Golgi no ha sido detectado en levaduras, se han detectado organelos de secreción envueltos en membrana en mutantes de secreción de proteínas de levaduras (Old R. W. & Primiose S. B. 1982).

- Desde el punto de vista comercial las levaduras también presentan ventaja sobre las bacterias entéricas porque pueden ser usadas como un huésped para la producción de proteínas

farmacológicamente importantes ya que no son patógenas bajo ninguna circunstancia conocida y por ser eucariotes probablemente podrán expresar más eficientemente los genes eucariotes. (Hinnen A. et. al. 1978).

HISTORIA:

El inicio del desarrollo del sistema de transformación de levaduras comenzó con los estudios de Hinnen A. (1978). Él logró obtener transformantes incubando esferoplastos (obtenidos por digestión enzimática) con ADN, en la presencia de iones de calcio y PEG seguido por la regeneración de los mismos en medio selectivo. El plásmido que usó Hinnen A. fue el pYeleu 10, el cual está compuesto por un un plásmido de E. coli (Col E1) y por un segmento de ADN de levadura (LEU 2). De esta manera los esferoplastos de una cepa auxótrofa estable eran transformados a protótrofos con una frecuencia de 10^{-7} . El análisis de las transformantes obtenidas, indicó que la transformación solo ocurría cuando el ADN se integraba a una región homóloga cromosómica.

Por otro lado, en el mismo año Begg J. D. (1978) construyó plásmidos recombinantes que contienen el plásmido de 2 μ m de levadura (plásmido de función desconocida, que ocurre naturalmente en S. cerevisiae), fragmentos de ADN nuclear y el vector pMB 9 de E. coli. Estos plásmidos fueron capaces de replicarse tanto en E. coli como en la levadura, además de que transformaron a las mismas a una frecuencia más alta.

Pronto, otra forma de replicación autónoma fue descubierta cuando los genes de TRP 1 y ARG 4 fueron usados en experimentos de transformación. El análisis del TRP 1 mostró que era una sola secuencia de ADN vecina y no el gen TRP 1 en sí, el que confería al plásmido la propiedad de autoreplicarse. Actualmente muchas secuencias de replicación (ARS) han sido establecidas (Old R. W. & Primiose S.B. 1982).

CLASES DE PLÁSMIDOS DE LEVADURAS:

Los plásmidos de levadura generalmente presentan un origen de replicación bacterial, sitios de restricción que ocurren uno o dos veces dentro del plásmido (lo cual facilita la clonación de ADN extraño), marcadores de resistencia a un antibiótico que pueden ser seleccionados en E. coli y marcadores de auxotrofia como LEU 2, HIS 3, URA 3 y TRP 1 para la selección de las células de levadura transformadas.

La principal diferencia que existe entre las clases de plásmidos está relacionada a la forma en que se mantienen estos dentro de la célula, y es en base a esta característica que Botstein D. & Davies R. W. (1982) los clasificaron en:

YIp. (plásmido integrativo de levadura): Estos plásmidos se caracterizan porque no tienen un origen de replicación de levadura por lo que sólo pueden estar dentro de la célula cuando se integran hacia una región homóloga del cromosoma. La frecuencia de transformación es baja y las transformantes obtenidas son muy estables en comparación a las transformantes de YRp o YEp. La tasa de

segregación normalmente es menor al 1 % por generación en un medio no selectivo.

YEp. (plásmido episomal de levadura): La principal diferencia de ésta y las otras dos clases de plásmido con respecto al YIp es que se mantienen dentro de la célula porque contiene ciertas secuencias de ADN que les permite autoreplicarse en levadura.

La secuencia de ADN que le permite autoreplicarse al plásmido episomal es un segmento del plásmido de 2 μ m. Las ventajas que tiene esta clase de plásmido es que tienen una frecuencia alta de transformación (10 000 veces mayor que YIp), las transformantes son relativamente estables (la segregación ocurre en aproximadamente un 1 % por generación en un medio no selectivo) y el número de copias es relativamente alto.

YRp. (plásmido replicativo de levadura): Estos plásmidos son mantenidos dentro de la célula porque contienen un ARS (secuencia de replicación autónoma), la cual ha sido aislada de plásmidos endógenos de levadura o del cromosoma de ésta. Ellos transforman a la levadura eficientemente pero las transformantes son bastantes inestables, la tasa de segregación es mayor de 1 % en medio no selectivo. Los YRp tienen la ventaja de que ocasionalmente se integran a regiones homólogas además de que ofrecen una alta frecuencia de transformación.

YCP. (plásmido con centrómero): Plásmidos que se caracterizan por contener además de una secuencia ARS, un ADN centromérico funcional. Esta secuencia estabiliza el número de copias, limita la replicación y regulariza la segregación de los plásmidos.

MARCADORES USADOS EN LEVADURA

Una característica importante de la transformación de levaduras es que el mecanismo de selección más usado es por complementación a alguna auxotrofia, mientras que en procariotes el mecanismo de selección es por resistencia a un antibiótico.

Esto es consecuencia de la falta de un antibiótico efectivo contra eucariotes. Como ejemplo se puede citar el caso específico de levaduras, en el cual Hollenberg C. P. (1979) mostró que S. cerevisiae expresa el gen bacterial de resistencia a Amp, Km y Cm, pero debido a que esta levadura es insensible a antibióticos relacionados a la penicilina y es moderadamente sensible a Km y Cm dichos antibióticos no son útiles en la selección de las transformantes de levadura

El hecho de que el G418, un antibiótico relacionado estructuralmente a la gentamicina y kanamicina, tenga una actividad inhibitoria hacia una gran variedad de procariotes y eucariotes, ha abierto la posibilidad de desarrollar diferentes sistemas de transformación por selección a la resistencia de dicho antibiótico. Hasta ahora existen varios trabajos de investigación enfocados a este punto. Jimenez A. y Davies J. (1980) lograron establecer un sistema de selección para S. cerevisiae, ya que mostraron que dicha levadura podía expresar el gen neo de Tn5 (gen que da resistencia a las levaduras hacia el G418 y a las bacterias hacia Km), además de que mostraron su sensibilidad hacia el G418.

El uso de este sistema de selección se propagó rápidamente hacia otras células eucariotes como células L de ratón (Santerre F. R. et.

al. 1984) y otras líneas celulares de mamíferos como roedores, simios e incluso humanos (Colbere-Garapín F. et. al. 1981).

APLICACIONES DE LA TRANSFORMACION.

La ingeniería genética de levaduras ha proporcionado nuevas herramientas para el análisis genético detallado de las mismas. En base a las características presentadas por los diferentes sistemas de transformación se han planteado metodologías experimentales que favorecen la manipulación específica del genoma del huésped. Como ejemplo de estas metodologías podemos citar a la expulsión y sustitución de genes mutantes y la inactivación insercional de un gen.

Expulsión y sustitución de genes mutantes en levadura:

La expulsión es usada para analizar los cambios que ha experimentado la secuencia del ADN de un gen mutado por métodos clásicos. El método se caracteriza por ser rápido y exacto y por esquivar la necesidad de preparar un banco de la cepa mutante, eliminando la posibilidad de clonar alguna secuencia diferente a la del gen mutado (figura 3.1).

La sustitución permite que una sola copia de un gen (previamente modificado) sea integrado hacia el genoma de levadura en su localización cromosomal, remplazando completamente la copia de la cepa silvestre. Esto da una situación ideal para observar in vivo los efectos de la alteración (in vitro) de las secuencias de ADN (figura 3.2).

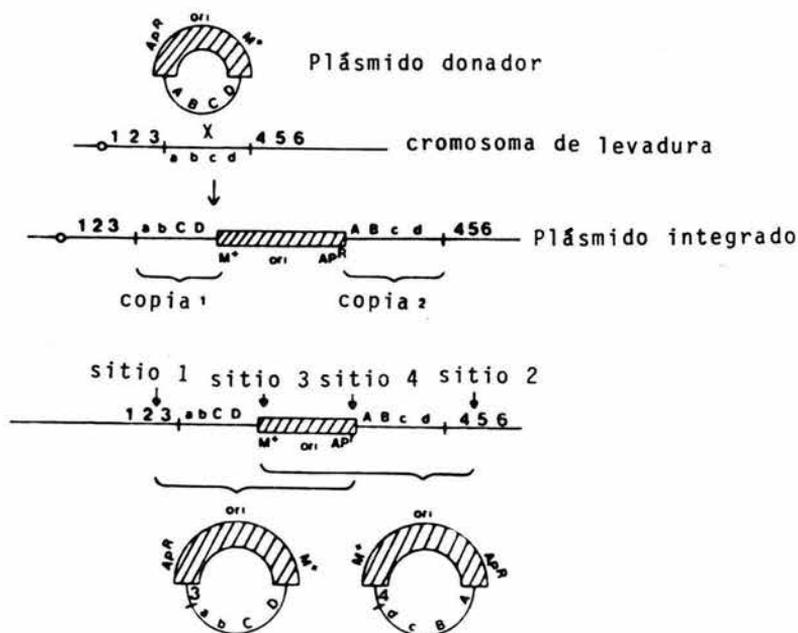


Figura 3.1. Expulsión de un segmento de ADN del cromosoma. Un plásmido que contiene una determinada secuencia cromosomal (A B C D) es integrado hacia el cromosoma de levadura después de un único evento de recombinación, dando una duplicación no al azar del segmento A B C D.

Para la expulsión de un segmento de ADN del cromosoma el ADN de la cepa transformada es digerido con una enzima de restricción que corte los sitios 1 y 2 (6 3 y 4). Los fragmentos lineales generados son ligados para formar los plásmidos correspondientes. Los plásmidos así obtenidos llevarán secuencias que originalmente estaban en la secuencia cromosomal a b (6 c d) y además una pequeña región adyacente (3 6 4). Por esta última característica a la expulsión se le considera como un método adecuado para "caminar" a lo largo del cromosoma. (Winston F. et al., 1983).

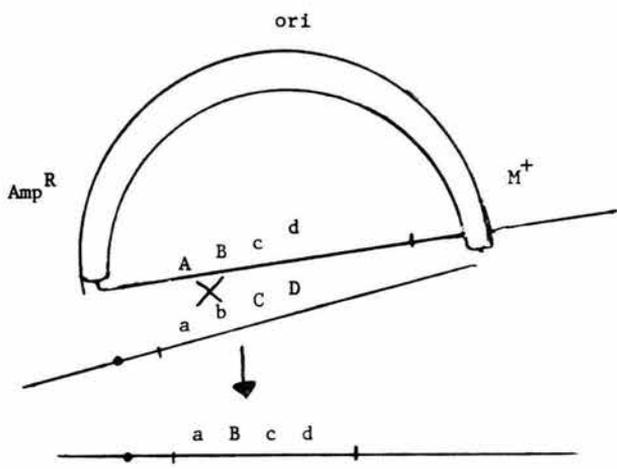


Figura 3.2. Sustitución de un gen (o un segmento de ADN) de levadura. La recombinación entre dos copias del segmento de ADN - reduce el número de copias a uno y se pierde el plásmido que se había integrado (Winston F. et. al. 1983).

La expulsión y sustitución de genes mutantes depende de las propiedades de la transformación integrativa en levaduras.

Aunque los métodos para expulsión y sustitución de genes mutados son concebidos junto con la genética molecular de levaduras, las técnicas podría ser aplicada a algún sistema donde la transformación integrativa ocurre. Normalmente estas técnicas son limitadas a levaduras y bacterias. La transformación integrativa en células superiores no parece depender de la homología de secuencias de ADN, por lo tanto es difícil imaginar la aplicación directa de estas técnicas a otros sistemas eucariotes para los cuales los sistemas de transformación existen.

Inactivación insercional de un gen de levadura:

Este método es usado para determinar si un fragmento clonado contiene un gen específico, si un gen clonado es esencial y para alterar o deletar completamente una región específica. El método se basa en que durante la transformación de levaduras los extremos libres facilitan la recombinación, porque interactúan directamente con secuencias homólogas en el genoma (figura 3.3).

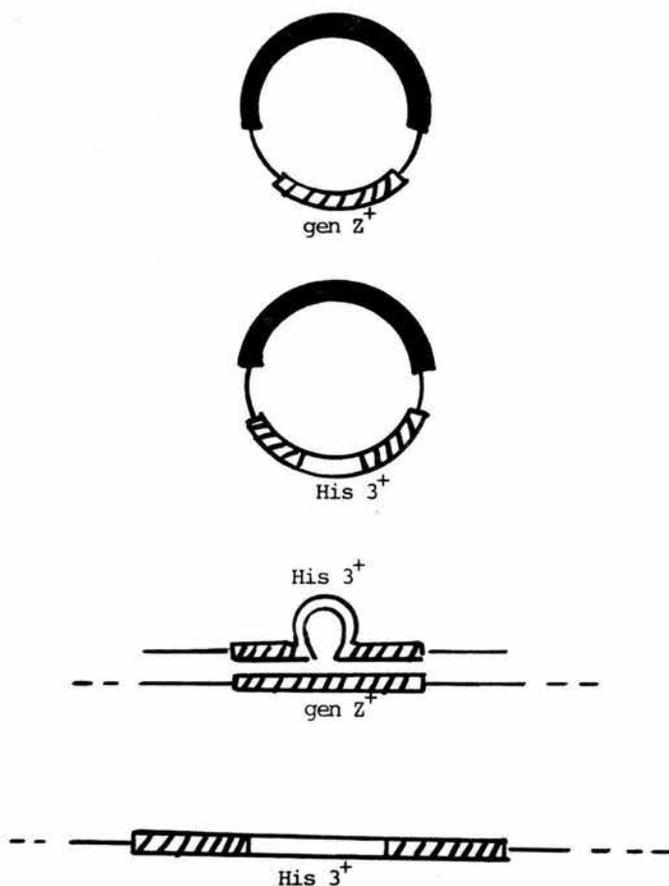


Figura 3.3. Inactivación insercional (rompimiento de un gen en un solo paso). El fragmento clonado que contiene el gen Z^+ es digerido con una enzima de restricción que corte dentro de su secuencia. Un fragmento que contiene un gen de levadura seleccionable (ejemplo - $His\ 3^+$ es clonado dentro del gen Z^+ . El fragmento que contiene el gen $His\ 3^+$ on secuencias del gen Z^+ a ambos lados, es liberado de las secuencias del plásmido. La transformación de las células de levadura con este fragmento lineal es realizada para que haya una sustitución del fragmento lineal por las secuencias del cromosoma (Rothstein R. J. 1983).

TRANSFORMACION DE KLUYVEROMYCES

El desarrollo de sistemas de transformación en diferentes especies de levadura es de importancia práctica debido a su potencial como huéspedes para la clonación y expresión de genes extraños y nativos (Das Sunil 1984). Sin embargo el desconocimiento de las condiciones de transformación para cada levadura, la falta de vectores adecuados y la falta de marcadores auxótrofos han obstaculizado las transformaciones de levaduras industriales.

Estos problemas fueron detectados en el desarrollo del sistema de transformación de K. lactis, cuando se trató de traslapar el sistema de S. cerevisiae a dicha levadura.

Algunas de las diferencias encontradas en relación a las condiciones de transformación han sido reportadas por Das Sunil & Hollenberg P. C. (1982) y por Sreekrishna K. et. al. (1984). Los primeros autores reportan que K. lactis es 10 veces menos eficiente que S. cerevisiae en la regeneración de protoplastos en condiciones similares. Ellos comprobaron que el estabilizador osmótico usado (sorbitol) estaba influyendo en este paso de la transformación, puesto que al cambiarlo por KCl la eficiencia de regeneración de protoplastos se mejoró por un factor de 3.

Sreekrishna K. et. al. (1984), en sus estudios de transformación de K. lactis establecieron que las condiciones para la regeneración de protoplastos eran diferentes para S. cerevisiae y K. lactis. La concentración adecuada de sorbitol y KCl para S. cerevisiae es de 1.2 M y 0.6 M respectivamente mientras que para K. lactis la

concentración de estos reactivos es de 1.5 M para sorbitol y 0.7 M para KCl.

Otra diferencia entre estas dos levaduras (Sreekrishna K. et. al. 1984) es la formación de esferoplastos. En S. cerevisiae normalmente se efectúa este paso con una digestión de la pared celular con glucanasas en cambio para K. lactis (excepto la cepa Y1118) es necesario un pretratamiento de las células con un agente reductor como 2-mercaptoetanol, L-cisteína o DTT para reducir enlaces glicosídicos.

Un trabajo que nos demuestra más claramente las diferencias en cuanto a las condiciones de transformación de estas dos levaduras, con un mismo método es el reportado por García H. M. et. al. (1985).

Aquí se trató de acoplar "la transformación con cationes alcalinos", un método establecido para S. cerevisiae, a K. lactis por lo que el análisis estuvo enfocado a aquellos factores determinantes en la transformación de S. cerevisiae. Los resultados que obtuvieron muestran que mientras para S. cerevisiae las sales de litio son necesarias y el 2-mercaptoetanol estimula la transformación de dicha levadura, para K. lactis las sales de litio son dispensables y el 2-mercaptoetanol tiene un efecto contrario al observado en S. cerevisiae. También se observó que el PEG 4000 y el shock térmico juegan un papel indispensable en la transformación de K. lactis.

El otro aspecto importante en el desarrollo del sistema de transformación de K. lactis como se mencionó anteriormente es la disponibilidad de vectores adecuados.

Das Sunil & Hollenberg P. C. (1982), fueron los primeros que usaron vectores de S. cerevisiae para transformar K. lactis. Ellos usaron en sus experimentos dos plásmidos replicativos el pTY75-LAC 4 y el pL 4. El primero es un plásmido que contiene el ADN de 2 μ m de S. cerevisiae, el gen de resistencia a Km de Tn903 y el gen LAC4 mientras que el pL 4 esta formado por el YRp 7 (ARS 1) y un fragmento limitado por sitios de la enzima Xho 1 que lleva el LAC 4.

Ambos plásmidos presentaron una baja frecuencia de transformación en relación a la presentada por S. cerevisiae bajo las mismas condiciones. Con el pTY75 obtuvieron 40 a 50 transformantes por μ g de ADN en S. cerevisiae, mientras que con K. lactis obtuvieron 4 transformantes por μ g de ADN. Un análisis mas profundo de las transformantes mostró que ambos plásmidos presentan un comportamiento diferente en las dos levaduras. El pL4 por ejemplo no se encuentra en el citoplasma celular, sino que se integra al cromosoma de K. lactis, lo que indica que el ARS 1 probablemente no funciona en dicha levadura. El pTY75, aunque no se integró al cromosoma de su huésped, la baja frecuencia de transformación y el más bajo número de copias pueden reflejar la ineficiente replicación y/o transmisión del origen de replicación del plásmido de 2 μ m.

Además de usar plásmidos específicos de S. cerevisiae para la transformación de K. fragilis, se optó por aislar secuencias ARS de Kluyveromyces. Das Sunil & Hollenberg C. P. (1982) mejoraron la eficiencia de transformación cuando construyeron plásmidos que contenían fragmentos de ADN del genoma de K. lactis. Ellos supusieron que los segmentos de ADN eran ARS. También Sreekrishna K. et. al. (1984), aisló varios KARS con los cuales se incrementaba la

eficiencia de transformación.

Otra manera de desarrollar un sistema de transformación de Kluyveromyces es construir vehículos pero con plásmidos nativos de esta levadura, la posibilidad que esta siendo explorada es la de usar los plásmidos killer, (K1 y K2). Estos son dos plásmidos lineales endógenos de Kluyveromyces que confieren a la célula huésped la capacidad de matar células sensibles, debido a que producen una toxina difusible. Hasta ahora se han hecho varios estudios acerca del funcionamiento de cada plásmido, del comportamiento de ambos plásmidos killer en otras levaduras como S. cerevisiae y C. pseudotropicalis, de la secuencia de los plásmidos y de la purificación y caracterización de la toxina por lo que la posibilidad de poder usar estos plásmidos como vectores en la transformación de Kluyveromyces esta siendo apoyada, incluso Louvencourt L. et. al. 1983 reporta la transformación de K. lactis usando el K1 como vector.

GENETICA DE LA ASIMILACION DE LACTOSA EN KLUYVEROMYCES

El conocimiento que existe acerca de la genética involucrada en la asimilación de la lactosa en K. lactis ha sido el resultado de investigaciones hechas para entender el mecanismo molecular de este proceso, la mayoría de las cuales han sido realizadas por el grupo de Dickson. Ellos han abordado el problema desde varios puntos, usando tanto técnicas bioquímicas como genéticas (ADN recombinante y genética clásica).

Dickson R. C. y Markin J. S. (1978) aislaron el gen que codifica

para la β -galactosidasa de K. lactis (LAC 4) usando técnicas de ADN recombinante. Posteriormente Lacy L. R. & Dickson R. C. (1981), determinaron que el mecanismo molecular de inducción era transcripcional. Esto fué posible debido a que el gen estructural fue usado como una sonda de hibridización para medir niveles de mRNA β -galactosidasa antes y después de la inducción de la enzima.

Por otra parte en un intento para elucidar el mecanismo molecular para la regulación de síntesis de β -galactosidasa Sheetz R. M. & Dickson R. C. (1980) aislaron y caracterizaron parcialmente 51 mutantes de K. lactis que no crecían en lactosa. En base a pruebas de complementación y estudios de mapas genéticos, ellos definieron 7 genes (LAC 3, 4, 5, 6, 8 y 9), uno de los cuales codifica para la β -galactosidasa (Sheet R. M. y Dickson R. C. 1981). A diferencia de las bacterias en donde los genes involucrados en una vía metabólica están agrupados en un operón, los genes que controlan el metabolismo en K. lactis no están contiguos excepto lac 4 y 5.

Posteriormente Dickson R. C., Sheet R. M. & Lacy L. R. (1981) descubrieron un gen adicional, lac 10c que gobierna la actividad transcripcional de β -galactosidasa, las mutaciones en este gen causan la síntesis constitutiva de la enzima.

TRANSFORMACIONES DE LEVADURA CON EL GEN LAC 4

Con el gen LAC 4 se han reportado cuatro transformaciones en levadura, de las cuales tres han sido en S. cerevisiae y una en K. lactis.

Dickson R. C. (1980) construyó tres plásmidos que llevan el gen LAC 4: YIplac 4, YRplac 4 y YEplac 4 los cuales difieren por la forma en que se mantienen dentro de la célula. Los resultados que obtuvo fué que todas las transformantes expresaban el gen de la β -galactosidasa, pero el nivel de la actividad enzimática dependía del tipo de plásmido usado, siendo más alta en plásmido multicopia (citoplásmaticos) y menor en plásmidos integrativos, lo que refleja que la actividad enzimática probablemente depende de la dosis del gen. La clase de plásmido también influye en la estabilidad del LAC 4. El principal problema que encontró Dickson R. C. es que las transformantes no crecían en lactosa por la falta de la proteína permeasa.

Posteriormente Sreekrishna K. & Dickson R. C. (1985) lograron obtener una cepa de S. cerevisiae que crecía en lactosa, cuando clonaron junto con el gen LAC 4 un fragmento de ADN de K. lactis que se encuentra entre 2 a 8.6 Kb arriba del extremo 5' de dicho gen. Al parecer este fragmento de ADN contiene el gen de la permeasa (LAC 12). Por experimentos con hibridización encontraron que el vector se integraba de 15 a 25 veces al azar al genoma de la levadura.

A las conclusiones que llegaron es que el fenotipo LAC 4 sólo ocurre cuando el plásmido se integra al genoma del huésped y solamente cuando lo realizaba en ciertos lugares. Al parecer la integración fue necesaria para la expresión del gen de la permeasa. La explicación dada a esto es que la integración probablemente sirva para activar la transcripción del gen de la permeasa fusionándolo a un promotor del huésped o separándolo de ciertas secuencias que impidan la transcripción y traducción.

En contradicción con lo que Dickson R. C. 1980 suponía, el fenotipo lac no depende de la dosis del gen integrado, ya que ellos obtuvieron dos transformantes de la misma cepa que tenían de 15 a 25 copias del gen integradas (por hibridización) pero una era lac⁺ y la otra lac⁻. Ellos también encontraron que el fenotipo lac es altamente inestable, lo cual no sucede con el fenotipo G418^R.

Recientemente Vellati-Bellini A. et. al. (1986) construyeron un plásmido que tiene fusionado el gen LAC 4 de K. lactis a un promotor inducible de S. cerevisiae: Gal 10, con lo cual lograron obtener una cepa de S. cerevisiae con altos niveles de β -galactosidasa. El resultado es que el gen LAC 4 esta ahora bajo el control de un sistema de expresión inducible, además de que la producción de la enzima depende también de las condiciones de crecimiento.

En K. lactis el gen LAC 4 ha sido usado como marcador para montar el sistema de transformación de esta levadura (Das S. & Hollenberg C. P. 1982).

SELECCION DEL SISTEMA DE TRANSFORMACION

Como se mencionó anteriormente este trabajo de tesis forma parte de un proyecto cuyo objetivo general es construir una cepa sobreproductora de β -galactosidasa.

La principal razón por la cual se desea tener una cepa con esta característica es porque esta representa una alternativa para incrementar la producción de la enzima lo cual favorecería al proyecto "Elaboración de un biocatalizador con actividad de β -galactosidasa". Este proyecto se realiza actualmente en el depto. de Biotecnología en el Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología.

Las alternativas que existen para la obtención de una cepa sobreproductora de cualquier metabolito son por genética clásica o por ingeniería genética. La diferencia entre ellas radica básicamente en que el mecanismo empleado por la genética clásica, es 100 % al azar porque la modificación que pueda experimentar la cepa no es predeterminada, en cambio en la ingeniería genética (en base al conocimiento que se tenga), se puede diseñar la forma de alterar el mecanismo normal de producción del metabolito, siendo la obtención de la cepa menos fortuita.

Una de las posibles formas de aumentar la producción de un metabolito por medio de la ingeniería genética es aumentando la dosis del gen, para lo cual se puede usar un plásmido con un alto número de copias o bien propiciar las condiciones para que el gen estructural se integre al cromosoma dos o más veces (especialmente en levaduras).

Otra forma es clonando al gen estructural un promotor constitutivo o inducible.

Como se puede ver existen varias formas potenciales de alcanzar el objetivo antes planteado, pero nosotros decidimos tomar como primera estrategia la transformación de K. fragilis con un plásmido integrativo.

Esta estrategia presenta varias ventajas y desventajas sobre todo en la elección del sistema de transformación es decir en la elección del microorganismo a transformar: Kluyveromyces o Saccharomyces. A continuación se presenta estas.

A). Las ventajas de trabajar con S. cerevisiae son:

- S. cerevisiae es la levadura mejor estudiada en relación a su transformación, los vehículos construidos han sido un tanto específicos para esta, además su biología a nivel molecular es mejor conocida.

- Ha sido reportado que S. cerevisiae puede expresar el gen de β -galactosidasa de K. lactis.

B). Desventajas:

- El trabajar con S. cerevisiae implicaría clonar el gen de la permeasa además del gen de la β -galactosidasa, ya que esta levadura no tiene ninguna información genética para incorporar la lactosa. Este sistema ya fue probado y no es satisfactorio (Dickson R. 1980).

- La introducción de un sistema totalmente nuevo dentro de la parte biotecnológica ya establecida y en optimización.

Las principales ventajas y desventajas que presenta trabajar con Kluyveromyces son las siguientes:

C). Ventajas:

- Kluyveromyces es una levadura que tienen la información genética para realizar la hidrólisis de la lactosa por lo que clonando el gen de β -galactosidasa es factible obtener la cepa sobreproductora.

- Sería más fácil acoplar al proyecto una cepa sobreproductora de K. fragilis que una de S. cerevisiae, porque las condiciones de crecimiento y producción son conocidas.

D). Desventajas:

El principal inconveniente de utilizar Kluyveromyces es que el sistema de transformación de esta levadura está poco estudiado, por lo que no hay un gran adelanto en la construcción de vectores específicos. Sin embargo los informes encontrados nos indican que se ha podido transformar Kluyveromyces, aunque con una baja frecuencia.

En el presente proyecto se decidió abordar el problema usando una cepa de Kluyveromyces porque en el laboratorio se está trabajando con esta levadura en proyectos colaterales lo que trae como ventaja que una vez obtenida una cepa con una elevada actividad enzimática, ésta pueda ser más fácilmente acoplada a la obtención de un producto con actividad de lactasa, bajo las condiciones que se hayan establecido.

OBJETIVO GENERAL:

Diseñar y construir un plásmido con el gen de β -galactosidasa para la transformación de K. fragilis.

DISEÑO DEL PLÁSMIDO

Lo que influyó en la elección de un plásmido integrativo fue el hecho de que para mantener un gen clonado dentro de un huésped generalmente se requiere de presión selectiva y para un proceso fermentativo a gran escala esta implicaría un fuerte gasto. Como los plásmidos integrativos son más estables que los plásmidos replicativos sin presión selectiva se creyó que éste podría ser un buen comienzo para eliminar la necesidad de mantener una presión selectiva.

En base a estas características y un poco a los recursos se decidió trabajar con el YIp 5. Este es un vehículo de clonación usado para construcciones estables en el cromosoma de S. cerevisiae. El plásmido puede replicar en E. coli y lleva los genes de resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tc) del pBR322 para usarlos como marcadores de selección en E. coli. No se replica en levadura, la única forma de mantenerse es por recombinación con el cromosoma. El gen URA 3 de S. cerevisiae se usa como marcador en cepas de levadura auxótrofas en este gen. En algunas aplicaciones el gen URA 3 puede también ser usado como una región de homología para la recombinación en el cromosoma. Las construcciones una vez introducidas a la

levadura se segregan con el ADN cromosomal y están presentes en el mismo número de copias como cualquier secuencia cromosomal no repetitiva.

La secuencia del YIp 5 ha sido deducida de las secuencias del pBR322 y del gen URA 3. Aquí se asume la presencia de 10 residuos C y de 10 residuos G entre los pb 1428-1437 y entre 2601 y 2610. La secuencia de estas posiciones ha sido considerada provisional. (Ver figura 5-1)

Las dos modificaciones fundamentales que se le harán al plásmido YIp 5, para que pueda ser utilizado como un vehículo en la transformación de K. fragilis son:

- 1.- La clonación del gen LAC 4.
- 2.- La clonación del gen neo

La clonación del gen neo tiene por objeto el introducir un marcador a la célula ya que esta cepa no presenta auxotrofia para uracilo, así se planteó clonar en el vehículo un gen que diera resistencia a la levadura hacia algún antibiótico y de esta forma seleccionar a las células transformadas.

Las razones específicas por las cuales se decidió clonar el gen neo a nuestro vehículo son:

- 1.- El gen neo se ha utilizado como marcador en la transformación de S. cerevisiae (Webster T. D. & Dickson R. C. 1983), de K. lactis (Sreekrishna K. et. al. 1984) y de K. fragilis (Das Sunil et. al. 1984).

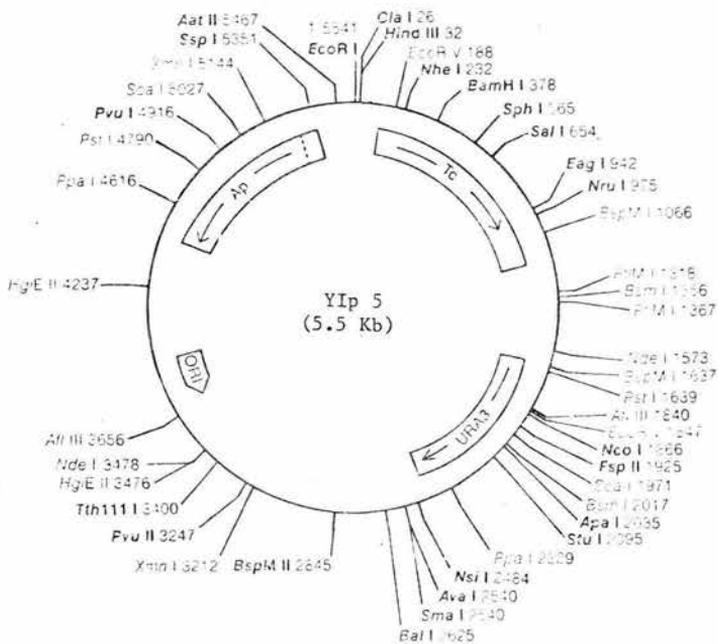


Figura 5.1. Mapa del Yip 5 que muestra algunos sitios de restricción (Manual Biolabs 1986).

2.- Este gen da resistencia a la levaduras para el antibiótico G418, y a las bacterias a la kanamicina, lo que facilita su manipulación en E. coli cuando se construye un vehículo.

3.- Aunque no se tiene el gen neo de Tn 903, se tiene la mayor parte del transposón Tn 5. Un gen del mismo es responsable de inactivar diferentes antibióticos 2-deoxystreptamina aminoglucoídos como kanamicina y G418.

OBJETIVOS PARCIALES:

1.- Clonar el gen neo, el cual nos va a servir como marcador, a un plásmido integrativo de levadura: YIp 5. (Construcción del pMG 1).

2.- Clonar el gen LAC 4, el cual codifica para la β -galactosidasa de K. lactis al pMG 1. (Construcción del pMG 2).

CONSTRUCCION DEL PLASMIDO:

El procedimiento a seguir en la construcción del plásmido es el siguiente:

I: Obtencion del pMG 1

II: Obtencion del pMG 2.

I: Obtencion del pMG 1.

El primer paso en la construcción del vehículo molecular es la clonación del gen neo. Este gen se tiene actualmente clonado en el sitio Hind III del pBR322 como un inserto de 3.4 Kb del transposón Tn

5, con lo cual se forma un plásmido de 7.7 Kb: el pMJ05. (figura 5.2).

La forma mas conveniente de extraer el gen neo es la de reducir al mínimo el tamaño del fragmento a clonar, para una mayor estabilidad del plásmido construido. En base a los mapas de restricción y a la secuencia reportada por Beck E. et. al. (1982) y Genilloud O. et. al. (1984) se analizó la estrategia más conveniente a seguir: (ver figura 5.3).

Del extremo 5' terminal, la enzima más adecuada para extraer el gen neo es Hind III porque Bgl II divide al promotor de dicho gen, además de que no existe este sitio en el YIp 5.

El extremo 3' terminal es el extremo en donde se puede reducir el fragmento a clonar. Las enzimas con las que se que se pudiera efectuar este paso, por ser estos sitios únicos o poco frecuentes en el Tn 5 son: Ava I, Bam HI, Bgl II, Sal I, Sma I y Xho I.

La posibilidad de usar Bgl II y Xho I no es favorecida porque no existen estos sitios en el YIp 5, además de que Bgl II inactiva al promotor. Si se usara Ava I o Sma I el problema radicaría al digerir el YIp 5 con Hind III / Ava I o Hind III / Sma I porque el fragmento que se eliminaría (2.5 Kb) incluiría el gen Ura 3. Al parecer las enzimas más adecuadas a usar son Bam HI y Sal I. Nosotros decidimos extraer el gen neo con una digestión Hind III / Bam HI por varias razones:

1.- La digestión del pMJ05 con estas enzimas nos dá un fragmento de 1.8 Kb (el cual contiene el gen neo completo).

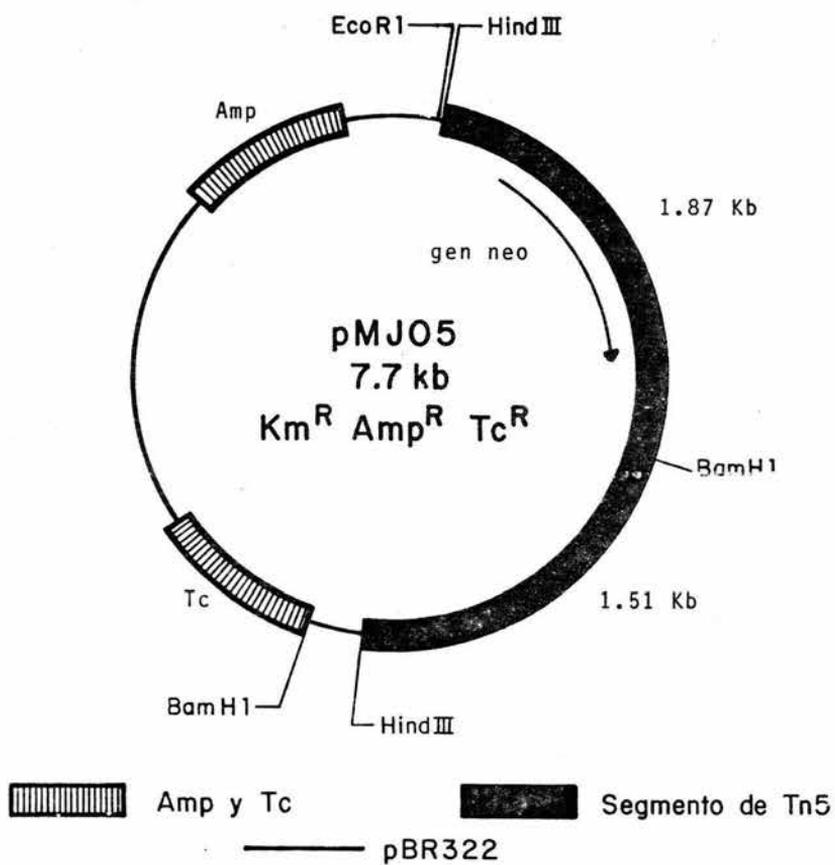


Figura 5.2. Muestra las principales características del pMJ05.

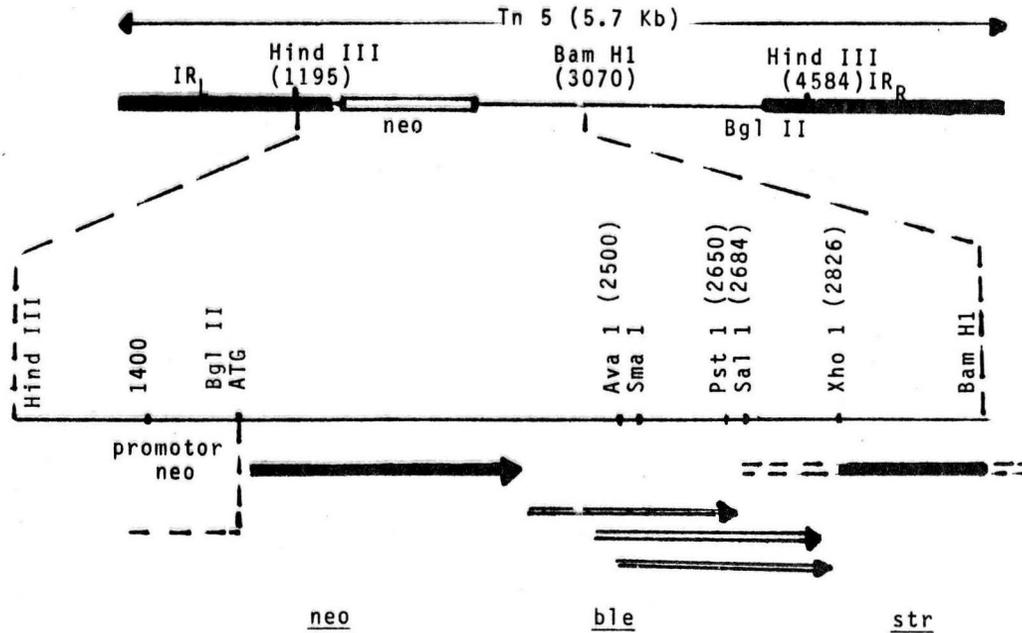


Figura 5.3. Mapa de restricción del Tn 5. El fragmento Hind III / Hind III se tiene clonado en el pMJ05. El fragmento Hind III / Bam HI - es el que se clonó con el pMG1. IR = secuencias invertidas L y R izquierda y derecha respectivamente.

2.- Estos sitios son únicos en Ylp 5 y el fragmento que se eliminaría es de únicamente .346 Kb. Sin embargo como el sitio de Bam HI se encuentra dentro del gen que codifica para la resistencia a Tc, el plásmido resultante será Tc^S.

3.- Otra característica considerada es que después del gen neo, se encuentra el gen de resistencia a bleomicina y streptomicina todos controlados por el promotor del primer gen, (Genilloud O. et. al. 1984). El gen bleomicina da resistencia a una clase de antibióticos estrechamente relacionados a los antibióticos glicopéptidos, que dañan el ADN y que son producidos por S. verticillus. Las bleomicinas son tóxicas a células de mamíferos así como a bacterias y son usadas en el tratamiento de cáncer.

La digestión con Bam HI dejaría intacto el gen de bleomicina y casi completo el gen de streptomicina, lo que no ocurre con la digestión con Sal I, debido a que divide el gen ble. La ventaja de dejar intacto el gen ble, es que podría ser útil para la construcción de vectores de eucariotes, debido a que estos son sensibles a las bleomicinas y en particular para microorganismos que son espontáneamente resistentes a kanamicina.

Los pasos planteados para la obtención del pMG 1 fueron:

- La digestión del pMJ05 con Hind III / Bam HI, con la cual se obtienen 4 fragmentos de 4.02, 1.87, 1.51 y .34 kb.

- El aislamiento de la banda que contiene el gen neo (1.87 Kb) por medio de un gel de agarosa.

- La digestión del Ylp 5 con Hind III / Bam HI con la

subsecuente purificación de la banda de 5.2 Kb.

- La ligación del vehículo YIp 5 digerido con Hind III / Bam HI y el gen neo.

- La transformación de E. coli cepa K12 HB101, con dicha mezcla de ligación.

-La selección de las transformantes en cajas de medio Luria con Km y verificación del fenotipo: Km , Amp y Tc a las transformantes obtenidas.

- Micropreparaciones de ADN del plásmido de las transformantes para comprobar que en realidad contienen el plásmido deseado.

II: Obtención del pMG 2:

Una vez construido el pMG 1, el siguiente paso es la clonación a dicho plásmido del gen LAC 4.

El gen LAC 4 se va extraer del pK16. Este es un pBR322 que tiene insertado en el sitio Eco RI un fragmento de ADN de K. lactis el cual contiene el gen LAC 4. (Dickson R. C. y Markin J. S. 1978).

En la estrategia planteada para la clonación del LAC 4 al pMG 1 es conveniente que ninguna secuencia del pBR322 esté en el fragmento a clonar porque favorecería la inestabilidad del plásmido resultante. También es importante reducir al mínimo el fragmento a clonar (unicamente LAC 4) para favorecer la estabilidad del plásmido, sin embargo la clonación de un fragmento mas grande de ADN de K. lactis probablemente podría favorecer a la integración del plásmido

al genoma de la levadura. De aquí que en la clonación del LAC 4 únicamente se tendrá en cuenta que prácticamente no haya secuencias de ADN del pBR322.

En el mapa de restricción reportado por Dickson R. C . (figura 5.4) se nota que el ADN de K. lactis en el pK16 es de 6.2 Kb, de las cuales solo 3.8 kb codifican para la β -galactosidasa. Analizando este mapa se puede ver que no existen dos sitios únicos a los extremos del ADN de K. lactis, para poder extraer dicho fragmento, lo que nos dice que la única forma de hacerlo es con una digestión parcial, es decir con una digestión en la cual la enzima no corte todos sus sitios específicos, de tal forma que dé varias bandas de diferente tamaño, una de las cuales contendrá el gen LAC 4 integro.

Así la manera en que se planteó extraer el gen LAC 4 fue con una digestión parcial con Eco R1, debido a que la banda que contiene el gen LAC 4 no tiene ninguna secuencia del pBR322 además de que esta es una enzima muy accesible.

De acuerdo a Dickson R. C. el patrón de restricción esperado para una digestión parcial con Eco R1 comprende 13 posibles bandas de las cuales la de 6.2 Kb situada arriba del pBR322 lineal es la que contiene el gen LAC 4 integro y por lo tanto es la banda que hay que purificar.

Los pasos planteados para la construcción del pMG 2 fueron:

- 1.- La digestión parcial del pK16 con Eco R1 y la separación de la banda de interés (6.27 Kb) por medio de un gel de agarosa.
- La digestión del pMG 1 con Eco R1, lo cual nos linealizará el

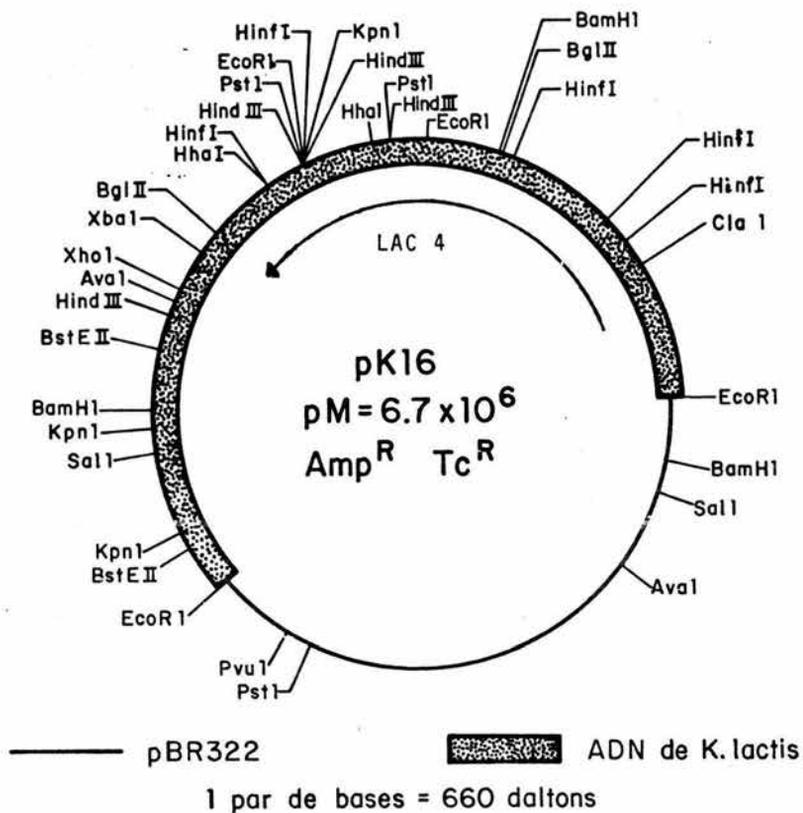


Figura 5.4. Mapa de pK16 que muestra algunos sitios de restricción (Dickson R.).

plásmido.

- La ligación de ambos fragmentos y la transformación de E. coli DG75 (cepa lac z⁻) con dicha mezcla.

- La selección de las transformantes en cajas de Luria con Km y X-gal. El X-gal (5 bromo, 4 cloro, 3 indol β -galactosido) es un compuesto incoloro que cuando es hidrolizado por la β -galactosidasa forma una tinta azul indigo insoluble. Otra forma de seleccionar a las transformantes es plaqueando en medio mínimo con lactosa (con los requerimientos necesarios para completar otras auxotrofías de la cepa). Las células que crezcan son las que tendrán el gen LAC 4 expresándose.

- La verificación de fenotipo: colonias azules de X-gal, Km^R, Amp^R y Tc^S.

- Y la purificación del plásmido obtenido para verificar por medio de digestiones con enzimas de restricción que es el plásmido deseado.

MATERIALES Y METODOS

6.1 GENERALES

6.1.1). REACTIVOS.

Los reactivos usados son de las siguientes casas comerciales:

- J. T. Baker, U.S.A.: azul de bromofenol, xilencianol.
- Bio-Rad Laboratories U.S.A.: agarosa, resina Dowex 50W-X8, dodecil sulfato de sodio (SDS)
- Difco: agar bacteriológico, casaaminoácidos.
- Sigma Chem Co.: aceite mineral, albúmina, bromuro de etidio, cloranfenicol, cloruro de cesio, X-Gal (5 bromo,4 cloro,3 Indol β -D galactosido).
- J.T. Baker: todo lo demás.

6.1.2). CEPAS Y PLASMIDOS.

Cepas:

E. coli HB101: (F⁻, hsd S 20 (r θ^+ , m θ^+), rec A13, ara-14, pro A 2, lac Y 1, galK 2, rps L 20 (Sm^r), xyl-5, mtl-5, sup E 44, λ .

E. coli DG75: (hsd S 1, leu-6, ara-14, gal K 2, xyl-5, mtl-1, rps L 20, thi-1, sup E 44 ,lac Δ z 39.

Plásmidos:

Yip 5. Plásmido de 5.5 Kb, que tienen como marcadores de selección los genes de Amp y Tc. Este plásmido es un pBR322 que tiene clonado el gen URA 3 de S. cerevisiae, el cual codifica para la orotidina descarboxilasa. (Stewart S. & R.W. Davies 1979). Proporcionado por la Dra. A. González. UNAM.

pMJ05. Plásmido de 7.7 Kb, que contiene los genes Km, Amp y Tc. El pMJ05 es un pBR322, que tiene clonado en el sitio Hind III la mayor parte del transposón Tn 5. Proporcionado por la Dra. C. Gomez & J. Martínez UNAM.

pK16. Este plásmido es de 10.8 Kb, tiene como marcador los genes de Amp y Tc. Es un pBR322 que tiene clonado en el sitio Eco RI, un fragmento de ADN de K. lactis. Este ADN contiene el gen LAC 4, el cual codifica para la β -galactosidasa. Proporcionado por el Dr. J. Dickson.

6.1.3). MEDIOS DE CULTIVO.

Luria (Medio Rico).

- Triptona10 gr.
- Extracto de levadura..... 5 gr.
- Cloruro de sodio.....10 gr.
- Agua destilada 1 lt.

Ajustar a pH 7. Para medio sólido agregar agar al 2 %.

Medio M-9. (Medio semicompleto).

- Sales 10 X esteriles 100 ml.

- Glucosa 20 % 20 ml.
- Cloruro de calcio 0.1 M. 10 ml.
- Sulfato de magnesio 0.1 M. 10 ml.
- Casaaminoácidos 20 % 20 ml.
- Agua 850 ml.

Sales 10 X:

- Fosfato dibásico de sodio 70 gr.
- Fosfato monobásico de potasio 30 gr.
- Cloruro de sodio 5 gr.
- Cloruro de amonio 10 gr.
- Agua 1000 ml.

Para medio mínimo omitir casaaminoácidos. Otras fuentes de carbono pueden sustituir la glucosa.

Medio empleado en la purificación del plásmido

- Cloruro de calcio 10 mM 1 ml.
- Sulfato de Magnesio .1M 1 ml.
- Sales M9 10X..... 10 ml.
- Luria..... 10 ml.
- Glucosa al 25 % 2 ml.
- Casaaminoácidos al 20% 1 ml.
- Antibiótico (el necesario para los 100 ml).
- Agua para 100 ml.

Cajas X-gal: Después de esterilizar el medio Luria, dejar enfriar a 60°C aproximadamente y adicionar directamente .1 ml de una solución X-gal en N,N dimetilformamida (2 mg/ml) por cada 15 ml de medio,

Antibióticos:

- Ampicilina. Solución concentrada: 5 mg/ml de ampicilina en agua. Esterilizar por filtración. Trabajar a una concentración final de 200 µg/ml. No usar esta solución por más de un mes. Almacenar en congelación.

- Tetraciclina. Solución concentrada: 12.5 mg/ml de tetraciclina en una mezcla etanol-agua al 50 % v/v. Trabajar a una concentración final de 20 µg/ml. Guardar en oscuridad por un mes.

- Kanamicina. Solución concentrada: 1.5 mg/ml de Km en agua. Esterilizar por filtración. Trabajar a una concentración final de 20 µg/ml guardar en congelación.

Soluciones usadas en la purificación del plásmido:

Solución I. Sacarosa 20 %, Tris 50 mM pH 8, EDTA 50 mM pH 8.

Solución II. SDS 1 % y NaOH .2 N. Al usar mezclar un volumen de SDS al 2 % con un volumen de NaOH .4 N.

Solución III. Acetato de sodio 3M pH 4.8.

- Fenol hidratado: Al fenol sólido de le adiciona agua hasta que se disuelva completamente entoces se deja en reposo para que se separen las dos fases la orgánica y la acuosa. El fenol es la fase inferior.

- Solución concentrana de RNAasa: Disolver RNAasa pancreática a una concentración de 10 mg/ml en Tris.Cl 10 mM (pH 7.5) y NaCl 15 mM. Calentar a 100°C durante 15 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente. Almacenar a - 20°C.

6.1.4).ENZIMAS.

a).- Endonucleasas de restricción.

Estas enzimas fueron adquiridas a Promega Biotech y CEINGEBI.
Los buffers de reacción para cada una de las endonucleasas de restricción son las siguientes:

Bam HI: 150 mM NaCl

6 mM Tris-HCl (pH 7.9)

6 mM MgCl₂

100 µg/ml de BSA

Eco RI: 100 mM Tris-HCl (pH 7.5)

50 mM NaCl

50 mM MgCl₂

100 µg/ml de BSA

Hind III: 50 mM NaCl

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

10 mM MgCl₂

100 µg/ml de BSA

Pst I: 100 mM NaCl

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

10 mM MgCl₂

100 µg/ml de BSA

b).- Ligasa

Buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7.8)

10 mM Mg Cl₂

20 mM DTT

1 mM ATP

50 µg/ml BSA

6.2). TECNICAS

6.2.1). PURIFICACION DE PLASMIDOS

Para la purificación de todos los plásmidos se utilizó una modificación del método reportado por Rodríguez R. L. & Tart R. C. 1983. El procedimiento fué el siguiente:

Con una colonia de E. coli que contenía el plásmido deseado se inoculaban 5 ml de medio Luria y se incubaban a 37°C y a 200 r.p.m. durante toda la noche.

Con .4 ml del cultivo anterior se inoculaban 100 ml de medio (ver sección de reactivos y medios) el cual contenía 200 µg/ml de amp o 20 µg/ml de Km dependiendo del plásmido que se fuera a purificar y se dejaba incubando a 37 °C y 200 r.p.m. hasta que alcanzara una densidad óptica de 1.0 a 660 nm (aproximadamente 7-8 horas).

Una vez alcanzada esta D. O. se adicionaban 2 ml de glucosa al 25 %, 0.5 ml de casaaminoácidos al 20 %, 10 ml de medio Luria y el antibiótico correspondiente, y se dejaba incubando otros 30 min en las mismas condiciones.

El siguiente paso consistió en amplificar el plásmido

adicionando 20 mg de cloranfenicol en polvo e incubando 16 horas a 37°
C y 200 r.p.m.

Transcurrido este tiempo se lavaban las células, para lo cual se centrifugaba a 5 000 r.p.m. durante 5 minutos, se tiraba el medio de cultivo y se resuspendían en 150 ml de NaCl 10 mM y volviéndose a centrifugar en las mismas condiciones. La suspensión celular se dividía en dos partes iguales antes de centrifugar.

En seguida se resuspendían las células en 2 ml de la solución I (ver sección de reactivos y medios), se añadía .2 ml de RNAasa (10 mg/ml) y 4 mg de lizosima, se agitaba el tubo y se dejaba en hielo por 45 minutos.

Después de este tiempo se añadía 4 ml de la solución II (fresca), se mezclaba bien por inversión (sin agitación violenta) y se dejaban en hielo otros 15 minutos, por último se agregaba 1.5 ml de la solución III y se dejaba en hielo 60 minutos más.

Después de haber lisado las células, se quitaban los restos celulares centrifugando a 17 K.r.p.m. una hora y se conservaba el sobrenadante. Al sobrenadante se le añadía .1 ml de RNAasa (10 mg/ml) y se dejaba 15 minutos a temperatura ambiente

El siguiente paso era hacer dos extracciones con fenol y cloroformo para quitar las proteínas del plásmido. Un volumen de sobrenadante (8 ml aproximadamente) se mezclaba con un volumen de fenol hidratado, después se mezclaba con un volumen de cloroformo y se centrifugaba (en rotor de columpio) a 5 000 r.p.m. por 15 minutos, para separar la fase acuosa de la orgánica. Con la ayuda de una micropipeta de 1 ml se sacaba la fase acuosa (superior), se

mezclaba con un volumen de cloroformo, y se volvía a centrifugar en las mismas condiciones para extraer la fase acuosa.

Una vez realizadas las extracciones fenol/cloroformo se precipitaba el ADN, mezclando la fase acuosa recientemente extraída con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y dejando dicha mezcla a -70°C durante 1 hora o bien dejándola en el refrigerador toda la noche. Para obtener la temperatura de -70°C se mantenía el tubo en hielo seco y ocasionalmente se le agregaba etanol al hielo.

Después de efectuado este paso se centrifugaba la mezcla a 8 000 r.p.m. por 15 minutos, se tiraba la solución y se resuspendía el ADN en .5 ml de buffer T.E. (Tris 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM pH 8).

El siguiente paso en la purificación del plásmido era aplicar una muestra de la solución de ADN (generalmente 10 μl) a un gel de agarosa para cuantificar el plásmido purificado y para ver si estaba contaminado con ADN cromosomal o ARN.

Si se obtenía una buena cantidad de plásmido se procedía a pasar este a través de un gradiente de cesio para separar el ADN cromosomal y el plásmido roto del plásmido circular, o de lo contrario se volvía a purificar más plásmido.

6.2.2). CENTRIFUGACION EN CLORURO DE CESIO.

1.- Se pesaba 2.15 gr de CsCl en los tubos de centrifuga (para rotor S.W.50.1, ultra clear Beckman), se añadía 1 a 1.5 ml de agua o buffer TE y se agitaba para disolver la sal de cesio.

En seguida se añadía 1 a .5 ml de DNA del plásmido en solución

(no más de 500 μ g de ADN), se mezclaba suavemente por inversión, se añadía 150 μ l de solución acuosa de yoduro de propidio (2 mg/ml), después de lo cual se volvía a mezclar el tubo para colocarlo dentro de su camisa y protegerlo de la luz. Este paso se tiene que hacer rápidamente porque la luz daña el ADN cuando este contiene yoduro de propidio.

Los tubos que contenían esta mezcla eran llenados con aceite de parafina hasta 2-4 mm del borde del tubo y calibrados para ser centrifugados durante 20 horas a 38 000 r.p.m. y 20°C.

Una vez efectuado éste paso la banda superior e inferior del gradiente se recolectan por separado. La forma en que se realizaba era picando el fondo del tubo con una aguja caliente para recolectar únicamente la porción del líquido de interés o bien con una jeringa de insulina se succionaban las bandas por la parte superior del tubo.

Como el ADN recolectado contenía yoduro y cloruro de cesio los siguientes pasos eran para quitar estos compuestos. Para quitar el yoduro de propidio del ADN, la mezcla se pasaba a través de una columna de intercambio iónico. Se colocaban 2-3 ml de resina Dowex en una columna de plástico de 10 ml, se equilibraba la columna con 10 ml de buffer Dowex (Tris 50 mM pH 8, EDTA 1 mM y NaCl 1M) por cada ml de resina, se colocaba la muestra previamente diluida 1:1 con buffer Dowex y se lavaba la columna con otro volumen de buffer.

Para quitar el CsCl, el ADN recolectado de la columna era dializado contra 2 l de buffer TE pH 8 durante 14 horas a 4°C, haciendo por lo menos cuatro cambios de buffer. Después de la

diálisis el ADN era precipitado con etanol y resuspendido en el volumen deseado de buffer TE.

Por último una muestra (102 µl) eran aplicados a un gel de agarosa para cuantificar el ADN y para ver si estaba contaminado con ARN.

Si el plásmido tenía ARN se centrifugaba a través de una solución de NaCl o se precipitaba con PEG para quitar el ARN.

6.2.3). ELIMINACION DE ARN CENTRIFUGANDO A TRAVES DE UNA SOLUCION DE NaCl.

Para quitar el ARN a través de una solución de NaCl generalmente:

Se adicionaba RNAasa al plásmido a una concentración final de 10 µg/ml y se incubaba una hora a temperatura ambiente.

Se ponían 4 ml de NaCl 1M en un tubo ultraclear Beckman SW50-1, se adicionaba 1 ml de plásmido tratado con RNAasa, (si era necesario se llenaba el tubo con TE) y se centrifugaba 6 hrs a 40 000 r.p.m. a 20 °C en rotor SW50-1. En este paso el plásmido sedimenta en el fondo del tubo mientras los ribonucleótidos permanecen en la solución.

Por último se tiraba la solución y resuspendía el plásmido en 0.5 o 1 ml de buffer TE.

6.2.4). PRECIPITACION DEL PLASHIDO CON PEG.

En esta técnica se resuspendía el ADN en 4 ml de TE, se añadía RNAasa (1000X) y se incubaba 20 minutos a temperatura ambiente.

Después se añadía NaCl 5M a una concentración final de .55M, polietilenglicol 8000 al 10 % y se incubaba 2 horas a -20°C o 15 minutos a -70°C.

En seguida se centrifugaba 15 min a 10 000 r.p.m., se tiraba el sobrenadante y se resuspendía el ADN en el volumen deseado de TE.

6.2.5). DIGESTIONES DEL ADN

Cuando se tenía completamente limpio el plásmido se procedía a digerirlo con las enzimas convenientes. Para efectuar una digestión se colocaba en un tubo de polipropileno (.5 ml) la cantidad deseada de plásmido que se iba a digerir, se adicionaba el buffer correspondiente (el buffer era 10 X), agua para completar el volumen final y la enzima correspondiente. En seguida se mezclaba y se incubaba a 37°C. (excepto Pst I la cual se incubaba a 29°C).

Para digestiones totales se dejaba incubando 1 hora o más dependiendo de la actividad de la enzima. Para digestiones parciales el tiempo de incubación era menor, éste era determinado previa titulación de la enzima.

Para la titulación de la enzima (Eco RI o Bam HI) generalmente se colocaba en un tubo 5 µg de ADN, con el buffer correspondiente y 1 µl de la enzima. Se incubaba a 37°C y se tomaban muestras cada 10 ó 15 minutos, a las cuales se les agregaba la mezcla de aplicación (ver la siguiente técnica) y se refrigeraban. Cuando era tomada la última muestra se aplicaban éstas a un gel de agarosa para determinar el tiempo adecuado de la digestión. Cuando la reacción era muy rápida se diluía la enzima con buffer de almacenamiento.

6.2.6). ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

Para la preparación de un gel a 25 ml de buffer TBE (Tris-base 90 mM, EDTA 2.5 mM y Ac. bórico 90 mM pH 8.2) se le adicionaban 0.25 gr de agarosa en polvo y se calentaba hasta ebullición, durante 2 ó 3 minutos. Una vez disuelta ésta, se vaciaba en los geles de vidrio, los cuales habían sido previamente montados con separadores de 1.5 mm, se ponía un peine (para hacer los carriles) y se dejaba enfriar. Cuando se había solidificado el gel se retiraba el peine y se colocaba en la cámara de electroforesis. En seguida se aplicaban las muestras (de 5 - 10 μ l) con una solución de aplicación (6 g urea, 1 ml de azul de bromofenol al .5 % y 1 ml de xilencianol al .5 %, a un volumen final 10 ml). En base a la migración de esta solución se determina el tiempo que debe correr el gel.

La electroforesis se llevaba a cabo a 150 o 100 volts por 60 minutos aproximadamente (hasta que el azul de bromofenol se acercaba al final del gel. Terminando la electroforesis, los geles se sumergían en la solución de bromuro de etidio (4 mg/ml) y al someterlos a luz U.V. se observaba el ADN.

6.2.7) AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE ADN MEDIANTE ELECTROFORESIS PREPARATIVA.

Para aislar una banda de ADN, una vez realizada la digestión, se corría un gel preparativo de agarosa y se cortaba el fragmento que contenía la banda de interés. El procedimiento de extracción del ADN de la agarosa, dependió del tipo de agarosa usado en el experimento.

A). Para agarosa normal el procedimiento que se usó fué el siguiente:

En un tubo de propileno se colocaba la banda de gel que contenía el ADN y con ayuda de una punta de micropipeta se trituraba. En seguida se adicionaba 100 μ l de fenol, se agitaba vigorosamente por 10 segundos, se congelaba a -70°C durante 5 a 15 minutos y se centrifugaba a 12 000 rpm durante 15 minutos. Una vez formadas las dos fases, la fase acuosa era extraída con una micropipeta y colocada en un tubo limpio. A esta fase se le hacían dos extracciones con fenol, para lo cual se mezclaba la misma con un volumen de fenol hidratado y se centrifugaba a 12 000 r.p.m. durante 15 minutos.

Después de la segunda extracción con fenol, el ADN se precipitaba con etanol y se resuspendía en buffer TE.

B). Agarosa de bajo punto de fusión.

Para purificar el ADN de agarosa de bajo punto de fusión, la banda de gel con el ADN se colocaba en un tubo de propileno y se calentaba en baño maría a 65°C . Cuando la agarosa se fundía, se hacía una extracción con fenol y una extracción con fenol y cloroformo, después de las cuales el ADN se precipitaba con etanol y se resuspendía en buffer TE.

6.2.8). PREPARACION Y TRANSFORMACION DE CELULAS COMPETENTES.

La metodología usada fué una combinación de las técnicas reportadas por Rodríguez R. L. (1983) y Maniatis T. (1982).

A). Preparación de células competentes:

Para preparar células competentes se ponía a crecer la cepa en 20 ml de medio Luria a 37°C y a 200 r.p.m. y cuando las células alcanzaban una D. 0. de 0.5 o 0.6 a 550 nm, se dejaban reposar en hielo durante 10 minutos para después centrifugarlas a 5 000 r.p.m. durante 10 minutos.

El paquete celular era entonces resuspendido en 10 ml de $MgCl_2$ 100 mM y vuelto a centrifugar en las mismas condiciones. El paquete celular así obtenido era resuspendido en 10 ml de $CaCl_2$ 100 mM, mantenido en hielo por 30 a 45 minutos y centrifugado.

El último paso era resuspender las células en 2 ml de $CaCl_2$ 100 mM y glicerol al 15 % y almacenar las células competentes en tubos de polipropileno (0.6 ml por tubo) a - 70°C.

B). Transformación:

Para transformar las células, el ADN se centrifugaba de 1 a 2 minutos a 12 000 r.p.m. y se colocaba la cantidad deseada en un tubo estéril. A este tubo se le adicionaban 35 μ l de $CaCl_2$ 100 mM y 200 μ l de células competentes, en condiciones estériles. El tubo era entonces mantenido en hielo por una hora, para después calentarlo (en baño maría) a 42°C durante 90 segundos y dejarlo en hielo otros 5 minutos.

En seguida 3 ml de medio Luria eran adicionados, las células incubadas a 37°C de 0.5 a 2 horas antes de ser sembradas en medio selectivo (50 A 200 μ l por caja).

El medio selectivo para la obtención del pMG1 fué Luria con Km (20 μ g / ml) y el medio selectivo para la obtención del pMG 2 fué el mismo más X-gal.

RESULTADOS

CONSTRUCCION Y CARACTERIZACION DEL pMG 1

El pMG 1 se construyó siguiendo la estrategia planteada en el diseño experimental. El primer paso en la construcción fue la purificación de los plásmidos que se iban a usar: el YIp 5 y el pMJ05 (ver materiales y métodos) y la comprobación de su patrón de restricción. La forma en que se efectuó este paso fue digiriendo el YIp 5 con Pst 1, Pst 1 / Eco R1 y Pst 1 / Bam H1 y el pMJ05 con Hind III / Bam H1.

Los resultados obtenidos fueron los correctos: la digestión del YIp 5 con Pst 1 dió dos bandas de aproximadamente 3.1 y 2.4 Kb, con Pst 1/ Eco R1 dió tres bandas de 3.1, 1.6 y .7 Kb y con Pst 1 / Bam H1 dió tres bandas de 3.1, 1.2 y 1.1 Kb (foto 7.1) y la digestión del pMJ05 con Hind III / Bam H1 dió cuatro bandas de 4.0, 1.8, 1.5 y 0.3 Kb (foto 7.2).

El siguiente paso fue la digestión de 5 µg de pMJ05 con Bam H1 y posteriormente con Hind III (ver materiales y métodos). Por otra parte se digirió 5 µg de YIp 5 con las mismas enzimas (foto 7.2).

Cuando las digestiones fueron totales se aplicaron a un gel de agarosa de bajo punto de fusión para purificar los fragmentos de ADN de nuestro interés. Una vez purificados los fragmentos de la agarosa, se incubaron con ligasa (ver materiales y métodos) a una relación molar de inserto/vehículo de 2.5 y después con esta mezcla se

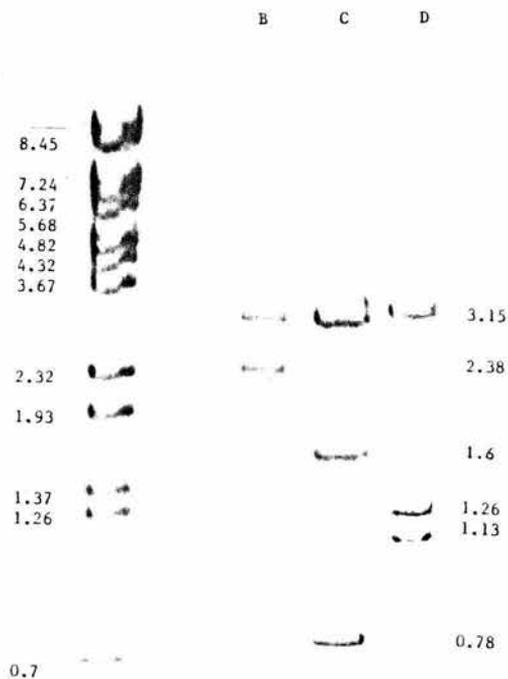


Foto 7.1. Caracterización del YIp 5. Carril A: Fago λ digerido con BstE II (control). Carril B, C y D YIp 5 digerido con Pst I, Eco RI/Pst I y Bam HI/Pst I respectivamente

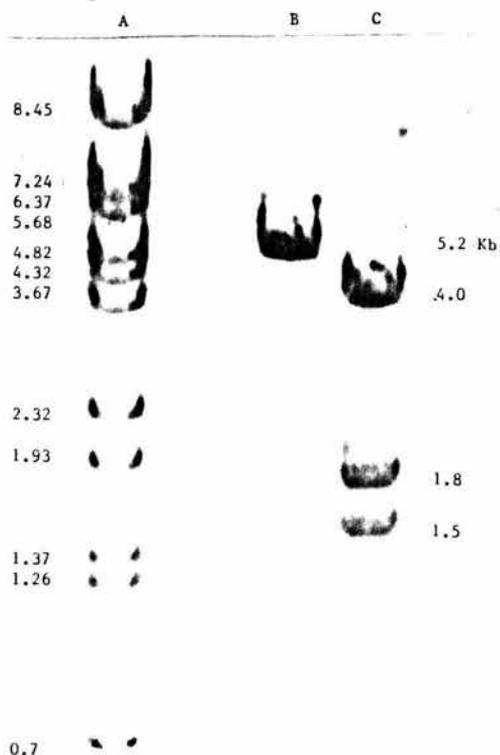


Foto 7.2. Construcción del pMG 1, Carril A: Fago λ digerido con BstE II (control). Carril B: YIp 5 digerido con Hind III y Bam HI. Carril C: pMJ05 digerido con las mismas enzimas.

transformó E. coli HB101. La selección de las transformantes se hizo en cajas de Luria con Km, para lo cual se sembraron 200 μ l de células transformadas por caja. Únicamente se sembraron dos cajas de Km y una de Amp.

El control de la eficiencia de transformación de las células competentes fue pMJ05 superenrollado. Se adicionó .1 μ g de pMJ05 a una mezcla de ligación (las mismas condiciones que los tubos del experimento), con dicha mezcla se transformó el mismo lote de células competentes y se sembró una cada de Luria con Km, (200 μ l).

Del control, se obtuvieron un gran número de colonias, aproximadamente 1500, lo cual nos demostró que las células tenían una buena eficiencia de transformación. Del experimento se obtuvieron 6 colonias de las dos cajas con Km y 40 colonias de la caja con Amp.

El siguiente paso fue comprobar el fenotipo esperado de las transformantes. El fenotipo de las 6 transformantes seleccionadas en Km y de tres transformantes seleccionadas en Amp (las demás colonias no fueron analizadas) fue el correcto: Km^R, Amp^R y Tc^S.

A seis de estas colonias se procedió a hacer microensayos de ADN para comprobar que se tenía el plásmido deseado con una digestión de Pst 1. El patrón de digestión esperado eran 4 bandas de aproximadamente 3.1, de 1.6, de 1.3 y de .9.

El resultado de este experimento nos dió una prueba de que los 6 plásmidos purificados eran el esperado, debido a que se observó el patrón correcto, sin embargo también se observaron otras bandas que indicaban una digestión parcial.

Posteriormente se purificó el plásmido de una de estas colonias y se digirió con Hind III / Bam HI y con Pst I. Los resultados son mostrados en la foto 7.3. La digestión con Hind III / Bam HI nos dió dos bandas, la del inserto (1.8Kb) y la del vehículo (5.2 Kb). La digestión del plásmido con Pst I dió cuatro bandas de 3.1, 1.6, 1.3 y .9 Kb, lo cual prueba que el plásmido purificado es el plásmido esperado.

CONSTRUCCION Y CARACTERIZACION DEL pMG 2

Una vez construido el pMG 1 y antes de extraer el gen LAC 4 (del pK16) se procedió a verificar el plásmido con el que se estaba trabajando era el pK16, para lo cual se digirió con Eco RI, encontrándose que la digestión total daba cuatro bandas de aproximadamente 4.3, 3.0, 2.4 y .7 Kb las cuales formaban el patrón de restricción esperado.

En seguida se hicieron varias digestiones parciales del pK16 con Eco RI para aislar el gen LAC 4, previa titulación de la enzima. Con estos experimentos generalmente se obtenía muy poca cantidad de la banda de interés después de una digestión parcial además de que dicha banda no presentaba una clara separación con respecto a las bandas superiores (foto 7.4).

Después de varios intentos infructuosos (ver discusión) solo se obtuvo una transformante que presentaba el fenotipo Km^R , Amp^S , Tc^S y azul en X-gal. Aunque este no era el fenotipo esperado (Km^R , Amp^R , Tc^S y azul en X-gal) se procedió a aislar el plásmido de dicha transformante para caracterizarlo pero esto no se logró ya que la purificación siempre fue negativa. Una posible explicación de estos

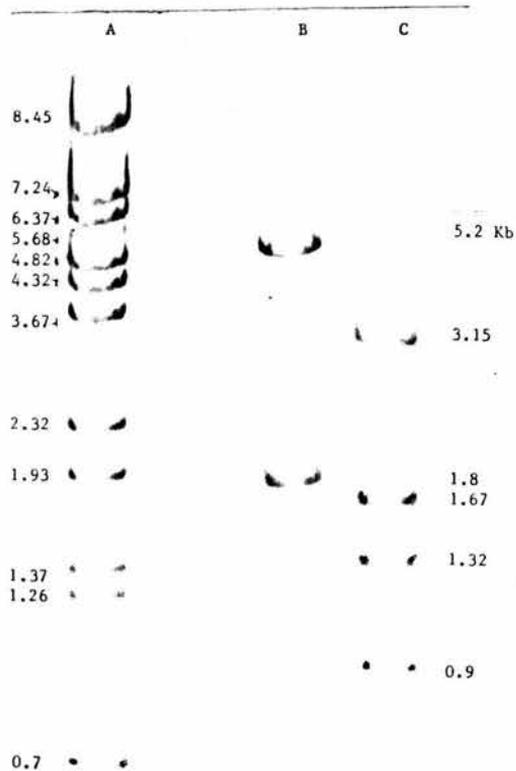


Foto 7.3. Caracterización del pMG 1. Carril A: PAGO digerido con BstE II (control). Carril B y C pMG 1 digerido con Hind III, Bam HI y Pst I respectivamente.

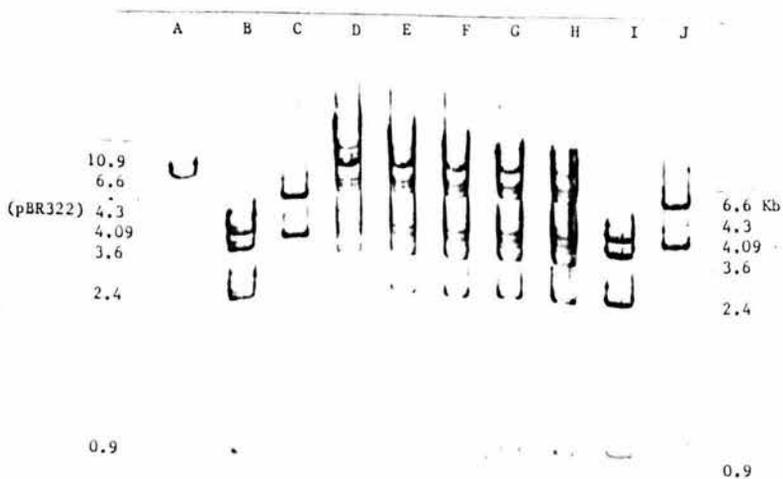


Foto 7.4. Titulación de la enzima Eco RI (pK16). Controles usados: pBR275 lineal (carril A), pBR275 digerido con Eco RI (carril C y J) y pK16 digerido totalmente con Eco RI (carril B e I). Carril D a H pK16 digerido parcialmente con Eco RI, las muestras se tomaron a los 10, 20, 30, 40 y 50 minutos.

resultados es que el ADN se haya integrado al genoma de E. coli, sin embargo es necesario efectuar otros experimentos que proporcionen pruebas más contundentes que apoyen esta hipótesis.

Ante estos resultados se procedió a cambiar la enzima para aislar el LAC 4 del pK16, la enzima que se uso fue Bam HI en lugar de Eco RI. Con esta enzima el patrón de restricción de una digestión parcial más probable contiene siete bandas siendo la banda de 6.27 Kb la que contiene el gen LAC 4. Una característica de esta banda es que contiene un fragmento de .345 Kb de ADN del pBR322 que comprende del sitio Eco RI al sitio Bam HI. La importancia de esta característica radica en que esta secuencia puede complementar el gen de Tc que se había perdido en la construcción del pMG 1, dependiendo de la forma en que se inserte el fragmento, es decir el pMG2 puede adquirir el fenotipo de Tc^R, (figura 7.1).

Para obtener la digestión parcial del pK16 con Bam HI se digirieron 5 µg de pK16 (volumen final 20 µl), tomándose muestra a los 15, 30, 45, 60 y 120 min (4 µl por muestra). Estas muestras se corrieron en un gel de agarosa .8 % a 100 volts, hasta 10 minutos después de que saliera el colorante. Los controles fueron pK16 digerido totalmente con Bam HI y pBR275 digerido con Eco RI.

El resultado que el gel nos mostró fué que el plásmido se había digerido completamente desde los 15 minutos, por lo tanto se decidió diluir la enzima 1:10 con buffer de almacenamiento, para poder usar menos cantidad. En esta ocasión se digirieron los mismos µg de ADN pero con 2 µl de Bam HI (volumen final 25 µl). Se tomó muestra a los 10, 20, 30, 40, y 50 minutos (5 µl por muestra).

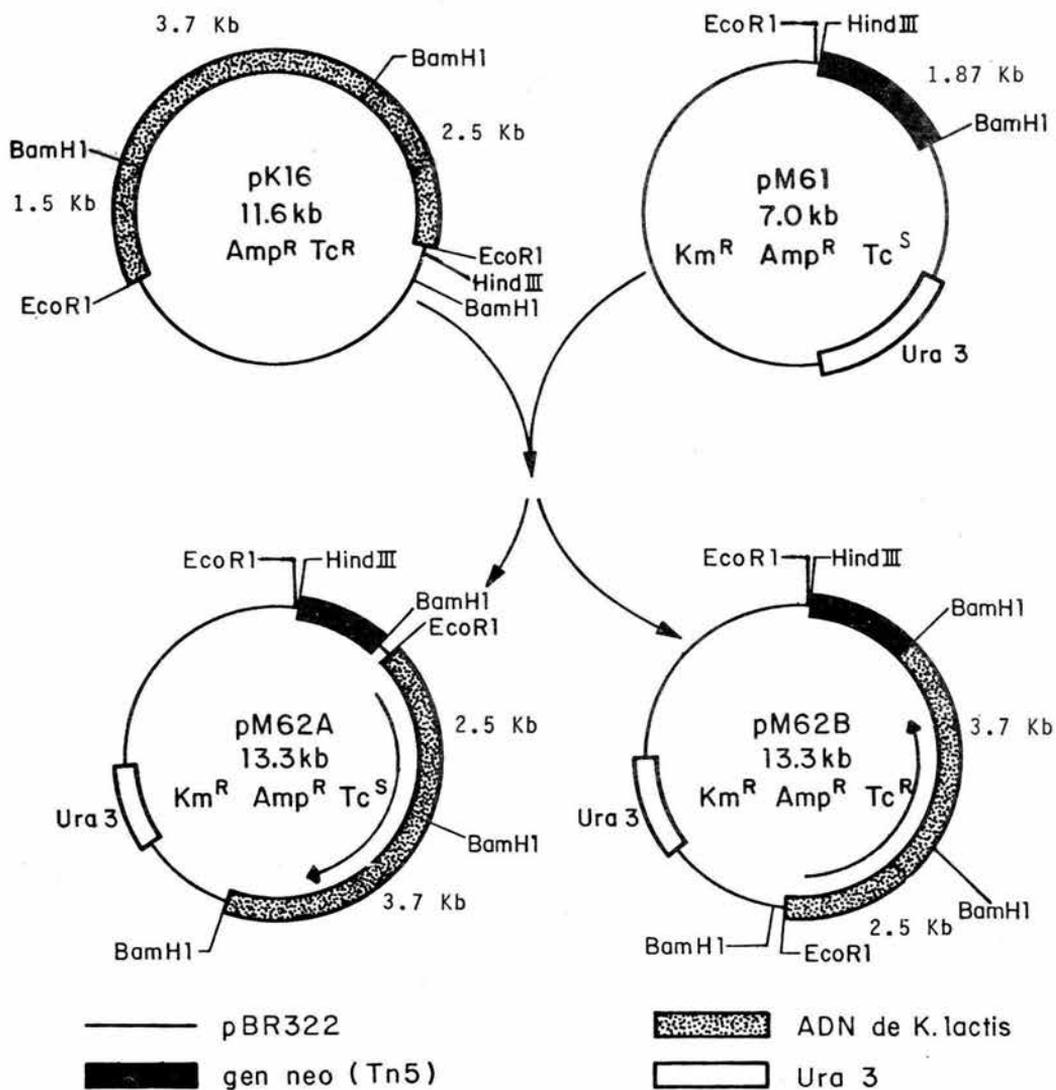


Figura 7.1. Muestra las posibles formas de inserción del gen LAC 4 en la construcción del pMG 2.

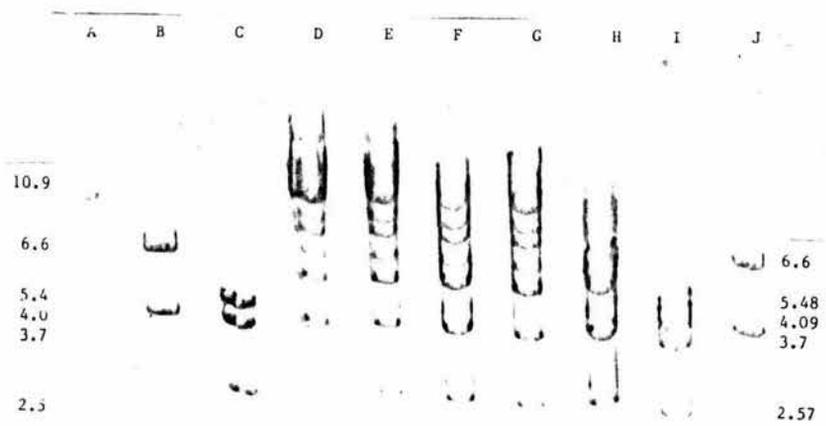


Foto 7.5. Titulación de la enzima Bam HI (pK16). Controles usados pBR275 lineal (carril A), pBR275 digerido con Eco RI - (carril B y J) y pK16 digerido totalmente con Bam HI - (carril C e I). Carril D a H pK16 digerido parcialmente con Bam HI, las muestra fueron tomadas a los 10, 20, 30 40 y 50 minutos.

En el gel se notaban las bandas de una digestión total y las bandas de 6.2, 8.0, 9.1 y 11.1 Kb, pero también había una buena cantidad de plásmido sin digerir.

Debido a los resultados obtenidos, se decidió repetir el experimento, en condiciones similares, únicamente aumentando la cantidad de enzima diluida y por lo tanto el volumen final de la digestión (30 μ l) para ver si se podía obtener una mayor cantidad del fragmento deseado (6.2 Kb) sin llegar a una digestión total.

El resultado de este tercer experimento es mostrado en la foto 7.5 en donde se observa que en todos los tiempos aparece la banda que contienen el gen LAC 4 (6.2 Kb), sin embargo a los 10 y 20 minutos hay bastante plásmido sin digerir por lo que los tiempos adecuados para efectuarla digestión parcial es a los 20, 30 ó 40 minutos.

Con estos resultados se procedió a correr el gel preparativo, para lo cual se duplicó la cantidad de plásmido a digerir y por lo tanto también la enzima, las demás condiciones fueron las mismas. La única modificación que se le hizo al gel es que se dejó de correr una hora después de que saliera el colorante, para que hubiera una mayor separación de bandas.

Después de correr el gel preparativo (en total 2) en agarosa normal y de purificar el ADN (ver materiales y métodos) se procedió a ligar dicho fragmento con el pMG1 linealizado con Bam HI.

Para este experimento se colocó en un tubo de propileno de .5 ml .1 μ g de pMG 1 linealizado, .3 μ g del inserto, buffer de ligasa 10X, PEG 5X y agua, al tubo se le calentó a 65°C durante un minuto y en seguida se le adicionó DTT 5X, ATP 10X y la enzima ligasa, el

volumen final de reacción fué de 15 μ l. Esta mezcla de ligación se dejó incubando cuatro horas a temperatura ambiente y posteriormente con la misma se transformó a E. coli DG75 (ver materiales y métodos. El experimento se hizo por duplicado, lo único que variaba uno del otro fue la procedencia del inserto (provenían de diferentes geles preparativos).

El pMG 1 superenrollado y el pMG1 linealizado con y sin ligasa fueron los controles usados en este experimento, por lo que se les dió el mismo tratamiento.

La selección de las transformantes se hizo sembrando cuatro cajas de medio Luria y Km con las células recién transformadas (200 μ l/caja), en dónde se obtuvieron 280 colonias en total.

El siguiente paso fue probar el fenotipo a todas las colonias obtenidas para lo cual se picaron en cajas de Amp con X-gal, Tc y Km. Los controles fueron E. coli DG75 y E. coli HB101 que contiene el pK16 y HB101 que contiene pMG 1.

El resultado fue que todas las colonias crecieron en Km y Amp, sin embargo no presentaban el fenotipo azul en X-gal. En Tc solo creció una colonia (sin embargo era blanca en X-gal), por lo que se procedió a aislarla para analizarla más detalladamente. Los controles mostraron los resultados que se esperaban: E. coli DG75 no creció en ninguna caja, E. coli HB101 que contenía el pK16 creció en Amp y Tc y dió colonias azules en X-gal. pMG 1 creció en Km y Amp pero no en Tc.

Ante estos resultados se procedió a concentrar las células transformantes que quedaban en los tubos y se sembraron ocho cajas de Luria que contenían Km y X-gal (cuatro cajas por tubo).

A las 24 horas se observó que habían crecido alrededor de 500 colonias en cada caja, sin embargo ninguna presentaba el fenotipo azul, fue hasta las 48 horas que se notó una colonia azul en una caja y en otra había aproximadamente 12 colonias azules pequeñas (satélites).

A estas colonias no se les hizo ningún análisis profundo porque debido a la forma en que aparecieron parecían más bien contaminantes, únicamente se purificaron y guardaron. La única colonia que se aisló y se verificó el fenotipo fue a la que apareció sola, y como este fue el fenotipo esperado Km^R , Amp^R y Tc^S y azul en X-gal se procedió a purificar el plásmido para caracterizarlo con digestiones de Bam HI, Eco RI y Pst I.

El resultado de este experimento es mostrado en la foto 7.6 en donde se observa que la digestión con Bam HI nos da tres bandas de aproximadamente 7.0 Kb (vehículo), de 3.7 y 2.5 Kb (inserto), la digestión con Eco RI da cuatro bandas de 7.7, 2.4, 2.1 y 0.9 bandas y la digestión con Pst I da 3.1 3.0, 2.1, 1.3 y .9 Kb siendo estos los resultados esperados. A este plásmido se le llamó pMG2-A.

Como la colonia aislada anteriormente no daba el fenotipo azul, no se caracterizó el plásmido, únicamente se le hizo un microensayo de ADN y se digirió con Eco RI, por ser ésta la digestión que nos muestra una diferencia mas clara de la orientación del inserto en el plásmido. El resultado fue que este plásmido sí tiene el inserto en orientación contraria al del pMG2-A. Las bandas obtenidas del pMG2-A con Eco RI son de 7.7, 2.4, 2.17 y 0.9 Kb mientras que las obtenidas con el pMG2-B son de 5.5, 4.3, 2.4 y .9 Kb.

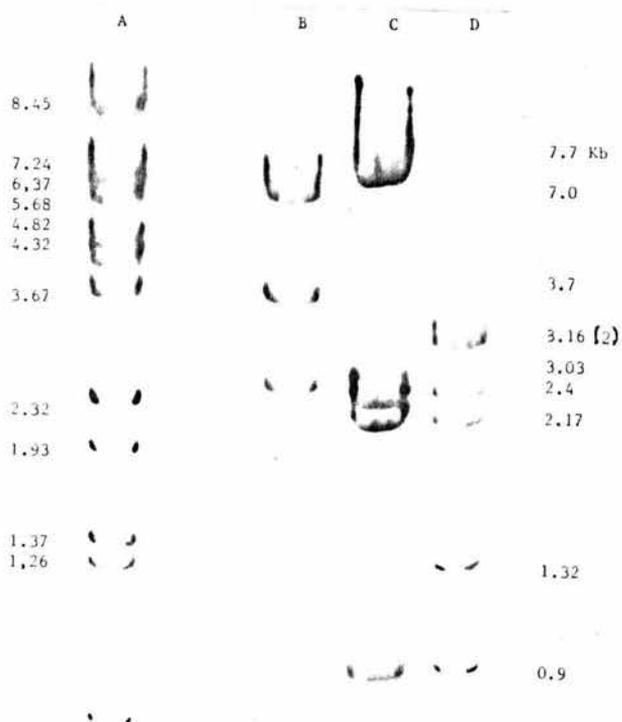


Foto 7.6. Caracterización del pEG2-A. Carril A: PAGO λ digerido con BstE II (control). Carril B, C y D pEG2-A digerido con Bam HI, Eco RI y Pst I respectivamente.

Cabe mencionar que la clona que contiene el pMG2-B adquiere el fenotipo azul en X-gal después de varios días de incubación.

DISCUSION

Como parte de un proyecto que tiene como objetivo la construcción de una cepa de K. fragilis sobreproductora de α -galactosidasa a través de la ingeniería genética, se construyó un plásmido el pHG 2, el cual está constituido por el YIp 5 (un plásmido integrativo de levadura), el gen neo del Tn5 y el gen LAC 4 (figura 8.1).

En el diseño del plásmido se eligió un plásmido integrativo porque la segregación de esta clase de plásmidos en un medio no selectivo es menor al 1 % por generación, en cambio los plásmidos citoplasmáticos se segregan a una velocidad mayor (al 1 % por generación). Esta característica es importante para procesos fermentativos, en donde adicionar la presión selectiva al medio de cultivo representa un gasto fuerte.

Al YIp 5 además de clonarle el gen LAC 4 de K. lactis se le clonó el gen neo del Tn 5, porque no se tiene una cepa auxótrofa en URA 3 y por lo tanto el marcador del YIp 5 (gen URA 3) no puede ser usado. El hecho de que el gen neo de resistencia a las bacterias hacia la Km y a las levaduras hacia el G418 lo hace propicio para ser usado como un marcador.

La clonación del gen neo se hizo entre los sitios Hind III / Bam HI del YIp 5. Se decidió extraer este gen con dichas enzimas porque fué una forma de reducir el tamaño del fragmento a clonar, además de que el fragmento contiene el gen ble íntegro junto al gen neo y el gen ble puede ser usado como marcador en la transformación

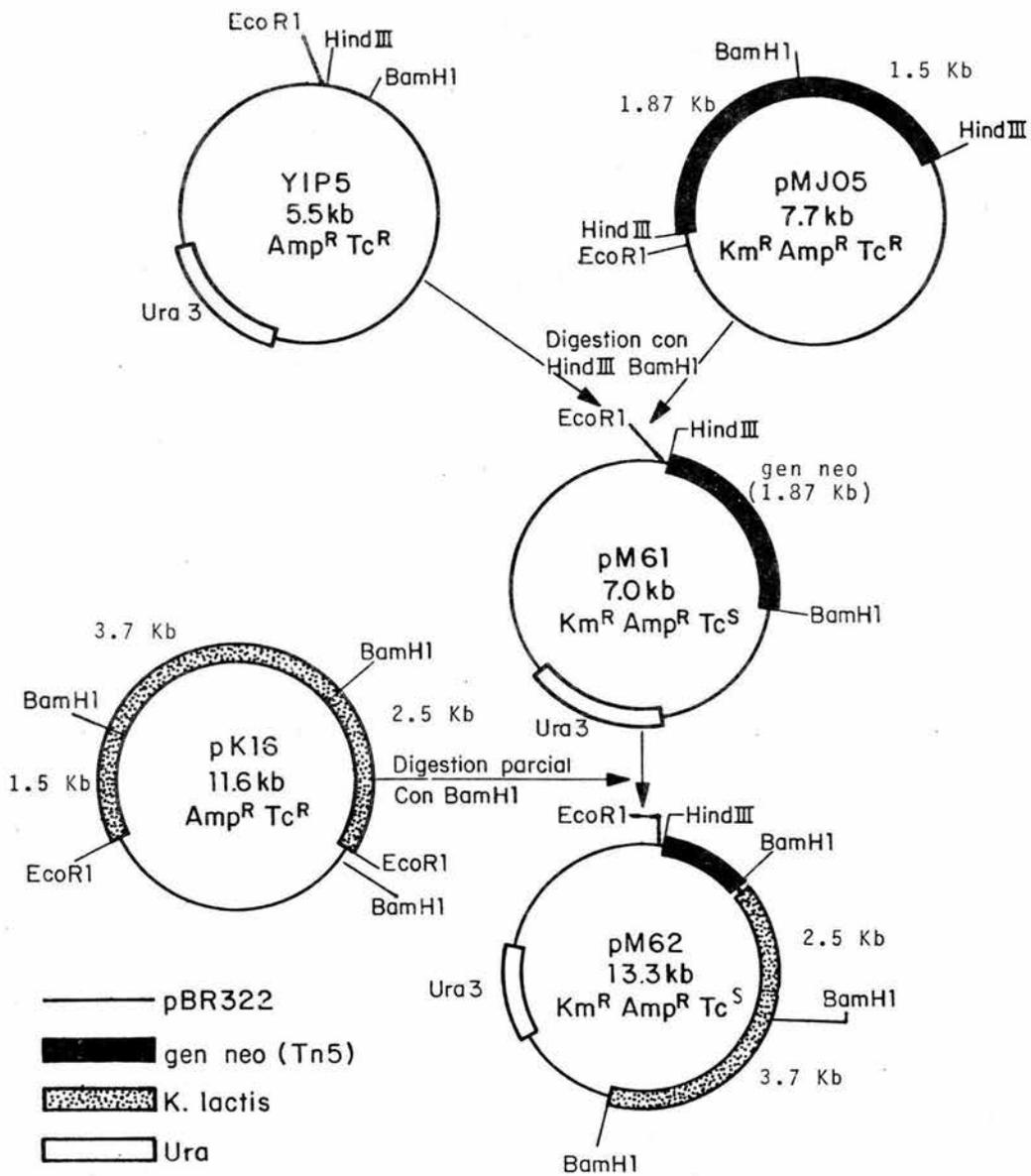


Figura 8.1 Construcción del pM62.

de células eucariotes.

La primera estrategia planteada para la extracción del pK16 fue con una digestión parcial del pK16 con Eco R1. El hecho de no haber logrado la clonación del fragmento LAC 4 como fragmento Eco R1 se puede explicar si comparamos y analizamos los mapas reportados por Dickson R. C. (1980), y por Breuning C. P. et. al.(1984).

En el mapa reportado por Dickson R. C. (figura 5.4) sólo existen cuatro sitios de Eco R1, por lo que una digestión parcial de dicho plásmido con esta enzima nos daría 13 posibles bandas (incluyendo el plásmido lineal) de las cuales la de 6.2 Kb es la que contiene el gen LAC 4. Esta banda es la banda inmediata superior de la que corresponde al pBR322 lineal de aquí, que se pensará en su fácil aislamiento.

En el mapa reportado por Breuning C. P. 1984 (figura 6.1) existen 6 sitios de Eco R1 y ésto da como resultado que en una digestión parcial del pK16 con Eco R1, el número de bandas aumente el doble (27), además de que las bandas que contienen el gen LAC 4 (7.0 y 7.3) se encuentran en medio de un grupo de bandas de tamaño similar que están constituidas por el pBR322 y la mayor parte del gen LAC 4. Estas bandas dan pruebas falsas de la transformación (azúl en X-gal) ya que la mayor parte del gen LAC 4 está clonado, además de que por tener el pBR322 los posibles plásmidos formados son altamente inestables por sus secuencias repetidas (recuerdese que el YIp 5 es un pBR322 que tiene clonado el gen URA 3).

Como la primera estrategia para aislar el gen LAC 4 fue apoyada en el mapa de Dickson R. C., la banda que se estaba aislando no era

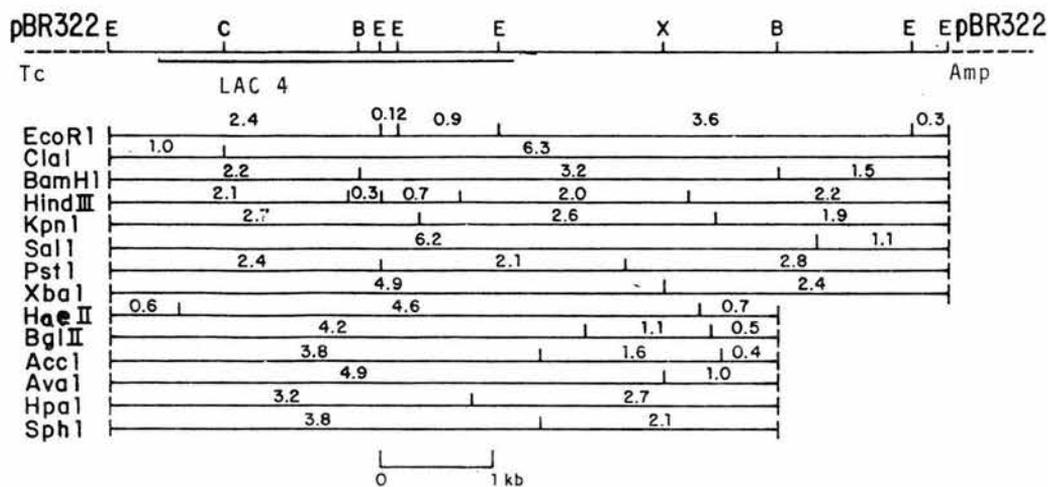


Figura 8.2. pK16. Mapa de restricción del ADN de *K. lactis* (LAC 4) que está clonado en el pBR322 (Breuing *K. D. et. al.*, - 1984).

la deseada, por lo que no se obtuvo el plásmido deseado.

Con estos experimentos sólo se obtuvo una colonia con el fenotipo de Km^R, Amp^S, Tc^S y azul en X-gal. Aunque este fenotipo era muy similar al esperado, la cepa no contenía el plásmido deseado. Al parecer parte del ADN clonado se integró al genoma de E. coli ya que no se logró purificar el plásmido, sin embargo hacen falta otras pruebas más contundentes para confirmar esta hipótesis.

La clonación del gen LAC 4 en el pMG 1, se logró obtener cuando se aisló dicho gen con una digestión parcial de Bam HI del pK16. El resultado de este experimento nos dió dos plásmidos que difieren en la orientación del segmento clonado. En el plásmido pMG2-A se tiene insertado gen LAC 4 de tal forma que su transcripción es en la misma dirección que el gen URA 3 y el gen de Tc y en el pMG2-B la orientación es inversa. En este último plásmido la resistencia a Tc es recuperada debido a que el segmento Hind III / Bam HI que se le había deleccionado al YIp 5 para la clonación del gen neo, ahora es proporcionado por el fragmento de ADN que lleva el gen LAC 4 y en el pMG2-B el fragmento está clonado de la forma apropiada.

PERSPECTIVAS

El siguiente paso para la construcción de la cepa sobreproductora de β-galactosidasa es la transformnacoón de K. fragilis de acuerdo con la estrategia planteada. Para efectuar este paso es necesario determinar la concentración letal del G418 para nuestra cepa y establecer las condiciones de transformación.

Una vez realizado este paso se puede intentar incrementar la

eficiencia de transformación cortando dentro del ADN de K. lactis o del gen URA 3 o bien deletando una pequeña parte de estos genes. Debido a que el gen LAC 4 está clonado junto al gen neo, se puede intentar aumentar la producción enzimática por amplificación génica, es decir aumentar el número de copias del gen aumentando considerablemente la presión selectiva en el inóculo, (concentraciones de 6418 muy elevadas) de tal forma que crezcan únicamente aquellas células que tengan el gen neo varias veces clonado (Valle F. 1987). Otra posibilidad es hacer un banco de K. fragilis (para tener secuencias homólogas que faciliten la integración) y seleccionar aquellas clonas que tengan una mayor actividad enzimática y sean más estables.

Si esta estrategia no funcionara se puede clonarle al LAC 4 un promotor fuerte de levadura, sin embargo existe la posibilidad de que si se usa uno de S. cerevisiae este no funcione de la misma manera que en su huésped original.

Otra de las estrategias para obtener la cepa sobreproductora de β -galactosidasa sería cambiando de huésped es decir usar S. cerevisiae en lugar de K. fragilis. Esta estrategia está fuertemente apoyada porque es en esta levadura en donde el sistema de transformación está mejor desarrollado además de que existen varios trabajos en donde se reporta que el gen LAC 4 e incluso el gen de la permeasa se pueden expresar.

Si se sigue esta estrategia en el laboratorio, el gen LAC 4 se puede usar como rastreador del gen que codifica para la permeasa. Sreekrishna K. & Dickson R. C. (1985), reportan que el gen de la permeasa se encuentra entre 2 a 8 Kb arriba del gen LAC 4.

A pesar de los adelantos y éxitos que ha tenido la ingeniería genética en la construcción de cepas sobreproductoras de algún metabolito, todavía existen una serie de problemas que resolver como establecer mecanismos para mantener estables el gen clonado y buscar condiciones óptimas de crecimiento para la producción de la enzima.

BIBLIOGRAFIA

1.- Beck E., Ludwig E. A., Averwald B. R. & H. Schaller. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn 5. *Gene* 19: 327-336.

2.- Begg J. D. 1978. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature* 275: 104-109.

3.- Bolivar R. F. et. al., 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles, II A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-112.

4.- Botstein D. & Davis R. W. 1982. Principles and practice of recombinant DNA research with yeast. In: *The molecular biology of the yeast Saccharomyces. Metabolism and gene expression.* Editors Jeffrey N. Strathern, Elizabeth W. Jones & James R. Broach. Cold Spring Harbor Laboratory.

5.- Botstein D. et. al., 1979. Sterile host yeast (SHY): a eucaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene* 8: 17-24.

6.- Breunig K. D., Dahlems U., Das S. & Hollenberg C. P. 1984. Analysis of a eucaryotic β -galactosidase gene: the terminal end of the yeast *Kluyveromyces lactis* protein shows homology to the *E. coli* lac Z gene product. *Nucleic Acids Research*. Vol 12(5): 2327-2341.

7.- Castillo R. E. 1986. Desarrollo de un sistema de inmovilización de células completas de levadura con actividad de

β-galactosidasa. Tesis para obtener el título de Químico farmacobiólogo. Facultad de Química. UNAM.

8.- Churchwar G. D. & H. Chandler. 1985. In vitro Recombinant DNA Technology. In: Comprehensive Biotechnology. The principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine. Editor in chief Moo-Young. Vol 1. Pergamen Press. New York.

9.- Colbere-Garapin F. et. al. 1981. A new dominant hybrid selective marker for higher eucariotic cells. Journal Molecular Biology 150: 1-14.

10.- Das S. & Hollenberg C. P. 1982. A high frequency transformation system for the yeast Kluyveromyces. Current genetics 6: 123-128.

11.- Das S., Kellerman E. & Hollenberg C. P. 1984. Transformation of Kluyveromyces fragilis. Journal Bacteriology 158(3): 1165-1167

12.- Dickson R. C. 1980. Expression of a foreign eucaryotic gene in S. cerevisiae: β-galactosidase from Kluyveromyces lactis. Gene 10: 347-356.

13.- Dickson R. C. & Markin J. S. 1978. Molecular cloning and expression in E. coli of a yeast gene coding for β-galactosidase. Cell 15: 123-130.

14.- Dickson R. C. & Markin J. S. 1980. Physiological studies of β-galactosidase induction in Kluyveromyces lactis. Journal Bacteriology 142: 777-785.

15.- Dickson R. C., Sheetz R. M. & Lacy L. R. 1981. Genetic Regulation: Yeast Mutants Constitutive for β -galactosidase activity have an increased level of β -galactosidase Messenger Ribonucleic Acid. *Molecular and Cellular Biology* 1: 1048-1056.

16.- García H. M., Martínez M. de los A., Vásquez R. & Delgado J. 1985. Transformation of Kluyveromyces lactis cells by plasmids DNA does not require alkaline cations. *Biotechnology letters*. 7 (10): 723-726.

17.- Genilloud O., Garrido M. C. & Moreno F. 1984. The transposon Tn 5 carries a bleomycin-resistance determinant *Gene* 32: 225-233.

18.- Gekas V. and López-Leiva M. 1985. Hydrolysis of lactose: A literature review. *Process Biochemistry* 20 (2): 2-12.

19.- Hinnen A., Hicks J. B. & Fink G. R. 1978. Transformation of yeast. *Process National Academic Science USA*. 75(4): 1929-1953.

20.- Hollenberg C. P. 1979. The expression of bacterial antibiotic resistance genes in the yeast Saccharomyces cerevisiae. In *Plasmid of medical environmental and Commercial Importance*. Timmis K. N. & Puhler A. (Eds). Elsevier Nor Holland Biomedical Press Amsterdam. 481-49 .

21.- Hoopwood D. A. 1981. The genetic programming of industrial microorganism. *Scientific American* 245(3): 67-78.

22.- Irving S. J. & Burnett P. Jr. 1978 Problems and potencial of industrial recombinant DNA research. In: *Genetic Engineering* H. W. Boyer & S. Nicosia Eds. North-Holland Press.

- 23.- Jimenez A., Davies J. 1980. Expression of a transposable antibiotic resistance element in Saccharomyces. Nature 287: 869-871.
- 24.- Lacy L. R. & Dickson R. C. 1981. Transcriptional regulation of the Kluyveromyces lactis α -galactosidase gene. Molecular and Cellular Biology 1(7): 629-234.
- 25.- Lomeli Buyoli H. M. 1984. Introducción de un sitio de restricción adyacente al origen de replicación del plásmido pBR327. Tesis para obtener el título de Químico farmacobiólogo. E. N. E. P. Zaragoza. UNAH.
- 26.- Louvencourt L., Fukuhara H., Heslot H. & Wesolowski M. 1983. Transformation of K. lactis by killer plasmid DNA. Journal Bacteriology 154(2): 737-742.
- 27.- Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. 1982. Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
- 28.- Old R. W. & Ptimiose S. B. 1982. Principles of gene manipulation. An introduction to genetic engineering. University of California Press.
- 29.- Roberts R. C. 1976. Restriction endonucleases. Crit. Rev. Biochem. 4: 123-164.
- 30.- Rodríguez R. L. & Tart R. C. 1983. Recombinant DNA techniques. An Introduction. Addison Publishing Company.
- 31.- Rothstein R. J. 1983. One step gene disruption in yeast. Methods in enzymology 101: 202-211.

32.- Santerre R. F. et al 1984. Expression of prokariotic genes for hygromycin B and G418 resistance as dominant selection markers in mouse L-cells. *Gene* 30: 147-156.

33.- Sheets R. M. & Dickson R. C. 1980. Mutations affecting synthesis of β -galactosidase activity in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* 95: 877-890.

34.- Sheets R. M. Dickson R. C. 1981. LAC 4 is the structural gene for β -galactosidase in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* 98: 729-745.

35.- Sreekrishna K. & Dickson R. C. 1983. Construction of strains of *Saccharomyces cerevisiae* that grown on lactosa. *Process National Academic Science* 82: 7909-7913.

36.- Sreekrishna K., Webster T. D. & Dickson R. C. 1984. Transformation of *Kluyveromyces lactis* with kanamycin (G418) resistance gene of Tn 903. *Gene* 28: 73-81.

37.- Struhl Kevin 1983. The new yeast genetics. *Nature* 305: 391-397.

38.- Sugisaki Y., et al. 1985. Transfer of DNA killer plasmids from *Kluyveromyces lactis* to *Kluyveromyces fragilis* and *Candida pseudotropicalis*. *Journal Bacteriology* 164(3): 1373-1375.

39.- Stewart S. Davis R. W. 1979. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. *Process National Academic Science. USA.* 76(10): 4951-4955.

40.- Valle F. 1987 GENENCOR, Inc. Comunicacion personal.

41.- Velati-Bellini A., Pedroni P., Martegani E. & Alberghina L. 1986. High levels of inducible expression of cloned β -galactosidase of Kluyveromyces lactis in Saccharomyces cerevisiae. Appl. Microbiol Biotechnol 25: 124-131.

42.- Webster T. D. & Dickson R. C. 1983. Direct selection of Saccharomyces cerevisiae resistant to the antibiotic G418 following transformation with a DNA vector carrying the kanamycin resistance gene of Tn 903. Gene 26: 243-252.

43 - Winston F., Chumley F. & Fink G. R. 1983. Eviction and transplacement of mutant genes in yeast. Methods in enzymology. 101: 211-228.

44.- Zurita O. H. E. 1983. Construcción y caracterización de vehículos moleculares de clonación para el estudio de transcripción en E. coli. Tesis para obtener el título de biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM.