

---

FACULTAD DE QUIMICA

U.N.A.M.

**Estabilización de Material Genético Heterólogo  
en Escherichia coli K - 12**

**T E S I S**

Que para obtener el título de :  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
p r e s e n t a :  
**ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES**

---

México, D. F.

1975





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

CLAS. Tesis  
ADQ. 1975  
FECHA  
PROC. 117-82



QUIMICA

JURADO ASIGNADO :

PRESIDENTE: OSCAR AMOR DODERO.  
VOCAL: CARLOS DEL RIO ESTRADA.  
SECRETAR : FRANCISCO G. BOLIVAR ZAPATA.  
1<sup>er</sup> SUPLENTE: JOSE DE JESUS MANRIQUE O.  
2<sup>o</sup> SUPLENTE: BERARDO KONO YAIKO.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones  
Biomédicas UNAM

SUSTENTANTE : ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES

ASESOR DEL TEMA : FRANCISCO G. BOLIVAR ZAPATA



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Alejandra R.', is written over the printed name of the presenter.

Mi más sincero agradecimiento al  
Dr. Francisco Bolívar Z. por la  
ayuda que me prestó durante la -  
realización de este trabajo.

A MIS PADRES Y HERMANOS

A MIS AMIGOS

A MIS TIOS

Y AMAR LA VIDA MERCED AL TRABAJO  
ES INTIMAR CON EL SECRETO MAS --  
OCULTO DE LA VIDA.

GIBRAN.

PARA TI

## I N D I C E

	Pág.
OBJETIVO .....	1
ANTECEDENTES .....	3
GENERALIDADES .....	4
MATERIALES Y METODOS .....	32
a) Materiales .....	32
b) Métodos .....	36
RESULTADOS .....	45
a) Aislamiento de ADN de plásmido por gradiente isopienico a equilibrio de Cloruro de cesio - Bromuro de etidio: --- Col El, pSC101, SCPl y Plásmido críptico de <u>Bacillus pumi</u> <u>lus</u> .....	45
b) Caracterización en gradientes neutros de Sacarosa 5-20% y en geles de agarosa 0.8 % .....	46
c) Obtención del plásmido compuesto: pSC101 - <u>N. crassa</u> ...	48
DISCUSION .....	49
BIBLIOGRAFIA .....	53

## OBJETIVO

Se podría decir que el objetivo de nuestro trabajo es de dos tipos, uno inmediato y otro mediato.

Esta tesis alcanza a cumplir el primero de ellos, ésto es, llegar a estabilizar material genético heterólogo en un microorganismo que presenta ciertas ventajas como lo es Escherichia coli K-12. Como se verá en el curso de este trabajo, se exponen una serie de problemas que habían impedido el mantenimiento en forma estable de material genético de organismos de otra familia, en una bacteria como E. coli, debido a mecanismos de restricción y modificación que están presentes en la célula y a la falta de homología entre ADN. Sin embargo, en la actualidad ha sido posible estabilizar ADN heterólogo en E. coli gracias al sistema -- Eco RI- Ligasa T4 la cual es una metodología que nos permite manejar el material genético de tal manera que es posible formar plásmidos "compuestos" que al ser introducidos por transformación en E. coli, por sus características de replicón, permanecen estables.

Claro es que el objetivo mediato será tratar que esta nueva información que ha sido introducida se exprese y, no sólo eso sino que esa información sea específica, es decir, se tratará de introducir genes puros que codifiquen para moléculas de interés.

La aplicación futura que podría ser a muchos niveles se presenta como un nuevo método para el estudio de los mecanismos de regu



lación en los diferentes organismos tanto procariotes como eucariotes - así como una nueva forma de producción industrial de ciertas enzimas, - antibióticos, etc.

Otro punto importante sería la sustitución de ciertos pro ductos comerciales (fertilizantes) por la transformación directa a plan tas; por ejemplo, utilizando los genes para fijación de  $N_2$  de ciertos - microorganismos como Klebsiella aerogenes (1).

De ahí la importancia de este trabajo en donde se reporta la estabilización de un material genético heterólogo en E. coli K-12 -- como lo es un fragmento de ADN de N. crassa. Este microorganismo pre-- senta ciertas características importantes como el ser un eucariote sencillo cuyo mecanismo de regulación de fijación de nitrógeno ha sido extensamente estudiado (2).

### ANTECEDENTES

Hasta ahora sólo se había llegado a provocar modificaciones sobre el ADN en un microorganismo preexistente, ésto es, mutagenizándolo y seleccionando específicamente ciertos organismos sobreproductores (3).

Sin embargo, existe la posibilidad de modificar la información genética de un organismo dado sin la necesidad de mutagenizar el ADN existente, es decir, introduciendo material genético de organismos de la misma o diferente especie. De hecho ésto ya se ha realizado por Cohen et al, logrando la construcción de nuevas cepas bacterianas por medio de la formación de plásmidos compuesto de ADN. Estos plásmidos compuestos son generados por la acción conjunta de la endonucleasa de restricción Eco R1. y de una ligasa de ADN (4).

Es de interés hacer notar la importancia de este sistema enzimático (Eco R1 - Ligasa), ya que abre el camino para el desarrollo futuro de la Ingeniería Genética puesto que gracias a ella será posible, como se indicó antes, construir nuevos organismos, que no necesariamente serán "monstruos" ni crearán problemas, sino que ayudarán a la resolución de una serie de problemas de carácter mundial.

## GENERALIDADES

Los tres fenómenos que hasta ahora han sido reportados en Biología como instrumentos para la modificación de la cantidad y/o calidad de la información genética preexistente en una célula son: Transducción, Conjugación y Transformación, los cuales presentan las siguientes características:\*

### Transducción

Es el proceso de transferencia del material genético ADN en bacterias el cual está mediado por partículas fágicas. La transducción puede ser un método común para el intercambio de información genética en la naturaleza.

Fué en 1952 cuando Zinder y Lederberg reportaron por vez primera este fenómeno, al comprobar que el fago temperado PLT22 de Salmonella typhimurium era capaz de transferir marcadores genéticos entre diferentes cepas de este organismo (5).

Este fenómeno es una propiedad que poseen muchos fagos -- temperados de diferentes tipos de bacterias (6) y actinomicetos; a estos bacteriofagos se les conoce como fagos transductantes.

---

\* De estos tres mecanismos enfatizaremos sobre las características -- respectivas al fenómeno de Transformación debido a las ventajas -- que presenta y, que serán enumeradas posteriormente.

El mecanismo de transducción se lleva a cabo de la siguiente manera (Fig. 1):

Infección de una bacteria por un fago transductante. El ADN del fago da lugar al rompimiento del cromosoma bacteriano en fracciones de tamaño diferente de las cuales algunas serán semejantes en tamaño y peso al ADN fágico y, se inicia también la síntesis de proteínas virales. Se ensamblan los viriones y puesto que existen fragmentos de ADN bacteriano del mismo peso que el viral, se ensamblan éstas como si fueran ADN fágico. Se lisa la bacteria huésped y ocurre la liberación de las partículas virales entre las cuales algunas, las transductantes, sólo llevan ADN bacteriano. Posteriormente si ocurre la infección de una célula receptora por un fago que lleva el ADN bacteriano, el ADN bacteriano portado por la partícula transductante se incorpora al del huésped por medio de un proceso de recombinación (7) con la subsecuente formación de células con diferentes caracteres genotípicos.

Como hemos visto, el material genético transferido por el fago transductante es un fragmento del genoma bacteriano; ahora bien, cuando dos o más genes se encuentran separados por una distancia de ADN menor que el tamaño máximo que puede ser transferido por un determinado fago transductante, estos genes pueden ser cotransducidos. Entre mayor sea la distancia menor será la frecuencia de cotransducción.

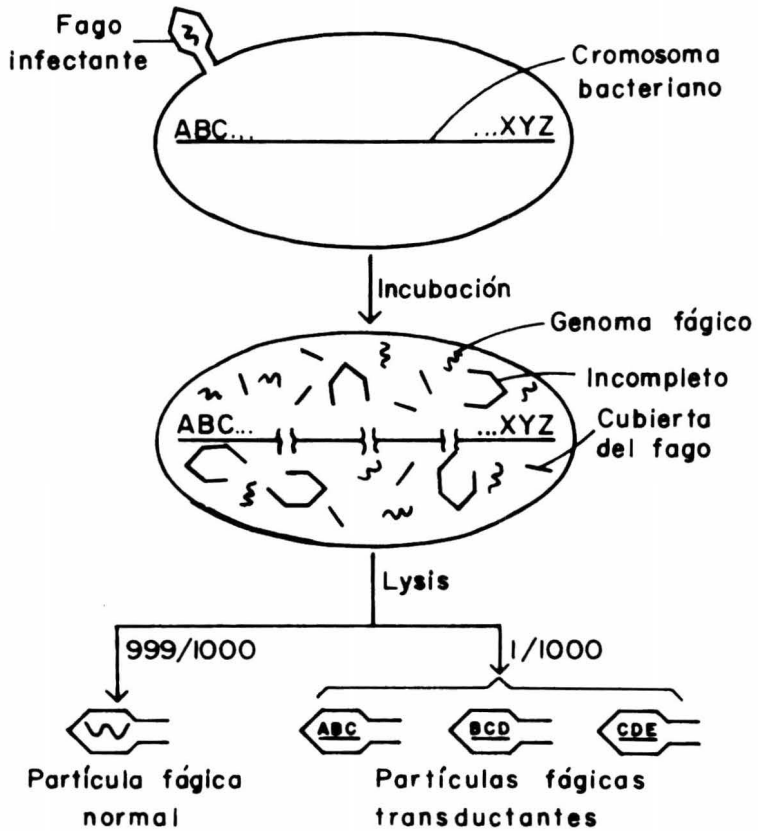


FIGURA 1 . MECANISMO DE TRANSDUCCION.

( El mecanismo se detalla en el texto )

Se conocen dos tipos de transducción, a saber:

- a) Transducción generalizada y,
- b) Transducción especializada

Cada una de las cuales se restringe a dos tipos de fagos respectivamente.

a) En el caso de la transducción generalizada un virus - en particular puede transferir una fracción de ADN bacteriano proveniente de cualquier parte del cromosoma. Por lo tanto, la transducción de cualquier gene o genes cromosomales o citoplásmicos puede ser mediada - por virus de este tipo (virus generalizados) como sería el caso de Mu-1 el cual se integra en cualquier sitio del cromosoma bacteriano o, P<sub>1</sub> el cual nunca se integra sino que en la fase tardía de la infección produce nucleasas las cuales degradan el cromosoma bacteriano en una variedad muy grande de fragmentos. Las características de este tipo de transducción fueron descritas por Ikeda y Tomizawa (8).

b) En la transducción especializada sólo ciertos genes -- cromosomales, aquellos que están cercados a la localización del profago en el cromosoma bacteriano, pueden ser transferidos.

Este es el caso del fago  $\lambda$  de E. coli el cual sólo puede transferir aquellos genes bacterianos que se encuentran cerca del locus de integración del profago. Este fago se integra de manera lineal entre los marcadores gal y bio (gal: operón que otorga a la célula la habili--dad de fermentar la galactosa; bio: operón que codifica para la produc--ción de biotina) minuto 17.4 del cromosoma de E. coli K-12 (9). (Fig. 2).

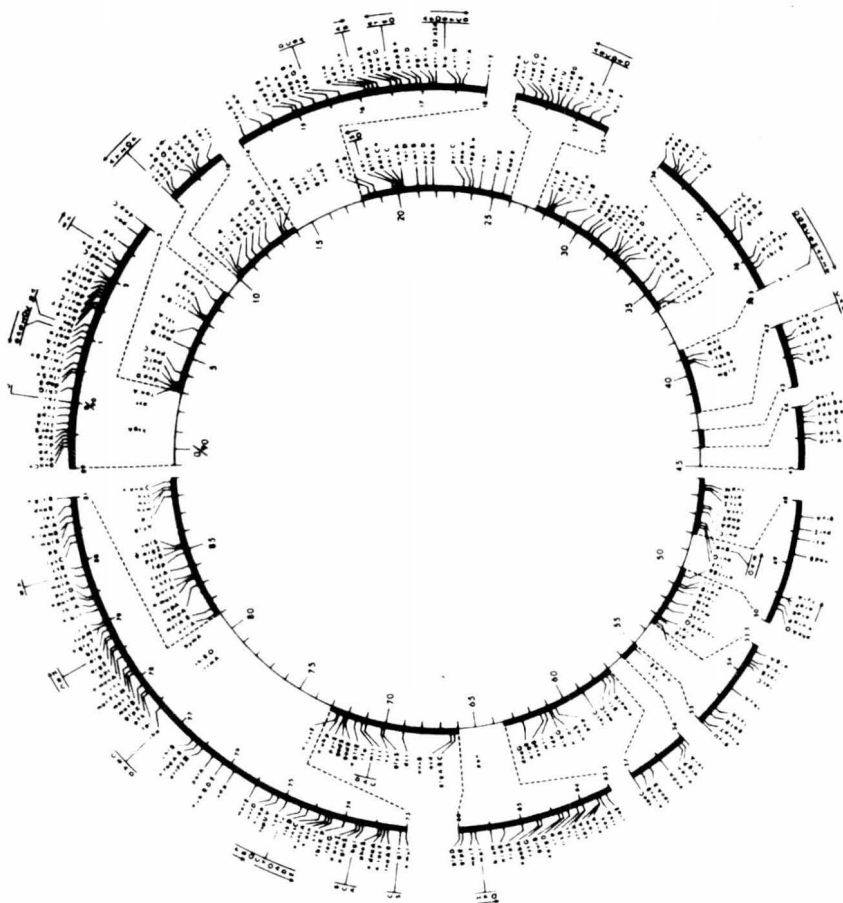


FIGURA 2 . MAPA DEL CROMOSOMA DE E. coli.

El cromosoma de E. coli mide 90', que es el tiempo que tardaría en pasar todo un genoma en una conjugación.

La simbología está de acuerdo a A. Taylor (28).

Los genes que pueden ser transferidos en transducciones - especializadas difieren de acuerdo al sitio de inserción del virus --- transductante de que se trate.

### Conjugación

Fué Joshua Lederberg quien en 1946 descubrió el proceso - sexual en bacterias que ahora conocemos como conjugación y, en el cual el ADN es transmitido como resultado del contacto celular (10).

Es necesario para que la conjugación ocurra que uno de -- los organismos posea ciertas prolongaciones llamadas fimbria o pili --- (11). Estos pelos sólo son producidos por aquellos organismos que po-- seen una molécula de ADN llamada factor sexual o factor de fertilidad. El primer factor sexual reportado fué el factor F, en E. coli, que es - un ADN de  $45 \times 10^6$  d, que puede existir como factor extracromosomal, cir-- cular y capaz de replicarse en forma autónoma pero sincronizadamente al ADN cromosomal (12), o bien puede integrarse y formar parte del cromo-- soma (13).

Los factores que pueden existir en forma alternativa como parte del cromosoma o libres en el citoplasma y que no son indispensa-- bles para la célula son llamados episomas (14).

Los organismos que portan el factor F son  $F^+$  y son capa-- ces de donar material genético, en tanto que aquéllos que carecen de él son  $F^-$  y sólo funcionan con receptores.



El factor F además de intervenir en su propia transferencia es capaz de provocar la transferencia de los genes cromosomales. -- Esto sucede cuando el episoma pasa a formar parte del cromosoma. A esta célula con el factor F integrado se le conoce como Hfr (high frequency of recombination = alta frecuencia de recombinación) (15) y, la diferencia con respecto a la célula que presenta el factor F como episoma, es que la primera es capaz de transmitir genes cromosomales a la receptora a altas frecuencias mientras que la segunda no.

El factor F se puede insertar en cualquier parte del cromosoma, de ahí que exista una gran variedad de cepas Hfr de acuerdo a la localización de integración de éste (16) (Fig. 3).

El mecanismo por el cual marcadores cromosomales son -- transferidos por el fenómeno de conjugación es como sigue:

Inserción del factor F en el cromosoma donador. Unión de la bacteria donadora ( $F^+$ ) a la receptora ( $F^-$ ) por medio de un puente -- citoplásmico o pili sexual. Transferencia del ADN cromosomal con el -- factor F insertado al final del macho ( $F^+$ ) a la célula hembra ( $F^-$ ) por medio del puente de conjugación (11). Generalmente esta transferencia es incompleta ya que sólo entra parte del cromosoma del macho antes de que las células se separen. Recombinación entre el ADN de la hembra y el del macho con el subsecuente proceso de segregación que da lugar a -- una progenie haploide. (Fig. 4).

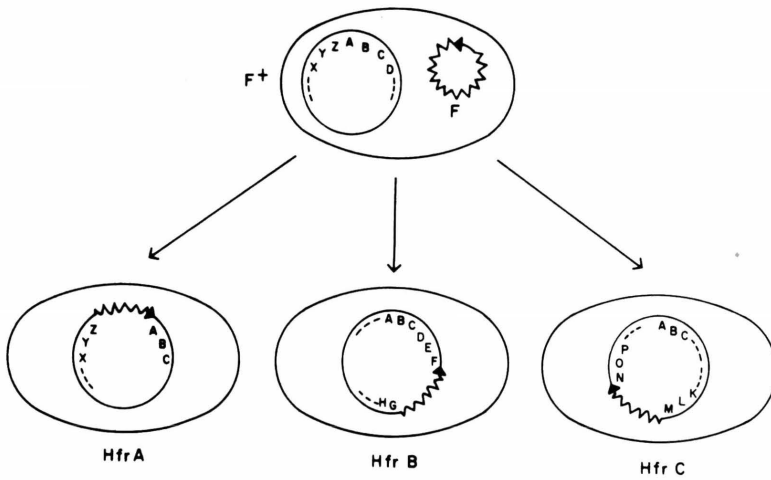
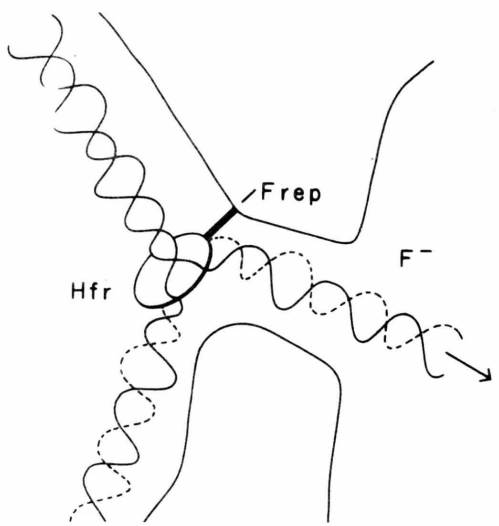
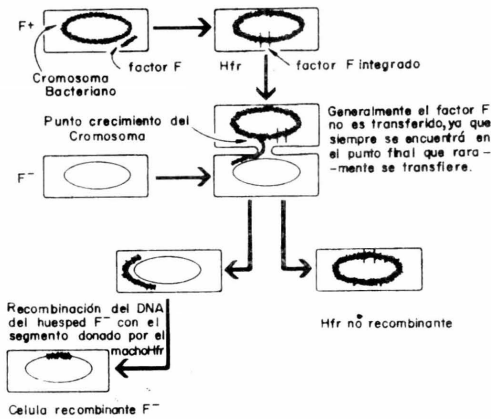


FIGURA 3 . FORMACION DE DIFERENTES TIPOS DE CEPAS Hfr.

La formación de una gran variedad de cepas Hfr es posible debido a la capacidad del factor F de insertarse en cualquier parte del cromosoma. El sitio de recombinación se - señala con una flecha a la mitad del episoma.



**SEXUALIDAD EN *E. coli***  
**TRANSFERENCIA CROMOSOMAL DEL MACHO Hfr A LA HEMBRA F<sup>-</sup>.**

(A) SEXUALIDAD EN *E. coli* .- Mecanismo del fenómeno de conjugación.  
 (B) MODELO PARA EL MECANISMO DE TRANSFERENCIA DE ADN DURANTE LA CONJUGACION. La unión del extremo de un pelo (pili) a una célula F<sup>-</sup> de alguna manera activa una maquinaria (F rep), unida a la membrana celular en la base del pelo, la cual inicia la replicación asimétrica del ADN en el sitio de iniciación de un factor F.

En organismos pertenecientes a diferentes niveles en la - escala biológica se ha llegado a detectar este fenómeno de conjugación a saber en: bacterias, actinomicetos, hongos superiores y algunos protozoarios, sin embargo esta transferencia de material genético no es -- indiscriminada ya que el ADN no puede ser transferido de organismo a organismo de diferentes familias, puesto que generalmente ocurre la des--trucción del ADN heterólogo al ser reconocido por enzimas de restricción de la célula receptora. Los símbolos de reconocimiento son grupos químicos, tales como grupos metilo, los cuales son adicionados a las bases del ADN por enzimas modificantes para formar un patrón que es específico para un organismo o cepa determinadas. Cuando el ADN entra a una bacteria puede ser destruido por una enzima de restricción, una nucleasa, que destruye el ADN cuyo patrón de grupos modificantes es diferente al de la bacteria misma (17). Tal restricción presenta pues, ciertos obstáculos para la transferencia de ADN de organismo a organismo o, de una especie a otra y, por lo tanto limita la calidad de información genética que pudiera ser transferida.

#### Transformación

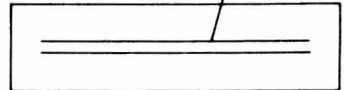
El descubrimiento de transformación bacteriana por Griffith (18) en 1928 y, posteriormente la demostración por Avery, Macleod y McCarty (19) en 1944, de que el factor transformante es ADN, ha llevado a pensar en un gran número de posibilidades de transformación ge--nética en bacterias. Hasta la fecha se ha demostrado que E. coli es -- capaz de recibir información genética de muchos microorganismos (20) --

(Ver Tabla I) y probablemente sea capaz de recibirla de cualquiera, teniendo en cuenta, por supuesto, que son necesarios una serie de requisitos en función del tipo de material genético que recibe, para que éste pueda estabilizarse y replicarse. En la actualidad se sabe el ADN transformante puede ser lineal o circular y, que debe ser ADN nativo es decir, no desnaturalizado (de una sólo hélice).

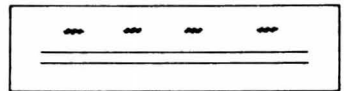
Hoy en día es aún poca la información que se tiene a cerca del mecanismo de transformación, sin embargo los siguientes tres pasos parecen estar involucrados en este mecanismo: El ADN debe ser liberado de la célula donadora. Debe adsorberse y luego absorberse en el organismo receptor. El ADN absorbido por la célula receptora debe recombinar con el cromosoma del receptor o quedar como un ADN extracromosomal circular. (Fig. 5).

FIGURA 5.  
MECANISMO DE  
TRANSFORMACION.

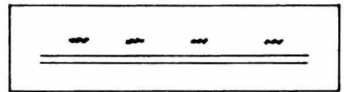
1.- ADN donador mezclado con células receptoras competentes.



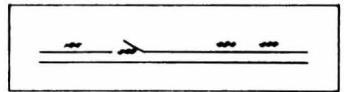
2.- Absorción del ADN donador.  
Degradación del ADN donador de doble hélice a una sólo hélice.



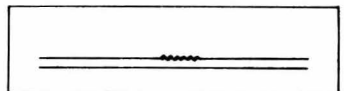
2'- Apareamiento del ADN donador con regiones homólogas del cromosoma receptor.



3.- Inserción de ADN donador en el cromosoma receptor.



4.- "Reparación" de las rupturas para dar una molécula de ADN híbrido.



5.- Replicación para dar una molécula homocigoto



Tabla I

Sistemas en los cuales se ha reportado paso de material genético entre dos organismos de diferente especie

Mecanismo	Organismos	Involucrados	Tipos de genes transmitidos
Conjugación	Donador DNA	Receptor DNA	
	<u>Salmonella typhimurium</u>	<u>E. coli</u> (40)	Todos los cromosomales y episomales
	<u>Klebsiella pneumoniae</u>	<u>E. coli</u> (41)	Operón <u>nif</u> , genes que codifican para enzimas para fijación de nitrógeno atmosférico
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	<u>E. coli</u>	Resistencia a penicilina episomal en <u>Pseudomonas</u> a cromosomal en <u>E. coli</u>
Transducción	Fibroblasts humanos	<u>E. coli gal gal</u> (42)	Genes del operón de <u>galactosa</u> de <u>E. coli</u> que permiten utilizar la <u>galactosa</u> como fuente de carbono
	células de plantas superiores (tomate)	<u>E. coli gal gal</u> (44)	Genes del operón de <u>galactosa</u> de <u>E. coli</u> que permiten utilizar la <u>galactosa</u> como fuente de carbono.
Transformación	DNA de <u>Streptomyces coelicolor</u>	<u>B. subtilis</u> (43)	Genes que codifican para enzimas biosintéticas; curación de auxotrofia
	DNA de <u>Salmonella typhi</u>	<u>E. coli</u> (37)	Genes que codifican para enzimas biosintéticas; curación de auxotrofia
	DNA episomal Híbrido <u>Salmonella Panama + E. coli</u>	<u>E. coli</u> (4)	Resistencia episomal a antibióticos
	DNA episomal Híbrido <u>Staphylococcus aureus + E. coli</u>	<u>E. coli</u> (38)	Resistencia episomal a antibióticos
	DNA episomal compuesto <u>Xenopus laevis +</u>	<u>E. coli</u> (39)	Transcripción, y replicación DNA 28S y 18S de <u>X. laevis</u>

### Transformación en E. coli K-12

Se habían llevado a cabo una serie de intentos antes de Oishi para transformar E. coli (21, 22) y se necesitaron salvar dos obstáculos para lograrlo.

El primer obstáculo era que el ADN no lograba penetrar al citoplasma bacteriano. Sin embargo, esta barrera se sobrepuso, tratando las células con altas concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  (30 mM) a 0°C, permitiendo ésto la transformación con ADN circulares tipos plásmido, más no con ADN lineales (23).

La razón de esto último, es que aparentemente si el ADN que entra es lineal, es degradado por una exonucleasa dependiente de ATP, codificada por los genes recB y recC, que se localizan en el minuto 54 del cromosoma de E. coli K-12 (22, 24, 25). De acuerdo con lo anterior se intentó transformar una mutante de estos genes con ADN lineal. El intento fue infructuoso, ya que al perder la célula esta actividad, aún cuando no degrada el ADN exógeno, tampoco puede recombinar, ya que esta exonucleasa es una de las actividades enzimáticas que se requieren para ello.

Sin embargo, para entonces se tenían ya una serie de mutantes supresoras fenotípicas de esta actividad de recB recC, a saber: las mutantes sbcB y sbcA que son células en donde aparecen nuevas vías que permiten que la célula recombine sin la actividad exonucleolítica codificada por recBC. Oishi et al., logran transformar E. coli K-12

recBC sbcB ó sbcA (7, 25) usando ADN lineal extraído de E. coli K-12 --  
(26).

Sin embargo, no logra transformar células de E. coli K-12 usando ADN de otras fuentes, como E. coli B, o B. subtilis.

Ventajas de la transformación sobre la conjugación y la transducción como sistema para introducir ADN heterólogo en una célula.

Como habrá podido notarse, existe una ventaja fundamental del sistema de transformación sobre los de conjugación y transducción - en cuanto a la posibilidad de que el donador de ADN sea de otra especie.

En el caso de la conjugación, el paso de material genético de un organismo a otro, está limitado a organismos de la misma familia o de familias muy cercanas filogenéticamente, ya que no se han reportado - conjugaciones entre familias no relacionadas. Lo mismo aplica para la - transducción, ya que este fenómeno implica la obtención de partículas -- transductantes a partir de una célula infectada y para que estas partí-- culas infecten a una célula se requieren de los receptores de pared y es por ello que es poco probable que células poco relacionadas dentro de la escala biológica compartan estos receptores fágicos (27, 28).

Es así que la transformación se convierte en el sistema -- idóneo para introducir material genético heterólogo en una célula, independiente de lo que a este material le ocurra, ya que siendo heteró



logo, es probable que así lo reconozca la célula y lo degrade (17).

Importancia de E. coli como posible receptor y estabilizador de un material genético heterólogo.

Aun cuando es poco probable, como se dijo arriba, que una célula logre estabilizar e incorporar como suyo un ADN heterólogo, se tratará a continuación, de explicar un modelo basado en el conocimiento actual, que se tiene de organismos como E. coli, para superar las dificultades intrínsecas de esta célula y lograr modificarla para hacerla aceptora y estabilizadora de material genético no homólogo.

Es indudable la importancia que esto podría tener para el hombre, ya que significaría una verdadera ingeniería genética en el sentido de poder introducir y estabilizar genes que codifican para la síntesis de enzimas involucradas en vías biosintéticas importantes presentes en un organismo y llevarlos a otro que por sus características permitan una mejor producción de alguna sustancia deseada.

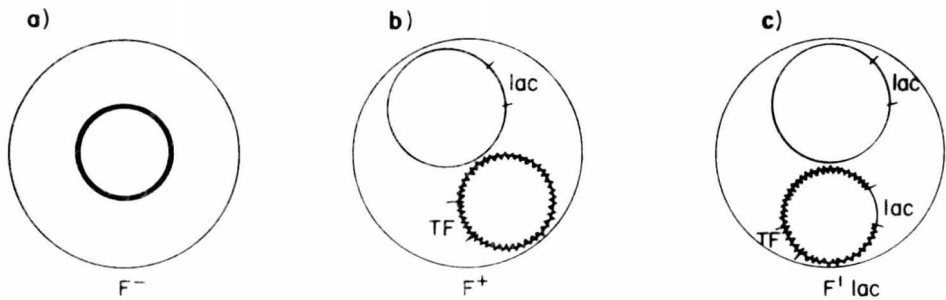
Ahora bien, existen varias razones por las cuales E. coli podría ser considerado como organismo aceptor de material genético heterólogo:

- 1) Este organismo es el mejor conocido tanto genética como bioquímicamente (28).
- 2) Su velocidad de multiplicación es superior a la de la gran mayoría de otros organismos y requiere de medios sencillos y baratos para crecer.

3) Existe en E. coli la posibilidad de multiplicar la -- dosis de gene y para ello hay varios caminos:

a) obtención de merodiploides gracias a episomas  $F^{lac}$  que son aquellos episomas que se generan de escisiones aberrantes, llevándose durante éstas, segmentos de ADN cromosomal (29, 13, 30) (Fig. 6).

FIGURA 6 .

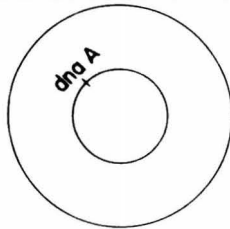


El factor sexual  $F^+$ , que es un episoma o elemento genético extracromosomal, no está presente en células hembras  $F^-$  a) los machos,  $F^+$  b), lo portan ya sea como episoma libre o como integrado Hfr.  
En algunos casos, cuando el episoma integrado se escinde del cromosoma, lo hace llevándose una parte del cromosoma y así se generan los factores  $F' lac$  c).

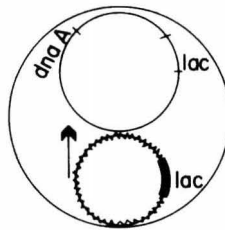
- b) Integración de  $F^1$  por el fenómeno de supresión -- por integración. Este fenómeno, reportado por -- Caro et al permite, mediante el uso de un tipo -- de mutantes de E. coli incapaz de replicar su ADN a  $42^\circ\text{C}$ , la integración de varios tipos de plásmidos en el cromosoma bacteriano (31, 32) (Fig. 7).

FIGURA 7 .

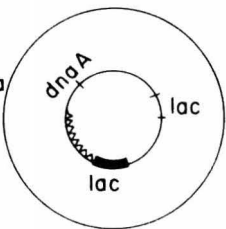
E. Coli mutante termosensible para locus *dna A* crece a  $32^\circ\text{C}$  no crece a  $42^\circ\text{C}$



$F^+$  lac  
Crece a  $32^\circ\text{C}$



Calentando a  $42^\circ\text{C}$



SUPRESION INTEGRATIVA.

Mutantes termosensibles para la replicación del DNA cromosomal, no crecen a  $42^\circ\text{C}$ , pero si a  $32^\circ\text{C}$ . Cuando la cepa es  $F^+$ , y se crece a  $42^\circ\text{C}$ , algunas células logran crecer. Entre estas células, algunas son revertantes, pero otras no lo son. Estas segundas, crecen debido a la inserción del episoma F en el cromosoma y gracias a esto, la célula replica todo su DNA con el sistema del episoma integrado.

- c) Formación de partículas transductantes especializadas.

El fenómeno de transducción especializada implica la formación de partículas fágicas que llevan ADN híbrido en el sentido que es de origen bacteriano y fágico. Estas partículas, son el resultado de escisiones aberrantes del genoma viral. Por este

mecanismo se obtienen lisados ricos en partículas que llevan parte del operón de galactosa o de --- otros operones dependiendo donde se haya insertado el fago  $\lambda$  u otro fago. Posteriores infecciones con estas partículas aumentan en varios ordenes de magnitud, la síntesis de las enzimas codificadas por los genes que van unidos covalentemente al ADN viral (9).

d) Existencia del factor Col El que permite la amplificación de genes debido a que en presencia de -- cloromicetina se replica en tanto que el ADN cromosomal no (50).

4) Otra de las ventajas de E. coli es que es posible obtener fácilmente mutantes constitutivas para las enzimas encargadas de la biosíntesis de algún metabolito, así como obtención de mutantes no retroinhibidas.

Sin embargo, aun cuando las ventajas, por sí mismas, resultan atractivas es necesario mencionar que este organismo presenta -- también una serie de desventajas en cuanto a considerarlo como organismo aceptor de material genético heterólogo, desventajas que necesariamente habría que salvar para lograr el objetivo deseado.

Entre las desventajas aparentes que presenta este sistema podrían mencionarse las siguientes:

a) E. coli parece ser un organismo muy eficiente en el sentido que no "le gusta" mantener ninguna información redundante y en cuanto no la usa, la segrega.

- b) E. coli tiene mecanismos para reconocer y degradar -- material genético heterólogo: mecanismos de restricción (17).
- c) E. coli no conjuga mas que con algunas otras enterobactereaceas y sólo es infectable por algunos bacteriofagos.
- d) E. coli requiere de homología, es decir de regiones - de ADN semejantes en cuanto a secuencia de nucleótidos, para que pueda haber recombinación.

Como se dijo anteriormente, costó mucho trabajo el poder llegar a transformar E. coli con ADN homólogo, ya que como primer obstáculo este ADN no penetraba a la célula. Una vez resuelto esto, el problema de la degradación del ADN lineal, se resolvió, como se mencionó, usando mutantes recB recC sbcA ó B en las cuales la actividad de exonucleasa ATP dependiente no existía y sin embargo, la célula recombinaba por otra vía, con otras enzimas.

En la misma forma en que fué resuelto este problema, se han resuelto ya los problemas más importantes para convertir a E. coli en un sistema transformable por ADN heterólogo.

#### Transformabilidad de E. coli por ADN heterólogo

Obviamente la forma para vencer algunos de estos obstáculos es obteniendo mutantes que no los presenten, como fué el caso de la

obtención de mutantes recB recC sbcB transformables a partir de células salvajes no transformables.

Uno de los impedimentos a vencer es el mecanismo de reconocimiento que tiene la célula hacia todo ADN extraño, degradando este material heterólogo.

En 1967 Herber Boyer caracterizó, previa purificación, una enzima de E. coli B, presente también en K-12, cuya función es la de reconocer el ADN extraño y degradarlo. Esta enzima, una endonucleasa, conocida con el nombre de endonucleasa de restricción, rompe las dos hélices de todo ADN que no sea propio, en sitios específicos del ADN de cuatro o seis nucleótidos (17, 33, 34, 35, 36).

La forma en que esta enzima distingue entre ADN propio y extraño, es que el ADN propio está "modificado" (17, 35).

El concepto "modificado" significa que el ADN está metilado. Esta es una de las posibles razones por las que Oishi (26) no logró transformación en E. coli K-12 recB recC sbcB usando ADN de E. coli o de B. subtilis.

En nuestro laboratorio se ha construido una cepa de E. coli K-12 recB recC sbcB que es transformable y que además no restringe ADN heterólogo, ya que tiene una mutación en el gene que codifica para la enzima de restricción caracterizada por Boyer (37).

En esta cepa se logró transformación con ADN lineal de -- Salmonella thyphi lo cual habla que el ADN heterólogo de este organismo no fué degradado y pudo recombinar con el del huésped para transformarlo (37).

De acuerdo con ésto, se pensó que se habría salvado el obs táculo para transformar E. coli con ADN heterólogo.

Sin embargo, al intentar transformar este organismo con ADN extraído de otros microorganismos como B. subtilis, N. crassa ó -- Streptomyces pheocromogenes, no se logró y se pensó que podía haber dos razones para ello:

Que estos organismos no tuvieron los genes que a E. coli faltaban, aunque esto era poco probable por el gran número de selecciones diferentes que se hizo, o porque aunque entraran estos genes y no fueran degradados, no existía una región de homología que les permitiese recombinar con el cromosoma de E. coli y por ende se diluirían con la multiplicación celular., ya que por no ser replicones, no podrían replicarse autónomamente. Este modelo parece altamente probable, ya que se tienen datos que hacen pensar en la necesidad de la homología para esta bilizar por recombinación con el cromosoma del huésped, un segmento de ADN lineal.

#### Transformabilidad de E. coli con ADN circular

Los datos anteriores pudieran hacer pensar que la trans-

formación heteróloga en E. coli quedaba restringida a usar ADN de células muy cercanas dentro de la escala biológica. Sin embargo, esto no es así. El problema de la falta de homología en E. coli puede ser salvado mediante transformaciones con ADN que no requiere recombinar para estabilizarse y esto es el caso de ADN circular de tipo plásmido que a diferencia de segmentos de ADN lineal, es capaz de replicarse autónoma y sincrónicamente con el cromosoma bacteriano sin requerir integrarse para ello. En otras palabras, si bien es poco probable que usando segmentos de ADN lineal heterólogo se pueda lograr heterotransformación -- por falta de recombinación, por falta de homología, es posible lograrlo introduciendo ADN de tipo plásmido, ya que éste no requiere integrarse para estabilizarse.

Los trabajos de Cohen (23, 4) demuestran la transformabilidad de E. coli con plásmidos. Además, la cepa no requiere ser recB recC sbcB ya que ésta exonucleasa no afecta el plásmido por no presentar éste extremos libres y, por no requerir de la recombinación para estabilizarse.

Surge entonces una pregunta: Si es que es posible la transformación con ADN de plásmido de otros organismos sobre E. coli, ¿el -- número de genes transformables quedará restringido a los genes presentes en estos plásmidos?.



### Transformabilidad de E. coli con Plásmidos Compuestos

Cohen et al (4), como se ha mencionado anteriormente, logran transformación en E. coli usando ADN plásmido, específicamente de un plásmido R.

Otra de las cosas interesantes hechas por Cohen et al, es el que logran transformar E. coli con plásmidos generados a partir de la acción de la endonucleasa Eco R-1 sobre plásmidos mayores en tamaño.

En otras palabras, cuando un plásmido, por ejemplo el -- R-6 (4) que confiere resistencia a Sulfonamida (SU), Cloromicetina -- (Cm), Kamamicina (Km), Neomicina (Nm), Tetraciclina (Tet) y Estreptomina (Sm) que tiene un peso molecular de  $65 \times 10^6$  daltones y que reside en E. coli K-12, es sometido a la acción de esta enzima Eco R-1, se rompe en 12 sitios reconocibles por la enzima de restricción Eco R-1 en -- este ADN extraído de E. coli K-12. Ahora bien, si se trata el plásmido con esta enzima y posteriormente el producto de esta reacción se usa -- para transformar E. coli salvaje, se obtienen diferentes tipos de transformantes algunos de los cuáles sólo son resistentes a Tetraciclina. -- Si se analiza con ayuda del microscopio electrónico y en corrimiento en geles de acrilamida, el ADN plásmido presente en estos transformantes, en comparación con el ADN presente en transformantes obtenidos del trata-- miento del plásmido sin enzima y seleccionando para la misma resisten-- cia, se podrá observar que en aquellos primeros, la gran mayoría de las células son portadoras de un plásmido más pequeño que el original, ---

$5.6 \times 10^6$  daltones, y que sólo porta la resistencia a tetraciclina, -- mientras que en aquellos donde no hubo tratamiento con la enzima el plásmido es el original R-6. Este plásmido que sólo porta resistencia a -- Tet fué llamado pSC101. Fué posible también seleccionar para Kanamicina y así obtener otro tipo de plásmido que sólo lleva esta resistencia y que pesa  $17 \times 10^6$  daltones. Este plásmido recibió el nombre de pSC102.

Es importante hacer notar que mediante pruebas de desnaturalización del ADN de estos plásmidos, producto del tratamiento con --- Eco R-1, y de renaturalización en presencia de ADN hélice sencilla del - plásmido original R-6, se logra demostrar que ambos plásmidos se gene--- ran de este plásmido R-6, ya que hay hibridización entre estos ADN con - el del R-6.

Estos datos significan que mediante la acción de esta en--- zima es posible generar ADN más pequeños a partir de un plásmido mayor - y que si estos ADNs son usados para transformar, se ciclizan y se con--- vierten en plásmidos mas pequeños.

Sin embargo, no acaba aquí la potencialidad del sistema. - Si ambos plásmidos pSC101 y pSC102 son mezclados y posteriormente trata- dos con la enzima de restricción Eco R-1 y una ligasa de ADN se genera - una molécula circular formada por ADN de ambos plásmidos originales que posee resistencia a Tetraciclina y a Kanamicina y que pesa la suma de -- ambos pSC101 y pSC102. Este plásmido recibe el nombre de pSC105. A este ejemplo se añade otro aun más interesante.

Mezclando el plásmido pSC101 Tet<sup>R</sup> y un plásmido extraído de Salmonella panama RSF1010 que confiere resistencia a SM y tratándolos con la enzima de restricción Eco R-1 y una ligasa de ADN y usando el producto de esta reacción para transformar E. coli y seleccionando para ambos Tet<sup>R</sup> y SM<sup>R</sup>, se logró aislar una célula que tiene un plásmido que es el resultado de la unión covalente de los plásmidos originales, merced al tratamiento con la enzima (38).

Estos ejemplos, por sí solo, hablan de la potencialidad de este sistema en donde la clave es la enzima endonucleasa de restricción Eco R-1 que propicia la formación de "ADN circulares compuestos" extraídos de especies diferentes.

Ahora bien, lo expresado hasta aquí abre una posibilidad - muy interesante e importante para la ingeniería genética.

Si como antes se mencionó, es poco probable estabilizar un segmento de ADN lineal heterólogo en E. coli debido a que no recombina - con el ADN cromosomal del huésped y por el hecho de ser un segmento de un genoma, es muy poco probable que se replique, este ADN se pierde. Sin embargo, si este segmento de ADN es incorporado en un ADN circular que - posteriormente se use para transformar E. coli que no restrinja el material genético heterólogo, sería factible pensar que así, sin la necesidad de recombinar con el ADN cromosomal del huésped y pudiendo ser replicado por la maquinaria del plásmido, se podría estabilizar.

### Sistema Enzimático: Eco R1 - Ligasa de ADN

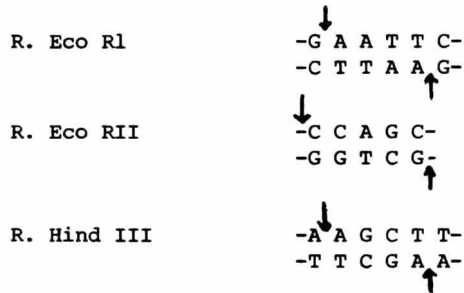
El uso de las endonucleasas de restricción para romper -- ADN en fragmentos específicos que contienen uno o más genes ha ido en - aumento. Algunas de estas endonucleasas provocan rompimiento en las -- dos hélices del ADN, generando pequeños extremos cohesivos de una sola - hélice. Estos extremos cohesivos permiten la formación de puentes de -- hidrógeno con extremos complementarios y este sistema es luego sustrato para la ligasa formando de nuevo la unión covalente fosfodiéster (4, 34).

La mezcla de los fragmentos de ADN resultantes del trata-- miento con la endonucleasa de restricción Eco R1 y posteriormente unidos con la ligasa ha sido usada para transformar a E. coli K-12. Los plásmi-- dos recombinantes fueron seleccionados en base a las propiedades genéti-- cas asociadas a uno ó más de los fragmentos de ADN. Las moléculas de -- ADN de plásmido son recuperadas a partir de las clonas de células trans-- formadas y caracterizadas.

### Mecanismo de acción

Son tres las endonucleasas de restricción más utilizadas - en este tipo de metodología. En la Tabla II se muestran las secuencias de nucleótidos reconocidos por cada una.

Tabla II



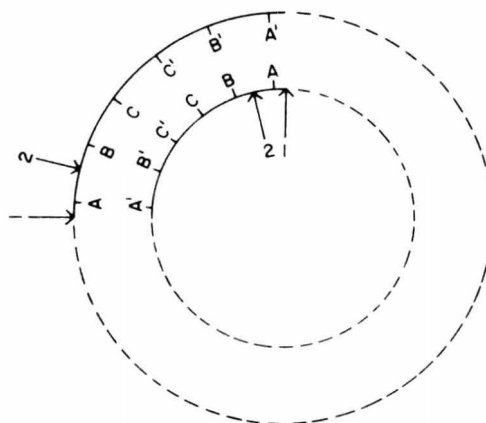
Puesto que de estas enzimas es la Eco RI la que nos interesa vale la pena aclarar un poco su mecanismo de acción.

La enzima Eco RI rompe el ADN heterólogo en regiones específicas en las dos hélices de un ADN, si es que el ADN no presenta modificación.

Lo interesante de esta secuencia es que presenta un doble eje de simetría como se muestra en la Fig. 8.

FIGURA 8 .

MODELO DE ROMPIMIENTO DE LA ENDONUCLEASA  
DE RESTRICCIÓN.

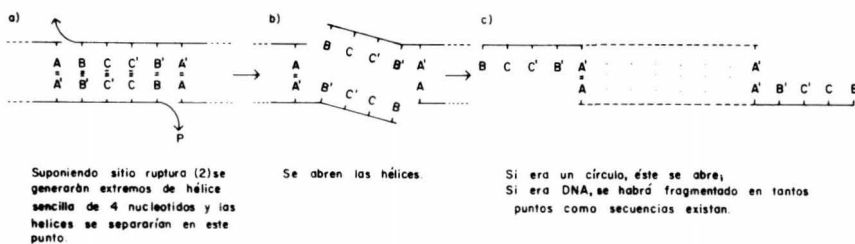


Las letras ABC significan bases.  
Las primas son las bases complementarias.  
Las flechas con números 1 y 2 son posibles sitios de  
ruptura de la endonucleasa, generándose extremos  
de 4 ó 6 nucleótidos.

La posición de las flechas indican dos sitios alternativos de rompimiento de la enzima. Suponiendo el sitio de ruptura en 2, se generan extremos de hélice sencilla de 4 nucleótidos y las hélices se separan en este punto tal como en la Fig. 9.

Posteriormente las hélices se separan como se puede ver en la misma figura y el círculo se abrirá generando fragmentos con extremos de hélice sencilla de 4 nucleótidos. Estos extremos cohesivos generados por la Eco RI son suficientemente estables a bajas temperaturas (4 - 15°C) de tal manera que las uniones fosfodiéster pueden ser

FIGURA 9 .



Modelo de rompimiento de la  
 ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN.

regeneradas por acción de la ligasa de polinucleótidos (25).

Lo interesante es que como el sitio de acción de la enzima es único, sólo puede generar estos fragmentos y, si una molécula de ADN lineal o circular presenta estas secuencias de 6 nucleótidos, la enzima la romperá en tantas fracciones como secuencias tenga, siendo esta la razón por la cual el plásmide R-6 se rompe en doce fragmentos.

Por otro lado, y este aparentemente es el caso para la formación de "plásmidos compuestos", cuando dos ADN, ya sean lineales o circulares, son mezclados y puestos en contacto con la enzima, ésta generará sólo este tipo de fragmentos con los extremos de 4 bases libres. Probabilísticamente es factible que haya asociación a través de estas hélices sencillas, ya que son dos a dos complementarias, entre -

ADN diferentes y que permanezcan unidos así mediante los puentes de -- hidrógeno. Si esta asociación, es ligada y luego se usa para transformar a E. coli, se pueden obtener toda una gama de plásmidos compuestos.

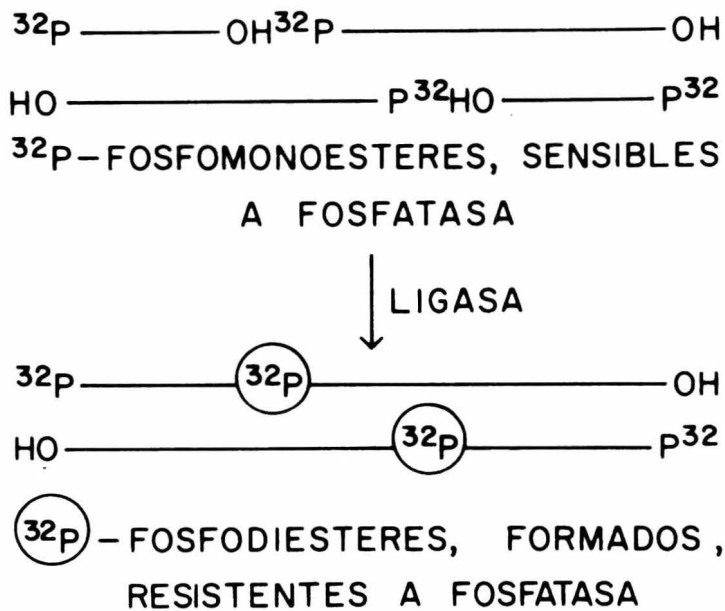
La ligasa de polinucléotidos de ADN, que ha sido estudiada ampliamente hasta la fecha y cuya actividad parece estar presente en la síntesis y mecanismos de reparación de ADN (26) ha sido aislada y purificada tanto de E. coli (48) como de E. coli infectada con el bacteriofago T4 (46), ésta última que fué la que nosotros usamos, ha sido identificada como parte de un sistema enzimático y actúa catalizando la unión de -- los extremos 5'-fosforil y 3'-hidroxil correspondientes a cada una de -- las hélices de un ADN de doble hélice, sólo si las bases de cada uno de los extremos se encuentran separadas por una ruptura en la unión fosfo-- diéster y no por la ausencia de una o más bases. (Ver Fig. 10) (45), -- además requiere de ATP (Trifosfato de adenosina) para su actividad.

Ahora bien, tanto el principio mencionado anteriormente -- como su modo de acción fueron aprovechados por Cohen et al para generar plásmidos compuestos, entre un factor R de E. coli, el plásmido pSC101, y un ADN circular, de otro organismo como Staphylococcus aureus (38) y entre un plásmido R, pSC101 de E. coli, y un ADN lineal de un eucariote, el sapo, Xenopus leavis (39) (Ver Fig. 11).

Este sistema enzimático ha sido la base del procedimiento -- conocido como clonamiento de ADN en bacterias, descrito recientemente -- (49), en donde este tipo de recombinación "in vitro" presente una serie



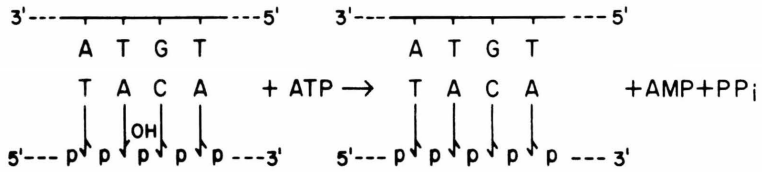
FIGURA 10 a .



REPRESENTACION ESQUEMATICA DE UN ENSAYO PARA LA LIGASA DE POLINUCLEOTIDOS.

de ventajas para el aislamiento de genes específicos. Ahora bien, por clonamiento de ADN debemos entender el procedimiento por el cual un fragmento de ADN, aislado en unión covalente con un replicón independiente, se obtiene como una población homogénea de moléculas derivadas de una --

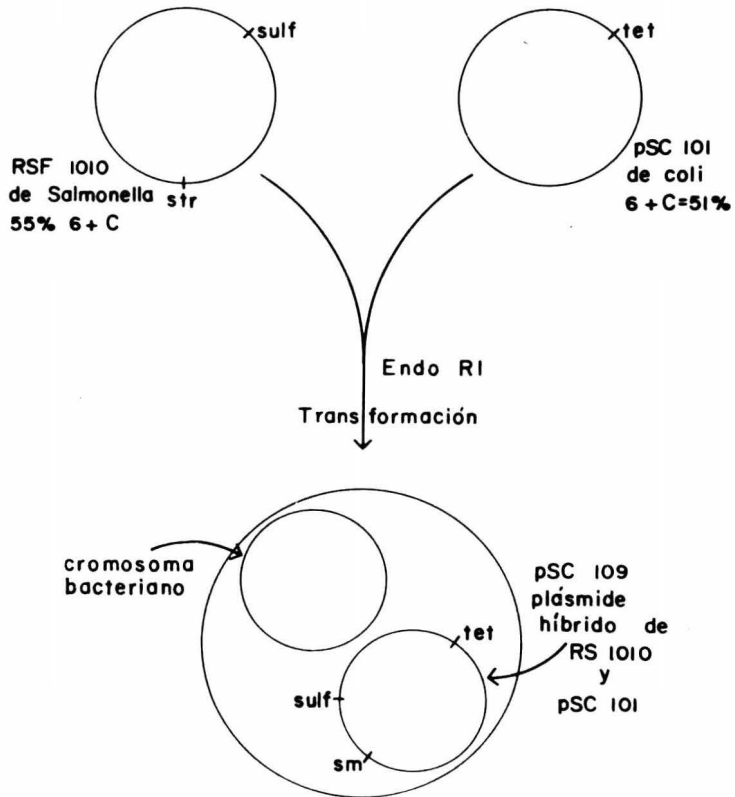
FIGURA 10 b .



MODELO DE REPARACION DEL ADN POR LA LIGASA DE POLINUCLEOTIDOS.  
 EN LA REACCION SE FORMA LA UNION FOSFODIESTER, AMP Y PP<sub>i</sub>.

FIGURA 11 .

CONSTRUCCION DE PLASMIDES COMPUESTOS.



molécula padre. Este procedimiento ha sido ampliamente usado en la actualidad por Boyer et al (49) con el objeto de estudiar varios genomas eucarióticos junto con sus genomas mitocondriales, por ejemplo: células HeLa, LA9 y Drosophila melanogaster.

#### Vehículos moleculares de ADN

Los plásmidos bacterianos con los cuales se van a recombinar los fragmentos de ADN formados por la Eco R-1 deben poseer ciertos requisitos de tal manera que este plásmido replique cualquier molécula que esté unida a él; a este ADN lo llamamos "vehículo molecular".

Además de que este plásmido se replique en forma autónoma debe poseer un gene el cual pueda ser usado con propósitos de selección. También debe tener un sólo sitio para la endonucleasa de restricción -- Eco R-1 y este sitio no debe estar en un gene que pueda interrumpir la replicación del vehículo, ni tampoco debe ser el gene usado para la selección de las transformantes.

Hasta ahora, dos han sido los plásmidos que han sido utilizados como vehículos moleculares (4, 38, 39, 50).

Uno de ellos es un plásmido bacteriano pequeño ( $5.8 \times 10^6$  d.), pSC101, el cual posee un sitio de acción para la Eco R-1 y un gene cuyo producto no permite la acción del antibiótico Tetraciclina (Tc). - Los fragmentos de ADN generados por la Eco R-1 pueden recombinar con esta molécula y ser recuperados en transformantes resistentes a tetraciclina.

El segundo plásmido, Col El, presenta una serie de nuevas características en relación al plásmido anterior. Esta molécula de ADN ( $4.2 \times 10^6$  d.) también se rompe en un sólo sitio por la acción de la -- endonucleasa de restricción Eco R-1. La inserción de los fragmentos de ADN resultantes del tratamiento con la Eco R-1 en esta molécula no alte ran su habilidad de autorreplicarse, pero tales plásmidos compuestos no producen colicina El (50). Sin embargo, los plásmidos recombinantes de Col El presentan inmunidad a la actividad bactericida de la colicina - El. Por lo tanto, cuando usamos el plásmido Col El como vehículo se -- puede seleccionar para inmunidad a colicina y por la inhabilidad de pro ducir colicina. Además la característica más atractiva de este plásmi- do es el hecho de poder obtener un gran número de copias incubando las células que lo llevan en presencia de cloranfenicol (Cm) (51). Ordina- riamente se obtienen 35 copias del plásmido por célula, sin embargo, -- cuando se inhibe la síntesis de proteínas con Cm se acumulan aproximada mente, 3000 copias del plásmido por célula (50). Además, el ADN del -- plásmido Col El está libre del complejo proteico de relajación el cual interfiere con la purificación del ADN del plásmido superenrollado.

Es posible obtener 2 - 3 miligramos de ADN de Col El puri ficado por un litro de células después de 12 horas de amplificación en cloromicetina y se ha demostrado que los plásmidos compuestos de Col El se amplifican de la misma forma que el plásmido Col El.

MATERIALES Y METODOSMATERIALESCepas Microbianas

	Cepa	Genotipo <sup>+</sup>	Factor extra-cromosomal	Derivación	Fuente
<u>E. coli</u>	JM291	thy <sup>-</sup> , arg <sup>-</sup> , his <sup>-</sup> , leu <sup>-</sup> , met <sup>-</sup> , lac <sup>-</sup> , mal <sup>-</sup> , xyl <sup>-</sup> , Sm <sup>r</sup> , gal <sup>-</sup>	Col E1	JC411	Dr. H. Boyer
<u>E. coli</u>	JM295	thr <sup>-</sup> leu <sup>-</sup>	pSC101 (Tc <sup>R</sup> )	C600	Dr. H. Boyer
<u>B. pumilus</u>		protótrofa	plásmido críptico	ATCC7065	
<u>S. coelicolor</u>		phe <sup>-</sup>	SCP1	IF12	Dr. D. Hopwood
<u>N. crassa</u>		protótrofa		74A	Dr. J. Mora
<u>E. coli</u>	JM259	recB <sup>-</sup> , recC <sup>-</sup> , sbcB <sup>-</sup> , hsr <sup>-</sup> , hsm <sup>+</sup> leu <sup>-</sup> , arg <sup>-</sup> , his <sup>-</sup> , pro <sup>-</sup>		JM250	Dr. F. Bolivar

+ Nomenclatura de acuerdo a A. L. Taylor (28)

Medios

- 1) Medio Completo (Medio Luria): Triptona (Difco) 10 g, extracto de levadura (Difco) 5g, NaCl 10g, Agua 1 lt. pH: 7 (ajustar con NaOH).
- 2) Medio de Crecimiento para Micelio en forma de esferoplastos de Streptomyces coelicolor (Medio Sacarosa-Casaminoácidos-glicina): Sacarosa 34 %, Casaminoácidos (Difco) 2.4 %,  $MgCl_2$  1 %, Glucosa 0.5 %, Glicina 0.5 %, Fenilalanina 50 mg.
- 3) Medio Completo para S. coelicolor:  $K_2HPO_4$  5 g, NaCl 0.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5 g, Casaminoácidos (Difco) 1.5 g., Hidrolizado de ácidos nucleicos 5 ml., Solución de vitaminas (Riboflavina 0.1 %, Nicotina mida 0.1 %, Aminobenzoico 0.01 %, Piridoxina-HCl 0.05 %, Tiamina-HCl 0.05 %, Biotina 0.02 %) 1 ml, Glucosa 25 g, Peptona 2 g, Extracto de levadura 1 g, pH: 7.2 (ajustar con NaOH), Agua 1 lt, Agar 15 g.
- 4) Medio Mínimo M 9:  $NH_4Cl$  1 g,  $KH_2PO_4$  3 g,  $Na_2HPO_4$  6 g, NaCl 0.5 g, Agua 1 lt. Esterilizar y agregar 1 ml. por lt. de una solución de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  al 25 % esterilizada aparte.
- 5) Medio Mínimo M P:  $KH_2PO_4$  2.722 g,  $(NH_4)_2SO_4$  1.98 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.246 g,  $FeSO_4$  0.001 g, Glucosa 2 g, Agua 1 lt. pH: 7 (ajustar con KOH)
- 6) Medio Vogel:  $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$  117.5 g,  $KH_2PO_4$  250 g,  $NH_4NO_3$  100 g, -  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  10 g,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  5 g, Reactivo trazas 5 ml., Biotina 250 ug, Agua 1 lt. Añadir 5 ml. de cloroformo como preservativo.  
 Reactivo Trazas:  $H_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$  5 g,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  5 g,  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$  1 g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.25 g,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.05 g,  $H_3BO_3$  anhidro 0.05 g,  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  0.035 g.  
 Diluir antes de usar en proporción 1:50 con agua y agregar Sacarosa 1.5 %, Agar 1.5 %.

### Amortiguadores

- 1) TES: NaCl 0.05 M, EDTA (ácido etilendiminotetracético) 0.005 M, --  
Tris (hidroximetil aminometano) 0.05 M. Ajustar pH: 8.
- 2) TE: Tris 0.01 M, EDTA 0.001 M. Ajustar pH: 8.1
- 3) Boratos + Tris - EDTA (Geles de agarosa): Tris 10.8 g,  $H_3BO_3$  anhidro  
5.5 g, EDTA 9.3 g. Ajustar pH: 8.3
- 4) TM 10X (Reacción de Eco R-1): Tris 1 M,  $MgCl_2$  0.05 M. Ajustar ---  
pH: 7.5.
- 5) SSC 0.1X: NaCl 0.015 M,  $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$  0.0015 M. Ajustar pH: 7.0

### Enzimas

- 1) Endonucleasa de Restricción Eco R-1: Fué un regalo del laboratorio  
del Dr. H. Boyer del Centro Médico de la Universidad de California.  
La actividad de la enzima es la siguiente: 1  $\lambda$  digiere 50 % de ---  
5  $\mu$ g de ADN (ácido desoxirribonucleico) de Col E1, el cual sólo tie  
ne un sitio de rompimiento para esta enzima.
- 2) Ligasa T 4: Es un producto comercial preparado por Miles Co., ---  
Kankakee, Ill. (serie No. 39-625-2) de acuerdo al método de B. Weiss  
(46) y, purificada por cromatografía en DEAE-Celulosa. Es estable  
6 meses a  $-20^\circ C$ . Su actividad es la siguiente: 5  $\lambda$  de Ligasa T4 -  
convierten 1 nm de  $P^{32}$ -monoésteres en fosfatasas resistentes a  $37^\circ C$   
por 20 min.



Reactivos

Metil- H<sup>3</sup> Timidina 1 mCi/ml fue obtenida de New England Nuclear.

Lisozima, Deoxirribonucleasa y Ribonucleasa de Worthington Biochemical Corporation

Bromuro de etidio y Pronasa grado B de Calbiochem

Cloruro de cesio de Schwarz/Mann

Agarosa y sacarosa (libre de RNAasa) de Sigma Chemical Co.

Todos los aminoácidos son de Sigma Chemical Co.

Todos los demás reactivos son de J. T. Baker.

METODOS1) Obtención de ADN de Neurospora crassa

Se crece la cepa de N. crassa 74 A en medio Vogel, para la obtención de micelio, incubando a 28°- 30°C se enfría a 4°C y es cosechada --- en fase logarítmica tardía por medio de centrifugación a 3000 rpm -- durante 10 min. a 4°C. Se hacen polvos de acetona del micelio obtenido y posteriormente un macerado usando Nitrógeno líquido o hielo seco. Se resuspende en 1/20 de su volumen original en una solución de NaCl (0.1 M) - EDTA (0.1 M) pH: 8.5 y, se homogeniza para romper el micelio; en seguida se adiciona Pronasa 10 mg/ml, en SSC 0.1X, -- previamente digerida por 4 horas a 37°C (con el objeto de eliminar - posibles nucleasas contaminantes) para dar una concentración final - de 500 microgramos/ml y se incuba durante toda la noche. Se añade - RNasa, también inactivada, a una concentración final de 50 µg/ml du-- rante 30 a 37°C. Se añade Dodecil Sulfato de sodio (10 % en amortigua-- dor Tris-HCl 1M.pH: 9) para dar una concentración final de 1 %. -- Después de incubar a 37°C por 30 min., se adiciona igual volumen de una mezcla 1:1 de fenol (recientemente bidestilado)- Cloroformo prepa-- rada inmediatamente antes de usarse. Se agita vigorosamente por -- 5 min. hasta volver homogénea la mezcla, después se continúa la --- agitación muy suave durante 20 min. a temperatura ambiente. Se centri-- fuga la emulsión en una centrífuga Sorvall RC2-B con un rotor de -- columpio por 10 min. a 10 000 rpm. Se separa la fase acuosa (supe-

rior) la cual vuelve a ser extraída dos veces más, sólo que en estas dos últimas se adiciona igual volumen de una mezcla Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y, se agita suavemente por 20 min. La fase acuosa fué precipitada con etanol absoluto (2 volúmenes) frío (-20°C) dejando escurrir el etanol suavemente por las paredes del vaso de precipitados. Se pasa a tubos Corex y, se deja precipitar el ADN a -20°C durante 12 horas aproximadamente. El ADN crudo obtenido se separa centrifugando a 10 000 rpm durante 10 min. a -20°C. Posteriormente se seca por medio de una corriente de N<sub>2</sub> líquido para eliminar el etanol remanente.

## 2) Obtención del Lisado Claro de *Bacillus pumilus*

Se crecen las células a 37°C en 1 lt. de medio mínimo M 9 hasta el final de la fase logarítmica (80-90 unidades Klett-Somerson. UK). Se lavan 2 veces con amortiguador TES y se resuspenden en 5 ml. de Sacarosa 25 % en TE y se procede a lisarlas de acuerdo con el método de Guerry et al, 1973 (52). Se agrega 1 ml. de EDTA 0.2 M pH = 8 manteniéndose la mezcla durante 5 min. en hielo, agitando cuidadosamente de vez en cuando; al finalizar el tiempo se añaden 0.33 ml. de Lisozima (75 mg/ml en Tris 0.01 M pH = 8) y se incuba durante 5 min. a 30°C con poca agitación; después de transcurrido este tiempo se enfría rápidamente en hielo y, se adiciona 1 ml. de EDTA 0.25 M pH = 8, se deja en hielo por 5 min. Posteriormente se agrega Tritón a una concentración final de 1 % y, se mantiene en hielo por otros 5 min. En seguida se trata con Ribonucleasa a una concentración --

final de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . y se deja reposar durante 10 min. en frío. Se añade NaCl 5 M a una concentración final de 1 M y se deja en reposo durante 4 horas a 4°C. Al cabo de este tiempo se centrifuga a 20 000 rpm durante 30 min. a 4°C en una centrífuga Sorvall RC2-B y un rotor de ángulo fijo 8 x 40. El sobrenadante (llamado lisado claro) se recoge y se diluye con agua hasta una concentración final de Sacarosa de 12 %. Inmediatamente después se extrae con fenol bidestilado (88 % - 12 % agua) y, se centrifuga a 10 000 rpm a 4°C para separar las fases, se recupera la fase acuosa y se trata con éter etílico para eliminar excesos de fenol hasta que esta fase se observe transparente. Se separa la fase acuosa correspondiente al lisado claro y, por cada 8 ml de éste se agregan 1 ml. de NaCl 5 M, 18 ml. de etanol absoluto y se deja en reposo a -20°C durante 12 horas. Se centrifuga a 10 000 rpm durante 20 min. a -20°C en tubos Corex. Al precipitado obtenido se le hace pasar una corriente de  $\text{N}_2$  para eliminar el alcohol remanente, se resuspende en SSC 0.1 X y se guarda a -70°C.

Nota: Para el caso de la obtención del lisado claro de Streptomyces coelicolor se llevaron a cabo las siguientes modificaciones, de acuerdo al método reportado por Schrempf, et al (53). Se crecen las células a 28°- 30°C en medio Sacarosa-Casaminoácidos-Glicina durante 4-5 días. Las células se lavan con amortiguador TES-Sacarosa 34 %. Se resuspenden en 5 ml. de Sacarosa 34 % en TE. El tiempo de incubación a 30°C es de 10 min. con poca agitación.

Para el caso de Escherichia coli: La Lisozima se prepara en Tris 0.25 M, pH: 8. No se incubaba a 30°C sino que se deja en hielo - durante 10 min. No se añade EDTA 0.2 M, pH = 8.

3) Gradiente Isopicnico a Equilibrio de Cloruro de Cesio en Presencia de Bromuro de Etidio.

2.3 ml. del lisado claro obtenido se adicionan a una mezcla constituida por 7.36 g de CsCl, 2.28 ml. de Bromuro de etidio (700 µg/ml. en agua estéril) y 3.42 ml de agua; se homogenizan cuidadosamente y un volumen de 9 ml. se pasa a tubos de nitrocelulosa, llenando el tubo hasta el nivel del tapón con aceite mineral (Nujol). Se centrifuga a 44 000 rpm durante 40 horas a 15°C en una centrífuga MSE-50 superspeed, rotor 10 x 10 de ángulo fijo.

La banda más densa correspondiente al plásmido deseado se recogió - con jeringa y, esta fracción se trata con alcohol isoamílico para extraer el bromuro de etidio y se dializa contra SSC 0.1X durante - 12 horas a 4°C. En aquellos casos en que no se llegó a observar la banda del plásmido se picaron los tubos y se recogieron fracciones de 6 gotas que se colectaron en tubos pequeños.

4) Conteo de Radioisótopos

Una alícuota de 20 µl de cada fracción se colocó en círculos de papel filtro Whatman No. 3 y, se lavaron con TCA (ácido tricloroacético) 10 % (10 min.), TCA 5 % (5 min.), etanol 70 % (5 min.) y - - - eter etílico, se dejaron secar. Ya secos, los papeles filtros se

colocaron en viales que contenían 10 ml de líquido de centelleo ( 3 g de POPOP (1,4-bis (2-(5-feniloxazolil))benceno); 6 g de POP (2,5-difeniloxazol) para 1 lt. de tolueno). Se contaron en un contador de centelleo Nuclear Chicago.

5) Gradiente de Sacarosa 5 - 20 % en TE

Una alícuota de 0.2 ml del ADN de plásmido ya aislado, se coloca en la superficie de un gradiente neutro de Sacarosa 5 - 20 % en amortiguador TE. Se centrifuga a 40 000 rpm durante 3.5 horas a 15°C en una centrífuga MSE-50 superspeed, rotor 3 x 5 de columpio. Se recolectaron fracciones de 10 gotas en discos de papel filtro Whatman No. 3 y, se siguió el tratamiento ya mencionado para conteo de radioisótopos.

6) Electroforesis en Geles de Agarosa

Este método, reportado por Helling, et al, 1974 (54), consiste en lo siguiente: Se toman alícuotas de 50  $\mu$ l. con 5-50  $\mu$ g. de ADN; se mezclan con 18  $\mu$ l. de la mezcla ST (glicerol 75 %, SDS 0.1 %, azul de bromofenol 0.1 %) y se aplican a placas (10 x 10 x 0.3 cm) o tubos (7.5 x 0.4 cm) con agarosa disuelta en amortiguador Boratos-Tris. En nuestro caso la concentración de agarosa utilizada es de 0.8 %.

La electroforesis se corre aplicando 40 voltios por placa o 5 voltios por tubo durante un tiempo aproximado de 3 - 4 horas para las placas

1 - 2 horas para los tubos. Al final del corrimiento, los geles se tratan con una solución de bromuro etidio ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) en amortiguador de Boratos-Tris durante aproximadamente 20 min. Son fotografiadas en luz ultravioleta, 3500 nm usando un filtro naranja # 9, Kodak -- Wratten, con película Recording 2475 1000 ASA, con un tiempo de exposición de 15 a 20 seg.

7) Digestión con la Endonucleasa de Restricción de E. coli, Eco R-1

La mezcla de reacción (volumen total de  $50 \mu \text{lt.}$ ) contiene: Tris-HCl pH = 7.4 (90 mM);  $\text{MgCl}_2$  (10 mM); ADN de N. crassa o plásmido -- ( $5\text{-}20 \mu\text{g/ml}$ ) y Eco R-1 ( $5 \mu \text{lt.}$ ). La mezcla se incuba a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hora y, la reacción se termina agregando  $18 \mu\text{lt.}$  de la mezcla - ST cuando se va a correr una electroforesis en geles de agarosa, o - bien, calentando a  $65^\circ\text{C}$  durante 5 min. cuando el producto de la reacción se va a utilizar como sustrato para el tratamiento con la enzima Ligasa T4.

8) Tratamiento con la Enzima Ligasa T4

Esta reacción se lleva a cabo en un volumen final de  $100 \mu\text{lt.}$  La muestra obtenida por digestión con la enzima Eco R-1 se mantiene en hielo y se le adiciona lo siguiente:  $\text{MgCl}_2$  50 mM ( $10 \mu\text{lt.}$ ); ditri $\underline{o}$  eritritol 0.1 M ( $10 \mu\text{lt.}$ ); TFA (trifosfato de adenosina) 0.5 mM -- ( $10 \mu\text{lt.}$ ); agua ( $20 \mu\text{lt.}$ ) y Ligasa T4 (100 manomolar U/ml;  $1 \mu\text{lt.}$ ).

La mezcla de reacción se incuba en hielo durante 18 horas. A esta mezcla se le añaden 3  $\mu$ l. de  $\text{CaCl}_2$  1 M inmediatamente antes de --- que sea usada para transformar.

9) Transformación

Toda manipulación se llevará a cabo entre 0 - 4°C. Se crecen 10 ml de la cepa receptora, E. coli JM259  $\text{hsr}^-$ ,  $\text{hsm}^+$ ,  $\text{recB}^-$   $\text{recC}^-$   $\text{sbcB}^-$ , en medio P con requerimientos durante toda la noche y, son usados para inocular 100 ml. de medio fresco precalentado a 37°C. Estas células son crecidas con agitación hasta 80 - 90 UK ( $8 \times 10^8$  células/ml), en este punto se enfría el cultivo, se centrifuga a 3 000 rpm durante - 10 min. a 4°C. Se lavan las células con  $\text{CaCl}_2$  10 mM (100 ml.) y se resuspenden en  $\text{CaCl}_2$  30 mM (50 ml.). Después de haberse incubado a 4°C por 30 min. se centrifuga y resuspenden en  $\text{CaCl}_2$  30 mM (5 ml.). Una porción de la suspensión de células (0.3 ml) se transfiere a tubos que contienen ADN tratado con la enzima Ligasa T4 (50  $\lambda$ ) y ---  $\text{CaCl}_2$  1 M (3  $\lambda$ ). Se incuba la mezcla de reacción por 30 min. a 4°C y 20 min. a 37°C. Se centrifugan para eliminar el  $\text{CaCl}_2$  existente y se resuspenden en medio completo (Caldo Luria) (5 ml.) Se incuban a 37°C durante 3 horas como mínimo.

Se platearon 0.5 ml, 0.3 ml. y la dilución  $10^{-1}$  de la mezcla en ca--jas de Luria - Tetraciclina 20  $\mu$ /ml (Tc). Las transformante apare--cen después de 19 horas de incubación a 37°C.



Se utilizaron cajas de medio completo para contar el número de células viables en la mezcla de transformación.

RESULTADOS

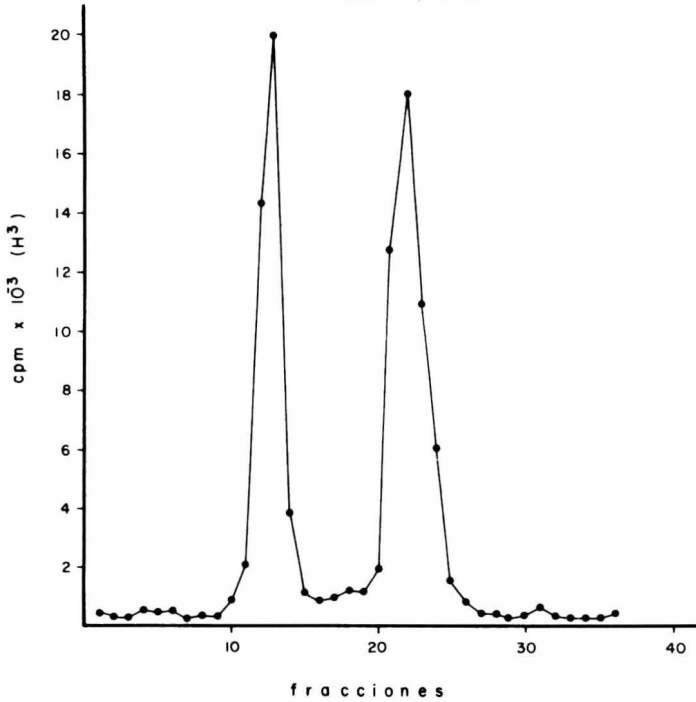
- 1) Aislamiento de ADN de Plásmido por Gradiente Isopícnico a Equilibrio de Cloruro de Cesio - Bromuro de Etidio: Col El, pSC 101, SCP 1, y Plásmido Críptico de Bacillus pumilus.

El ADN circular superenrollado, presente en gran proporción en los lisados claros de las cepas portadoras de plásmidos, es separado del ADN lineal por medio de centrifugación a equilibrio en CsCl-bromuro de etidio. Al llegar al equilibrio se observaron dos bandas en el gradiente formado, correspondiendo la de mayor densidad al ADN circular y la otra al ADN lineal, debido a que el bromuro de etidio presente se intercala en mayor proporción entre las dos hélices de éste último ADN disminuyendo así su densidad.

Cuando la cantidad de ADN es pequeña no es posible observar las bandas, de ahí que sea necesario usar una marca radioactiva ( $H^3$ -timidina) y fraccionar el gradiente, obteniéndose los resultados que se indican en la Fig. # 12. Como se puede ver en cada una de las gráficas se obtiene dos picos para aquellas cepas portadoras de plásmidos y, uno sólo en aquellas que carecen de él.

La cantidad de ADN de plásmido obtenida va a depender de la proporción en que éste se encuentre en la célula y de la eficiencia del método de lisis.

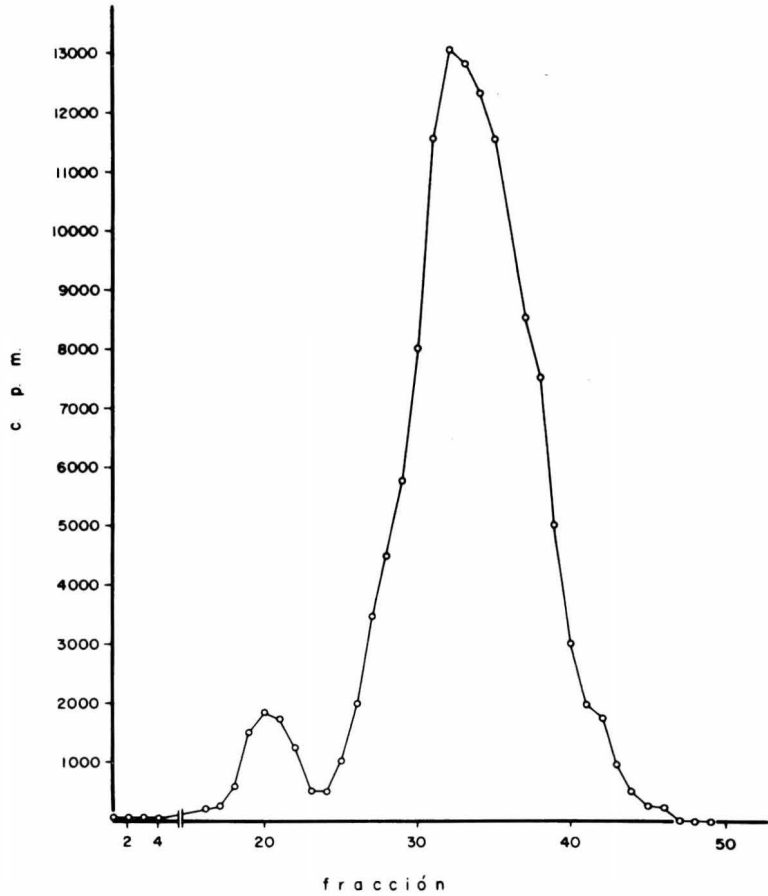
GRADIENTE DE CsCl-EtBr DE LISADO CLARO DE LA CEPA  
JM 295 pSC 101.



(a)

FIGURA 12 (a). Los gradientes de CsCl - EtBr se llevaron a cabo como se indicó en Materiales y Métodos, centrifugando a 40,000 rpm. durante 40 horas a 15 C en una centrifuga MSE-50. (a) El pico que aparece en las primeras fracciones corresponde al ADN del plásmido pSC101, siendo éste el ADN de mayor densidad.

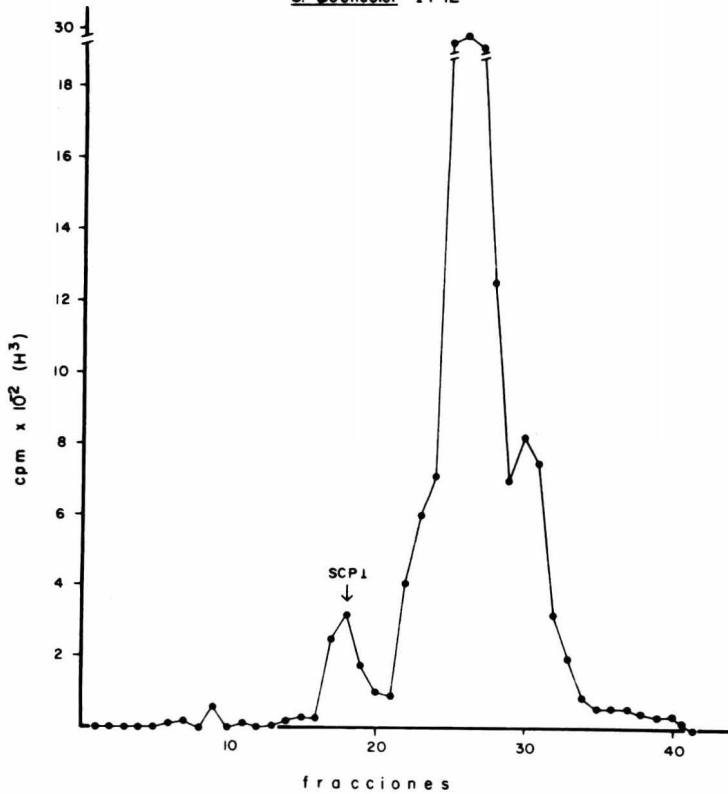
GRADIENTE CsCl-BrEt1 DE UNA CEPA DE Bacillus pumilus QUE PORTA  
UN PLASMIDO CRIPTICO.



(b)

FIGURA 12 (b). En este caso el pico que aparece en las primeras fracciones pertenece al ADN del plásmido críptico de B. pumilus.

GRADIENTE CsCl-EtBr DE LISADO CLARO DE  
S. coelicolor I F 12



(c)

FIGURA 12 (c). En este caso el pico que aparece en las primeras fracciones pertenece al ADN del plásmido SCP1 de S. coelicolor

2) Caracterización en Gradientes Neutros de Sacarosa 5 - 20 % y en --  
Geles de Agarosa 0.8 %.

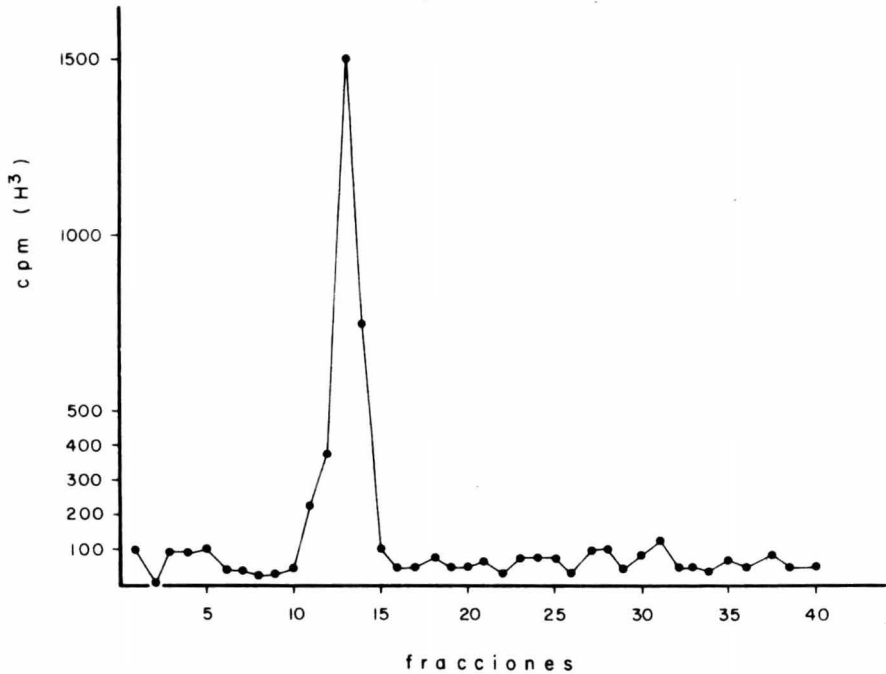
La caracterización de cada uno de estos plásmidos se llevó a cabo - por gradientes neutros de sacarosa 5 - 20 % con el fin de compro--- bar sus coeficientes de sedimentación, obteniéndose datos similares a los reportados (4, 52, 53) y, por medio de electroforesis en geles de agarosa 0.8 %.

Para el primer caso, se tomaron fracciones de 0.2 ml. del ADN de -- plásmido aislado y se colocaron sobre un gradiente neutro de sacarosa 5 - 20 % en TE, utilizando como control interno ARN 18 S y 28 - S para el gradiente correspondiente a los plásmidos Col E1 y pSC101. Por el plásmido de S. coelicolor (SCP 1) control de sedimentación - usado fué ADN de Col E1 (Fig. # 13.)

El ADN de las fracciones correspondientes a las bandas más densas de cada uno de los gradientes de densidad se colectó, se trató como se indica en Materiales y Métodos, y se sometió a una electroforesis -- en geles de agarosa 0.8 % obteniéndose una sola banda en cada uno de los casos (Fig. #14).

Tanto el ADN de Col E1 como de pSC101 fueron tratados con la endonu- cleasa de restricción de E. coli (Eco R-1) y aparece una sola banda que migra en forma diferente a la correspondiente al plásmido super- enrollado lo cual nos indica que ambos plásmidos poseen un solo si- tío de rompimiento específico para esta enzima. Esto no ocurre en -

GRADIENTE DE SACAROSA (5-20 %) NEUTRO.  
DE pSC 101

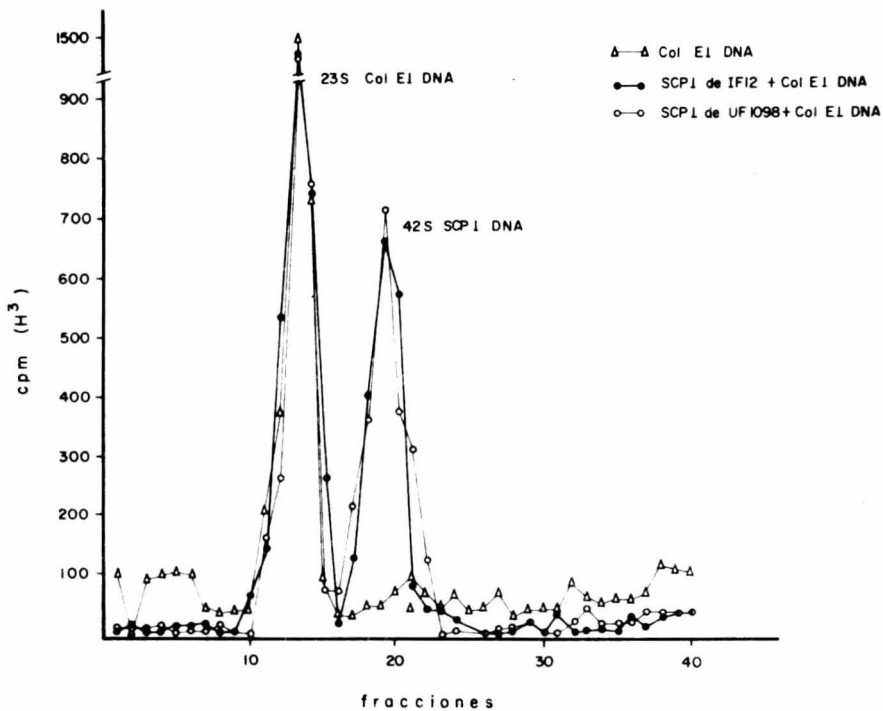


(a)

FIGURA 13 (a). Los gradientes de sacarosa neutros (5-20 %) se llevaron a cabo como se indicó en Materiales y Métodos, centrifugando a 40,000 rpm. durante 3.5 horas a 15 C. en una centrífuga MSE-50, rotor de columpio 3 x 5.

(a) Caracterización del plásmido pSC101 de E. coli.

GRADIENTE SACAROSA EN TES 5-20%



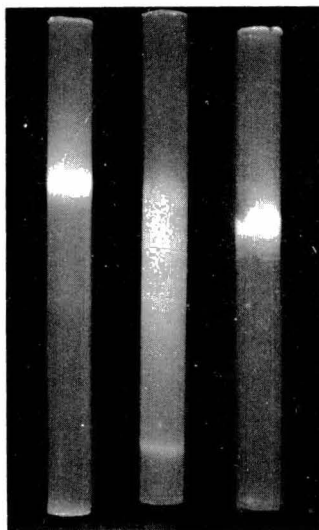
(b)

FIGURA 13 (b). Caracterización del plásmido SCP1 de S. coelicolor utilizando como control interno al -- plásmido Col E1 de E. coli.



el caso del plásmido críptico de B. pumilus, el cual al ser tratado con la enzima Eco R-1 de un número mayor de bandas, llegándose a -- detectar 4 de ellas con diferente patrón de corrimiento. (Fig. # 1 ).

El tratamiento del plásmido PSC1 de S. coelicolor no se llevó a cabo debido a que la cantidad de ADN obtenida no fué suficiente.



(a) (b) (c)

FIGURA 14 . . . Los geles de agarosa se llevaron a cabo colocando 50  $\mu$ l con 5 - 50  $\mu$ g de ADN; se mezclan con - 18  $\mu$ l. de la mezcla ST y se aplican a tubos con agarosa disuelta en amortiguador Boratos-Tris-EDTA al 0.8%. Se aplican 5 voltios por tubo durante un tiempo aproximado de 90min.

(a) ADN del plásmido críptico de B. pumilus sin tratar con la enzima Eco R1. (b) ADN del plásmido críptico de B. pumilus tratado con la enzima Eco R1. (c) ADN del plásmido pSC101 usado como control de corrimiento.

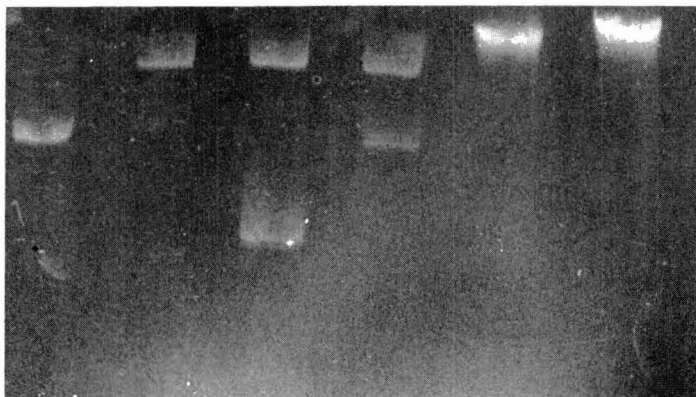
3) Obtención del Plásmido Compuesto: pSC101 - N. crassa

20  $\mu$ g. de ADN de N. crassa, obtenido como se indica en Materiales y Métodos, fueron tratados con la enzima Eco R-1 y, de igual manera, 10  $\mu$ g. de ADN del plásmido pSC101; éste se llevó a cabo en tubos separados.

Después de la digestión, se mezclaron ambos ADN's y se trataron con la enzima Ligasa T4; el ADN resultante fué utilizado para transformar a la cepa JM259 y las transformantes fueron seleccionadas para resistencia a Tc, ya que ésta es la información que lleva el vehículo de ADN (pSC101). La frecuencia de transformación obtenida fue de  $10^{-5}$ .

Al azar fueron tomadas 12 colonias transformantes Tc<sup>R</sup> y, del lisado claro de cada una de ellas se hicieron gradientes de CsCl-bromuro - de etidio. El ADN del plásmido recuperado fue caracterizado por el electroforesis en geles de agarosa 0.8 %, observándose en un caso una banda que corría un poco menos que el ADN del plásmido pSC101 original. (Fig. # 15).

El siguiente paso fué tratar este ADN con la enzima Eco R-1 y, cuando se corrió en geles de agarosa se observaron dos bandas (Fig. # 15) - de las cuales una correspondía al ADN del vehículo y, la otra a un fragmento del ADN de N. crassa cuyo peso aproximado va de 1 a 1.5 x  $10^6$  daltones.



(a) (b) (c) (d) (e) (f)

FIGURA 15 . Las placas de agarosa 0.8 % se corrieron en forma semejante a los tubos, excepto que el voltaje fué de 40 voltios por placa durante un tiempo aproximado de 3.5 horas.

(a) ADN del plásmido Col El tratado con Eco R1; (b) ADN del plásmido pSC101 tratado con Eco R1; (c) ADN del plásmido compuesto tratado con la Eco R1; (d) ADN de una mezcla de pSC101 y Col El tratado con Eco R1; (e) ADN de pSC101 sin tratar con Eco R1; (f) ADN del plásmido compuesto sin tratar con Eco R1.

## DISCUSION

Los motivos de haber aislado ADN extracromosomal no sólo de E. coli K-12 sino también de B. pumilus y S. coelicolor son los siguientes.

En el caso de los plásmidos pSC101 y Col El de E. coli el objetivo fué el uso de estos ADN como vehículos moleculares en el clonamiento de ADN de organismos tanto procariotes como eucariotes de interés.

El aislamiento del plásmido de S. coelicolor, SCPl, es de interés ya que éste plásmido parece llevar la información para la producción de un antibiótico (53), de tal manera que estos genes podrían ser estabilizados y amplificado en E. coli utilizando un vehículo adecuado como sería Col El, pudiendo enfocar ésta ventaja hacia su producción industrial.

Para el plásmido críptico de B. pumilus la finalidad fué - saber que tipo de fragmentos se obtendrían después de que éste plásmido fuera tratado con la Eco R-1, ya que cabría la posibilidad de que uno de estos fragmentos al recircularizarse tuviera las propiedades de un - replicón como son las que presenta el vehículo pSC101, de tal forma que éste nuevo plásmido también pudiera servir como vehículo molecular en -- otros microorganismos como B. subtilis o en el mismo B. pumilus. Esto resolvería ciertos peligros que presenta E. coli, al ser usado como re-

ceptor en este tipo de experimentos, por ser el hombre su huésped natural. Sin embargo, los resultados hasta ahora obtenidos no han sido lo suficientemente satisfactorios, ya que como podemos ver en la Fig. 14 el patrón de corrimiento de éste plásmido presenta 4 bandas las cuales se distinguen difusamente, no pudiendo por ello identificar un fragmento de este ADN extracromosomal que cumpla con las características antes mencionadas. Para lograr ésto, estamos tratando de obtener el ADN de éste plásmido en una concentración mayor y, posteriormente afinar el método de rompimiento con la enzima Eco R-1.

En relación al tratamiento enzimático del plásmido de S. coelicolor presentó algunos problemas, debido a que el ADN extracromosomal obtenido se encontraba en muy baja concentración, por lo que no fué posible observar ninguna banda en los geles de agarosa.

Las razones de ésto son las siguientes: la primera se refiere a la dificultad de obtener una buena concentración de ADN aún cuando se crezcan grandes volúmenes; la segunda es que el tiempo de duplicación en el medio adecuado para obtener células susceptibles de lisis es mayor de 48 horas; y la tercera fué que aunque la lisis de este estreptomiceto que se llevó a cabo, de acuerdo al método reportado por Schrempf et al (52) (ver Materiales y Métodos), daba una resolución adecuada en el gradiente de CsCl - bromuro de etidio, no ocurría lo mismo en relación a la concentración del ADN episomal obtenida.

De los plásmidos de E. coli, el pSC101 fué el utilizado --

como vehículo en la formación compuesto con ADN de N. crassa gracias -- a la ventaja que presenta en relación a la selección de las transformantes  $Tc^R$ , cosa que no ocurre con el plásmido Col El cuya selección se -- hace por la característica de inmunidad que las transformantes tienen -- hacia la ~~colicina~~ Colicina El.

Este plásmido compuesto pSC101 N. crassa al ser tratado -- con la Eco R-1, tal y como podemos ver en la Fig. 15, presenta un nuevo fragmento de ADN que se encuentra unido covalentemente al pSC101 y que todo parece indicar se trata de ADN de N. crassa. Sin embargo, para -- que ésto se pueda afirmar categóricamente será necesario llevar a cabo experimentos hibridización de ADN - ADN.

Ya que la importancia de este nuevo plásmido compuesto -- representa la posibilidad de un estudio más detallado de los mecanismos de regulación de N. crassa que, como ya se había indicado, es de inte-- rés puesto que se trata de un organismo eucariote, siendo esta caracte-- rística la que en un futuro próximo haga posible el entender algunos -- de los aspectos sobre los diferentes mecanismos de regulación del gene en células superiores así como la estructura y función de los cromosomas eucarióticos.

Ahora, considero que es necesario recalcar la importan--- cia de esta nueva metodología puesto que cada día se identifican nuevos plásmidos en microorganismos tales como Shigella, Pseudomona, Strepto-- coccus, Klebsiella, etc. y que además portan información de interés para

el hombre en el entendimiento de problemas clínicos comunes como serían, una disenteria o una caries dental. Esto requiere aún de un estudio más profundo, sin embargo ésto no impedirá que se lleve a cabo.

También desde el punto de vista de su aplicación industrial representa un posible avance, ya que el uso de vehículos tales -- como el plásmido Col El harán posible la amplificación de la información de un gene hasta 3000 veces logrando una producción del metabolito deseado (antibióticos, aminoácidos, etc.) mucho mayor a la que normalmente existe en la célula.

Todo ésto nos hace pensar que el desarrollo y conocimiento de la Ingeniería Genética será un punto importante en la resolución de problemas de carácter mundial, tales como la producción de sustancias de interés dentro de la industria alimenticia y, de problemas básicos - en Biología como sería la regulación en organismos superiores.

BIBLIOGRAFIA

1. Shanmugam, K.T. and R.C. Valentine  
Molecular Biology of Nitrogen Fixation. Science 187, 919  
(1975).
2. Vaca, G., A. González, G. Espín, Y. Mora y J. Mora  
Regulación del Metabolismo Nitrogenado en Neurospora --  
crassa. Los Perfiles de la Bioquímica en México. Prime  
ra edición. Pág. 191 (1974).
3. Bolivar, F. y R. Quintero  
Influencia de la biotecnología en el desarrollo de la --  
ciencia (primera parte). Coordinación del metabolismo -  
microbiano. Rev. Soc. Quim. Mex. 19, 16 (1975).
4. Cohen, S.N., A.C. Chang, H.W. Boyer, and R. Helling  
Construction of biologically functional bacterial plasmid  
Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 3240 (1973)
5. Zinder, N. and L. Lederberg  
Genetic exchange in Salmonella. J. Bacteriol 64, 679  
(1952).
6. Hayes, N.  
The Genetics of Bacteria and their viruses. Third printing.  
John Wiley & Sons, Inc. U.S.A. (1968).
7. Clark, A.J.  
Toward a metabolic interpretation of genetic recombination.  
Ann. Rev. Microbiol. 25, 437 (1971).
8. Ikeda, H. and Tomizawa  
"Prophage P<sub>1</sub>: an extrachromosomal replication unit" Cold  
Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 171 (1966).



9. Morse, M.L. and J. Lederberg  
Transduction in E. coli K-12. *Genetics*, 41, 142 (1956).
10. Sforza, L.L., J. Cavalli, S. Lederberg and E.M. Lederberg.  
*J. Gen. Microbiol.* 8, 89-103 (1953).
11. Brintton, C.  
The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili. *Transactions New York Academy of Sciences*, 40, 1003 (1967).
12. Jacob, F., A. Brenner and F. Cuzin  
On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28, 329 (1963).
13. Jacob, F. and A.E. Adelberg  
Transfer caracteres genetiques par incorporation and facteur sexual d' Escherichia coli. *Comptes Rendues de L'Academi de Sciences*, 249, 189 (1951).
14. Campbell, A.  
Episomes. Harper and Row Publishers. New York and LONDON (1969).
15. Hayes, W.  
The mechanism of genetic recombination in E. coli. *Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol.* 18, 75 (1953).
16. Low Brooks  
Escherichia coli K-12 F, Factors, Old and New *Bacteriol. Rev.* 36, 587 (1973).
17. Boyer, H.W.  
Genetic control of restriction and modification in E. coli *J. Bacteriol.* 88, 1652 (1964).
18. Griffith, F.  
Significance of Pneumococcal types  
*Hyg. J.* 27, 113 (1928).

19. Aavery, O., C. MacCleod, and N. McCarty  
Studies on the chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococco Types" J. of Experimental Medicine 79, 137 (1944).
20. Bolivar, F. y R. Quintero.  
Influencia de la biotecnología en el desarrollo de la ciencia. (Tercera parte). Ingeniería Genética. Rev. Soc. - Quim. Mex. 19, No. 3, 75 (1975).
21. Oishi, M.  
"An ATP dependent deoxyribonuclease from E. coli with a possible role in genetic recombination". Proc. Nat. Acad. Sci. 64, 1292 (1972).
22. Wakernagel, W. and C. Radding  
"Genetic Transformation in E. coli; the Inhibitory role of the recBC DNase" Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 306 (1973).
23. Cohen, S. and Chang A.  
"Recircularization and Autonomous replications of a sheared R-factor DNA segments in E. coli transformants". Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70, 1293 (1973).
24. Wright, M., G. Buttin and J. Hurwitz  
"The isolation and characterization from E. coli of an ATP dependent deoxyribonuclease directed by recBC genes. J. Biol. Chem. 246, 6543 (1971).
25. Barbour, S.D., H. Nagaishi, A. Templin, and A.J. Clark  
"Biochemical and Genetic studies of recombination proficiency in E. coli" Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 128 (1970).
26. Cosloy, S. and M. Oishi  
"The Nature of the Transformation Process in E. coli K-12" Molec. Gen. Genet. 124, 1 (1973).

27. Curtis III R.  
"Chromosomal aberrations associated with mutations to bacteriophage resistance in E. coli" J. Bacteriol. 89, 28 (1965).
28. Taylor, A. L.  
"Current linkage map of Escherichia coli K-12" Bacteriol. Rev. 34, 155 (1970).
29. Clark, A. J. and A.D. Margoulis  
"Isolation and characterization of recombination deficient mutants of E. coli K-12". Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53, 451 (1965).
30. Broda, P., J. R. Beckwith, and J. Scaife  
"The characterization of a new type of F prime factor in Escherichia coli K-12" Genet. Res. 5, 489 (1964).
31. Nishimura, A., L. Caro, M. Berg and Y. Hirota  
"Chromosome replication in E. coli IV. Control of chromosome replication and cell division by an integrated episome". J. Mol. Biol. 55, 441 (1971).
32. Nishimura, N., Y. Nishimura and L. Caro  
"Isolation of Hfr strains from R<sup>+</sup> and ColV2<sup>+</sup> strains of E. coli and derivation of an R 'lac factor by transduction". J. Bacteriol. 116, 1107 (1973).
33. Messelson, M. and R. Yuan  
"DNA restriction Enzyme from E. coli" Nature 217, 1110 (1968).
34. Mertz, J. and R. Davis  
"Cleavage of DNA by R<sub>1</sub> Restriction endonuclease generates cohesive ends". Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 330 (1972).

35. Ford, E. and H. Boyer  
"Degradation of Enteric bacterial DNA by the E. coli B.  
restriction endonuclease". J. Bacteriol. 104, 594 (1970).
36. Morrow, J. and P. Berg  
"Cleavage of SV40 DNA at a unique site by a bacterial  
restriction enzyme". Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 3365  
(1972).
37. Sánchez, F., F. Bolivar and J. Martuscelli  
Transformation of E. coli K-12 by lineal DNA from  
Salmonella typhi Microbial Genetic Bulletin 38 13 (1975).
38. Chang, A. and S. Cohen  
"Genome construction between bacterial Species in vitro:  
replication and expression of Staphylococcus plasmid  
genes in Escherichia coli" Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71,  
1030 (1974).
39. Morrow, J., S. Cohen, A. Chang, H. Boyer, H. Goodman and R. Helling  
"Replication and Transcription of eukaryotic DNA in  
Escherichia coli" Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1743  
(1974).
40. Anderson, R.S., V.M. Kemelen, C.M. Jones and J.S. Patton  
"Study of the association of resistance to two drug in a  
transferable determinant in S. typhimurium" Genet. Res.  
11, 119 (1968).
41. Dixon, R.A. and J.R. Postgate  
"Genetic transfer of nitrogen fixation genes from  
Klebsiella pneumoniae to Escherichia coli" Nature 237,  
102 (1972).
42. Richmond, M.H. and R.B. Sykes  
"The chromosomal integration of a lactamase gene derived  
from P-type R-factor R PI in E. coli" Genet. Res. 20,  
231 (1972).

43. Merrill, C. R., M.R. Geis and J. C. Petricciani  
"Bacterial virus gene expression in human cells" *Nature*  
233, 398, (1971).
44. Mergeay, M., R. Martin, and J. Remy  
"Transformation d' un mutant de Bacillus subtilis par du  
DNA Streptomyces colicolor Arch. Int. Biochem. Physiol.  
78, 603 (1970).
45. Doy, C. H., P.M. Gresshoff and B. Rolfe  
"Biological and Molecular Evidence for the Transgenosis of  
Genes from Bacteria to Plant Cells". Proc. Nat. Acad. Sc.  
USA 70 723 (1973).
46. Weiss, B. A. Jacquemin Sablon, T. R. Live, G. C. Faseed, and C.C.  
Richardson.  
"Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid  
J. Biol. Chem. 243, 45 (1968).
47. Goulian, M.  
Biosynthesis of DNA. Ann. Rev. Biochem. 40, 855 (1971).
48. Modrich, P., and I. R. Lehman  
"Enzymatic joining of polynucleotides. J. Biol. Chem.  
245, 3626 (1970).
49. Boyer, H. W., R. C. Tait, B. J. McCarthy, and H. M. Goodman  
"Cloning of Eucaryotic DNA as an approach to the analysis  
of chromosome structure and function. (en prensa).
50. Hershfield, V., H. W. Boyer, C., Yanofsky, M. A. Lovett, and D. R.  
Helinski  
"Plasmid Col E1 as a Molecular Vehicle for Cloning and  
Amplification of DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71,  
3455 (1974).
51. Clewell, D.B.  
"Nature of Col E1 plasmid replication in Escherichia coli  
in the presence of chloramphenicol". J. Bacteriol. 110,  
667 (1972).

52. Guerry, P., D.J. Le Blanc and S. Falkow  
General method for isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 116, 1064 (1973).
53. Schrempf, H., H. Bujard, D.A. Hopwood and W. Goebel  
Isolation of covalently closed circular deoxyribonucleic acid from *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J. Bacteriol.* 121, 416 (1975)
54. Helling, R. B., H.M. Goodman, and H.W. Boyer  
Analysis of endonuclease R Eco R-1 fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose gel electrophoresis.  
*J. Virol.* 14, 1235 (1974).

Agradezco al Dr. Federico Sánchez  
el haberme proporcionado ADN de  
Neurospora crassa.