

83

LIBRO DE REGISTRO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACION DE LOS GENES DE
TRANSFERENCIA Y DISEMINACION DEL
PLASMIDO pJVI DE *Streptomyces phaeochromogenes*

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

p r e s e n t a

VICTOR RIVELINO JUAREZ GONZALEZ



DIVISION DE ESTUDIOS
PROFESIONALES
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

Mexico, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron el pasante(s) Juárez González Victor Rivelino

con número de cuenta 8955259-5 con el Título: _____

Identificación de los genes de transferencia y diseminación del plásmido pJV1 de Streptomyces phaeochromogenes NRRL B3559.

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Biólogo

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Dr.	Luis	Servín González	
Director de Tests			
Biol.	Miguel Angel	Neneses Pérez	
Biol.	Carlos A.	Castillo Pompeyo	
Dr.	René de Jesús	Cárdenas Vázquez	
Suplente			
M. en C.	María Elena	Calderón Segura	
Suplente			

AGRADECIMIENTOS.

A el Dr. Luis Servín por su incalculable apoyo y permitirme junto con Clementina Castro, conocer el plásmido pJV1 así como a la bacteria *Streptomyces lividans*.

A mis sinodales, Carlos Pompeyo, Miguel Angel Meneses, René Cardenas y María Elena Calderón, por sus valiosos comentarios y puntos de vista.

Muy especialmente a toda mi familia, así como amis compañeros y amigos de laboratorio y Faculataad de Ciencias.

A todos mis amigos y cuates que trabajan.

Al Instituto de investigaciones Biomedicas y a la U.N.A.M. por todo lo que me brindo.

DEDICATORIAS

**Dedico muy especialmente todo este trabajo a mis padres, por todo el apoyo que me
brindarán constantemente**

INDICE

	Núm. pag
INTRODUCCION.....	(3)
OBJETIVOS.....	(18)
MATERIAL Y METODOS.....	(19)
- PREPARACION DE ESPORAS DE STREPTOMYCES.....	(19)
- COSECHA DE LAS ESPORAS.....	(19)
- OBTENCION DE MICELIO PARA TRANSFORMACION.....	(19)
- TRANSFORMACION.....	(20)
- EXTRACCION DE DNA Y CONFIRMACION DE LA ESTRUCTURA DE LOS PLASMIDOS (" minipreps").....	(21)
- PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA EN GELES DE AGAROSA DE BAJO PUNTO DE FUSION (LMP).....	(23)
- TRATAMIENTO CON LA FOSFATASA ALCALINA.....	(24)
- EXTRACCION CON FENOL/CLOROFORMO.....	(24)
- CRUZAS GENETICAS.....	(25)
- DILUCIONES DE LAS ESPORAS Y CUANTIFICACION DE LAS MISMAS..	(25)
- CUANTIFICACION DE LA TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS Y DE LA MOVILIZACION DEL CROMOSOMA.....	(26)
- DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE FORMACION DE "POCKS".....	(26)
- MANIPULACION DE DNA.....	(26)
- MEDIOS DE CULTIVO Y BUFFERS.....	(27)
- CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS.....	(31)
RESULTADOS.....	(33)

- DELECCIONES E INSERCIONES DE LOS DERIVADOS DEL pJV1.....	(33)
- DETERMINACION DE LA EXISTENCIA DE UN SISTEMA KIL-KOR EN EL PLASMIDO pJV1.....	(37)
A) ELIMINACION DEL SITIO DE Bpu1102I.....	(37)
B) DELECCION DEL INTERVALO ScaI-Bpu1102I.....	(38)
C) DELECCION DEL INTERVALO Bpu1102I-EcoRI.....	(38)
DISCUSION.....	(39)
CONCLUSIONES.....	(46)
BIBLIOGRAFIA.....	(48)

INTRODUCCION.

Características generales del género *Streptomyces*.

Los *Streptomyces* son bacterias Gram positivas, caracterizadas por la formación de dos tipos de micelio, el vegetativo y el aéreo (Chater, 1984; Schauer et al, 1987). Su hábitat natural es el suelo y a diferencia de otros grupos de bacterias presentan un alto contenido de guanina (G) y citosina (C) en su DNA, de alrededor del 73%. Presentan un ciclo de diferenciación muy complejo, (Fig.1) en donde el micelio vegetativo penetra y solubiliza la materia orgánica empleando enzimas hidrolíticas, las cuales son secretadas al medio externo, como son proteasas, amilasas, lipasas, etc (Gusek y Kinsella, 1992). Una vez agotados los nutrientes se desarrolla un micelio aéreo, el cual posteriormente se fragmenta dando lugar a la formación de esporas. Se sabe que para la formación del micelio aéreo ocurre una lisis del micelio vegetativo, el cual de este modo sirve de nutriente al micelio aéreo (Gusek y Kinsella, 1992).

De estas bacterias se han aislado una amplia variedad de antibióticos, vitaminas, enzimas y metabolitos secundarios de importancia industrial, médica, etc. Cerca de 6000 antibióticos de origen microbiano han sido caracterizados, de los cuales más del 60% son producidos por los miembros del género *Streptomyces* (Gusek y Kinsella, 1992), teniendo aplicaciones quimioterapéuticas en la medicina humana, la medicina veterinaria, la agricultura y la industria pesquera; algunos de los muchos ejemplos que hay son el cloranfenicol (*Streptomyces venezuelae*) empleado para el tratamiento de la tifoidea, la mitomicina (*Streptomyces caespitosus*) empleada para el tratamiento del cáncer, la neomicina (*Streptomyces fradiae*) para tratamientos intestinales y la tetraciclina (*Streptomyces aureofaciens*), la cual presenta amplias aplicaciones clínicas (Okanishi y Manome, 1980; Okanishi et al, 1980; Gusek y Kinsella, 1992).

La mayor cantidad de genes de síntesis y resistencia, para la producción de antibióticos, se encuentran en los cromosomas de estas bacterias, salvo un caso muy particular como es el SCP1; este plásmido presenta los genes de síntesis y genes de resistencia para la producción del antibiótico metilenomicina (Wright y Hopwood, 1976; Kinashi, et al 1987; Kinashi y Murayama, 1991).

La mayor parte de las especies estudiadas de *Streptomyces*, presentan un mapa genético circular. Por medio de geles de electroforesis de campos pulsados (empleados para la separación de grandes moléculas de DNA y para poder diferenciar entre formas circulares y lineales), fue

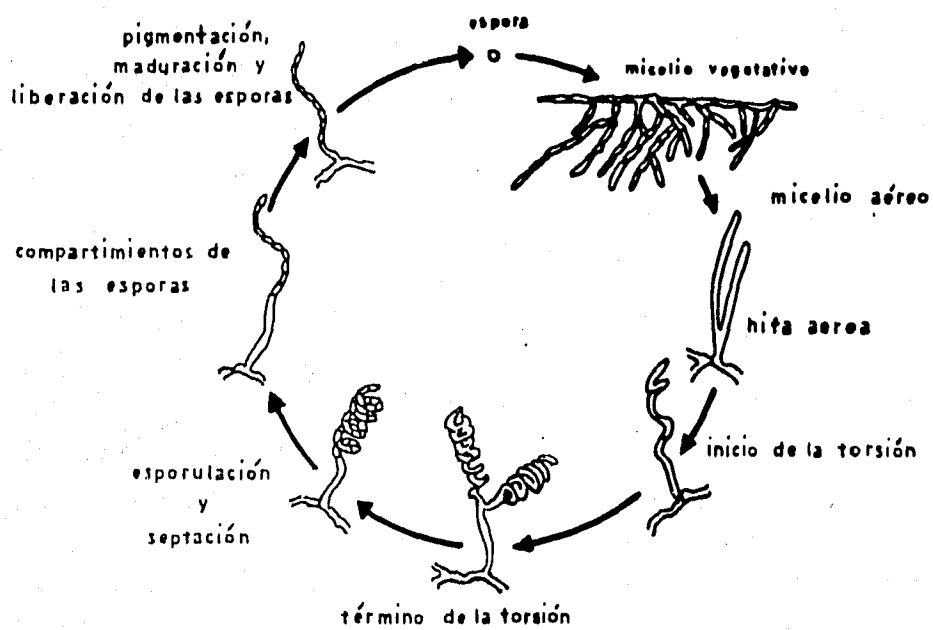


Fig.1 Ciclo de vida de los Streptomyces
Gusek y Kinsella, 1992.

posible demostrar que hay especies de *Streptomyces* que presentan un cromosoma lineal. Los cromosomas lineales han sido reportados, entre otras, para las especies: *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces lividans* (Chen et al, 1993b).

El DNA cromosómico de *Streptomyces lividans* 66 presenta una estructura lineal con dos terminales libres idénticas, cada terminal (telómero) lleva una proteína unida covalentemente. Aparentemente este tipo de asociaciones entre proteínas y telómeros tienden a circularizar la molécula in vivo (Chen et al, 1993b).

El DNA cromosómico de *Streptomyces coelicolor* A(3)2 presenta 8 Mb de DNA lineal, con la presencia de proteínas terminales en los extremos (Lin et al, 1993). La presencia de cromosomas lineales en otras especies de *Streptomyces* sugiere que la linearización del cromosoma podría ser común en este género de bacterias (Lin et al, 1993).

Plásmidos de *Streptomyces*.

Las bacterias, además del DNA cromosómico, presentan material genético extracromosómico, dentro del que destacan los plásmidos, se sabe que estos son pequeñas moléculas de DNA extracromosómico de tamaño variable, que generalmente son circulares aunque también se presentan los lineales.

En los *Streptomyces* se han aislado y caracterizado una amplia variedad de plásmidos; estos presentan un rango de tamaño de <4 a >200kb y el número de copias presente por célula, es desde una a más de cien. Todos los plásmidos físicamente caracterizados son moléculas de doble cadena de DNA; la mayor parte son moléculas de DNA covalentemente cerradas (ccc DNAs), sin embargo algunos son lineales.

Propiedades de los plásmidos de *Streptomyces*.

Numerosos plásmidos han sido aislados de los *Streptomyces* y analizados en detalle (Hopwood et al, 1986; Kataoka et al, 1991a; Kieser et al, 1982), etc. La mayoría de estos plásmidos presentan características en común. Una de las más significativas características es la presencia de genes involucrados en los eventos de transferencia intermicelial de plásmidos (genes *tra*) y de diseminación de los mismos a lo largo del micelio receptor (genes *spd* del inglés "spread"). Estos genes son los únicos requeridos para la conjugación de estos organismos

(Kataoka et al, 1991a). Estos plásmidos presentan pocos genes involucrados en la transferencia a diferencia de las bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, donde un mayor número de genes son los responsables de la transferencia.

Como producto de las funciones de transferencia los plásmidos de los *Streptomyces* presentan la capacidad de movilizar genes cromosómicos de la célula donadora, hacia la célula receptora del plásmido. Esto es llevado mediante eventos de recombinación genética entre el DNA del plásmido con regiones del cromosoma, pasando por conjugación este material genético a otra célula sin el plásmido (Holloway, 1979). En la célula hospedera el gen acarreado por el plásmido es incorporado en una región del nuevo cromosoma, mediante otro evento de recombinación. De esta manera el cromosoma tiene un nuevo gen funcional y el plásmido permanece libre en el citoplasma de la bacteria (Holloway, 1979).

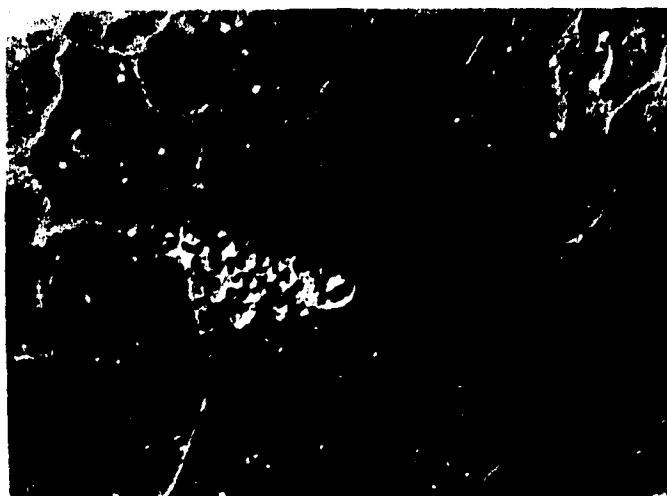
La mayoría de los plásmidos de *Streptomyces* presentan la capacidad de formar "pocks", (Fig.2) fenómeno también conocido como zigosis letal (LTZ). Los "pocks" son zonas circulares, visibles a simple vista, de 1 a 4 mm de diámetro; estos son formados por la adquisición del plásmido. El plásmido adquirido por la cepa receptora provoca una inhibición del crecimiento y la esporulación en la misma, (Bibb et al, 1977, Bibb et al, 1978, Bibb et al, 1980; Murakami et al, 1983; Hopwood et al, 1983 y Hopwood et al, 1986).

Algunos plásmidos de *Streptomyces* presentan el sistema Kil-Kor, como producto de las funciones de transferencia del plásmido, el producto del gen *kor* desempeña dos funciones, ya que se autoregula y regula (a nivel transcripcional) la expresión de los productos formados por los genes *kil* (Stein et al, 1989).

Replicación por el mecanismo del círculo rodante.

Los plásmidos pequeños circulares de alto número de copias de *Streptomyces*, normalmente se replican por círculo rodante (Fig.3). En este mecanismo participan 3 elementos principales, que son: el origen más (*ori +*), la proteína de replicación (*Rep*) y el origen menos (*ori -*).

El mecanismo del círculo rodante comienza con la síntesis de la proteína de replicación (*REP*) codificada por el plásmido, la cual reconoce una secuencia específica del DNA a la que se le denomina el *ori +* (Koepsel et al, 1985; Novick, 1987, 1989; Thomas et al, 1990 y de la



pocks

Fig 2. Morfología de los pocks formados por el plásmido pJV1 en *Streptomyces lividans*.

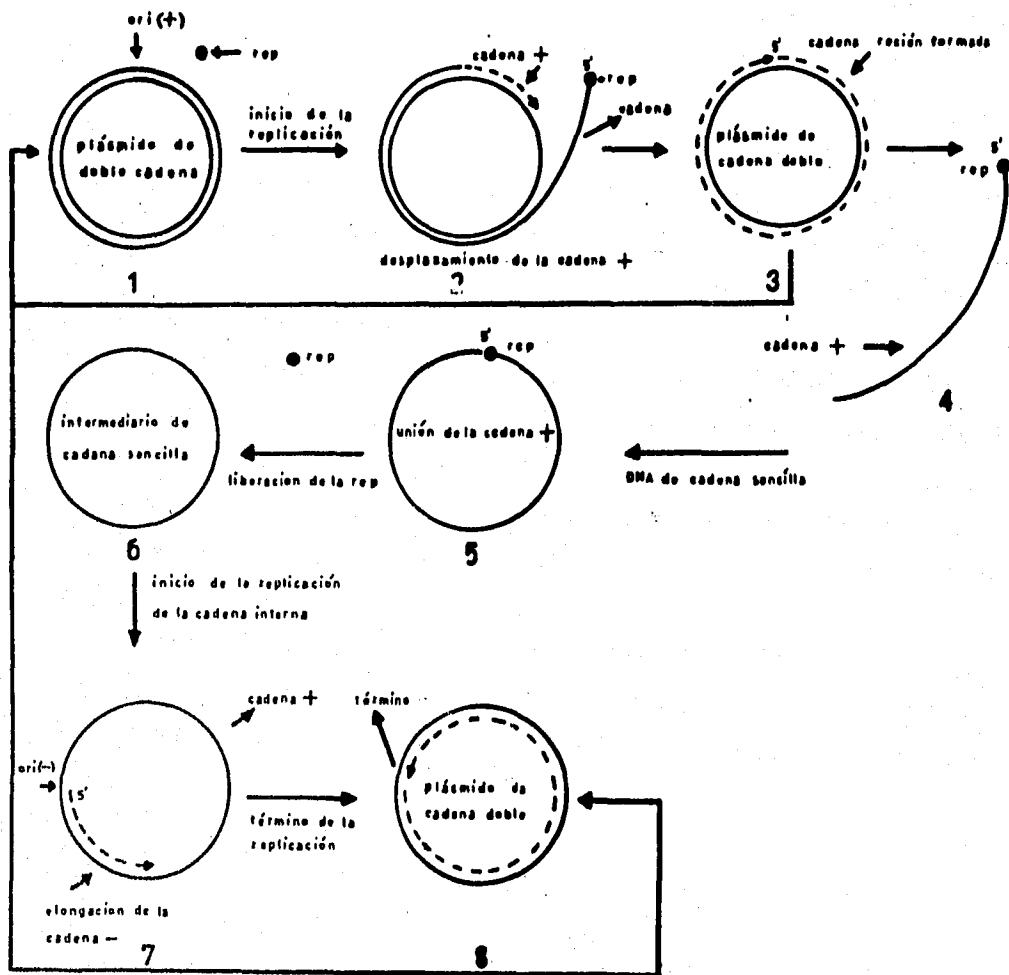


Fig.3 Estados principales de la replicación por el mecanismo del círculo rodante, en plásmidos con alto número de copias en *Streptomyces*, por Gruss y Ehrlich, 1989.

Campana et al, 1990). En esta zona la proteína Rep introduce un corte o "nick" y se pega en el extremo 5' terminal provocando el desplazamiento de la cadena externa o hebra positiva (del Solar et al, 1993; Gruss y Ehrlich, 1989). A medida que se desplaza la cadena externa de manera simultánea se da la síntesis de una copia de la misma, por medio de las DNA polimerasas celulares. La cadena externa o hebra positiva continúa desplazándose, al mismo tiempo que se genera una copia de la misma, hasta llegar al mismo sitio donde inició la replicación, en el cual la proteína Rep introduce un segundo corte y circulariza a la cadena positiva desplazada (del Solar et al, 1993; Gruss y Ehrlich, 1989). De esta forma se obtiene un plásmido de doble cadena y un intermediario de cadena sencilla, para obtener la síntesis de la cadena interna o negativa, esta es iniciada en una región diferente y específica del intermediario de cadena sencilla circularizado. A esta región se le ha denominado el ori (-), esta zona es considerada como el sitio de iniciación para conversión del DNA de cadena sencilla (ssDNA) a DNA de cadena doble (dsDNA), del Solar et al, (1987); Gruss y Ehrlich, (1989). La RNA polimerasa celular reconoce a este sitio introduciendo un primero de RNA dejando el extremo 3' terminal, el cual es reconocido por la DNA polimerasas de la célula, comenzando la replicación de la cadena interna en dirección 5'-3', ésta continúa replicándose hasta completar la hebra interna y de esta manera obtener un segundo plásmido de cadena doble, y terminar un ciclo productivo de replicación.

Los únicos elementos indispensables para que un plásmido pueda replicarse son la proteína Rep y el ori (+). Los plásmidos que carecen del ori (-) son funcionales, aunque la replicación es menos eficiente y acumulan gran cantidad de intermediarios de cadena sencilla (Gruss y Ehrlich, 1989).

Plásmidos lineales:

Este tipo de plásmidos presentan las siguientes características:

En sus extremos se encuentran flanqueados por una serie de secuencias de nucleótidos denominadas secuencias terminales invertidas repetidas (TIRs). Los extremos terminales 5' llevan proteínas unidas covalentemente vía residuos de fosfato, mientras que los extremos terminales 3' presentan grupos OH libres. Los plásmidos lineales presentes en estas bacterias, son diferenciados por el tamaño en plásmidos pequeños (<4 a <30kb) y plásmidos gigantes (>100 a >300kb).

Plásmidos pequeños:

Se han caracterizado plásmidos lineales como el pSLA2 formado por 12 Kb (Hayakawa et al, 1979a; Hayakawa et al, 1979b).

El plásmido pSCL1, fue aislado originalmente de la cepa *Streptomyces clavuligerus*; ya fue secuenciado completamente (Wu y Roy, 1993), se encuentra formado por 11.696 Kb de longitud con un contenido de G+C de 72% el cual es característico de los DNAs de *Streptomyces* y presenta 900 pb terminales invertidas repetidas; la secuencia terminal de la izquierda es idéntica en los primeros 690 pb a la secuencia terminal de la derecha, por lo que algún cambio o variación en esta región podría dañar el mecanismo de replicación.

En los extremos terminales 5' de ambas cadenas, se han encontrado proteínas unidas covalentemente.

De los 8 ORFs (marcos de lectura abiertos) predichos con base en la secuencia, solo dos presentan una similitud significativa y posible homología con algunas de las proteínas conocidas para el plásmido pIJ101; éstas son las siguientes:

La secuencia de aminoácidos encontrada para el producto del ORF-L (249 aminoácidos) del pSCL1, presenta un 45.5% de identidad en 231 aminoácidos a la secuencia de aminoácidos encontrada para la proteína KorA del pIJ101, esta similitud también se manifiesta en el tamaño. Lo anterior sugiere que este plásmido presente posiblemente un sistema kil-kor y que el producto del ORF-L forme una proteína reguladora (represor). El producto formado por el ORF-L no solo muestra un alto grado de similitud con el producto del gene *korA* del plásmido pIJ101, sino también es similar a un número muy alto de proteínas reguladoras que presentan un motivo hélice-vuelta-hélice (Wu y Roy, 1993). Se conoce que este sitio específicamente interactúa con una región muy particular del DNA del plásmido (Brennan y Matthews, 1989).

Por otra parte el ORF-4 formado por 327 aminoácidos, presenta un patrón de hidrofobicidad con 4 hélices transmembranales, esto es muy similar a lo conocido para la proteína SpdB del pIJ101 involucrada en la diseminación del plásmido, la cual contiene 3 fuertes dominios hidrofóbicos. Sin embargo poco es lo conocido sobre la formación de "pocks" del pSCL1 en *Streptomyces clavuligerus* y no se puede predecir si el ORF-4 está involucrado en una función semejante a la diseminación del plásmido (Wu y Roy, 1993).

El pBL1 es un plásmido conjugativo aislado de la cepa *Streptomyces bambergensis*, se encuentra formado por 43 kb y presenta la capacidad de formar "pocks".

La región involucrada en la transferencia está comprendida en una secuencia de 5.7 kb. Al realizar el análisis sobre esta secuencia se encontraron 6 posibles ORFs: El ORF-2 codifica para una proteína (338 aminoácidos) esencial de la transferencia, la cual está regulada negativamente por el producto del ORF-6 (118 aminoácidos); estos productos son muy similares al patrón determinado para la transferencia del pSN22 como son: El gen principal de la transferencia intracelular (*traA*) y el gen regulador del *traA* (*traR*) por (Kataoka et al, 1991a). Mutaciones realizadas en la secuencia del ORF-1, afectan la formación de "pocks" y reducen la frecuencia de transferencia. La proteína formada por este ORF presenta 2 motivos hélice-vuelta-hélice (HTH) los cuales son muy semejantes a los encontrados para las proteínas reguladoras de tipo activador (Breennan y Matthews, 1989).

Mutaciones en el ORF-5 provocan reducciones en el tamaño de los "pocks", así como en la frecuencia de transferencia, este producto ayuda a la diseminación del plásmido a lo largo de las hifas receptoras.

Las proteínas encontradas para los dos genes "spread" del pIJ101 presentan muy poca homología con el producto del ORF5. Estos genes desempeñan funciones muy importantes en la diseminación y transferencia de este plásmido (pBL1).

Al analizar el ORF-4 se encontró lo siguiente: Un contenido bajo de G+C en comparación al localizado en el DNA de los otros ORFs, así como la presencia de dos codones raros TTA (Zotchev et al, 1992). El ORF-4 se transcribe y su expresión puede estar regulada por el producto del gen *bldA*, del cual se conoce la codificación de un solo leucil-tRNA que reconoce codones UUA, ya que el gen *bldA* desempeña un papel muy importante en la regulación de la expresión de genes que contienen codones TTA, los cuales son raramente encontrados en los *Streptomyces* (Chater, 1989).

Al realizar mutaciones en el ORF-7 la eficiencia en la transferencia no se afecta, por lo que el producto de este ORF no es importante en la transferencia del plásmido.

Al efectuar el análisis de la secuencia sobre el plásmido pBL1, muestra que al menos 5 genes están involucrados en las funciones de transferencia y la formación de "pocks" del plásmido.

El ORF-5 reduce el tamaño de los "pocks" y la transferencia; mientras que los ORFs importantes en la eficiencia en la transferencia son ORF2 y ORF3 (Zotchev et al, 1992).

El plásmido SLP2 fue aislado de la cepa de *Streptomyces lividans* 66, está formado por 50 kb, se transfiere por conjugación y presenta la capacidad de formar "pocks". Por electroforesis de campos pulsantes se detectó esta molécula, al analizar la secuencia en sus extremos se encontraron 44 pb terminales invertidas repetidas, donde las 12pb terminales de ambos extremos son idénticas a los encontrados para el pSLA2 y SCP1 (Chen et al, 1993a).

Plásmidos Gigantes:

Son denominados así por su enorme tamaño, el SCP1 es un claro ejemplo de ello (Fig.4). Fue aislado originalmente de la cepa *Streptomyces coelicolor* M138, este plásmido se encuentra formado por 350 Kb (Kinashi y Murayama; 1991).

Se analizaron las secuencias de nucleótidos de las terminales invertidas repetidas (TIRS) en ambos extremos determinándose el tamaño de ambas, el cual es de 81 Kb. En ambos extremos de las secuencias terminales 5' se encuentran proteínas unidas covalentemente, para evitar que el DNA sea degradado durante la replicación del plásmido (Kinashi et al, 1991).

Se encontró una secuencia de inserción en la terminal invertida repetida de la región derecha (Fig.4.1) por Kinashi et al, (1992) por lo que se ha propuesto que el SCP1 se encuentra presente en tres formas en *Streptomyces coelicolor*:

- Puede encontrarse libre en el citoplasma celular, teniendo una replicación autónoma.
- Puede encontrarse libre en el citoplasma celular, conteniendo un fragmento del cromosoma y replicarlo.
- Puede encontrarse integrado en una región específica del cromosoma, replicándose cada que lo haga el cromosoma.

Los plásmidos circulares:

Son los plásmidos más frecuentemente encontrados en los *Streptomyces*. Algunos se replican por el mecanismo del círculo rodante; todos son conjugativos y presentan la capacidad de movilizar marcadores cromosómicos (cma) durante el evento de transferencia.

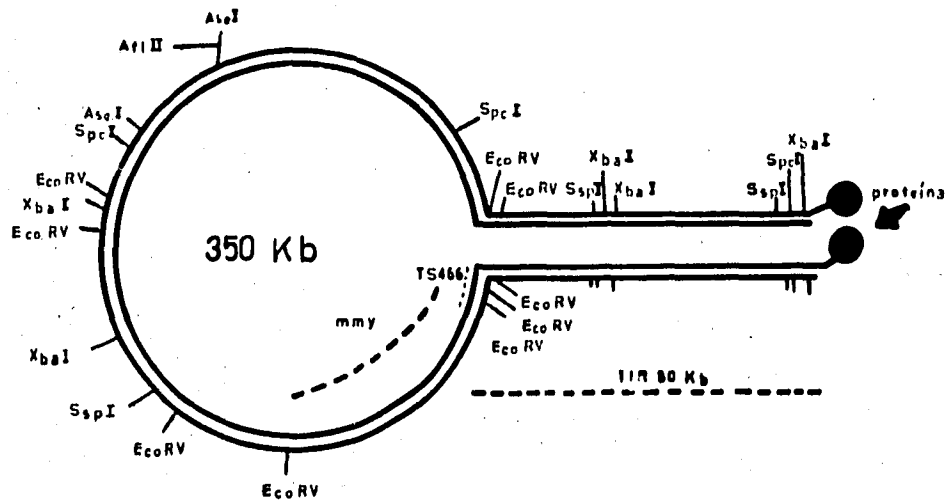


Fig.4 Mapa físico del plásmido SCP1, por Kinashi y Murayama, 1991.

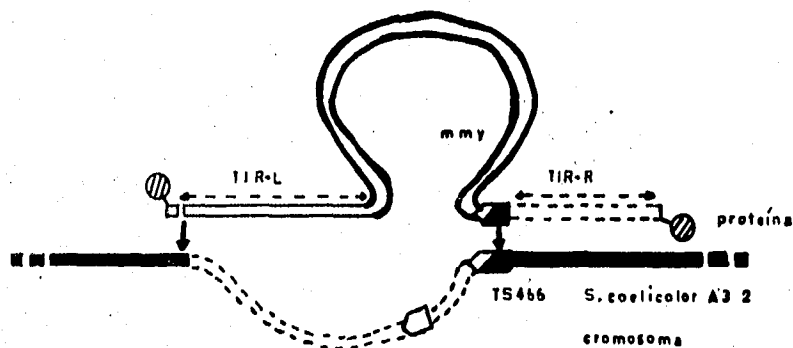


Fig. 4.1 Integración del plásmido SCP1 y las secuencias terminales invertidas repetidas, por Kinashi et al, 1992.

Estos plásmidos son divididos en base al número de copias que tienen por cromosoma en plásmidos con bajo número de copias y plásmidos con alto número de copias (multicopia).

Plásmidos con bajo número de copias:

El SCP2* (Fig.5) es un plásmido aislado de la cepa *Streptomyces coelicolor A(3)2*, el mapa físico de este plásmido fue determinado por Lydiate et al, (1985). El SCP2* se encuentra formado por 31,4 kb. Por medio de mutaciones (deleciones), se analizó la región responsable de la transferencia. Se encontraron 5 genes involucrados en ésta: *traA*, *traB*, *traC*, *traD* y *spd*, localizados en una región de 9 kb y formando un operón.

El gen *traA* es esencial para la transferencia principal del plásmido, así como para la movilización de marcadores cromosómicos (*cma*), dicho gen codifica para una proteína de 442aa. Mientras que el gen *traB* codifica una proteína de 137aa, mutaciones realizadas en este gen y en el gen *traD* reducen la frecuencia de transferencia y la movilización de marcadores cromosómicos (Brolle et al, 1993).

Mutaciones en los genes *spd*, presentan un efecto similar al producido en los *spd* del pIJ101, con una clara reducción en el tamaño de los pocks, pero sin afectar la *cma*. El SCP2* se transfiere con una alta frecuencia (100%), además de presentar la capacidad de formar "pocks".

Plásmidos con alto número de copias:

La región esencial de estos plásmidos comprende el origen de replicación (*ori* +) y la proteína *Pep*, como lo mínimo en requerimientos para que un plásmido sea funcional.

Los plásmidos de *Streptomyces* tienen además de la región esencial, genes involucrados en la transferencia (genes *tra*) y diseminación del plásmido (genes *spread*), estos genes son los responsables de la conjugación del plásmido entre cepas. El evento de conjugación bacteriana es un proceso de transferencia del material genético de una célula donadora del plásmido a otra célula receptora del mismo.

Las regiones de transferencia ya han sido identificadas en algunos plásmidos multicopia de *Streptomyces* como son:

El pIJ101 (Kendall y Cohen, 1988) y el pSN22 (Kataoka et al, 1991a), en los cuales muy pocos genes son los responsables de la transferencia de los plásmidos. También dichas regiones ya

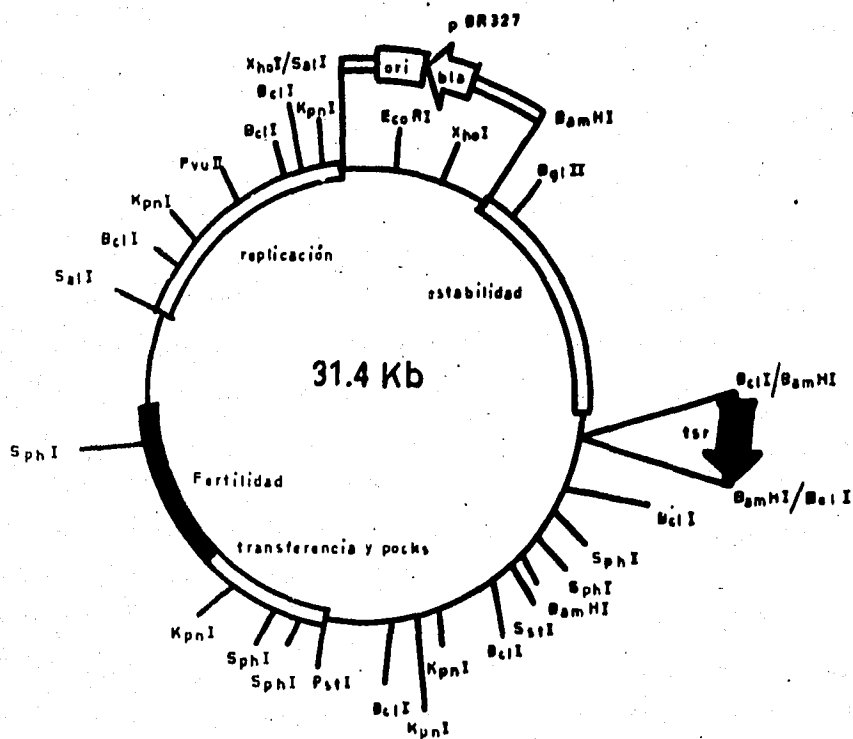


Fig.5 Mapa físico del plásmido SCP2*
 por Lydiate et al, 1985.

han sido identificadas en plásmidos que se integran en sitios específicos del cromosoma, entre los que destaca el pSAM2 (Hagege et al, 1993b).

El plásmido pSAM2 puede mantenerse funcionalmente en la célula a través de dos formas, es decir puede encontrarse integrado en el cromosoma o estar de manera libre en el citoplasma, donde llega a tener 10 copias por célula (Hagege et al, 1993a).

Una característica fenotípica muy particular de los plásmidos de *Streptomyces* producto de las funciones de transferencia es la relacionada con la formación de "pocks" o zigosis letal (LTZ) por Hopwood et al, 1983. Estos "pocks" no son otra cosa que zonas de inhibición del crecimiento y esporulación en la cepa receptora causada por la adquisición del plásmido (Hopwood et al, 1984). Se ha sugerido que la formación de "pocks", es una manifestación de la transferencia intramicelial del plásmido dentro del micelio de un cultivo receptor, después de la transferencia primaria o intermicelial del micelio donador (Hopwood y Wright, 1973; Hopwood et al, 1983; Hopwood et al, 1986).

Existe un sistema identificado en los plásmidos de *Streptomyces* conocido como Kil-Kor, el cual se encuentra involucrado en la transferencia de los plásmidos, en donde los genes *kil* desempeñan funciones específicas en la letalidad, una vez que el plásmido pasa a la cepa receptora. Por otra parte el gen *kor* sintetiza productos que se hayan involucrados en el control de la expresión del fenotipo Kil siendo por tanto la proteína Kor un inhibidor de la expresión de los productos formados por los genes *kil* (Kendall y Cohen, 1987).

Los plásmidos con alto número de copias, son los plásmidos mas estudiados de los *Streptomyces*; en ellos destacan: Los plásmidos integrativos, los cuales se integran en regiones muy específicas del cromosoma como: el SLP1 (Brasch et al, 1993) y el pSAM2 (Boccard et al, 1989a). Y los plásmidos que se encuentran en el citoplasma celular de la bacteria, denominados plásmidos libres como: el pIJ101 (Hopwood et al, 1981), el pSN22 (Kataoka et al, 1991a) Y el pJV1 (Bailey et al, 1986).

Plásmidos integrativos:

Estos plásmidos tienen una región de nucleótidos muy conservada denominada (*attP*), la cual es homóloga a una región presente en el cromosoma denominada (*attB*); por entrecruzamiento estos dos sitios de reconocimiento se pueden unir.

Los genes *int* codifican proteínas, que le permiten al plásmido integrarse al cromosoma en estas regiones, de esta forma el plásmido queda incorporado en una región específica del cromosoma. Los plásmidos integrativos presentan genes que sintetizan productos para el mantenimiento del plásmido y para la liberación del mismo (genes *xis*).

Características del plásmido SLP1.

El SLP1 es un elemento genético aislado del cromosoma de *Streptomyces coelicolor* A3(2), (Fig.6) se encuentra formado por 17.2 Kb. El análisis de la secuencias nucleótídicas involucradas en los mecanismos de inserción y liberación del plásmido en el cromosoma bacteriano, demostraron la presencia de 2 ORFS contenidos en una región de 2.2 Kb. El ORF formado por el gen *int* de 1.365 Kb, codifica una proteína básica de 50.6 kDa, esta proteína presenta una secuencia de aminoácidos similar a la familia de proteínas integrasas. El ORF6 codifica para una proteína básica de 7.1 kDa, la secuencia de aminoácidos formada por esta proteína, es muy similar a las secuencias de aminoácidos encontradas para proteínas excisionasas presentes en otros sistemas de recombinación (Brash et al, 1993). El análisis funcional de estos genes presentan una alta similitud con la secuencia de aminoácidos derivada para las proteínas recombinasas.

Los mecanismos de recombinación mediados por el SLP1, son el sitio *attP* (del plásmido) con el sitio *attB* (del cromosoma), los cuales comparten una región homóloga de 112 pb. El evento de integración forma dos nuevos sitios que son: el sitio de la izquierda (*attL*) y el sitio de la derecha (*attR*), por Omer y Cohen, (1984, 1986).

Características del plásmido pSAM2.

El pSAM2 es un elemento originalmente aislado de *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877, (Fig.7) presenta una longitud de 11 kb. Este plásmido presenta la capacidad de transferirse por conjugación y la capacidad de poder integrarse en sitios específicos del cromosoma de la cepa receptora (Smokvina et al, 1991). El pSAM2 puede mantenerse en dos formas diferentes en *Streptomyces*, ya sea integrado en el cromosoma o libre en el citoplasma celular donde llega a tener 10 copias por cromosoma (Hagege et al, 1993a). El sitio específico de integración fue localizado (Boccard et al, 1989a; Boccard et al, 1989b); el fragmento importante

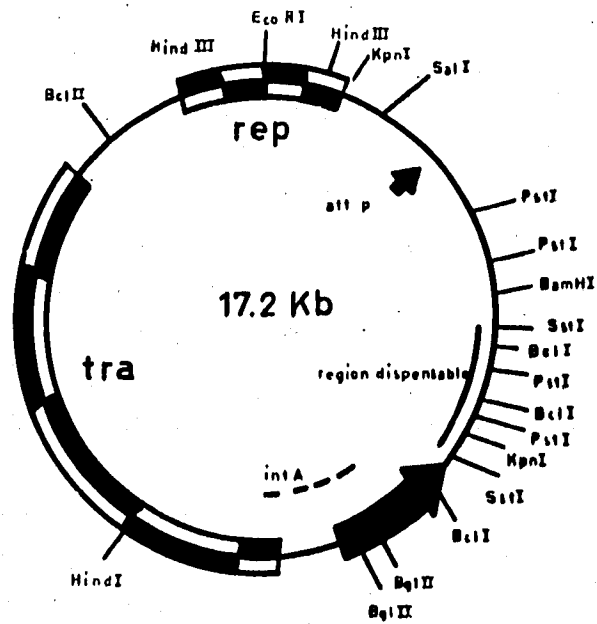


Fig.6 Mapa físico del plásmido SLP1, por Brash et al, 1993.

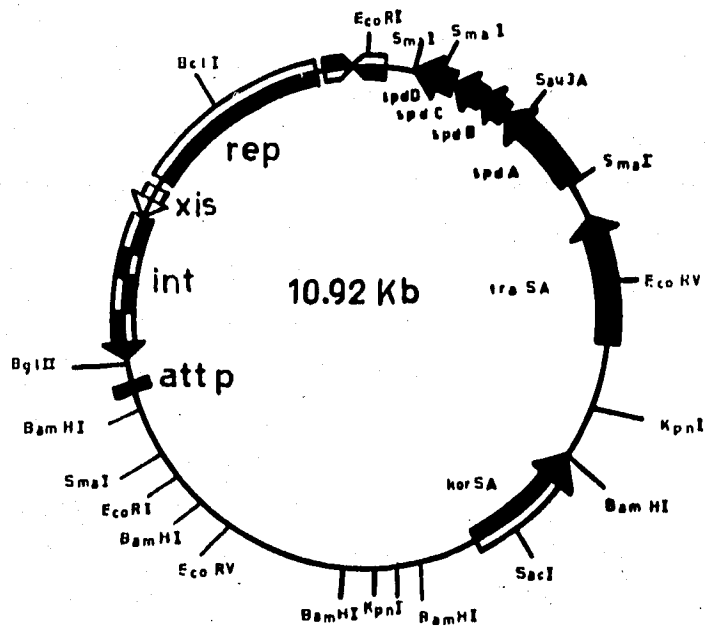


Fig.7 Mapa físico del plásmido pSAM2, por Smokvina et al, 1991.

para el evento de integración, se encuentra contenido en 2.3 kb el cual contiene los genes de integración (*int*), que codifican para una proteína integrasa, los genes (*xis*) que codifican para una proteína excisionasa y el sitio para el reconocimiento del plásmido (*attP*). Se conoce que el evento de recombinación ocurre a través de las 58 pb presentes en el sitio *attP* (pSAM2) y *attB* del cromosoma (*Streptomyces lividans*). Este plásmido puede integrarse también en sitios específicos del genoma de *Streptomyces lividans* y *Streptomyces coelicolor*.

Cuando el pSAM2 se encuentra libre en el citoplasma se replica de manera autónoma, se transfiere con una alta eficiencia, presenta la capacidad de movilizar marcadores cromosómicos y forma "pocks".

El mapa funcional de este plásmido fue determinado por Smokvina et al. (1991); al analizar la secuencia, se encontraron 7 ORFs los cuales son transcritos en la misma dirección y son los siguientes:

El gen encargado de la transferencia principal del pSAM2 es *traSA*, el cual sintetiza una proteína de 306 aa; esta proteína tiene algo de similitud a nivel de secuencia de aminoácidos, con la proteína Tra del pIJ101. El producto de *traSA* es esencial para la transferencia intermicelial del plásmido y formación de "pocks". En el pSAM2 se identificaron cuatro ORFs: *spdA* (224aa), *spdB* (58aa), *spdC* (51aa) y *spdD* (104aa), los cuales son los encargados de la transferencia intramicelial. Los cuatro genes son leídos en la misma dirección; parece haber acoplamiento traduccional, ya que el codón de término de un gen y el codón de inicio del siguiente gen, están separados por pocos nucleótidos, de tal manera que las secuencias Shine-Dalgarno se encuentran muy cercanas al término del gen anterior. Mutaciones en los genes *spread*, influyen en el tamaño de los "pocks", en la eficiencia de la transferencia y son requeridos para una transferencia intramicelial (Hagege et al, 1993b). El sistema Kil-Kor también se encontró en este plásmido, ya que el producto del gen *korSA*, puede controlar la expresión de los productos del gen *traSA* (Hagege et al, 1993b), y una cepa sin *korSA* no es viable.

Plásmidos libres:

La mayor parte de este tipo de plásmidos, caracterizados físicamente, se replican por el mecanismo del círculo rodante y son plásmidos multicopia. Dentro del género *Streptomyces* son los plásmidos más estudiados, en la mayoría de los casos han sido desarrollados como vectores de

clonación, por ejemplo: el pIJ101 (Deng et al, 1988), el pSN22 (Kataoka et al, 1991) y el pJV1 (Bailey et al, 1986).

Características del plásmido pIJ101.

El pIJ101 (Fig.8) es un plásmido circular, multicopia (300 copias por cromosoma), el cual fue aislado originalmente de la cepa de *Streptomyces lividans* ISP 5434, este plásmido está formado por 8.830 Kb presentando una composición de G+C de 72.98%, lo cual es característico del DNA de *Streptomyces* (Kieser et al, 1982).

La secuencia completa de este DNA ya ha sido determinada (Kendall y Cohen, 1988). Se han identificado varios genes que se encuentran involucrados en la transferencia del plásmido y asociados con la presencia de "pocks". Además ciertos genes desempeñan funciones específicas en la letalidad de la cepa receptora del plásmido (genes *kil*), mientras que para otros su función radica en codificar productos que controlan la expresión del fenotipo *kil* (genes *kor*). Los productos formados por los genes *kor* regulan negativamente su propia expresión, así como a la expresión de los genes de tipo *kil* a nivel transcripcional (Kendall y Cohen, 1987; Stein et al, 1989; Stein y Cohen, 1990).

Al analizar la secuencia del pIJ101 se encontraron 7 ORFS o marcos de lectura abiertos, los cuales se identificaron y correlacionaron con las propiedades fenotípicas específicas. Dos de los ORFS encontrados (*korA-korB*) codifican para proteínas represoras que controlan la expresión de varios promotores encontrados en otros genes en el plásmido. Las secuencias predichas de aminoácidos para estos ORFS no muestran regiones de homología con algunas otras proteínas represoras conocidas; aunque las secuencias de aminoácidos encontradas presentan un motivo (hélice-vuelta-hélice), el cual es común para proteínas que se pegan a regiones específicas del DNA.

En cuanto a las funciones de transferencia se localizaron cuatro ORFS: el primero codifica para una proteína Tra de 77 KDa, mutaciones hechas en regiones de este gen afectan la transferencia primaria del plásmido (Kendall y Cohen, 1988). Mediante inserciones se ha demostrado que los otros 3 ORFS (*spdA*, *spdB* y *kilB*) codifican proteínas involucradas en la diseminación del plásmido; éstas presentan tres fuertes dominios hidrofóbicos, lo que sugiere que

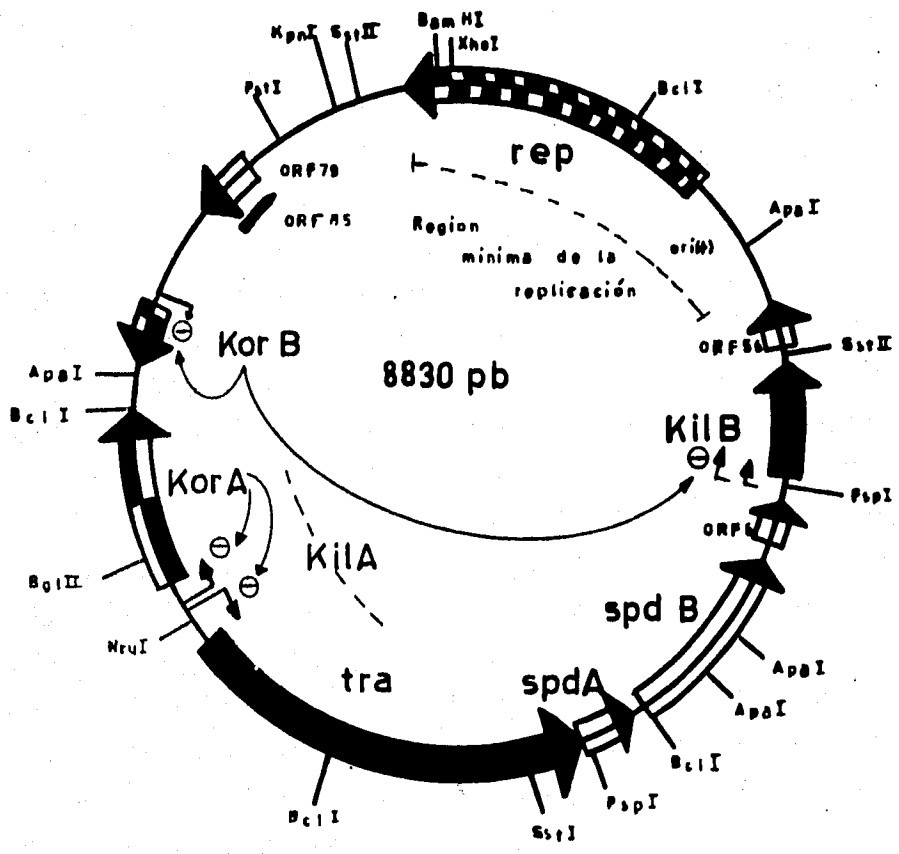


Fig.8 Mapa físico del plásmido pIJ101 por Kendall y Cohen 1988.

pueden estar asociadas a la membrana ayudando a la diseminación de los plásmidos a todo lo largo de las hifas.

El pIJ101 se transfiere con una alta frecuencia (100%) además de presentar la capacidad de movilizar marcadores cromosomales presentes en la cepa hospedera.

El pIJ101 se replica por el mecanismo del círculo rodante, ya se identificaron las siguientes regiones: el ori (+), la proteína de replicación (450 aminoácidos) y el ori (-) por Kendall y Cohen, (1988) y Zaman et al, (1993).

Características del pSN22.

El pSN22 es un plásmido multicopia el cual se aisló originalmente de la cepa *Streptomyces nigrifaciens*, (Fig.9) se encuentra constituido por 11 Kb (Kataoka et al, 1991a). Este plásmido ya fue secuenciado completamente, al realizar el análisis estructural y funcional sobre las regiones involucradas en la transferencia, se identificaron cinco genes, dos de los cuales se encuentran implicados en la transferencia (*traA* y *traB*) y otros en la formación de "pocks" (*spd*). La transferencia intermicelial se encuentra controlada por el gen *traB* de este plásmido, aumentando la fusión celular en la cual se da un contacto entre los micelios de la cepa donadora y receptora del plásmido favoreciendo la fusión entre células (Kataoka et al, 1991a). Por otra parte el gen *traA* promueve la transferencia intramicelial del plásmido una vez que el plásmido ha pasado al micelio receptor, además *traA* es esencial para la formación de "pocks", lo que sugiere que la cantidad apropiada de producto de este gen inhibe el crecimiento de las células del micelio receptor durante la transferencia del plásmido, manifestándose la existencia de zonas circulares de inhibición del crecimiento y la esporulación.

Los genes responsables de la diseminación o spread (*spdA* y *spdB*) facilitan el movimiento de los plásmidos a todo lo largo del micelio receptor (Kataoka et al, 1991b). Las mutaciones efectuadas en estas zonas, afectan el tamaño de los "pocks".

El gen *traR* forma un producto (Kor) regulador tanto de si mismo, como de los productos formados por los genes *kil* (*TraA* y *TraB*), de tal manera que mutaciones realizadas en *traR* son letales para la célula, manifestandose de esta forma la expresión del fenotipo Kil.

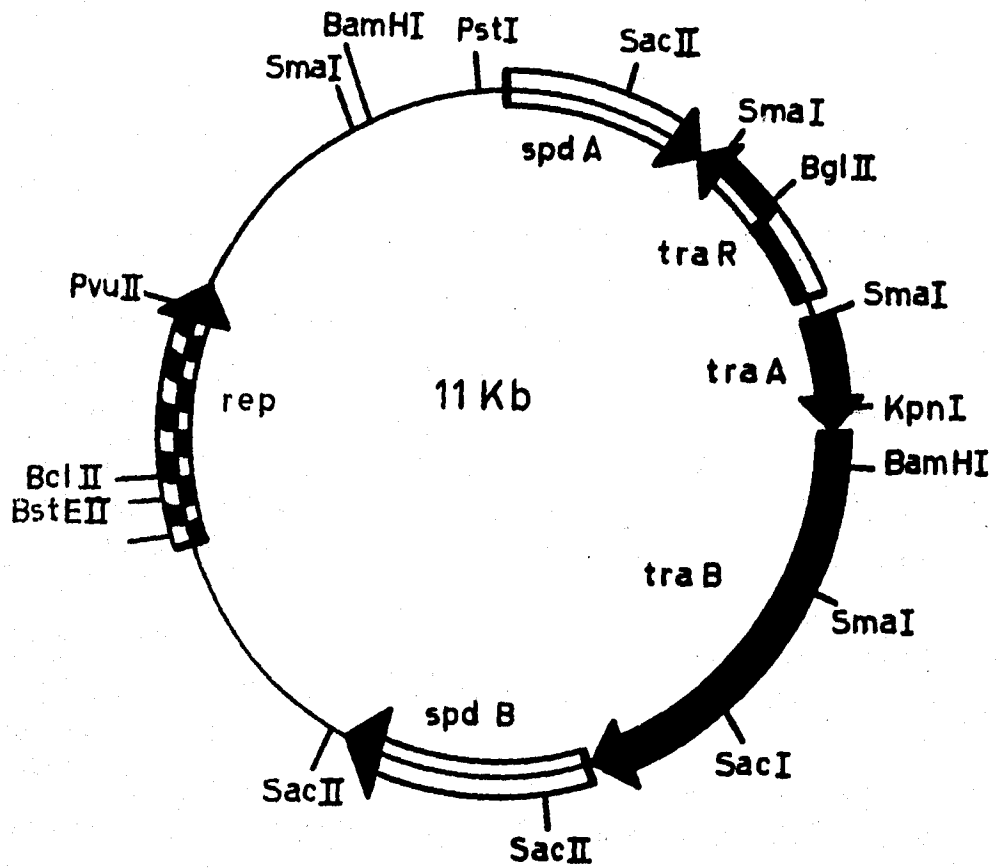


Fig.9 Mapa físico del plásmido pSN22, por Kataoka et al, 1991.

El pSN22 se replica por el mecanismo del círculo rodante, la región esencial mínima para la replicación se encuentra localizada en un fragmento de 1.9 Kb (Kataoka et al, 1994a), en donde se localiza un gen para una proteína Rep y un ori(+) prácticamente idénticos a los del pIJ101.

Características del pJV1.

El pJV1 es un plásmido multicopia, (Fig.10) que fue aislado originalmente de la cepa *Streptomyces phaeochromogenes* NRRL B3559 (Doull et al, 1983). Se encuentra formado por 11.14 Kb de longitud, se replica por el mecanismo del círculo rodante a través de intermediarios de cadena sencilla, es un plásmido multicopia (150 copias por célula) y presenta la capacidad de formar "pocks" (Bailey et al, 1986).

El pJV1 ya fue secuenciado completamente (Servín et al, 1994). El análisis de la secuencia ha demostrado que existe homología de las regiones *tra* y *spd* con las del pSN22. El análisis hecho sobre la región esencial del pJV1 identificada por Bailey et al, (1986) reveló la presencia de un ORF que codifica la proteína (Rep), la cual está formada por 523 aminoácidos. Este análisis efectuado sobre la región esencial (Servín, 1993) mostró un modo de organización similar, al reportado para el plásmido pIJ101 (Kendall y Cohen, 1988), encontrándose que las secuencias de aminoácidos que componen las proteínas (Rep), tienen una identidad del 30% aproximadamente. La proteína Rep del pJV1 presenta un motivo muy conservado, que es muy similar al reportado para todas las proteínas (Rep), el cual contiene una tirosina involucrada en hacer un "nick" en el origen de replicación (ori +). El ori (+) también fue identificado, se encuentra comprendido entre 3368pb-3438pb y se conoce también el sitio exacto para iniciar la replicación (Servín, 1993). Aún no se conoce la secuencia que forma el origen menos.

Se encontraron ORFs equivalentes a los genes *traR*, *traA*, *traB* del pSN22. También existe homología significativa en la región de los genes *spd*. Con excepción de *traR*, todos se encuentran alineados en la misma dirección y posiblemente están constituyendo un operón, al igual que en el pSN22. Curiosamente el pJV1 parece carecer de un gene *spdA* que se encuentra en el pSN22. A pesar de que el pJV1 y el pSN22 muestran gran similitud a nivel de los genes *tra* y *spd*, la similitud de las proteínas Rep es mucho más baja, ya que la proteína Rep del pSN22 solo muestra un 30% de identidad con la del pJV1, pero un 98% con la del pIJ101. Esto parece ser un fenómeno muy similar al encontrado por otros plásmidos que se replican por intermediarios de

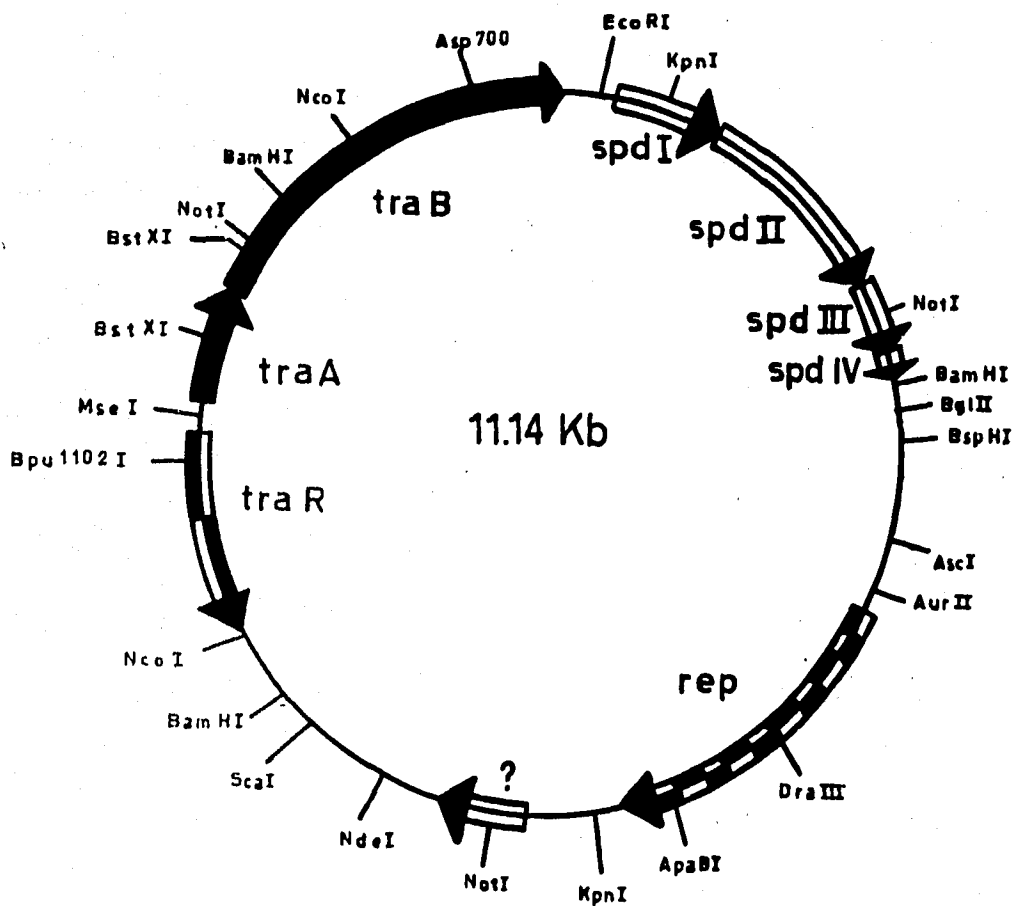


Fig.10 Mapa físico del plásmido pJV1, por Bailey et al, 1986.

cadena sencilla, los cuales presentan una estructura modular (Gruss y Ehrlich, 1989); de esta forma el pSN22 parecería estar formado por un módulo de genes *tra* y *spd* similar al del pJV1 y un módulo Rep similar al del pIJ101, (Servín et al, 1994).

Los genes responsables de la transferencia intermicelial, la transferencia intramicelial y diseminación o (spread) del pJV1 codifican para proteínas muy similares a las del pSN22, además de presentar una alta similitud entre las regiones intercistronicas, (Servín et al, 1994).

Aunque ya se tienen identificados por homología, los genes involucrados en la transferencia y diseminación del pJV1, no se conoce si el funcionamiento de estos es parecido a los del pSN22, tampoco se sabe si se presenta un sistema Kil-Kor. Estos últimos puntos son el principal tema de estudio de este trabajo.

Objetivos.

1. Caracterizar los genes de transferencia en el plásmido pJV1 de *Streptomyces phaeochromogenes*.
2. Comprobar la localización y función de los genes de transferencia (*tra*) y diseminación (*spd*) del pJV1.
3. Comprobar la localización y función de los genes responsables del fenotipo Kil-Kor del pJV1.
4. Demostrar la habilidad de recombinación cromosomal del pJV1.

MATERIAL Y METODOS.

Preparación de esporas de *Streptomyces*.

Las cepas de *Streptomyces lividans* se purificaron realizando estrias sucesivas en cajas de Petri conteniendo el medio rico R5, de manera que se obtuvieran colonias aisladas después de varios días de incubación a 29 °C, las cuales se dejaron esporular completamente. Para obtener cantidades suficientemente elevadas de esporas se tomaron con un asa estéril las esporas de una colonia aislada y se resuspendieron en un volumen pequeño (aproximadamente 0.5 ml) de agua desionizada estéril, el cual se distribuyó en la superficie de una o varias cajas de Petri de medio rico R5, a este último se le adicionaron además los requerimientos de cada cepa. De esta forma se obtuvo un crecimiento confluyente, el cual después de varios días de incubación esporuló abundantemente. Las cepas utilizadas de *Streptomyces lividans* fueron la TK64 (pro-2, str-6) y la cepa TK54 (his-2, leu-2, spc-1) por Bailey et al, (1986).

Cosecha de las esporas.

- Se agregaron 10 ml de agua desionizada estéril a cada caja de Petri y las esporas fueron raspadas con un asa estéril. La suspensión de esporas se tomó con una pipeta de 10 ml y se filtró a través de tubos con algodón estéril.
- Se agregaron otros 5 ml de agua estéril a la caja, para extraer las esporas que se hubieran quedado en la caja, y este volumen fue también filtrado a través de algodón.
- Las esporas filtradas se colectaron por centrifugación en tubos estériles de tapón de rosca, se lavaron con 5 ml de agua estéril, se volvieron a centrifugar y finalmente se resuspendieron en 1 ml de glicerol al 20% estéril.
- Las esporas se mantuvieron en viales a -20 °C, hasta utilizarse.

Obtención de micelio para transformación.

Para preparar el micelio a ser transformado, se utilizaron matraces de 250 ml con un resorte de acero inoxidable en el fondo, para obtener una buena dispersión del micelio. Se colocaron en el matraz 25 ml de medio YEME con 34% de sacarosa, MgCl₂ 5mM y glicina 0.5%, y se inoculó el medio con 0.2 ml de esporas concentradas. El cultivo se incubó con agitación vigorosa durante dos días a 29 °C. Posteriormente el cultivo de cada matraz es vertido

en tubos de plástico estériles con capacidad de 40 ml, añadiendo 10 ml de una solución estéril de sacarosa al 10.3%, y el micelio fue cosechado por centrifugación a 5000 rpm durante 12 min. El sobrenadante se eliminó y el micelio se resuspendió en 15 ml de sacarosa al 10.3% estéril y fue centrifugado bajo las condiciones mencionadas con anterioridad. El sobrenadante fue desechado y al tubo se agregaron 6 ml de la solución de sacarosa, el micelio se resuspendió en este volumen y se dividió en 3 tubos limpios y estériles a los cuales se les adicionaron 2 ml de la solución de sacarosa al 10.3% por tubo. Estos tubos se centrifugaron a 3500rpm durante 10 min, los sobrenadantes se desecharon y los tubos con los pellets de micelio fueron almacenados en el congelador a -20 °C, hasta el momento de ser utilizados.

Transformación.

Para la transformación bacteriana se preparó el buffer P como describen Hopwood et al, (1985), con la diferencia de que se dejó reposar 1 hora, después de añadir todos los componentes, y se filtró a través de un filtro Millipore de 0.45 µm de poro, para eliminar cualquier material precipitado.

- Un tubo con micelio de la cepa TK64 fué descongelado a temperatura ambiente mezclando suavemente con golpes del dedo. Se agregó una solución estéril de lisozima 1mg/ml en buffer P al tubo con micelio, resuspendiendo con una pipeta de 5 ml, para homogenizar la muestra. El tubo con la mezcla se incubó a 29 °C, y cada 20 min se tomaron muestras para observarlas en un microscópio de contraste de fase, hasta que la mayor parte del micelio se hubiera transformado en protoplastos.

- Posteriormente se tomó todo el volumen con la pipeta y se filtraron los protoplastos a través de algodón estéril, el cual se lavó con 5 ml de buffer P, para bajar la mayor cantidad de protoplastos que hubieran quedado atrapados en el filtro de algodón.

- El volumen total fue pasado a un tubo estéril y los protoplastos fueron centrifugados a 3500 rpm durante 10 min.

- El sobrenadante se decantó y los protoplastos se resuspendieron suavemente con los nudillos, se adicionaron 5 ml de buffer P para lavar y nuevamente se centrifugaron bajo las mismas condiciones.

- Nuevamente se decantó el sobrenadante y el "pellet" de protoplastos, se resuspendió suavemente. A los protoplastos resuspendidos se les adicionó el DNA en un volumen pequeño (generalmente 10 ml) e inmediatamente se añadió 0.5 ml de PEG 1000 al 25% (W/V) en buffer P. Se mezcló subiendo y bajando 4 ó 5 veces toda la mezcla con una pipeta Pasteur y posteriormente se adicionaron 5 ml de buffer P y se volvió a centrifugar bajo las condiciones mencionadas con anterioridad.
- Se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió suavemente con los nudillos, agregando 500 μ l del buffer P, realizándose diluciones hasta 10^{-2} .
- Los protoplastos, ya sea concentrados o diluidos se distribuyeron en cajas de medio rico R2YE, previamente deshidratado, con ayuda de agar suave de transformación (2.5 ml por caja).
- Se dejó solidificar el agar suave a temperatura ambiente y se incubaron las cajas a 29 °C.
- El antibiótico fue agregado 18 hrs después del término de la transformación, para seleccionar las colonias transformantes. Con la excepción de las colonias que fueron transformadas con el plásmido silvestre, a las cuales no se les agregó el antibiótico.

Extracción de DNA y confirmación de la estructura de los plásmidos ("minipreps").

1.- Cada una de las distintas colonias transformantes de la cepa TK64 (con los plásmidos) de *Streptomyces lividans*, fueron crecidas en forma de sectores en cajas con medio R5 con 50 μ g/ml de thioestreptona. Las cajas fueron incubadas a 29 °C hasta tener completamente esporulados los sectores.

* Para las colonias transformantes de la cepa TK64 con el plásmido silvestre, no se adicionó el antibiótico (thioestreptona) a las cajas con medio rico R5.

2.- Se cosecharon las esporas con un asa estéril y se inocularon en tubos estériles con 2.5 ml de medio Luria (LB) y 2.5 μ l de thioestreptona, incubando con agitación constante durante 3 días a 29 °C.

3.- Se pasaron los diferentes cultivos a tubos eppendorf previamente etiquetados, los cuales se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min. Se eliminó todo el sobrenadante con una trampa de vacío.

- 4.- Se resuspendieron los "pellets" de micelio en 100 μ l de buffer TE25mM (Tris-Cl 25mM, EDTA 25mM pH8) y la lisozima a una concentración de 2mg/ml.
- 5.- Las muestras fueron incubadas por lo menos media hora a 37 °C, hasta que el micelio se apreciara visiblemente lisado, dando un aspecto translúcido y viscoso.
- 6.- Se adicionaron 200 μ l de una solución fresca de NaOH 0.2N, SDS 1%, y se mezclaron bien los tubos por inversión vigorosa, hasta observar una mezcla transparente, homogénea y viscosa. Las muestras fueron incubadas durante 10 min en hielo.
- 7.- Se adicionaron 150 μ l de acetato de potasio 3M pH4.8, mezclando bien por inversión, hasta perder la viscosidad y apreciar un precipitado blanco. Se incubó durante 15 min en hielo.
- 8.- Se añadieron 400 μ l de fenol/cloroformo (1:1), agitando 30 seg en vórtex y centrifugando 2 min a 14,000 rpm.
- 9.- Se pasó la fase acuosa a otro tubo eppendorf limpio previamente etiquetado y se agregó 1 ml de etanol absoluto frío. Posteriormente se dejó precipitar 5 min a temperatura ambiente.
- 10.- Se centrifugó 10 min a 14,000 rpm, desechándose el sobrenadante con una trampa de vacío evitando llevarse la pastilla o "pellet".
- 11.- El pellet se resuspendió en 50 μ l de buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM pH8), adicionándose 150 μ l de acetato de sodio 4M pH6, mezclando bien por inversión. Se incubó una hora a -20 °C.
- 12.- Se centrifugó 10 min a 14,000 rpm en la microfuga; se pasó el sobrenadante a un tubo eppendorf limpio, al cual se agregaron 200 μ l de isopropanol, dejando precipitar la muestra durante 10 min en hielo.
- 13.- Se centrifugó 10 min a 14,000 rpm en la microfuga; eliminando todo el sobrenadante con una trampa de vacío. Se resuspendió el pellet en 45 μ l de buffer TE10mM, se añadieron 5 μ l de acetato de sodio 3M pH6 y 125 μ l de etanol absoluto frío; dejando precipitar la muestra por 10 min en hielo.
- 14.- Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. Eliminando todo el sobrenadante con una trampa de vacío.
- 15.- El pellet fue secado y resuspendido en 25 μ l de buffer TE 10mM.
- 16.- Se comprobó el patrón de restricción de cada una de las "minipreps", empleando las enzimas adecuadas para cada caso en particular.

* Para las colonias transformantes de la cepa TK64 con el plásmido silvestre (pJV1), se inocularon en tubos con LB sin el antibiótico.

Purificación de fragmentos de DNA en geles de agarosa de bajo punto de fusión (LMP).

- 1.- Después de efectuar la electroforesis de las muestras y tefir el gel en una solución de bromuro de etidio 3µg/ml, se iluminó con luz ultravioleta (uv) de onda larga y se cortó la banda de interés.
- 2.- La rebanada de agarosa se colocó en un tubo eppendorf y se fundió 65-70 °C durante 10 min.
- 3.- Se calculó el volumen de la agarosa fundida y se agregó 1/10 de volumen de NaCl 5M, mezclando perfectamente, dejando la muestra otros 5 min en el mismo baño.
- 4.- Se puso la agarosa fundida 5 min en otro baño a 37 °C, al terminó de los cuales se adicionaron al tubo con el DNA 2/3 de volumen de fenol saturado con NaCl 5M (precalentado a 37 °C), se agitó de inmediato la muestra con el DNA y el fenol saturado en vórtex durante 30 seg.
- 5.- Se centrifugó inmediatamente durante 5 min a 14,000 rpm, y se pasó la fase acuosa a un tubo eppendorf limpio previamente etiquetado.
- 6.- Al fenol se le añadieron 45 µl de buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM pH8) y 5 µl de NaCl 5M y se agitó en vórtex.
- 7.- Se centrifugó 2 min a 14,000 rpm y se mezcló la fase acuosa con la del paso 5.
- 8.- Se adicionó un volumen de fenol/cloroformo (1:1) a la fase acuosa, se agitó durante 15 seg en el vórtex y se centrifugó 2 min a 14,000 rpm.
- 9.- Se pasó el sobrenadante a un tubo limpio y se repitió el paso anterior, pero solo con cloroformo.
- 10.- Se pasó el sobrenadante a un tubo eppendorf limpio y se añadieron 10 µg de tRNA y un volumen de isopropanol (no se añadió tRNA a los DNAs que serían desfosfatados, con fosfatasa alcalina posteriormente).
- 11.- Los DNAs se mantuvieron a -20 °C por lo menos 2 hrs.
- 12.- Las muestras fueron centrifugadas en la microfuga, durante 10 min a 14,000 rpm; se extrajo todo el isopropanol con una micropipeta.
- 13.- Se secó el pellet a 50 °C durante 15 min.
- 14.- Se resuspendió la muestra en un volumen adecuado de buffer TE 10mM.

Tratamiento con la fosfatasa alcalina.

- La reacción de la fosfatasa alcalina se llevó a cabo en un volumen de 50 μ l totales. Se utilizó el buffer proporcionado por el proveedor de la enzima (Boehringer-Mannheim).
- 1 μ l de la fosfatasa alcalina se agregó los primeros 20 min a la mezcla a 37 ° C.
- Se agregó otro μ l de la fosfatasa alcalina a la mezcla y se dejó otros 20 min a 37 ° C.
- Para inactivar la fosfatasa alcalina, se empleó la extracción con fenol/cloroformo, como se describe a continuación.

Extracción con fenol/cloroformo.

- En un eppendorf se agregó una mezcla de 50 μ l de TE 10mM con el DNA del plásmido, a la cual se adicionaron 50 μ l de una solución de fenol/cloroformo (1:1); el tubo fue pasado por vórtex durante 30 seg.
- La muestra se centrifugó en la microfuga 3 min a 14,000 rpm. Se pasó la fase acuosa a otro eppendorf y se agregaron 50 μ l de fenol/cloroformo (1:1), el tubo fue pasado por vórtex durante 30 seg.
- Al tubo inicial que queda con los 50 μ l de fenol/cloroformo, se agregaron 50 μ l de TE10mM, para extraer lo más que se pueda de DNA, la muestra fue pasada por vórtex durante 30 seg.
- Los tubos se centrifugaron en la microfuga 3 min a 14,000 rpm.
- Se pasó la fase acuosa del segundo tubo a un tercer tubo con 50 μ l de cloroformo, dando vórtex 30 seg, mientras que la fase acuosa del primer tubo, se pasó al segundo dando vórtex 30 seg.
- Ambos tubos se centrifugaron 3 min a 14,000 rpm.
- La fase acuosa del tercer tubo fue pasada a un cuarto tubo, mientras que la fase acuosa del segundo tubo se pasó al tercer tubo, se aplicó vórtex 30 seg y nuevamente se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 min.
- Se pasó la fase acuosa del tercer tubo y se agregó con los 50 μ l presentes en el cuarto tubo. A los 100 μ l totales se agregaron: 1 μ l tRNA, 10 μ l acetato de sodio 3M y 100 μ l de isopropanol, mezclando por inversión el tubo.

- La muestra se puso a precipitar en el congelador a -20°C por 2 hrs. Se centrifugó 10 min en la microfuga a 14,000 rpm.
- Se extrajo el sobrenadante con una punta estéril y el pellet fue resuspendido en 20 μl de TE 10mM a 50°C durante 15 min.
- Se corrió 1 μl de este volumen en un gel de agarosa de alto punto de fusión (1%), para saber qué tanto DNA fue recuperado.

Cruzas genéticas.

Cruza control.

Se agregaron 20 μl de esporas concentradas de la cepa TK64 y 20 μl de esporas concentradas de la cepa TK54, en una caja de medio R5 con histidina y leucina. Se agregaron 200 μl de agua para facilitar el plateo de las esporas, las cuales se esparcieron sobre la caja con un asa de vidrio estéril. Las cajas fueron incubadas a 29°C durante 5 días, al término de los cuales las esporas de la crua fueron cosechadas y almacenadas en una solución de glicerol al 20% a una temperatura de -20°C .

Cruzas con los distintos derivados del pJV1.

Se realizaron de la misma forma que la crua control, solamente que una de las dos cepas (normalmente la TK64) contenía alguno de los derivados del pJV1.

Diluciones de las esporas y cuantificación de las mismas.

Las esporas de los *Streptomyces* son resistentes a los cambios osmóticos, por lo que las diluciones fueron realizadas en agua desionizada estéril.

Se tomaron 10 μl de esporas concentradas y se diluyeron en 990 μl de agua estéril; siendo ésta la dilución 10^{-2} . Apartir de esta dilución se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} , pasando por vórtex cada dilución, para homogenizar las muestras.

Para la cuantificación de las colonias, las diferentes diluciones se agregaron en volúmenes de 100 μl por duplicado, en cajas con medio R5 con histidina y leucina. Las cajas fueron incubadas a 29°C hasta poder contar las colonias presentes en cada dilución, empleando un plumón indeleble.

Cuantificación de la transferencia de plásmidos y de la movilización del cromosoma.

Para determinar la transferencia del plásmido se hicieron diluciones de las esporas resultantes de las cruzas, hasta 10^{-6} . Normalmente la cepa donadora fue la TK64 (Stm R) y la receptora fue la TK54 (Spc R). De esta forma, para conocer la frecuencia de transferencia se dividió el número de colonias obtenidas en medio MMCY con espectinomicina y thioestreptona entre el número de colonias obtenidas en el mismo medio pero únicamente con espectinomicina. Para la cruzada recíproca se utilizó estreptomina en lugar de espectinomicina. Para cuantificar la movilización de marcadores cromosómicos se dividió el número de colonias obtenidas en medio mínimo con espectinomicina y leucina (sin histidina) entre la suma de las colonias obtenidas en medio MMCY sin antibióticos. De esta forma se midió el paso del marcador His⁺ de la cepa TK64 a la cepa TK54.

Determinación de la capacidad de formación de "pocks".

La manera por la que se pudieron visualizar los "pocks" fue la siguiente. Se agregaron 10 μ l del concentrado de esporas de la cepa TK64 con la dilución 10^{-6} (200 μ l) de la cepa TK64 con el plásmido, en cajas con medio R5. Con un asa de vidrio se espatularon estas esporas por toda la superficie de la caja y se incubaron a 29 °C durante 5 días, al término de los cuales se apreciaron los "pocks" en el crecimiento de tipo confluyente. De esta forma se aisló el plásmido silvestre (pJV1).

Manipulación de DNA.

Deleciones con enzimas de restricción.

- Con el empleo del mapa de restricción y el análisis de la secuencia del plásmido pJV1, se planearon diversas deleciones con enzimas de restricción para la localización y función de los genes de transferencia, los genes responsables de la diseminación y los genes involucrados en la manifestación del fenotipo Kil-Kor.
- Se comprobaron las digestiones enzimáticas en geles de agarosa al 1%/Buffer TBE teñidos con bromuro de etidio 3 μ g/ml.
- Se corrieron las digestiones en geles de agarosa 1% y geles de agarosa de bajo punto de fusión 0.6%, de estos últimos se purificaron las bandas de interés con el método mencionado con anterioridad.

- Para los extremos no cohesivos, se hicieron extremos romos para lo cual se empleó la enzima Klenow.
- Los plásmidos se ligaron con la enzima ligasa T4, a temperatura ambiente por lo menos 12 hrs.
- Los DNAs fueron almacenados en 25 μ l de buffer TE 10mM a -20° C.

Medios y buffers.

a) Medios de cultivo y soluciones.

Los diferentes medios de cultivo empleados en este trabajo, se esterilizaron en el autoclave a 120° C y 15 libras de presión, durante 20 minutos.

La esterilización de las soluciones de antibióticos, se hizo por filtración, a través de filtros millipore de 0.45 μ m de poro.

MM (medio mínimo)	100 ml agua desionizada por botella
	0.1 ml elementos menores (estériles) por botella
	1.5 g agar (por botella)

Soluciones accesorias que se agregan al medio mínimo después de esterilizarlas en el autoclave.

(NH ₄) ₂ SO ₄ 20%-----	1ml
MgSO ₄ .7H ₂ O 0.6%-----	1ml
Glucosa 50%-----	1ml
Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ 1M pH7.2-----	1ml
Elementos menores-----	0.1ml

Elementos menores:

ZnSO ₄ .7H ₂ O-----	0.1%
FeSO ₄ .7H ₂ O-----	0.1%
MnCl ₂ .4H ₂ O-----	0.1%
CaCl ₂ -----	0.1%

MMCY Se le añaden además de lo anterior:

Casaminoácidos 20%-----	1ml
-------------------------	-----

Extracto de levadura 10%----- 1ml

R2YE Sacarosa----- 103g
 K₂SO₄----- 0.25g
 MgCl₂.6H₂O----- 10.12g
 Glucosa----- 10g
 Difco casaminoácidos----- 0.1g
 Agua desionizada----- 800ml

* Poner 2.2g de agar a cada una de las botellas.

* Agregar de medio 80 ml por botella.

** Soluciones que se agregan después de autoclavar.

KH₂PO₄ 0.5%----- 1ml
CaCl₂.H₂O 3.68%----- 8ml
L-Prolina 20%----- 1.5ml
TRIS-HCl 3% pH7.2 ----- 10ml
Trazas R5----- 0.2ml
CuSO₄ 2mM----- 0.2ml
NaOH 1N----- 0.2ml
Extracto de levadura 10%----- 5ml

* Agitar cada que se agregue una nueva solución.

R5 (Medio sólido en el cual esporulan muy bien los *Streptomyces*).

K₂SO₄----- 0.25g
MgCl₂.6H₂O----- 0.12g
Glucosa----- 10g
Difco casaminoácidos----- 0.1g
Trazas sin autoclavar----- 2ml

Difco extracto de levadura----- 5g

Trisma Base----- 3g

**** Aforar a 1 Lt con agua desionizada.

Ajustar el pH7.2 con HCl

Poner 100 ml de medio por botella.

Agregar a cada una de las botellas 1.5 g de agar.

** Soluciones que se agregan después de autoclavar:

KH_2PO_4 ----- 1ml

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ----- 0.4ml

L-Prolina 20%----- 1.5ml

NaOH 1N----- 0.2ml

CuSO_4 2mM----- 0.2ml

* Agitar cada que se agregue una nueva substancia.

YEME (Medio empleado para crecimiento de micelio, cual fué usado para posteriores transformaciones).

Extracto de levadura----- 0.3g

Bacto-peptona----- 0.5g

Extracto de Malta----- 0.3g

Dextrosa----- 1.0g

Sacarosa----- 34g

* Aforar a 100 ml con agua desionizada.

* Después de esterilizar agregar la siguiente solución.

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1M----- 0.125ml

Glicina 10%----- 0.625ml

Luria(LB)

Bacto triptona-----	10g
Extracto de levadura-----	5g
NaCl-----	10g

* Ajustar a pH 7 y aforar a 1 Lt con agua desionizada.

* Acada una de las botellas agregar 1.5 g de agar y 100 ml del medio.

LB con Sacarosa (para la extracción de los plásmidos).

Bactotripton-----	1%
NaCl-----	1%
Extracto de levadura-----	0.5%
Sacarosa-----	30%

Ajustar el pH 7.2 y aforar a 100 ml con agua desionizada.

** Los tiempos para el secado en la campana de flujo laminar varian según el medio de cultivo empleado: el medio R2YE (para la transformación de protoplastos de *Streptomyces*) se necesitan de 3 a 4 hrs de secado; para los medios como el R5 (para la esporulación de los *Streptomyces*), MM, MMCY (para las cruza genéticas) y LB (para la extracción de los plásmidos), se emplean de 15 a 20 min de secado.

Buffer P (empleado para el mantenimiento osmótico de los protoplastos durante la transformación).

Sacarosa-----	103g
MgCl ₂ .6H ₂ O-----	2.02g
K ₂ SO ₄ -----	0.125g

* Aforar a 400 ml distribuir este volumen en botellas de 40 y 60 ml para esterilizarlas.

** Agregar después de esterilizar las siguientes soluciones.

	40 ml	60 ml
Trazas R5	100 µl	150 µl
KH ₂ PO ₄ (0.5%)	0.5 ml	0.75 ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O (3.68%)	5.0 ml	7.5 ml
Tris,HCl (3%, pH7.2)	5.0 ml	7.5 ml

* Todo el material (vasos de precipitados, probetas, etc.) debe estar bien limpio y enjuagado varias veces con agua destilada y desionizada, para eliminar cualquier resto de detergente.

TABLA I. CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS.

Cepa	Antibiótico	Auxotrofías
<i>Streptomyces lividans</i> TK64	Estreptomina ^R	pro-2
<i>Streptomyces lividans</i> TK54	Espectinomicina ^R	his-2, leu-2

Plásmido	Características
pJV1	(Silvestre formado por 11.14Kb de longitud).
PB2	(Se encuentra formado por 10.5Kb, carece de los genes de diseminación (spread) y presenta un origen híbrido).
PB53	(Se encuentra formado por 12.8Kb; al pB2 se le incorporaron los genes spread, provenientes del pJV1).
pB50	(El gene de <i>tsr</i> , se encuentra insertado en el sitio único de <i>BglII</i> del pJV1).
PB57	(Fragmento de <i>BamHI</i> de 5.7Kb del pB50 recircularizado, sin genes <i>tra</i> y <i>spread</i>).
pB58	(Delección del fragmento de <i>NcoI</i> del pB50, eliminando los genes <i>tra</i>).
pB59	(Delección del fragmento de <i>BstXI</i> del pB50, eliminando el final del gen <i>traA</i> y el principio del gen <i>traB</i>).
pB75	(Inserción del gene <i>tsr</i> , en el sitio único de <i>Asp700</i> del pJV1, con lo que se interrumpe el gen <i>traB</i>).
pB76	(El pB50 digerido con <i>BpuI102I-EcoRI</i> , la banda de mayor tamaño se trató con la enzima "Klenow", con esta mutación se quitaron los dos genes <i>tra</i>).

Tabla I. Nos muestra las cepas de *Streptomyces lividans* que fueron empleadas como cepas hospederas para los experimentos de clonación, así como los distintos derivados del pJV1. La cepa donadora de los plásmidos fue la TK64, mientras que la cepa empleada como receptora fue la TK54; con la excepción de la cruce realizada al inverso, en donde los papeles se invirtieron.

*** Se utilizó como control negativo, una cruce la cual no contenía plásmidos.

Cruzas genéticas.

Las características de los distintos derivados del pJV1 radicadas en la formación de "pocks", en la eficiencia de transferencia y la movilización de genes cromosomales, fueron llevadas acabo con las características de las cepas empleadas y plásmidos, lo cual se aprecia en la tabla Núm.I, con esto se crearon las siguientes condiciones, seleccionándose en cada una de ellas una característica en particular.

TABLA II.

Condición	Colonias que son capaces de crecer
MMCY	Total de las colonias TK64-TK54 con y sin plásmidos.
MMCY+thio	Solo crecen las colonias que presentan el plásmido con la resistencia al antibiótico (thiostreptona).
MMCY+thio+Str	Solo crecen las colonias de TK64 con plásmido.
MMCY+thio+Spc	Solo crecen las colonias de TK54 con plásmido.
MMCY+Spc	Crecimiento de todas las colonias de la cepa TK54 con y sin plásmido.
MMCY+Str	Crecimiento de todas las colonias de la cepa TK64 con y sin plásmido.
MM+Spc+Leu	Solo crecen colonias recombinantes, producto de la movilización de genes cromosómicos entre ambas cepas.

Tabla II. Nos muestra las diferentes condiciones empleadas, para hacer los estudios cuantitativos de los diferentes derivados del pJV1.

RESULTADOS

DELECCIONES E INSERCIONES DE LOS DERIVADOS DEL pJV1.

Con el empleo del mapa de restricción (Fig.11) y el análisis de la secuencia (Fig.12) del pJV1, se planearon diversas mutaciones con enzimas de restricción para determinar la localización y función de los genes responsables de la transferencia, los genes encargados de la diseminación, así como los genes involucrados en la manifestación del fenotipo Kil-Kor del pJV1.

Aislamiento del plásmido silvestre.

El pJV1 fue introducido a *Streptomyces lividans* (cepa TK64) por transformación en cajas con medio R2YE. Las cajas fueron incubadas a 29 °C hasta observar los "pocks". Se picaron con palillos estériles las zonas centrales de los "pocks" y se sectorizaron en cajas con medio R5, las cuales se incubaron a 29 °C hasta que los sectores se encontraran bien esporulados. Las esporas se rasparon con un asa estéril y se inocularon en tubos con 2.5 ml de LB con sacarosa, incubados a 29 °C por 3 días. A las diferentes muestras se les realizaron minipreparaciones para la obtención del plásmido y se digirieron con la enzima *Bam*HI. Esta enzima corta al pJV1 en 3 fragmentos de diferente peso molecular: 4.6, 3.6 y 2.5 Kb.

Aislamiento del plásmido pB50.

Este plásmido presenta la inserción de un fragmento de *Bc*II de 1.1 Kb que contiene el gen de resistencia a thioestreptona (*tsr*) en el sitio único de *Bg*III del pJV1 (Fig.13), lo cual facilitó la cuantificación de la presencia del plásmido por selección de colonias resistentes al antibiótico.

El pB50 fue introducido a la cepa TK64 por transformación en cajas con medio R2YE y thio, las cuales se incubaron a 29 °C hasta observar una esporulación total de las colonias transformantes. Las colonias se cosecharon con palillos estériles y se sectorizaron en cajas con medio R5 + thio. Las cajas se incubaron a 29 °C hasta tener bien esporulados los sectores. Se inocularon las esporas en tubos con 2.5 ml de LB y 2.5µl de thio, los cuales se incubaron a 29 °C durante 3 días. Se realizaron minipreparaciones a las diferentes muestras y se digirieron con

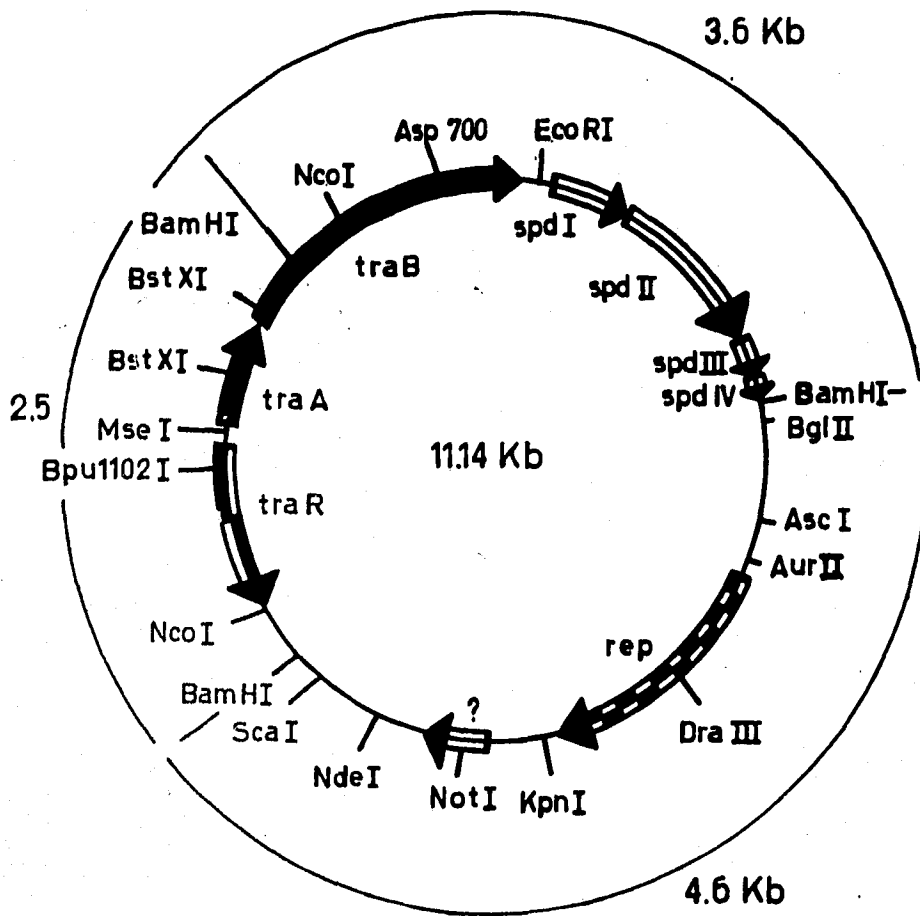


Fig.11 Mapa físico del plásmido pJV1, por Bailey et al, 1986.

EcoRI

1 GAATTCACGCTCAAGCGCGTGTGAATCGGCCGACACCGGCCGACACCGCCCGGACACACCCCGGACACCCACCCCGGACAGCAAGCGGGCCGA

101 CCCGGAGGCAACCGGATCGGCCGAGACACCGAGGAAACCCGTGAAGCCGAGCCCGATCCCGCCCTCGGGCCGAGATCACCGACGCGGAGCT
FM N A E P Q Y P A L G R Q I T D A E L

201 CCTCGCCGACTCCTGCCCAGACCCGCGCCGCGCGGAGCCACCGCCCGGCGCCCGGTCGCGGCCCGCCCTCGAGGTTGCCGG
L A A L L P D T A A G A E P T A P A A P V P V A P P V L D V A A

301 CTCCTGGAGCTGGCCCGCTCAGGCGCTCTGGAGGCGACCGTCCAGGCCAGGCCCGCCCGTCCCGGCGGAAGACAAGTTCTCTCCGGCCGCTCT
L L E L A R R Q G A L E A T V Q A Q A A P V P A E D K L S S G P L

401 CTCCCCTGGCCGCGCTACCGCGTGGCCCGTCCGCATCGGCCCGGACCCCTGCTCCTCGGCTGGGCGCTGACCTCCTCGCCCGGGAGCCGC
S P R W A A G T A V A A V G I G A G T L L L G W A L D L L A A G A A

501 CGCCGTCATGGCCGGATCAGCGCCGCGCCCGATGCTCATCGTCCGCGCGCTCCTGGTCCGCTCGCCCTCGGCGCGCTCCAAGACCGGCAACGAC
A V M A G I S A A A P M L I V G A V L V A A L L G R R S K T G N D

601 GGGTTCGAGATCAGCGAGACCATCACCCAGACCATCACCCAGACCGTCAAGGCGCGTGGCCGCGGTAAGCTCGACACCCAGCGCAGGTGGCCAGCGC
G F E I T Q T I T Q T I T Q T V K G G G R R End

701 GGAGCGCGTGTCCAGCTCGTGGATCATGCTCTCGGGCCGTCGCTTCTCGGTCCTCAGGTCACCCCGCTCGTGCAGCGGTCACCCCGGACGAG
E R V L Q L V W I I V F G A V A F S V L T V T P L V Q R V T P D E

801 TGGACTGGACCGCTGGTCTCCCGTCTCCGACACCGCGTCTCATCGTCCGAGTCCGACTCGATCGTCCGCGCCCTCGACGCGCCCGCCG
W D W T A W L L P V V S D T A V V I V V R V D S I V A R L D G R P

901 GCGGATGCGCCGCTCTCCGCTCGCTCACCGCGGATGACCTGCTCCTCAACGTGGGCGACTCGATGCTCAAGAACGACTGGTGGCGGTCCGCGT
G G W P A F L R W L T G G M T L L L N V G D S H L K N D W V G V G V

1001 CCACCGGTCGCCCCTGTGCTCATCGTCAACCGCGAGCCGCGCTCGGTCGCGCGCGGATCACACAGGCGGTCGCCCGCATCGACCGTGAAGCGG
H A V A P V L L I V T A E A A L G W R R A I T Q A V A R I D R E R

1101 GCGAAGAGCGGAGCGGAGGACCGTGAAGCGGAGGCCCGGAGAGGCGCTCACGGGCGGAGCAGAAGCCCGTCAGGAGGCGGAGCGGCGGAGCGCG
A E E R E R Q D R E R Q A R E E R S R A E Q K A R Q E A E Q A E R

1201 AGGTCAGGAGCGGCTGGCCGAGGAGCGGAGGCGGCGGCGGAGCGTGAAGCGGAGCGGCGGAGGCGGAGGCGGAGGCGGAGGCGGAGGCGGAG
E R Q E R L A E E R E R R A A A E R E R Q R E H E A K L A R E E R E

1301 GTACCGCCCGCATCGAGGAGGCGGCGGAGGCGGCGGAGGCGGAGGCGGAGGCGGAGGCGGAGGCGGAGGCGGAGGCGGAGGCGGAGGCGGAGG
Y A A R I E Q E R A E R E A A R E Q A A R E D A A R Q R K E E Q E

1401 CGAGCGGACCGGCTCCGCGTGAAGGAGGAGAAAGCCGAGGCTGAGCGCAAGGACAAGGAGGCGGCGGAGGCGGAGGCGGAGGCGGAGGCGGAGG
R A D R L R R E Q D E K A E R E R K D K E A A Q A A E R A R K A A

1501 AHGCCCCCGTACGCCCCCGCGTGAAGCGGCTGAGCGCGCTGAGCACGCCCGCGCGGCTGAGCGCCACCGTGAAGCAGCGGCTCCCGAGGCGGCTCAG
E A R R T A P P V S A A V S T P R P A V S A T V S T P A P E A A H D

1601 CSTCCCGGAGG
V P D A K K K L P V D K A L M V L A D A L R D G R S Q R Q I V A L

1701 ACCGGCAGGAGCTCCGCTGGTCCGAAAGCACTGCCAGGCGCTCACGTCCGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
T G R S S G W V A K H C Q A L T S G K K A E E V A A End

1801 CGGCACGCGAGGTGAAGCGGAGATCGCCCGACCGACTCAAGACCGGCTGCTTCTGGCCTTCGTCGGCGCGTGAAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
A H A E V K A E I A R T D S K T G L L L A F V G A V M A G A W T T

1901 GCGAAGGACCTCCGCTCACCTCCCGGTACCTCGTGGCGGTGCTGGCCTCGCGCTCCTCTGGTCGCGCCGGGCTCGCGCTCCAGGCGGTCCGCC
A K D L P L T L P A Y L V G G A G L A L L L V A A G L A L Q A V R

2001 CCAACCTCGGCGCGCGCGGCTTCACTCTGGCGACCTCACCCCGCAGCAGCTCGTCCGACCACCGAACTCGGACCTCGCCCGGACATCGT
P N L G G G R G F I L W A T L T P Q Q L V A T T E T R D L A A D I V

2101 CGGCCTGGCCGGATTGCCGTCGCAAGTTCGTGCTCTGCGCGCGCGGTGACCTCGTCTCGCCCGCGGCGCTTCTCTCGTGGCGGCTGATC
G L A R I A V A K F V L L R R A V D L V L A A G A F L L V A A L I

2201 GTTCTCGGAGGTCCCTGTGACCCGCGCGGACAGAGCAGAACGGCTACGCGGGCCACCGCGCGCAGAGCACGCCGACGACCGCACCGCAACGCG
V L G G A L End

IM T R P G Q K Q N G Y A G H R P Q S T A D D R T G N N A
IV →

2301 TCGGGCCACGAGGCCCGACACCACCGCAAGGCCAAGGGCCCAAGGCCTCTGACCCGACACAGCCCGCGGATCCACCGGCGGGCTCTCTTCG
R G H E A P D T T R K P K G P K A S End

BamHI

2401 GCCTCCAAAGTCACACAGCCCTCGCACAGTTCCTGGACTTTCTGGACCCCTACGCGGGGGCGTCCGACAGCCCTCGGCCACCGCAACGAA
BglII

2501 CGCCCCCTCGCCCCAGTTCGCCCCGGGGACCGTCAAGATCTGGCCCGCGACGTACTGCTACGTGAGACCCCGCCCGCGCTGACCAGCAGGA
2601 AGGACCGCAGATGAACTCATGAGACCCCTACGCGCGCGGGACCGGTAAACGCTGGGCCGCCACTCCGTCATACAGCCGAGAGAGAGAGAC
2701 CGCACAGTGGCACAGAGGCACTCCGAGCAGGGGAACAACCGCCCGCAGCGCCTACGCTCGGAGACGGCGGGCCGACCTCCAAAGGAGGAAT
2801 GCCCCGTCGCGCCAGTTCGCTCGCCGACCCAGCCCGACTTCCCGGACTGTGGTCTGGCGGAACCCCGACGCGCTTCTTCGCTGCGCTGGG
2901 GCTACTCGCAGAGCTCGCCGCGCGCCGTGTGGTGGAGCTGGTACTCACACAGGAGCACGCCGACGTCTGCTCTGACGACCGTGGGCGCTC
3001 TGAGGCATCGCGCGCGAGCCACGCGTGAAGCGGGGATGCGCGAGGATCTACCCGACAACTCCAGAAAAAGGAAAGCCAGGGGTCTAATCCCT
3101 GACCGCTTCTGACGTCACCCGCTACCAACCAAGGACTCGTCTGTGTCCAGCGTAAGGAGCGTTTGGCTCCGCAACCCCTCTTTGATCGGGCGC
3201 CGACTCAGTCGCGCGCGCGCTCCCGCGGGCCCGGTTGCCGCTGGCGCGCCCTCACGATCACCCCGCAAGGAGCCAGGAGTTTCTGCTCCGA
3301 GGCCTGCAAGAGCGCGCGCGCGCGGAAGCCGCGGACCGAGCCGCGCGCGTGGAGACCGCCCTGGCAAAAAGGAGGCTAGTATAA
3401 GGGTTGACAGAGTTTCCACCCCGCACTGACCAACGACTTTCCGGAAGTGGCAGTCTGGGAGGAACGGGAGAGTCCGAGAGGGCGGACCCCTTCGG
3501 AACAGACCACAAGGCGCGCGGACCGTGGCTACGCCGTACCAGGGCCGCAAGGTGCTCAACCGGGTCTCCGGATCGACCGCTCGGGCGGTCCGG
IM L N R V S G I D A C G G C G
IV →

3601 GCGCGGGTCTCGACCCGACCCGCGTGTACTACGCAAGTCGAGCGTGGGTACGTCGTCAGGATCGGCTGGTCCGCTCGGGCGGATCTGGTTC
R R V L D P D T G V I Y A K S S R G Y V V T I G L V R C G R I W F

3701 TGCCCGGATGCTCCTCGCGATCCGCGTGGCCGACCGAGGAGATCAAGACCGGTGCTCGGGCACCTCGCCCGCGGCGACGCTCGCCGTGTCG
C F E C S S A I R R G R T E E I K T G A L R H L A A G G T L A V V

3801 TCCTCACCCCGGATAACCAAGACCCGACCTCGACAGCCTGTCGCGCGCTCTGGGGCGGCTCTCTGGACGACAAGGGCGCCCGCTCTCGA
V L T A R H N Q T T D L D S L V A A L W G G P L L D D K G A P V L D

3901 CCGGTCGGCAAGCCCGCGCGCGGTCCTACAGCGGATGCTCAGGCCCGCGCTTCTACGCGCCCTGAGGCCCGCGCACCCGGAAGGAC
R S G K P R R A P G A Y Q R M L T A P A F Y G R P E A R R T R K D

4001 GGAACCGAGTACGTCGCGTCCGCTGAGGACCGCATCCGCCACCGGATCGGCTACATCGGATGGTCCGCGCGGCTGAGGTCACCCGCTCCAGAAGAAGC
G T Q Y V R P A E D G I R H R I G Y I G M V R A A E V T R S K K N

4101 GTTACCACCCCACTCAACCTGCTGGTCTTCTCGGGGGGAGCTCTTGGCACCCGGCCAAAGGTGACGTCGTCGGACACTTTGAGCCCTCCGAGAC
G Y H P H L N L L V F L G G E L S G T P A K G D V V G H F E P S E T
4201 GGACCTGGGGGACTGGGAGGACTGCTCCGGGAGATGTGGGGGGGGCCCTCAAGCGGGCTGACCCCAAGTTGAGCCCTCGACCGACTCGGACACCCCC
D L G D W E D W L R E M W A G A L K R A D P K F E P S T D C D T P
4301 GGCTGCAAGTCAAGGGCAAGGGCCACGGCGTGTGGTCTCGATCGTCCGGTCAGCTGACGACGTCGCGCTGATCGAGTACCTCACCAGAACCCAGGACG
G C K C K G K G H G V M V S I V R S A D D V A L I E Y L T K N Q D
4401 GGAAGCGAGAGCGGCCGACTCCGTGACCCAGGACCTCGAAGCCGCGCGCAGCTGCGATGGAGACCGCCGCTCGACTCCAAGACCGGCCGGGGCCG
G K R E R P D S V D Q D L E A A G A A M E T A R L D S K T G R G R
4501 GAAGTCCATGACCGCGTCCAGATCCTTACCGACTGTGGGACATCGAGTCCGCGGGCTCGACCCCGACATGGCCGAGGGCTACGGCAGCCGGAAGCAG
K S M T P F Q I L Y R L W D I E V A G L D P D M A E G Y G T P K Q
4601 CTGCGCGCTGGTGGGCCAGTACGAGGAGCCCTCCGCGGACGACGCGGATCGAGTGGACCCGAGGCTCGCGCGGACGTCGACCTCGACCGGTGACG
L R A W W A Q Y E E A L A G R R A I E W T R G L R R H V D L D G D
4701 ACGACGAGGAGACCGACCTCCAGTACGTCACGAGCCGGAGGCGCGCGCTCGACCGTGGCGTGTCTCCCTCACCTCCGACCGGATGCCCTGGTGTGCGG
D D E E T D L Q Y V Y E P E A A P L D G G V V L T S D A M R L V V G
4801 AGCCGACGCTGAACCTCGACCTCGACGACGTCGTCGCGCGGAGGCGTACTACTCCGCGGTTGACGTCGTCACCGGCTCGGAGGACGTCGGGATCACGTCG
A D A E L D L D D V V R A E A Y Y S A V D V V T G L G G R A D H V
4901 CGGGTCGCTACCGCCGAGGAACCTCGGGAGGTGCAAGGAGTGTGTTCGCGCGGACCGAAGCCGCGGAGGAGGACGCGCCAGCGCCGAATCGCGG
R V A T A E E L A E V Q E V L F A R T Q E R A E E S R R Q R R I A
5001 AGCAGGAGCCGAGCAGCCCGCCGATCGGAACCGGAGGAGCTCGCGCGGTGCTCGGGTCTGCTGTCAGGACGCGCGCGGACGACGAGGACGACTC
E H E A E Q A A A H R K R Q E L A R C L G L L V R Q R G G T Q D D S
5101 GCGCGCGGACAACCTCGTCCGCGACATCCACGCGAAGCGGTGACGACAACCCCGGTTGTGCGCCCGACCGTCCCGGTCGACGCGGAAACCCCGGGT
A A D H F V A H I H A N R End-----> <-----
5201 GACCGAGGCGCGGGCGTAACCTACCTAATACTCGCTCCGCTCCCTACTCGGAGAAGCCCGGGCCGAGAGTCCGGCGCCACGAT
-----><-----
5301 GACGGGCGCTCGATCCCTCCGACCTCCACCCAGTCCAGGTCGCGCTCGATCGCGGTCAGCGGACGCTTATCTCGCTCCGGATCTGGACA
5401 TCGGGCGCTCGCGGAGAGGGCGTGTGTGTCTCATGGCGCAGTCTCCGTGCGGTGAAGCGGTACGCTTCGCGCGGACTTCGTGTCGACCTGAG
5501 CGGTCAACCTCAGGATCAGCAATGCCCTCGGGTCCGACGCCCCCGGAAAGGTTGTCGAAGGGTGACACGTCGCCGTGCACACCGCTGCACGCG
5601 AGCCGTATGGCCCGCCATACCTTGGTACTTCGGGAGCGTGTACCGGTGCAAGCCCGCGCTCGACCTGGTCGAGGTACATCTCGTGAACCTTCG
5701 TGAACCGTCTACCGCGCGGTGCAACGGTCTCTCGCGTGTGTGCGGCTCTCGTGAACGCGGTTCTGTCGATGCATTTGGTGTGGCGATGAG
M W A N S
5801 TTCGAGCGGTA:TCCTGGTGTCTTCGTGCTCGATCGCGGCGCGCTGTTGGTCCGGCATGAACGGGACCCAGGACACGAGCAGCCACCGAGTTC
S S A Y S W S S S C S I A A A L V G P G M H G D Q E H E Q P T E F
5901 GCACAGATCGAAGCGCGGATGATCCGACTGCGCTCACCGAGGAGGTGGCGGAGTGTGACGACCCGCGAGTGTGCTGCTCGCTCGCGCGT
A Q I E A R M I R T A L T D E E W A E L I E H R P S L P A S L A A
6001 ACGAGCGGTGGGAGGCGGAGTCAAGGAGCGGGTGAAGTGGCGCGCGCAGTACTAAGGCGCGGCGATTCTGTTGACCGTCTCTGTTGTCG
Y E R W E A E V E T K A G End
6101 TCATCGCGCGCGGCGCACCTCATAGCGTCCGCGCGAGCTCCGCGATCAGCGGACGAGTCCGAGCGCTCCGCGCGAGATCGCGGTC
6201 ATGGCGACGGGCTGATCGCCAGGATCGCGAGCCCGAGCACCGCGAGCGGCAAGGGCGTACGGGTCGATGGGCAITGGTGTCTCTGTTGTCGACA

6301 AAAAGTCTCCGCCCGGACGGGACGGGTGGTCCGTAGGTTGGAGGACGGGTACTTAGGCCGCAAGTCACGTCTCCACCCCTTAGCGGGGGCTCGA
6401 CCGGTCGAGACAGTGAAGGGGCTATCGCGCCCTCCGCTCCCATATG^{3'}CGGATTGCAGCGGAACCTCCCTAGACCATTTCGGCGCGGTTCGGGCTCGC
6501 CCGGCGGCTCTGCACGGTCGGGCACACCGTCCGTAGGGCCCGAAGAGGGCTCACCAACGGGTAGGGAGTCGAATGCTCGGTCTGCTCCAGGGATGGTTG
6601 GTAGGACGGCTGGAGGGCGGGACCGAGGTTTGGAGACTTTTGGACCGTCTACGGCGCGGGCGCGGTGGGGACCCGGTCCGTCTGCTATCCGGCC
6701 GGGCGCGCGCGGAGCGCGGGCGGAGACAGAGCGGGCCCGCGGCTCGGGCCCGCGGCCCGGAGGGCCGCTTGATGGATAGGAAAAGTTGTACC
6801 GCGCCCTTCGAGGGCCCCAGGTCGTCCGCATACGGTCGACCCATGACGTACGACACCCCGGAGACGGCGAGGGCGACCCGCTGTCCGCGTGGTGC
6901 GGAGCCCGATGACGAGCCCGCACAGCCCGCGCGAGTACTGCCCGGCTCTGGCCGACGCGCCCTACGAGGACAGCGCCCTCCGTGAGGCC
7001 AGCGGAAGCGGTGGTAGCCGCTCTCCCAAGGCCGCTCTCCGCACTTCCGTTTCGTACGTGACGATGCCCGACTCCTCCGATCCGTCACGTGACGA
7101 AACGTTGCGCTCCCGGATCCCCAGCTAGTCGGCCGGTGGTGGTCCCGTGGCGAAGTCCCGCGCCTCCGAAGGAACACCGCCCGGTGGCGAGGG
7201 ATGGGTTTGTGGTACGGCGGATCGCGGACCGGTGCCCGGGACGGCCCGCAGCGCTGGGATCAGCTCGACTGCCTTAGCCACATCGCGGTAGCAGCTG
7301 CTCCCCTCAGCCCGAGACGGGGGTGGGTGGCTCAGCGCCCGTCTGGTTCGACGGCGGGGTACGGCCCGCCCGCCACTCCCGGCCCGCAGAGC
7401 GCGGTTTAGCGCCGTGACCCACCCCTCCCGCGTCAAGCGCCTTTGCCCGCCGAGCGGCCCGCAGCCGCGCACCGGCCGTCACGAGGATTACGG
7501 ACCTTGGGCGCCCTCCCGTACGGTCGGAGAGCGTGAAGAAGCCCGCCAGCGCCCGCGGGGGCGGCTATGTCAGGGGTGAGGAAGGTCACTCGCC
7601 ATGGGACCCCGGGCGGGGGGTAGACTCTCCAGTACCCAGTCCCTCTCGTCTGTTGGAAGGTACGGTGGTACCATGACGGCGACAGCGG
m p v r a g p a y v d e w y g l a r e d d h f t v t t v m v a v a s
7701 AGTGGGCGGAGCGTGGATCTCCAGCGCGCCAGCTCGTCTGGGAGCCCTGGCGTGGCGGGCGTCTCTGGCCCTTACGACCTCGCGCCGGTGG
h p p a d i e l a a l e d q a a q r a h a t r q g k v v e r g t r
7801 CTCGGTGTAGAGTGGTGAAGTGGCGGACCATCCGCTCGTCCGCGCGAGTTCGGCCAGCGCGCGGAGGTGTGGGGGGTAGACGAGACCGCGAGC
e t y l q d f q a v m r e d q g l e p v a a v t h p p y v s v g v
7901 GAGGAGGGCTTGTCTGTCGACCGGAAGACCGGATCGCGATCACGGCCTCGTCCCGGGTCCAGGTCCAGCGCGCGCAGACCTCCGGTCTGACACGG
s s p k d d q r f v r i r l v a e d g p e l d l a a c v e p d y v s
8001 AGCGTGCATGACCCGGTGGCGGAGGAGTCTCTCCGGTGGTACCGCTTCCGTTCTTGGCCATACGGTCCGACCGGTCCCGCGCGGTGATGACGAT
r q m v r h g s s t e g p a y r k g n k a m r d i r d a g t i v i
8101 CCGGACTTCGCCACGACGGTGGCCAGCGCCCGCGTGAAGTGGAGTCCACGGCTTGGACACAGCCAGAGCACGGCTCACGGTCTTGGCAGCGGAGC
p a k a v v t g l a g r s t v l g v r k i v a i a r s v t k a a v
8201 TCGAAGTGTGGCGATGTCGGTACCGAGGGAGTGGTCCGCGCGCGAGTTCGCGCGCTTGTATGGCGACCGGTAGTGTCTAGCGACCGTCTCGGT
d f q q r i d t v s p l a d g p a l e g a k i r s r y h e a v d a y
8301 ATCCCGCGCCCTGTCCTGTATGCCATGACTCCTCTGTTTGTGGATCAACCGTCAATGTCGAAGGTACATCAATGACCCCTCCGAAGGTACATCCTT
g a g q a r y a m
8401 GCGTGGTGGTCTCTCATGTACCTCAGGACGTCGCCAAGGTGCTTAAGTACCTAGTGGCGGACTGATGTGTACCTTCGTCGAGAGGTGAGTCACTG
fM
8501 GCAACCAGGAATGTCGCCCGCAGCGGGCCAGACCCGCAACCACTCGTGGCCAGAGCGCGCACGGCAACAAGTTCGGGGATCCCGTGCCTTCGCTG
A T R N V P P Q Q G Q T R N T T R G Q S A H G N K F A D A G A F A

8601 GCGGTCCTCTCGGGCGGATGGGCGGACGCTTGTCCGCGGATCAACCTCACGGTCAACTCGGGTGGCGGCGGGGGGCGTCAAGTCCCCCGCCCTCGCG
G G L L G A M G G S F V P P I N L T V N S G G G R G G Q S P A A S R

8701 TACGCCCACTTCATGCTGGGGAGCCGACGTTCCGCTCGACCGATGACGTCGGCAACTACTGCAACGGCGTCCGGCTCTGATGCTCCAGTGGCGATC
T P H F M L G E P T F A S T D D V R N Y C N G V R A L M L Q C A I
BstXI

8801 GAGCTCGGATGGGCGCAAGATCCTGGAGGCGGGCTCGCCAGGCCAGCCGCTCCCGGACGACACCCTCGATCCAGCGGAAGCTCCGGCGGATGAAG
E L A M G A K I L E A R L A Q A Q P L P D D T P I Q A K L R A M K

8901 TCGCCCGAAGCTCAAGCGCGCGCCGAGCGGCACCGCGCGCGGAGAACGGCTCGCGCTACGGCGCTTCAGCGTGTAGTACGGCGGACCTGAT
V G R K L K R A A D G A T A A A K N A V A A Y G A F Q R E Y A D L M

9001 GCGTCGCGCCCGCAAGCAGCGTCCGGCCAGACACCCTGTCAGTTCGAGGAGCAGCGTCAAGGAGGAGCAGCGGACAGCGGCGCTCCCG
R P R P K Q R P A Q T T P F Q F End fM V R N T Q Q Q D G L P
traB→

9101 GCCGTCACCTCGTACGGCAGCACCTTCAAGGGCGTGGCCCTGGCACGTGACCAAGCCGTTGCTCCGCGCGTGGGCGGTCCGCGGTCAACGGTCTGGCG
A V T S Y G S T F K A W A H H V T K P F V P P W A V A G V T G L A

9201 GCGCGGGCGCAACCTCTGTGGCAGGGCTCGCCCTGGCGGGCGTGGGCTCACCCCTCGGGTGGTCCGCTCACCGGCGCACCTGGGCGGGCGGGT
G G G A N L L W Q G S P W A G V G L T L G S V A L T G A T W A A G V
BstXI

9301 GAAGACCGTTCGGCAGCGCGTCTCCTCCGCAACCGTGGCGGGCGCTCGCGCTGGAGCAGCGGCGCGGATCAGCGGGCGGCTCTCCGGCCCG
K T G R Q R R L H S A I T V A A A S A W T T A A A I S G P L S G P

9401 CTCGCGACCTTACCTGATGGGCGCGCGCTCTCCGCTCTCTGGAACATCCGCGCGTCTCGCGGCGGGATGGCGAGACGTCGCGGAGTCCGG
L P D L Y L M G G A V L A L S W N I R R V L A A G H A E T S G E S

9501 CCGACAGGGCCCTCATGGAGAGGTGGGCTGGCGCGCACCTCTCAAGAACGTAAGGTGAGCGCAACAGGTGACCGCTCGTACGAGCTTCGGCG
A D K G L M E K V G L A R T L L K N V K V E P N K V T A S Y E L P A
BamHI

9601 GGGCGAGCTCACCAACGAGACCTGGGCAAGCGCGGACCGGATCGGCTCCGCGTCCGACGTCGCCACCGCGCCATCCGGATCCAGCAGATCCGGAC
G E L T N D D L G K A R D R I A S A L D V P T T A I R I Q H D P D

9701 TCGGCCGCGCGGACCGATCGTCACTCGTCCCGAGGACATGCTCAAGACCGGACGATCTGGCGCGCGCGTACGC CCCGGCGGATCCGTTGGAGTCC
S A R R G R I V I V P E D M L K T P T I W P G P Y A P G E S V E V

9801 CGCTGCGGATCGGGCTTACGACGCGGTGCGGACCTCGTCTCGCGCTCTGGCCGCAATCCAGTCTCGTGGTATGGGATGACCGCTCCGGCAAGAC
P L R I G V Y C D G A D L V L P L L A A I H V L V M G M T G S G K T

9901 CGAGGGCGCCTCGACCTCTGCTCGAACTCTTACCCGCGCGACGTCGTGGTCTGCTCGCGGACGGCGCAAGAGCGCGCAGGACTCCAGCCGCTG
E G A L D L L E L F T R R D V V V W L A D A A K S G Q D F Q P L
NcoI

10001 CTCGCGCATGACTGGGCGCGCTCGACACCCTCGCGCGCGCGATGTCGCGCGCTCCAGGCGTCACTCCCTGCCGTCAGCGCTGGCTGCGTG
L P A M D W A A L D T P S A A A M V A A V Q A V I P A R T A W L R

10101 ACCACGGCTACCGGGCTGGGAGGCGCGCGCGCGCGGCGCAGACCAACCGGGCGACTCTGCGCAAGGAGCGCGCGCTCGGCTGGCGAGGGAT
D H G Y R A W E A A A A R R Q T N P A H S C R K D G R A C G C D G M

10201 GGCCTACCTGCTCGCTGGTTCGAGGAGCGCGAAGCTCCTGCGGAGCTGGGGCAGGCGTTCACCGCATCGCCAGGAGGCCCGTCCGCGCGC
A Y L L A W F E E A A K L R E L G D D V F T G I A Q E A R S A G

10301 GTCTGCTCGTCTTCGATGCGAGCGCGCTCCGGCTACCAGCTCTCCACCGACAGGAGCGGCGCTCCCGCGCCATGTGCTCGGAGTGAAGGGG
V S L V Y S M Q R A S G Y Q L S T D T R A S L P A A M C F G V K G

10401 ACGACGCTCGTTCGCGCTGCGGAGGAGGTGCTCGACGCGGGCGGACCGGCGCGCTGGGCGCAACAAGCGCAAGGGCTACGTGACCTGCTCCCGC
D D A S F A L P E E V L D A G A D P A A W G N K R K G Y V Y L V S A

.Asp7001 .

10501 CGAGGTGGACGAGGACCTGCACGCCACCCCGGCGCACCTTCTGGACCGGCCCGTCGGGCGAGTACGAGCGGATGGCGGAGTACGTGGTGAAGCAGTTC
 E V D E D L H A T P A R T F W T G P S G E Y E R M A E Y V V K Q F

10601 GCGAAGCTCCGGGCCCGCTGGACGCCCTCACCGCGGCGCCCGGAGAAGGCCGTGGGGAGTCTTCACCCGCGCGCGGAGCGGGCCCTCGGCAACC
 A N V R A A L D A V T A G A A E K A V G E F F T R R R E R A L G N

10701 AGGCTGCCTGACCTCGGCGTGGAAACCGACCGGCGACCCGCTCCTCGATGGTCTCGCGGAGCAGGAGTCCGCCAGGCGGTCCGCCCGCTCGTCGACGA
 Q A A S T S A S E P T G D P L L D G L A E Q E S A Q A V A A L V D E

10801 GGAGGACCAAGGAGCTCGACGTCAACCGACCTCGACCCCGTGGAGACGGACATCGCTCTCCCGCGGCCAAGCCAGCCCGGAGGAGGCCCGGAGCTC
 E D Q E L D V T T D L D P V E T D I A L P A A K P S P E E A R E L

10901 CTGGAGACATGGTCCGATGCTCCCGGGTCCGCCCGGCGGTCGGGTCAAGGACCTCGGCCGTACCTGGAGCAGCTCGGCCGGGACCGGAGCT
 L E D M V A M L A G V G P G T V A V K D L G P Y L E Q L G R D R S

11001 GGGTCTCCAAGCAGATGCCGGATGGCCTCCGAGGGCGGCTCCGCCCGACCGCGAACAGGGCGTCTACCGCCTGGTGCCCGTCCCGCGCGGCGTG
 W V S K Q M S R M A S E G R L A P T A E Q G V Y R L V P V L A A A End

11101 ACCGCCCGCACCCCGCACACCCCGCACAGCCGCACAGCGC

Fig 12. Secuencia de nucleótidos completa del plásmido pJV1. La secuencia está numerada a partir de la primera base del único sitio de reconocimiento para la enzima *EcoRI*. Se muestran las secuencias de aminoácidos de la proteína de replicación (Rep); así como las proteínas responsables de la transferencia (TraA y TraB); las proteínas responsables de la diseminación del plásmido (SpdBI, SpdBII, SpdBIII y SpdBIV), las proteínas involucradas en la manifestación del fenotipo Kil-Kor (TraA, TraB y TraR) y una proteína de función desconocida (codificada entre los nucleótidos 5787 y 6038)

Se marcan en la secuencia de nucleótidos, los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción con las cuales se realizaron las mutaciones mencionadas en el texto. Las secuencias de reconocimiento para las enzimas se encuentran subrayadas.

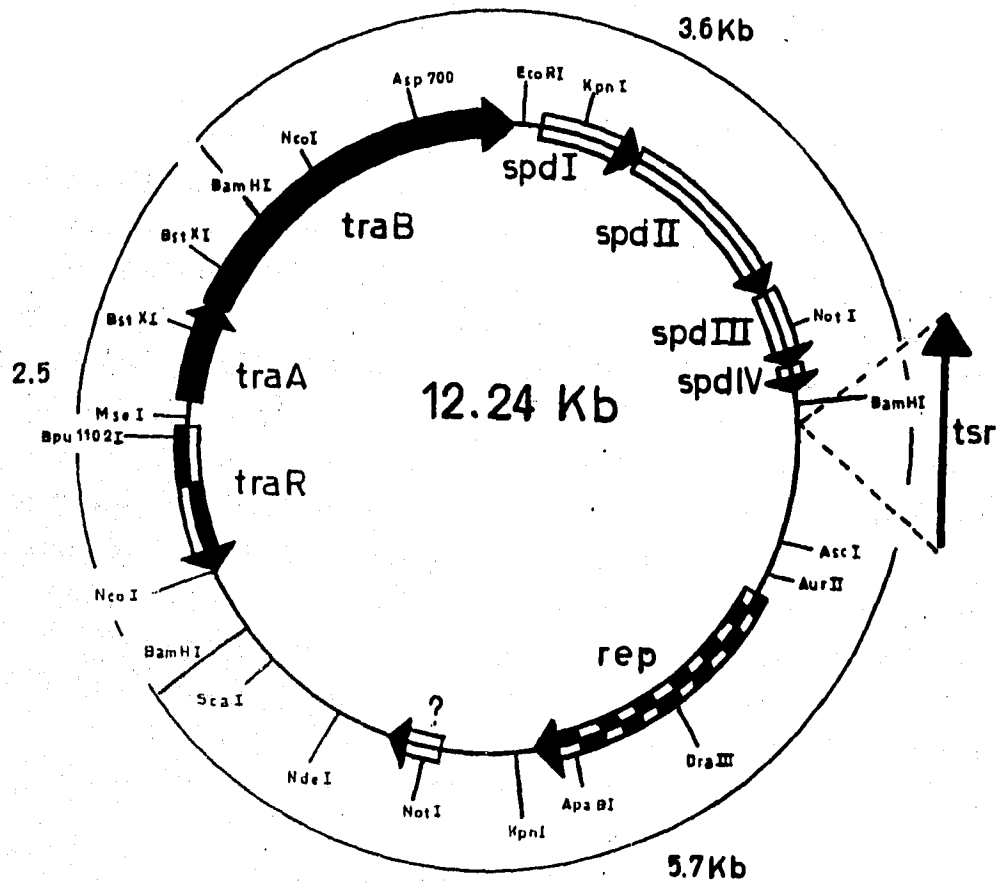


Fig.13 Mapa físico del plásmido p B50.

*Bam*HI para comprobar la presencia del plásmido. El patrón de bandas es similar al encontrado en el plásmido silvestre, solo que la banda de 4.6 Kb es de 5.7 Kb por la presencia del gen *tsr*.

* El pB50 también se introdujo por transformación a la cepa TK54.

** En las diferentes cruzas hechas con este plásmido, se observó la formación de los "pocks".

Aislamiento del plásmido pB2.

Este plásmido contiene un origen de replicación híbrido y fue generado *in vivo* al cointegrar al pJV1 silvestre con el vector pIJ486 (derivado del pIJ101, Ward et al, 1986), en sus sitios únicos de *Eco*RI (Servin, 1993). El pB2 posee, por lo tanto, una parte proveniente del pJV1 (comprendida entre el inicio de replicación y el sitio de *Eco*RI), que incluye los posibles genes *tra*, y otra proveniente del pIJ486 (comprendida entre el sitio *Eco*RI hasta el origen de replicación), que incluye al gen *tsr*, la cual sustituye a los posibles genes *spd* del pJV1 (Fig.14). El pB2 fue introducido a la cepa TK64 por transformación en cajas con medio R2YE + thio. Las cajas se incubaron a 29 °C hasta tener una esporulación total. Las colonias transformantes fueron sectorizadas con palillos estériles en cajas con medio R5 + thio incubadas a 29 °C hasta tener los sectores bien esporulados. Las distintas muestras se inocularon en tubos con medio LB + thio, incubados a 29 °C durante 3 días en agitación constante. A las diferentes muestras se les realizaron minipreps, las cuales se digirieron con *Bam*HI, ya que el pB2 presenta dos sitios de reconocimiento para ésta enzima, el patrón de bandas es el siguiente: una banda de 8 y 2.5 Kb.

En el pB2 se realizó una cruce entre las cepas (TK64 y TK64 con el pB2), para la observación de los "pocks", pero no se observaron los "pocks".

Aislamiento del plásmido pB53.

Al plásmido pJV1 se realizaron digestiones dobles con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI, para la extracción del fragmento que contenía los genes *spd*, el patrón de estas digestiones es el siguiente, son 4 bandas de diferente peso molecular: una banda 4.65, 2.5, 2.3 y 1.35 Kb. La digestión total fue corrida en un gel de agarosa LMP 0.6% (12 volts, por 14 hrs), para separar y aislar la banda de 2.3 Kb que contiene los genes *spd*.

Al plásmido pB2 de igual manera se realizaron digestiones dobles, solo que las enzimas empleadas fueron *Eco*RI y *Bg*II. La inactivación de las enzimas fue por extracción con

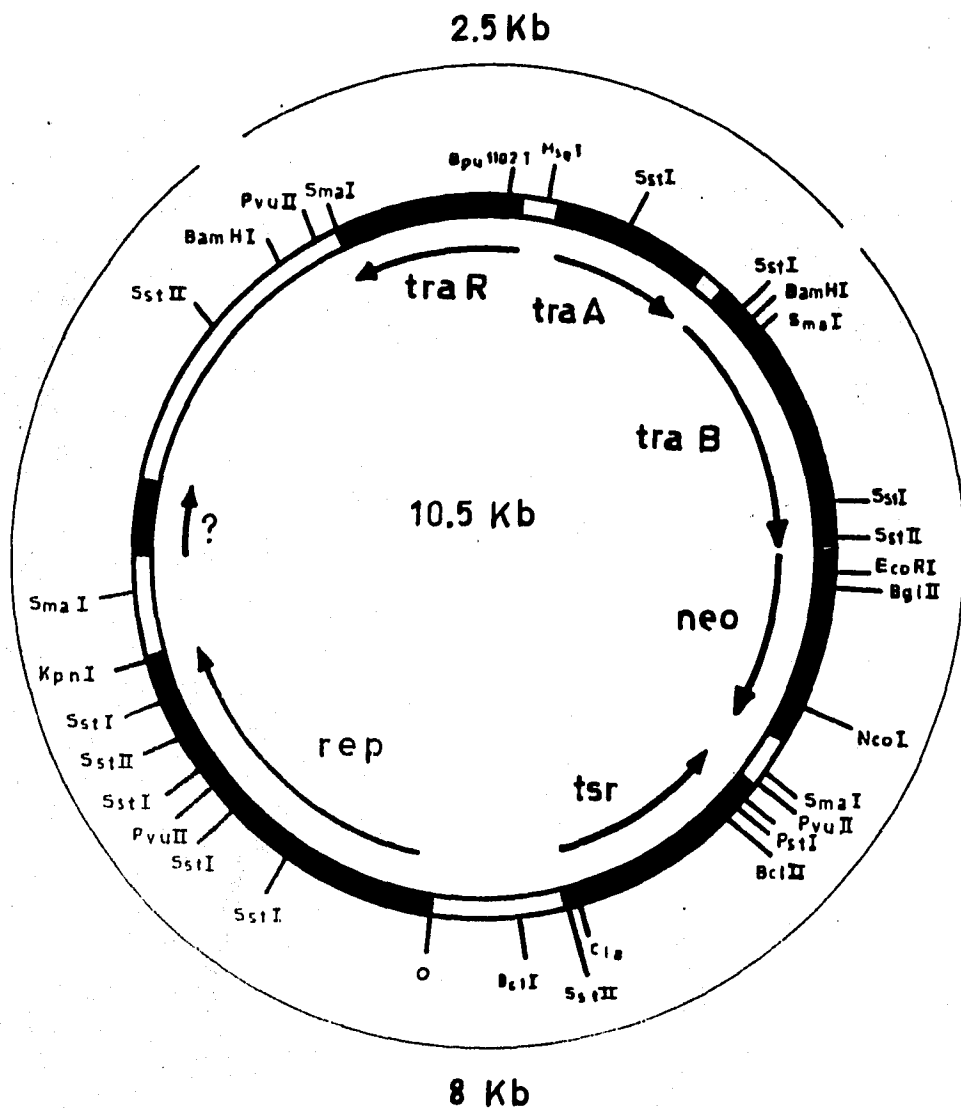


Fig.14 Mapa físico del plásmido pB2, por Servín, 1993.

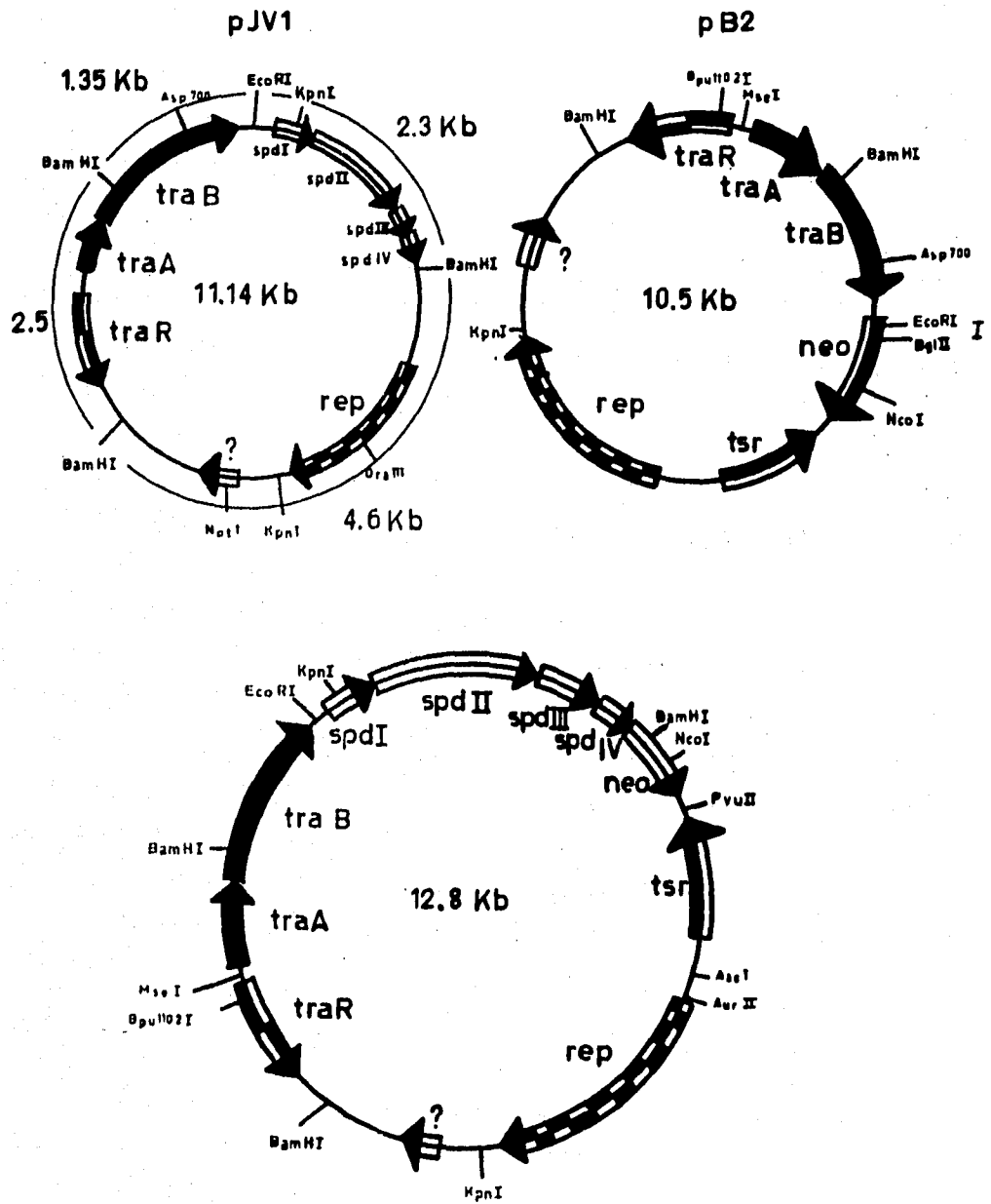


Fig.15 Mapa físico del plásmido pB53.

fenol/cloroformo. Los extremos que dejan estas enzimas no son compatibles, por lo que se esperaba que casi todo el fragmento se ligara con la banda de 2.3 Kb. La mezcla de ligación se introdujo por transformación a la cepa TK64 en cajas con medio R2YE + thio las cuales se incubaron a 29 °C hasta tener bien esporuladas las colonias. Se cosecharon las esporas y se inocularon en cajas con medio R5 + thio a 29 °C hasta llegar a una esporulación total. Se cosecharon las esporas y fueron inoculadas en tubos con medio LB + thio a 29 °C durante 3 días. A las diferentes muestras se les realizaron minipreps y se digirieron con las siguientes endonucleasas para comprobar la estructura del plásmido: *Sst*I, *Bam*HI y *Pst*I.

Al plásmido en el que el fragmento *Eco*RI-*Bam*HI que contiene la región *spd* se había ligado con el fragmento *Eco*RI-*Bgl*II del pB2 se le llamó pB53 (Fig.15).

* Se realizó una cruce entre las cepas (TK64 y TK64 con el pB53), para la observación de los "pocks" y sí se observaron.

Aislamiento del plásmido pB57.

El pB50 fue digerido con la enzima *Bam*HI y la digestión total fué corrida en un gel LMP (12 volts, por 14 hrs), para el aislamiento de la banda de mayor peso molecular (5.7 Kb). La banda aislada corresponde a la región esencial del pB50 y lleva incluido el gen de resistencia a thio. La banda se purificó y se ligaron los extremos cohesivos para circularizar el fragmento. La mezcla de ligación fue introducida a la cepa TK64 por transformación en cajas con medio R2YE + thio las cuales se incubaron bajo las mismas condiciones. Las colonias se tomaron con palillos estériles y se sectorizaron en cajas con medio R5 + thio incubadas bajo las mismas condiciones. Las esporas se cosecharon con un asa estéril y se inocularon en tubos con medio LB + thio. Se realizaron minipreps a todas las muestras y fueron digeridas con *Bam*HI.

Al plásmido que tenía la estructura deseada (fragmento recircularizado), se le llamó pB57 (Fig.16).

Aislamiento del plásmido pB58.

El plásmido pB50 fué digerido con la enzima *Nco*I, lo que genera una deleción de 2.5 Kb que abarca los genes involucrados en la transferencia. La digestión total, se corrió en un gel LMP (12 volts, por 14hrs). Se aisló la banda de mayor tamaño (9 Kb) y dicho fragmento fue

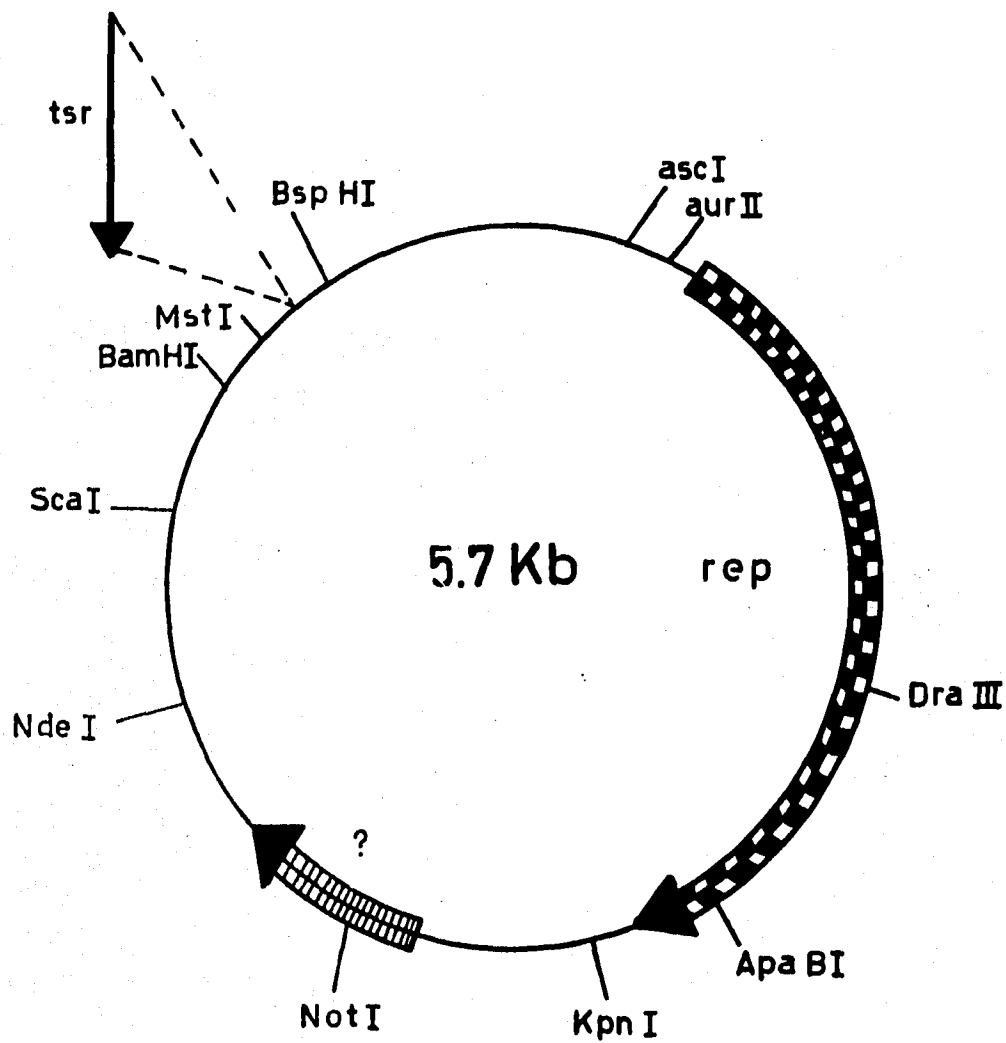


Fig.16 Mapa físico del plásmido pB57.

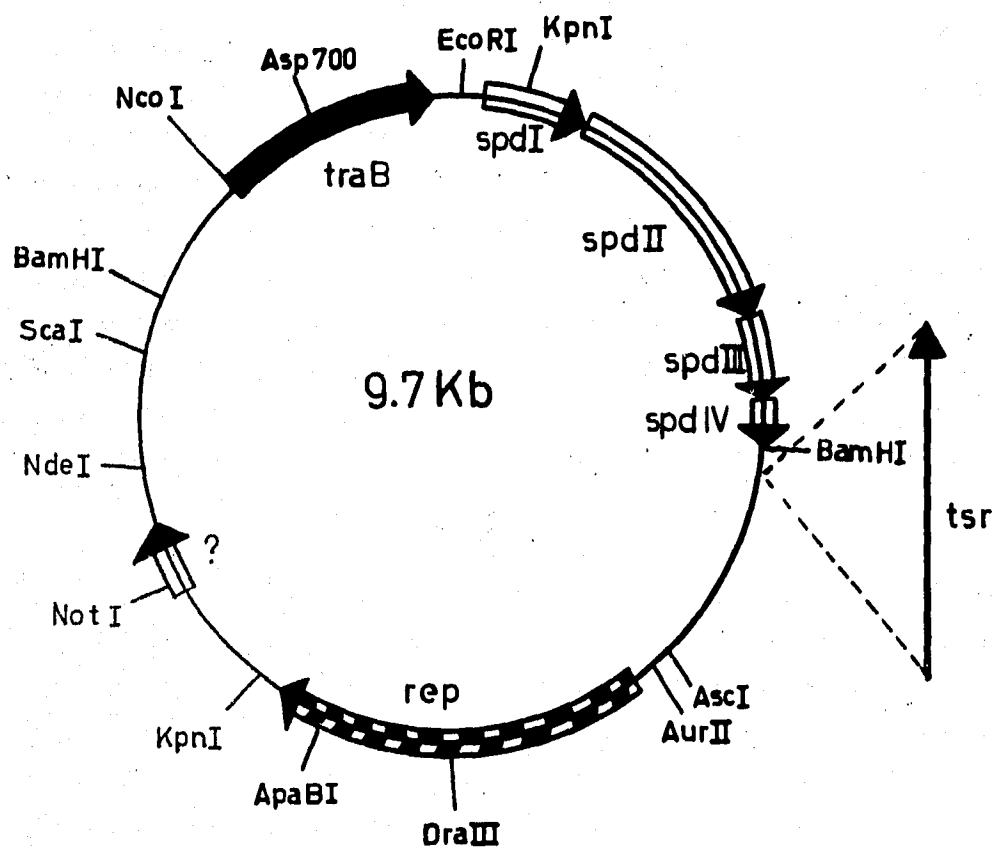


Fig.17 Mapa físico del plásmido pB58.

recircularizado con la ligasa T4. La ligación se introdujo a la cepa TK64 por transformación en cajas con medio R2YE, las cuales se dejaron esporular a 29 °C. Las esporas se cosecharon con palillos estériles y se inocularon en cajas sectorizadas con medio R5 + thio a una temperatura de 29 °C. Las esporas se cosecharon con un asa estéril y se inocularon en tubos con LB + thio por 3 días. Se realizaron minipreps a las diferentes muestras, las cuales fueron digeridas con *Bam*HI.

Al plásmido que contenía la deleción del fragmento *Nco*I de 2.5 Kb se le llamó pB58 (Fig. 17).

Aislamiento del plásmido pB59.

El plásmido pB50 fué digerido con la enzima *Bst*XI, eliminando un fragmento de 500 pb que comprende parte del gen *traA* y el principio del gen *traB*. Se corrió la digestión total en un gel LMP 0.6% (12 volts, por 14hrs), se purificó y recircularizo la banda de mayor tamaño, con la ligasa T4. La ligación fue introducida a la cepa TK64 por transformación en cajas con medio R2YE + thio incubadas a 29 °C hasta obtener las colonias transformantes bien esporuladas. Las esporas fueron cosechadas e inoculadas en cajas sectorizadas con medio R5 + thio las cuales se incubaron a 29 °C hasta obtener los sectores bien esporulados. Se cosecharon las esporas y se inocularon en tubos con LB + thio por 3 días. Se realizaron minipreps a todas las muestras y se digirieron con la enzima *Bam*HI.

Al plásmido que tenía la deleción del fragmento de *Bst*XI se le llamó pB59 (Fig. 18).

Aislamiento del plásmido pB75.

El plásmido pJV1 fue digerido con la enzima *Asp*700I (que deja extremos romos), la cual corta en un solo sitio dentro del gen *traB*. Por otro lado se obtuvo un fragmento de 1.1 Kb de *Bc*II, que contiene el gen de *tsr*, del pIJ702, y se trató con la Klenow para hacer romos los extremos y permitir la ligación con el pJV1 digerido con *Asp*700I. La ligación del pJV1 con el gen *tsr* fue introducida a la cepa TK64 por transformación en cajas con medio R2YE + thio a 29°C hasta que las colonias se encontraron bien esporuladas. Las colonias de esporas se cosecharon e inocularon en cajas sectorizadas con medio R5 + thio a 29°C. Las esporas se cosecharon e inocularon en tubos con medio LB+thio por 3 dias a 29°C. Se realizaron minipreps a todas las muestras y se digirieron con *Bam*HI, encontrando el siguiente patrón: una banda de 2.5 y 2 bandas de 4.6 Kb.

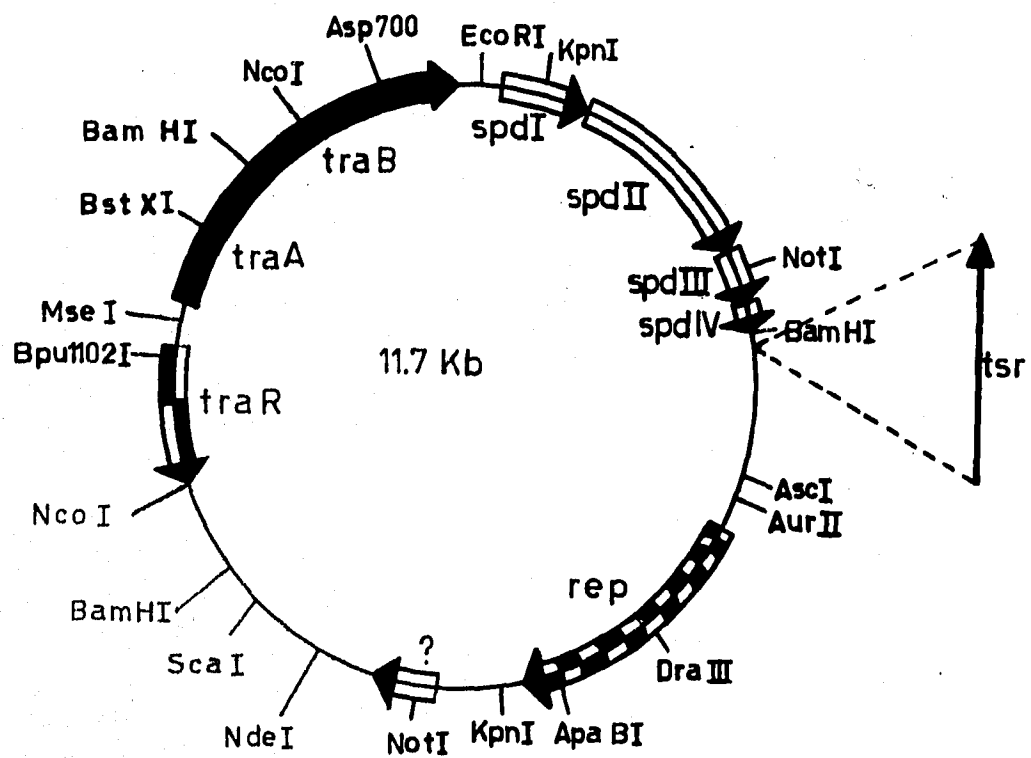
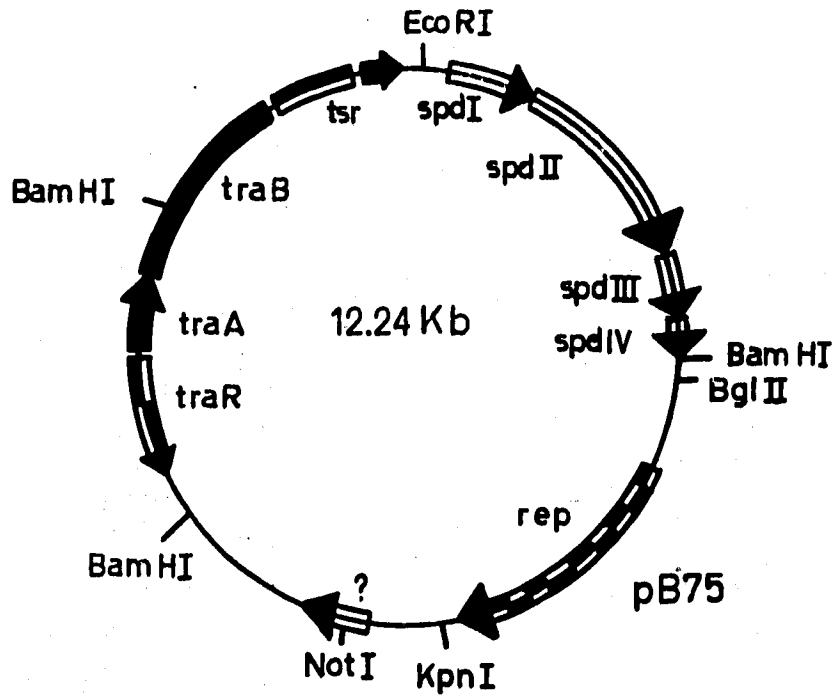


Fig.18 Mapa físico del plásmido pB59.



pIJ702

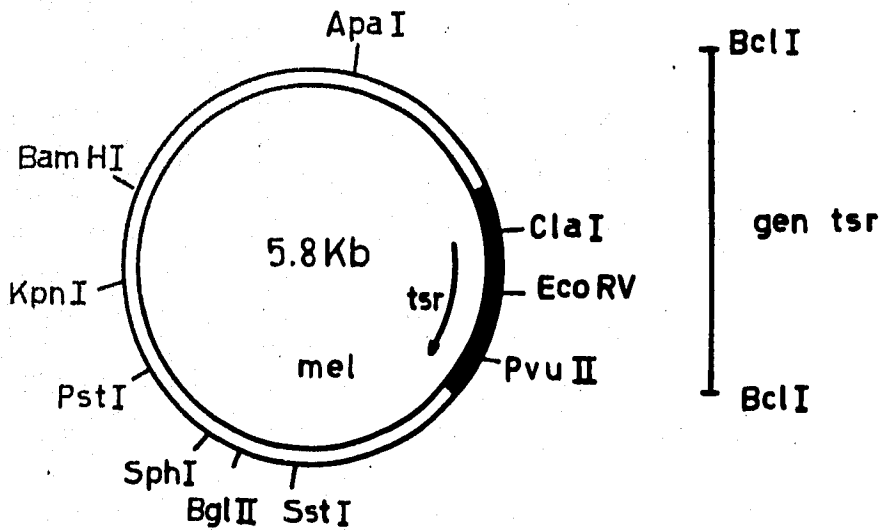


Fig.19 Mapa físico del plásmido pB75.

TABLA III

PLASMIDO	POCKS	CARACTERISTICAS	FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA	FRECUENCIA DE RECOMBINANTES
NINGUNO	-	control	0	0
pJV1	+	silvestre	1	5.2×10^{-6}
pB50	+	gen <i>tsr</i> en sitio de <i>BglII</i>	0.82	11.6×10^{-6}
pB2	-	sin genes <i>spread</i>	9×10^{-5}	4.4×10^{-5}
pB53	+	pB2 + genes <i>spread</i>	0.52	2.4×10^{-5}
pB57	-	fragmento <i>BamHI</i> 5.7 kb del pB50	$<10^{-7}$	$<10^{-7}$
pB58	-	delección del fragmento <i>NcoI</i>	$<10^{-7}$	$<10^{-7}$
pB59	-	delección del fragmento <i>BstXI</i>	2.5×10^{-7}	1.04×10^{-6}
pB75	-	inserción de <i>tsr</i> en <i>Asp7001</i>	7.3×10^{-5}	1.2×10^{-5}
pB50	+	crusa inversa	0.81	2.97×10^{-6}

Tabla III Representa los datos sobre las frecuencias de transferencia y recombinación, así como la formación de pocks, en los diferentes derivados del plásmido pJV1 por medio de cruza genéticas.

Al plásmido con esta inserción del gen *tsr* en *traB* se le llamó pB75 (Fig.19).

Determinación de la existencia de un sistema Kil-Kor en el plásmido pJV1.

Con base en la secuencia del plásmido pSN22, la cual es muy parecida a la del pJV1 en los genes *tra*, podría presentarse un sistema Kil-Kor similar al de dicho plásmido, en el cual el producto del gen *traR* provee la función Kor y los productos de los genes *traA* y *traB* las funciones Kil.

La única enzima para la cual existe un sitio único dentro del gen *traR* en pJV1 es la enzima *Bpu1102I*, por lo tanto se siguieron tres estrategias basándose en dicha enzima.

A) Eliminación del sitio *Bpu1102I*.

El pB50 fue digerido con la enzima *Bpu1102I*, que interrumpe el inicio del gen *traR*. Se checó 1 µl de la digestión en un gel de agarosa 1%. El resto de la digestión fue corrida en un gel LMP 0.6% (14hrs a 12 volts). Se purificó la banda de mayor tamaño y fue recircularizada con la ligasa a temperatura ambiente, después de eliminar los extremos cohesivos por medio de tratamiento con Klenow, lo cual genera una mutación al insertarse un aminoácido de más. Este plásmido fue incorporado al sistema de *Streptomyces* por transformación en cajas con medio R2YE y antibiótico (thio) incubadas a 29 °C hasta obtener las colonias bien esporuladas. Las colonias transformantes se sectorizaron en cajas con R5 + thio a 29 °C hasta que se encuentren bien esporuladas. Se cosecharon las esporas y fueron inoculadas en tubos con LB+thio durante 3 días. A todas las muestras se les realizaron minipreps y fueron digeridas con la enzima *BamHI*, comparando el tamaño de los fragmentos con el marcador de peso molecular.

Se observó que algunos plásmidos daban el patrón normal de bandas con *BamHI*, mientras que otros daban un patrón correspondiente a un plásmido más pequeño (Fig.20). Al checarlos con *Bpu1102I* se observó que los que daban el patrón normal con *BamHI* si se digerían con *Bpu1102I*, debido a que el tratamiento con Klenow no fue 100% eficiente, mientras que los más pequeños si habían perdido el sitio de *Bpu1102I* (Fig. 21).

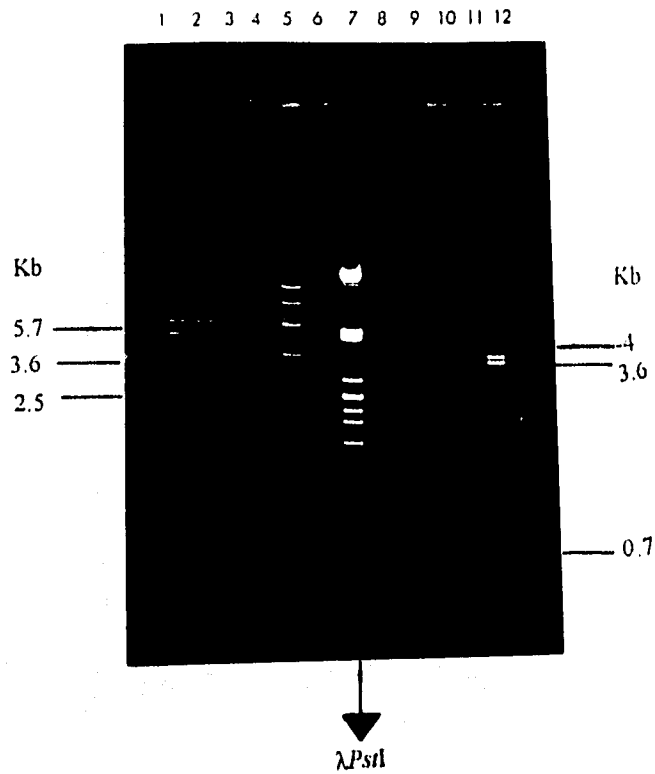


Fig.20. Gel de agarosa de alto punto de fusión (1%), por electroforesis se corrieron las muestras con los plásmidos mutados en el sitio de *Bpu* 1021, los cuales fueron digeridos con *Bam*HI y *Sst*I. Las muestras con el DNA en los carriles 1-6 fueron digeridos con *Bam*HI, en el carril 7 esta el marcador de peso molecular (λPst I) y finalmente los carriles 8-12 son las mismas muestras solo que digeridas con *Sst*I. Las muestras con el DNA en los carriles 5 y 6, digeridas con *Bam*HI dan el patrón normal de bandas (5.7, 3.6 y 2.5Kb); mientras que las muestras de los carriles 1-4 la banda de 2.5Kb disminuye de tamaño. La muestra de DNA en el carril 12 digerida con *Sst*I da el patrón normal de bandas de un plásmido que no tienen mutado el sitio de *Bpu* 1021, mientras que las muestras de los carriles 8-11 la banda que contiene el sitio *Bpu* 1021 mutado es más pequeña.

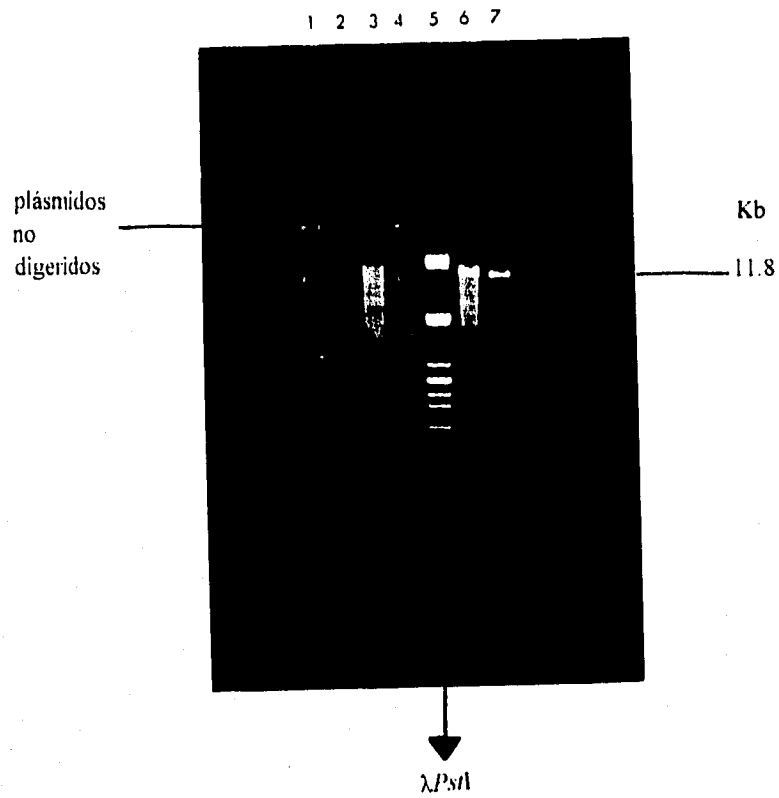


Fig.21. En el gel de agarosa al 1%, por electroforesis se corrierón los plásmidos que llevan mutado el sitio *Bpu*11021; los cuales fuerón digeridos con la misma enzima para comprobar que realmente tienen mutado el sitio. Las muestras con el DNA en los carriles 1-4 no fuerón digeridos con la enzima, por lo que estos plásmidos si perdieron el sitio de *Bpu*11021, mientras que los DNAs en los carriles 6 y 7 si fuerón digeridos con la enzima, presentando una banda de 11.8 Kb en ambas muestras, por lo que estos plásmidos no perdieron el sitio de *Bpu*11021. En el carril 5 se encuentra en marcador de peso molecular ($\lambda PstI$).

B) Delección del intervalo *ScaI-Bpu1101I*.

Al plásmido pB50 se le realizó una digestión doble, empleando las enzimas *Bpu1102I* y *ScaI*, lo cual eliminaría el gen *traR* sin tocar *traA* y *traB*. Se checó 1 μ l de la digestión total en un gel de agarosa 1%, el resto de la muestra fué corrida en un gel LMP (12 volts por 14 hrs). Se extrajo la banda de mayor tamaño, la cual fue ligada durante 10 hrs a temperatura ambiente, después de tratarla con Klenow.

De la ligación total se transformaron 10 μ l en la cepa TK64 sobre cajas con medio R2YE + thio las cuales se incubaron a 29° C. Al analizar las minipreps de las colonias resultantes se observó que todas daban plásmidos de un tamaño menor a lo esperado, en los que se había perdido espontáneamente *traA* y *traB* (Fig. 22).

C) Delección del intervalo *Bpu1102I-EcoRI*.

Al plásmido pB50 se le realizó una digestión doble con las enzimas *Bpu1102I* y *EcoRI*, lo cual eliminaría los genes *traA* y *traB* y el inicio de *traR*. Se checó 1 μ l de la digestión en un gel de agarosa 1%. El resto de la digestión fue corrida en un gel LMP 0.6% (12 volts, por 14 hrs). Se extrajo la banda de mayor tamaño, la cual fue ligada durante 12 hrs a temperatura ambiente, después de tratarla con Klenow. El plásmido con esta delección se llamó pB76 (Fig.23). Por transformación fue incorporado este plásmido a la cepa Tk64 sobre cajas con medio R2YE + thio incubadas a 29° C. Se observó que todas las colonias dieron plásmidos del tamaño esperado.

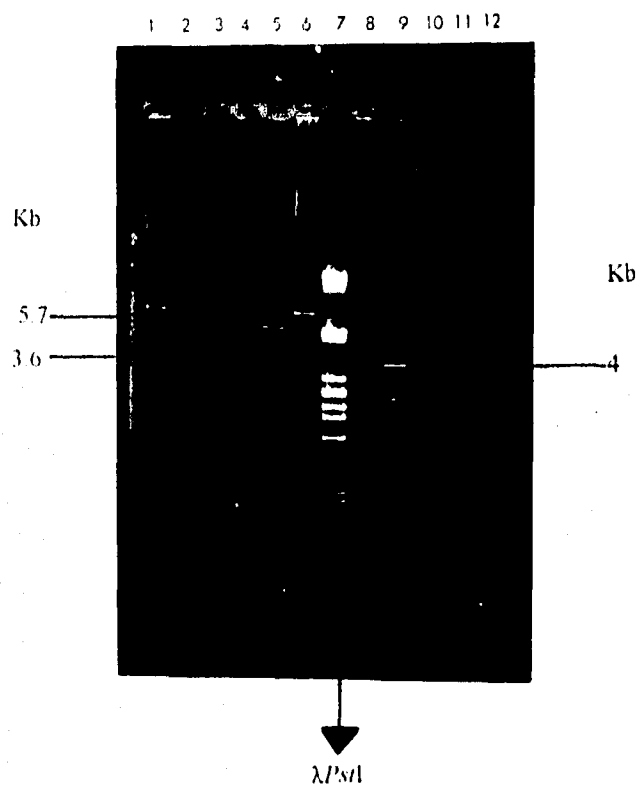


Fig.22. En el gel de agarosa al 1%, se corrierón por electroforesis las muestras que tienen los plásmidos mutados en los sitios *Bpu*I 1021-*Sca*I.

- Las digestiones a la izquierda del marcador de peso molecular fuerón hechas con *Bam*HI;
- mientras que las muestras de la derecha se tratarón con *Sst*I.
- Todas las muestras dierón tamaños menores a los esperados.

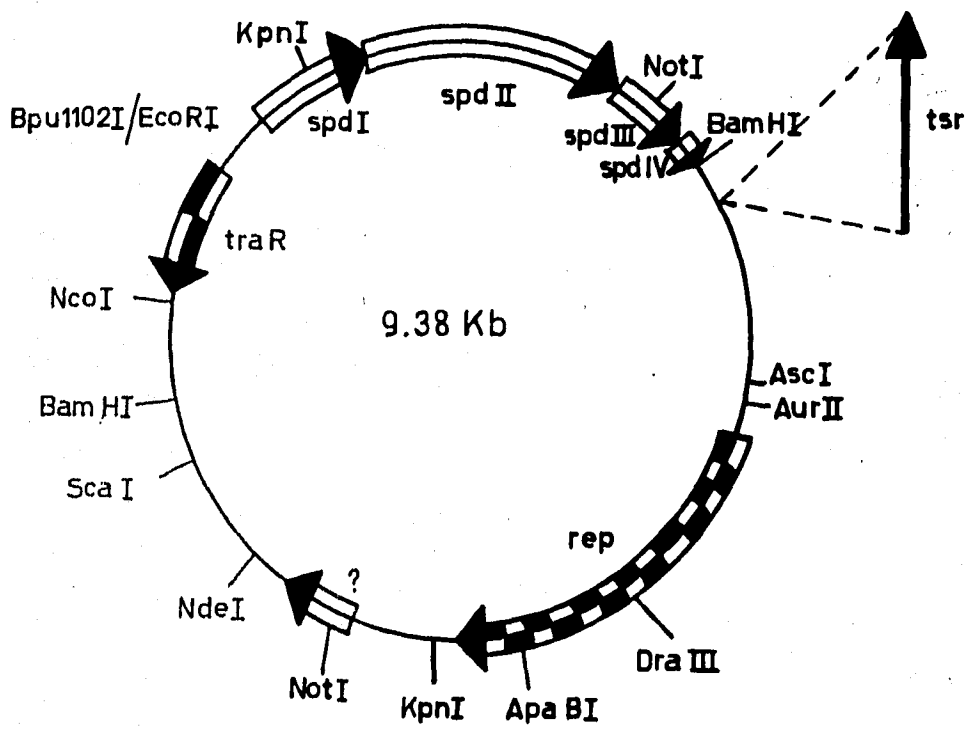


Fig.23 Mapa físico del plásmido pB76.

DISCUSION.

Nosotros reportamos aquí el análisis funcional y estructural de los genes involucrados en los mecanismos de transferencia y diseminación del plásmido pJV1 mediante el empleo de mutaciones en diferentes regiones del plásmido.

Los resultados obtenidos sobre las frecuencias de transferencia del plásmido y el paso de marcadores cromosómicos (frecuencia de recombinantes) se observan en la tabla III. El dato obtenido sobre la frecuencia de transferencia del control negativo fue cero, lo cual era esperado ya que estas cepas carecen de cualquier plásmido. Todos los datos obtenidos de las mutaciones en los diferentes genes involucrados en los mecanismos descritos con anterioridad se compararon con el dato control.

El plásmido silvestre (pJV1) presenta una frecuencia de transferencia a la cepa receptora de 100%, lo que es igual a una frecuencia de 1, por lo que este plásmido se transfiere con una alta eficiencia de una cepa hacia otra, por medio de la conjugación bacteriana. La alta eficiencia en la transferencia también ha sido encontrada en otros plásmidos libres con alto número de copias como son el pIJ101 (Kendall y Cohen, 1987, 1988) y el pSN22 (Kataoka et al, 1991a). En los plásmidos que se encuentran integrados en regiones específicas del cromosoma también se ha medido la frecuencia de transferencia, entre los que destaca el pSAM2 aislado de *Streptomyces ambofaciens*, del cual se sabe que cuando se encuentra libre en el citoplasma celular se replica de manera autónoma y se transfiere con una alta eficiencia de 100% al igual que lo hacen los plásmidos libres con alto número de copias.

Los dos datos obtenidos sobre la frecuencia de transferencia del pB50 de 0.82 (82%) (TK54, receptora del plásmido) y 0.81 (81%) (TK64, receptora del plásmido) se encuentran muy cercanos al 100% obtenido para el plásmido silvestre, por lo que el pB50 es un plásmido que se transfiere también con alta eficiencia; al parecer la inserción del gen *tsr* en el sitio único de *Bgl*II del pJV1 no afecta la transferencia del plásmido, ya que la inserción de este gen se encuentra en una región no codificadora para algún gen importante en el mantenimiento del plásmido o para la transferencia misma. La presencia del gen *tsr* en el pB50, tiene la ventaja de que permite seleccionar las colonias que contienen el plásmido, mediante la resistencia al antibiótico.

El plásmido pB2 carece de una región de 2.3 Kb que contiene a los genes *spd*, involucrados en la diseminación del plásmido a lo largo del micelio receptor. El dato obtenido sobre la frecuencia de transferencia del pB2 fue de 9×10^{-5} , es decir 100 mil veces menor a los datos encontrados en los plásmidos mencionados con anterioridad; este resultado muestra una enorme baja en la transferencia del plásmido, lo cual posiblemente sea atribuido a la falta de los genes *spd* (*spread*) y a la presencia del origen híbrido.

Al analizar el dato obtenido para el plásmido pB53, que es el pB2 con los genes *spd* reintroducidos, se observó que la frecuencia de transferencia aumentó a 0.52 (52%). Al incorporar los genes *spd* nuevamente en el pB2 se pudo demostrar que la ausencia de ellos ocasiona una enorme baja en la transferencia del plásmido; aunque la transferencia no fue tan eficiente como en los plásmidos (pJV1 y pB50) de alguna manera la presencia del origen híbrido del pB2 pudiera interferir, en que la transferencia no sea muy eficiente.

La mayor parte de las deleciones fueron realizadas en el plásmido pB50, por la presencia del gen *tsr* lo cual facilitó la expresión y selección de aquellas colonias que presentaran al plásmido con el gen de resistencia ante el antibiótico (thio).

La deleción de 500 pb entre los dos sitios *Bst*XI en el pB50, formando el plásmido pB59, interrumpió el final del gen *traA* y el principio del gen *traB*; el dato encontrado para la frecuencia de transferencia del pB59 es $< 10^{-7}$, dicho valor se encuentra muy cercano a cero de transferencia. Aunque se sintetiza la mayor parte de la proteína TraA el producto formado por el gen *traB* no existe. Al parecer ésta es la proteína más importante para la transferencia intermicelial del plásmido durante el evento de conjugación bacteriana del pJV1.

Una deleción mayor de 2.3 Kb fue llevada a cabo en el pB50 para la interrupción de todo el sistema involucrado en la transferencia intermicelial, como son los genes *traA*, *traB* y *traR*. Este sistema se encuentra localizado entre los dos sitios *Nco*I-*Nco*I, el dato encontrado para el plásmido pB58 es $< 10^{-7}$, dicho valor es muy cercano a cero de transferencia, además de ser igual al encontrado para el pB59.

Las deleciones de los fragmentos internos de *Bst*XI y *Nco*I han afectado claramente la transferencia de los derivados del pJV1; si comparamos los datos obtenidos para los plásmidos pJV1 y pB50 en los cuales la transferencia fue 100% y 82% respectivamente, mientras que en los plásmidos pB59 y pB58 disminuye a $< 10^{-7}$.

La delección de todo el sistema responsable de la transferencia y diseminación de las poblaciones de plásmidos, fue llevada en el pB50 formando el plásmido pB57 de 5.7 Kb, este pequeño vector se encuentra formado por la región esencial y el gen *tsr*, la frecuencia de transferencia encontrada en pB57 fue $<10^{-7}$ este valor es nuevamente muy cercano al cero de transferencia, lo sorprendente es que el valor esperado para este caso en particular debió de ser cero absoluto; ya que el plásmido pB57 carece del operón involucrado en la transferencia y en la diseminación de las poblaciones de plásmidos. Por lo que las pocas colonias que aparecieron en los medios de selección seguramente fueron colonias revertantes, estas colonias además de ser más pequeñas en comparación a las colonias normales, por alguna razón tienen la capacidad de revertir la mutación y pueden crecer en los medios de selección.

En el plásmido pB75, el dato obtenido sobre la frecuencia de transferencia fue 7.3×10^{-6} este valor es mayor al encontrado en las otras mutaciones realizadas en los genes *tra* de los plásmidos pB57, pB58 y pB59 ($< 10^{-7}$). El claro aumento que se presenta en la frecuencia de transferencia para este vector (pB75) posiblemente sea debido a una complementación de los productos formados por los genes *tra*. Como la mutación fue llevada al término del gen *traB* la mayor parte de la proteína TraB es sintetizada y su funcionalidad se encuentra complementada por el producto del gen *traA*, el cual sí se sintetiza completamente. El producto formado por el gen *traA* y la proteína TraB mutada en su parte final por la inserción del gen de *tsr*, provoca que se manifieste la transferencia, por pequeña que sea esta.

Con todo lo anterior podemos mencionar que los genes involucrados en la transferencia intermicelial del pJV1 son *traA* y *traB*, la ausencia de ambos provoca una baja en la transferencia del plásmido pJV1. Al parecer el gen más importante en la transferencia intermicelial del pJV1 es *traB*, por el dato obtenido en el plásmido pB75; aunque se encuentra funcional el producto del gen *traA* y se sintetiza la mayor parte de la proteína TraB, es claro que esta última debe ser sintetizada completamente para que la transferencia aumente al 100%. Por lo que el producto del gen *traA* solo complementa al producto del gen *traB*. Para apoyar un poco más estos fundamentos, lamentablemente no se pudo realizar una mutación sólo en el gen *traA*, para comprobar qué tan importante es su producto en la transferencia del pJV1.

Para que se pueda obtener una frecuencia de transferencia muy eficiente en los plásmidos con alto número de copias, los genes involucrados en la transferencia intermicelial del plásmido no

deben estar mutados, como sucedió con los plásmidos pJV1 y pB50. Reportes muy similares se han descrito para los plásmidos pIJ101 (Kendall y Cohen, 1988), pSN22 (Kataoka et al, 1991a), SCP2* (Brolle et al, 1993) y pSAM2 (Smokvina et al, 1991), en donde la frecuencia de transferencia encontrada fue de 100%.

Durante la cuantificación de las colonias presentes en las diferentes condiciones de selección presentes en la tabla II, para el plásmido pJV1 así como para los diferentes derivados del mismo, el número de colonias recuperado de la cepa TK54 fué mayor que el número de colonias encontrado para la cepa TK64, para lo cual fué necesario realizar una cruce al inverso empleando un plásmido que presenta una frecuencia de transferencia muy elevada, como lo es el pB50, con la finalidad de comprobar si la recuperación de un número mayor de colonias pertenecientes a la cepa TK54, es debido a la presencia del plásmido o a las características propias de la cepa de *Streptomyces lividans*. En la cruce inversa se encontró nuevamente un mayor número de colonias recuperado por parte de la cepa TK54 en las diferentes condiciones de selección, lo cual sugiere que esta cepa forma un mayor número de colonias que crecen y esporulan más rápido que las colonias formadas por la cepa TK64, la cual forma colonias que crecen y esporulan más lentamente. Los resultados demostraron que el mayor número de colonias encontrado de la cepa TK54, es debido a características particulares de la cepa. Por otra parte la frecuencia de transferencia obtenida en la cruce inversa con el pB50 fue 81%, este dato es similar al encontrado para el mismo plásmido en la cruce mencionada con anterioridad.

Como producto de las funciones de transferencia existen plásmidos en los *Streptomyces* que presentan la capacidad de movilizar genes presentes en el cromosoma de la célula donadora hacia la célula receptora del plásmido.

En cuanto a la frecuencia de recombinantes que refleja la capacidad del plásmido de movilizar al cromosoma (CMA), los datos se muestran en la tabla III. Para la determinación de esta característica se emplearon los fenotipos de las cepas de *Streptomyces lividans* mostrados en la tabla I, en donde la cepa TK64 es Prof⁺, Str^R, mientras que la cepa TK54 es Hist⁺, Leu⁺ y Spc^R.

La frecuencia de recombinantes obtenida para el control negativo es de cero ya que esta cruce no contiene ningún plásmido. Todos los datos sobre la frecuencia de recombinación fueron comparados con el control. Los datos obtenidos sobre la frecuencia de recombinación (CMA), para el plásmido pJV1 fue de 5.2×10^{-6} . Este valor es aproximadamente la mitad del encontrado

para el pB50 (11.6×10^{-6}), lo que refleja que ambos plásmidos presentan la capacidad de movilizar genes cromosómicos (*cma*), de la célula donadora (TK64) hacia la célula receptora (TK54) con eficiencia similar. Previos estudios mutacionales en las regiones de transferencia de los plásmidos pIJ101 (Kendall y Cohen, 1988), pSN22 (Kataoka et al, 1991a) y SCP2* (Brolle et al, 1993) demostraron que estos diferentes plásmidos presentan la habilidad de movilizar genes cromosómicos (*cma*).

El plásmido pB2, aunque presentó una frecuencia de transferencia disminuida unas 100 mil veces, en comparación a las frecuencias encontradas para los plásmidos pJV1 y pB50; el valor obtenido sobre la frecuencia de recombinantes fue 4.4×10^{-6} , el cual es muy similar al encontrado para los plásmidos pJV1 y pB50; por lo que la ausencia de los genes *spd* no afecta la capacidad del pB2 sobre la movilización de genes cromosómicos. Reportes muy similares han sido descritos para los plásmidos pIJ101 (Kendall y Cohen, 1988), pSN22 (Kataoka et al, 1991a) y SCP2* (Brolle et al, 1993) donde se mutagenizaron los genes *spd*. Al obtener las frecuencias de recombinantes de los plásmidos mutados y al compararlas con los plásmidos silvestres, esta no se encontraba afectada. En el plásmido pB53 la frecuencia de recombinación encontrada es 2.4×10^{-5} , este valor es mayor al encontrado en los plásmidos mencionados en la tabla III, por lo que de alguna manera la presencia de todo el sistema *spd* nos muestra un pequeño aumento del *cma*.

En el caso de los plásmidos pB57 y pB58 que presentan mutaciones en los genes *tra*, el dato obtenido sobre la frecuencia de recombinantes fue $<10^{-7}$ en ambos plásmidos. Mutaciones realizadas en los sistemas Tra de los plásmidos pIJ101 (Kendall y Cohen, 1988), pSN22 (Kataoka et al, 1991a) y SCP2* (Brolle et al, 1993) afectaron la capacidad de movilización del cromosoma, es decir estos plásmidos, al tener mutados los genes responsables de la transferencia primaria, no presentan la capacidad de movilización del cromosoma, por lo que los genes *tra* tienen dos funciones: se encuentran involucrados en la transferencia primaria y son esenciales para la movilización del cromosoma (*cma*). El valor obtenido para ambos plásmidos (pB57 y pB58) debió de dar cero ya que los genes involucrados en la movilización del cromosoma no existen, seguramente las pocas colonias que se encontraron en las cajas de selección de recombinantes fueron revertantes.

Como se aprecia el plásmido pB59 sí presenta *cma* (1.04×10^{-6}) aunque tiene mutados los genes *tra* en diferentes regiones, la síntesis de la mayor parte de los productos de los *traA*,

posiblemente son los responsables de la movilización del cromosoma. Lo mismo sucedió con el plásmido pB75 aunque tiene mutado el gen *traB* en su parte final, presenta un valor de 1.20×10^{-6} , la frecuencia de recombinación de este vector es mayor a la encontrada en pB59, la presencia de la proteína TraA y la mayor parte de la proteína TraB se encuentran involucradas en la movilización del cromosoma.

En los plásmidos de *Streptomyces* se ha identificado una característica fenotípica como producto de las funciones de transferencia, denominada zigosis letal o formación de "pocks". Se han identificado y caracterizado a través de estudios genéticos los genes responsables de esta función denominados genes *spd* responsables de la diseminación y formación de los "pocks". Este fenotipo ha sido observado en los plásmidos pIJ101 (Kendall y Cohen, 1988), pSN22 (Kataoka et al, 1991b; Kataoka et al, 1994a), SCP2* (Brolle et al, 1993) y en los plásmidos integrativos como el pSAM2 (Smokvina et al, 1991, Hagege et al, 1993b), en los cuales ya se han sido identificado los genes involucrados en la formación de los "pocks". En el caso de los plásmidos pJV1, pB50 y pB53 se observó la formación de "pocks", los cuales son visibles a simple vista, los "pocks" observados en estos plásmidos, son muy similares en tamaño, morfología y coloración. El plásmido pB2 no forma "pocks" ya que no presenta los genes *spd* los cuales están involucrados en la formación de "pocks".

En los plásmidos con alto número de copias de los *Streptomyces* se ha identificado un sistema de genes involucrado en la transferencia denominado Kil-Kor, en donde los genes *kil* desempeñan funciones específicas en la letalidad en ausencia del gen *kor* que forma la proteína represora de los *kil*. El fenotipo Kil-Kor ha sido identificado en los plásmidos: pIJ101 (Kendall y Cohen, 1987; Stein et al, 1989; Stein y Cohen, 1990; Tai y Cohen, 1993, 1994), pSN22 (Kataoka et al, 1994a). En el plásmido pJV1 se comprobó la presencia de los genes involucrados en dicho sistema, a través de mutaciones en las regiones Tra del pB50.

Los resultados demostraron que las cepas que adquirieron el plásmido pB50 mutado con *Bpu1102I*, se encontraron colonias crecidas en las cajas con medio de selección. La mayoría conservaban el sitio *Bpu1102I* y correspondían al plásmido silvestre, mientras que las que carecían del sitio *Bpu1102I* (y por lo tanto tenían mutaciones en *traR*) habían perdido parte de los genes *traA* y *traB* espontáneamente, sugiriendo que un plásmido con *traR* mutado y *traA* y *traB* normales no es viable.

El plásmido mutado de *EcoRI-Bpu1102I* (delección de los *tra*), las colonias encontradas en el medio, pudieron hacerlo ya que sus plásmidos que adquirieron carecen de los genes responsables del fenotipo Kil. Aunque estos plásmidos presentan un frecuencia de transferencia sumamente baja, las células que los adquieren presentan la capacidad de crecer.

En el caso de la mutación del pB50 digerido con *Bpu1102I-ScaI* la eficiencia de transformación de estas colonias fue sumamente baja. Con esta mutación se deletó el gen *traR* dejando los 2 genes *tra* (*traA* y *traB*) que al parecer son los genes involucrados en la manifestación del fenotipo Kil. Esta baja en la frecuencia de transformación fue debida a la ausencia del gen *traR* (*kor*, que sintetiza la proteína reguladora de la expresión de los genes *kil*), de tal manera que la mayor parte de las colonias transformantes murieron por el plásmido que obtuvieron. Resultados muy similares han sido demostrados en los vectores que carecen del gen *kor*, solo que en la eficiencia de colonias transformantes no obtuvieron colonias en el medio, mientras que en el pB50 sí se encontraron algunas, lo cual podría deberse a una serie de rearrreglos que sufrió el plásmido, es decir que las colonias observadas contenían plásmidos sin el gen *kor* pero además perdieron ciertas porciones de los genes *kil*, lo cual permitió la sobrevivencia de colonias que no presentan genes *kor*, pero tampoco genes *kil*.

Esto fue confirmado por digestiones realizadas sobre las pocas colonias que aparecieron en el medio, los patrones de restricción se muestran en las fotografías de los plásmidos.

Con todo lo anterior, podemos mencionar que los genes involucrados en la expresión del fenotipo Kil-Kor presentes en el pJV1 son: *traA* y *traB* (*kiIA* y *kiIB*), mientras que el gen *traR* (*kor*); el mismo patrón de genes fue encontrado en el plásmido pSN22 por Kataoka et al, (1991a).

La regulación de los genes *tra* del pJV1 y pSN22, es muy similar al que se presenta en los genes *tra* del plásmido pIJ101. La función del producto del gen *traR* en los plásmidos pJV1 y pSN22, es muy probablemente la misma a la del KorA en el pIJ101, en donde su funcionalidad es autorepresora y represor del operón Tra. En el plásmido pSN22 son *traA*, *traB*, *spdA*, *spdB* (*spdB1*, *spdB2*, *spdB3* y *spdB4*), por Kataoka et al, (1994a); en el pIJ101 son *tra*, *spdA* y *spdB*, por Kendall y Cohen, (1988), finalmente en el pJV1 son *traA*, *traB*, *spd* (*spdI*, *spdII*, *spdIII* y *spdIV*). No se ha encontrado en el pJV1 al igual que en el pSN22, el segundo sistema Kil-Kor analogo a los genes (*kiIB* y *korB*) del pIJ101 (Tai y Cohen, 1994).

CONCLUSIONES.

1. Se identificaron y analizaron los genes responsables de los mecanismos de transferencia, movilización cromosómica (cma), diseminación, formación de "pocks" y el sistema Kil-Kor del plásmido pJV1 de *Streptomyces phaeochromogenes*.
2. Los plásmidos derivados del pJV1 fueron clonados sin ningún problema, en las cepas de *Streptomyces lividans*.
3. Los genes responsables de la transferencia primaria o intermicelial, así como encargados de la movilización de genes cromosómicos presentes en el pJV1 son: *traA* y *traB*.
4. Los genes responsables de la transferencia secundaria o intramicelio (diseminación), así como encargados de la formación de los "pocks" en el pJV1 son: los *spread* (*spdI*, *spdII*, *spdIII* y *spdIV*). Este sistema de genes es muy similar al que se presenta en el plásmido pSN22. Curiosamente el pJV1 carece de un *spd* presente en el plásmido pSN22 (*spdA*).
5. Al igual que otros plásmidos con alto número de copias, entre los que destacan el pIJ101 y pSN22, el pJV1 presenta una frecuencia de transferencia muy eficiente (100%).
6. La presencia de mutaciones (delecciones e inserciones) en las regiones codificadoras de los genes responsables de la transferencia del pJV1 afectan la transferencia y la movilización de genes cromosómicos (cma).
7. La carencia de los genes *spd* (responsables de la diseminación del plásmido a lo largo del micelio receptor) en el pB2 afecta la frecuencia de transferencia disminuyéndola hasta unas 100,000 veces, sin afectar la capacidad de movilización del cromosoma (cma). Mientras que en el pB53, la transferencia aumentó hasta un 52% al reintegrar los genes *spd*.
8. La presencia de mutaciones en los genes *spd* del pJV1 afectan la formación de los "pocks", pero no alteran la capacidad de movilización del cromosoma (cma); datos muy similares han sido reportados en los plásmidos: SCP2*, pIJ101 y pSN22.
9. Los genes responsables de la manifestación del fenotipo Kil-Kor presentes en el pJV1 son: *kilA* (*traA*) y *kilB* (*traB*), estos genes son seguramente regulados por el producto del gen *traR* (Kor), ya que ninguna célula es capaz de sobrevivir en ausencia del represor de los *kil* si éstos están presentes. Datos muy similares han sido reportados en los plásmidos pSN22 y pIJ101, por Kataoka et al, (1994) y Cohen et al, (1989).

10. Debido al parecido significativo del patrón de genes que determinan la replicación, transferencia, diseminación, formación de "pocks", *cma* y la manifestación del fenotipo Kil-Kor, en los plásmidos pJV1, pSN22 y pIJ101, se ha propuesto que estos plásmidos presentan una organización modular.

BIBLIOGRAFIA.

1. Bailey, C.R., Bruton, C.J., Butler, M.J., Chater, K.F., Harris, J.E., and Hopwood, D.A. (1986). Properties of in vitro recombinant derivatives of pJV1, multi-copy plasmid from *Streptomyces phaeochromogenes*. *J. Gen. Microbiology*. 132:2071-2078
2. Bibb, M.J., Freman, R.F., and Hopwood, D.A. (1977). Physical and genetic characterisation of a second sex factor SCP2, for *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Gen. Genet.* 154:155-166
3. Bibb, M.J., and Hopwood, D.A. (1981). Genetic studies of the fertility plasmid SLP2 and its SLP2* variants in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* 126:427-442
4. Bibb, M.J., Schotlel, J.L., and Cohen, S.N. (1980). A DNA cloning system for interspecies gene transfer in a antibiotic-producing *Streptomyces*. *Nature*. 284:526-531
5. Bibb, M.J., Ward, J.M., and Hopwood, D.A. (1978). Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. *Nature*. 274:398-400
6. Bocard, F., Pernodet, J.L., Friedmann, A., and Guérineau, M. (1988). Site-specific integration of plasmid pSAM2 in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces ambofaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 212:432-439
7. Bocard, F., Smokvina, T., Pernodet, J.L., Friedman, A., and Guérineau, M. (1989a). Structural Analysis of loci involved in pSAM2 site-specific integration in *Streptomyces*. *Plasmid*. 21:59-70
8. Bocard, F., Smokvina, T., Pernodet, J.L., Friedman, A., and Guérineau, M. (1989b). The integrated conjugative plasmid pSAM2 of *Streptomyces ambofaciens* is related to temperate bacteriophages. *EMBO J.* 8:973-980
9. Brasch, M.A., Pettis, G.S., Lee, S.C., Cohen, S.N. (1993). Localization and Nucleotide Sequences of Genes Mediating Site-Specific Recombination of the SLP1 Element in *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology*. 175: 3067-3074
10. Brennan, R.G., and Matthews, B.W. (1989). The helix-turn-helix DNA-Binding motifs. *J. Biol. Chem.* 264:1903-1906
11. Brolle, D.F., Pape, H., Hopwood, D.A., and Kieser, T. (1993). Analysis of the transfer region of the *Streptomyces* plasmid SCP2*. *Molecular Microbiology*. 10:157-170
12. Chater, K.F. (1984). Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. *Microbiological Development*. 89
13. Chater, K.F. (1989). Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. *Science*. 5:372-377.
14. Chen, C.W., Lin, Y.S., Kieser, H.M., and Hopwood, D.A. (1993b). The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 appears to be linear. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 17:291-297
15. Chen, C.W., Yu, T.W., Lin, Y.S., Kieser, H.M., and Hopwood, D.A. (1993a). The conjugative plasmid SLP2 of *Streptomyces lividans* is a 50kb linear molecule. *Molecular Microbiology*. 7:925-932
16. Clewell, D.B. (1993). *Bacterial Conjugation*. Plenum Press. N.Y. 293-308.

17. de la Campana, A.G., Puyet, A., and Espinoza, M. (1990). Illegitimate recombination occurs between the replication origin of plasmid pC194 and a progressing replication fork. *J.Mol.Biol.* 213:247-262
18. del Solar, G., Moscoso, M., and Espinoza, M. (1993). Rolling circle-replication plasmids from Gram-positive and Gram-negative bacteria: a wall fall. *Molecular Microbiology*. 8:789-796
19. del Solar, G., Puyet, A., and Espinoza, M. 1987. Initiation signals for the conversion of single stranded to double stranded DNA forms in the Streptococcal plasmid PLS1. *Nucleic Acids.Res.* 15: 5561-5580
20. Deng, Z., Kieser, T., and Hopwood, D.A. (1988). "Strong incompatibility" between derivatives of the *Streptomyces* multi-copy plasmid pIJ101. *Mol.Gen.Genet.* 214:286-294
21. Doull, J.L., Vining, L.C., and Stuttard, C. (1983). A cryptic plasmid in the chloramphenicol-producing actinomycete, *Streptomyces phaeochromogenes*. *FEMS Microbiology Letters*. 16:349-352
22. Gruss, A., and Ehrlich, S.D. (1989). The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids. *Microbiol.Rev.* 53:231-241
23. Gusek, W.T and Kinsella, J.E. (1992). Review of the *Streptomyces lividans*/Vector pIJ702 System for Gene cloning. *Critical Reviews in Microbiology*. 18:247-260
24. Hagège, J., Pernodet, J.L., Friedmann, A., and Guérineau, M. (1993a). Mode and origin of replication of pSAM2, a conjugative integrating element of *Streptomyces ambofaciens*. *Molecular Microbiology*. 10:794-812
25. Hagège, J., Pernodet, J.L., Sezonov, G., Gerbaud, C., Friedmann, A., and Guérineau, M. (1993b). Transfer functions of the conjugative integrating element pSAM2 from *Streptomyces ambofaciens*: Characterization of a Kil-Kor system associated with transfer. *Journal of Bacteriology*. 175:5529-5538
26. Hayakawa, T., Otake, N., Yonehara, H., Tanaka, T., and Sakaguchi, T. (1979a). Isolation and Characterization of plasmids from *Streptomyces*. *Journal Antibiotic*. 32:1348-1350.
27. Hayakawa, T., Tanaka, T., Sakaguchi, K., Otake, N., and Yonehara, H. (1979b). A linear plasmid-like DNA in *Streptomyces* sp. Producing lankasidin group antibiotics. *J.Gen.Appl.Microbiol.* 25:255-260
28. Holloway, B.W. (1979). Plasmids That Mobilize Bacterial Chromosome. *Plasmid*. 2:1-19
29. Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiat, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., and Schrepf, H. (1985). *Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual*. Norwich: John Innes Foundation.
30. Hopwood, D.A., Hintermann, G., Kieser, T., and Wright, H.M. (1984). Integrated DNA sequences in three *Streptomyces* form related autonomous plasmids after transfer to *Streptomyces lividans*. *Plasmid*. 11:1-16
31. Hopwood, D.A and Kieser, T. (1993). *Bacterial Conjugation*. Clewell, B. Plenum Press, N.Y. 293-310.

32. Hopwood, D.A., Kieser, T., Lydiate, D.J., and Bibb, M.J. (1986). Streptomyces plasmids: Their biology and use as cloning vectors. In "The Bacteria: A Treatise on Structure and Function" (S.W. Queener, and L.E. DAY, Eds) 9:159-220. Academic Press, Orlando, F.C.
33. Hopwood, D.A., Kieser, T., Wright, H.M., and Bibb, M.J. (1983). Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66. *Journal of General Microbiology*. 129:2257-2269
34. Hopwood, D.A., Thompson, C.J., Ward, J.M., Kieser, T., and Wright, H.M. (1981). Progress in the development of plasmid cloning vectors for *Streptomyces*. In: Schlesinger, D. (ed). *Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington DC. 376-379
35. Hopwood, D.A., and Wright, H.M. (1973). Transfer of a plasmid between *Streptomyces* species. *Journal. Gen. Microbiology*. 77:187-195
36. Kataoka, M., Kiyose, Y.M., Michisui, Y., Horiguchi, T., Seki, T., and Yoshida, T. (1994). Complete Nucleotide Sequence of the *Streptomyces nigrifaciens* plasmid, pSN22: Genetic Organization and Correlation with Genetic properties. *Plasmid*. 32:55-69
37. Kataoka, M., Kuno, N., Horiguchi, T., Seki, T., and Yoshida, T. (1994). Replication of the *Streptomyces* plasmid pSN22 through single-stranded intermediates. *Mol. Gen. Genet.* 242:130-136
38. Kataoka, M., Seki, T., and Yoshida, T. (1991). Five Genes Involved in Self-Transmission of pSN22, a *Streptomyces* plasmid. *Journal of Bacteriology*. 173:4220-4228
39. Kataoka, M., Seki, Y., and Yoshida, T. (1991b). Regulation and Function of the *Streptomyces* plasmid pSN22 Genes Involved in Pock Formation and Inviability. *Journal of Bacteriology*. 173:7975-7981
40. Kendall, K.J., and Cohen, S.N. (1987). Plasmid Transfer in *Streptomyces lividans*: Identification of a Kil-Kor System Associated with the Transfer Region of pIJ101. *Journal of Bacteriology*. 169:4177-4183
41. Kendall, K.J., and Cohen, S.N. (1988). Complete Nucleotide Sequence of the *Streptomyces lividans* Plasmid pIJ101 and Correlation of the Sequence With Genetic Properties. *Journal of Bacteriology*. 170:4634-4651
42. Kieser, T., Hopwood, D.A., Wright, H.M., and Thomson, C.J. (1982). pIJ101, a multi-copy broad host range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectors. *Molecular and General Genetic*. 185:223-228
43. Kinashi, H., and Murayama, S.M. (1991). Physical Characterization of SCP1, a Giant Linear Plasmid from *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*. 173:1523-1529
44. Kinashi, H., Murayama, S.M., and Hanafusa, T. (1991). Nucleotide sequence analysis of the unusually long terminal inverted repeats of a giant linear plasmid, SCP1. *Plasmid*. 26:123-130
45. Kinashi, H., Murayama, S.M., and Hanafusa, T. (1992). Integration of SCP1, a giant linear plasmid, into the *Streptomyces coelicolor* Chromosome. *Gene*. 115:35-41
46. Kinashi, H., Shimaji, M., and Sakai, A. (1987). Giant linear plasmids in *Streptomyces* which code for antibiotic biosynthesis genes. *Nature*. 328:454-456

47. Koepsel, R., Murray, R., Rosenblum, W., and Khan, S. (1985). The replication initiator protein of plasmid pT181 has sequence-specific endonuclease and topoisomerase-like activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:6845-6849
48. Lin, Y.S., Kieser, M.H., Hopwood, D.A., and Chen, C.W. (1993). The Chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Molecular Microbiology.* 10:923-933
49. Lydiate, D.J., and Hopwood, D.A. (1981). Genetics studies of the fertility plasmid SCP2 and its SCP2* variant in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* 126:427-442
50. Lydiate, D.J., Malpartida, F., and Hopwood, A.D. (1985). The *Streptomyces* plasmid SCP2*: its functional analysis and development into useful cloning vectors. *Gene.* 35:223-235
51. Murakami, T., Nojiri, C.H., Toyama, H., Hayashi, E., Yamada, Y., and Nagaoka, K. (1983). Pock forming plasmids from antibiotic-producing *Streptomyces*. *Journal of antibiotic.* 36:429-434
52. Ning Tai, T.S., and Cohen, N.S. (1993). The Active form of the KorB protein Encoded by the *Streptomyces* plasmid pIJ101 Is a processed product That Binds Differentially to the Two Promoters It Regulates. *Journal of Bacteriology.* 175:6996-7005
53. Novick, R. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* 51:381-395
54. Novick, R. (1989). Host-plasmid interactions affecting plasmid replication and maintenance in Gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiological.* 43:537-565
55. Omer, Ch.A., and Cohen, S.N. (1984). Plasmid formation in *Streptomyces*: Excision and integration of the SLP1 replicon at a specific chromosomal site. *Mol. Gen. Genet.* 196:429-438
56. Omer, Ch.A., and Cohen, N.S. (1986). Structural Analysis of plasmid and Chromosomal Loci Involved in Site-Specific Excision and Integration of the SLP1 Element of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology.* 166:999-1006
57. Okanishi, M., and Manome, T. (1980). Isolation and characterization of plasmid DNAs in actinomycetes. *Journal of antibiotics.* 33:88-91
58. Okanishi, M., Manome, T., and Umezawa, H. (1980). Isolation and characterization of plasmid DNAs in Actinomycetes. *J. Antibiotic.* 33:88-91
59. Pernodet, J.L., Simonet, J.M., and Guérineau, M. (1984). Plasmids in different strains of *Streptomyces ambofaciens*: free and integrated form of plasmid pSAM2. *Mol. Gen. Genet.* 198:35-41
60. Servin, L.G. (1993). Relationship between the Replication Functions of *Streptomyces* Plasmids pJV1 and pIJ101. *Plasmid.* 30:131-140.
61. Servin et al, (1994). Aun no publicado.
62. Shauer, A., Ranes, M., Santamaria, R., Gujjarro, J., Lawlor, E., Mendez, C., Chater, K., and Losic, R.K. (1987). Visualizing Gene Expression in Time and Space in the Filamentous Bacterium *Streptomyces coelicolor*. *Science.* 240:762-766
63. Smokvina, T., Boccard, F., Pernodet, L.J., Friedmann, A., and Guérineau, M. (1991). Functional Analysis of the *Streptomyces ambofaciens* Element pSAM2. *Plasmid.* 25:40-52

64. Stein, D.S., and Cohen, N.S. (1990). Mutational and functional analysis of the *korA* and *korB* gene products of *Streptomyces* plasmid pIJ101. *Mol Gen Genet.* 222:337-344
65. Stein, D.S., Kendall, K.J., and Cohen, S.N. (1989). Identification and Analysis of Transcriptional Regulatory Signals for the *Kil* and *Kor* Loci of *Streptomyces* plasmid pIJ101. *Journal of Bacteriology.* 171:5768-5775
66. Tai, T.J., and Cohen, N.S. (1993). The Active Form of the *korB* Protein Encoded by the *Streptomyces* Plasmid pIJ101 Is a Processed Product That Binds Differentially to the Two Promoters It Regulates. *Journal of Bacteriology.* 175:6696-7005
67. Tai, J.T., and Cohen, S.N. (1994). Mutations that affect regulation of the *korB* gene of *Streptomyces lividans* plasmid pIJ101 alter plasmid transmission. *Molecular Microbiology.* 12:31-39
68. Thomas, C.D., Projan, S., Kumar, C., and Carleton, S. (1990). Replication control for pT181, an indirectly regulated plasmid. *J. Biol. Chem.* 265:5519-5530
69. Thompson, C.J., Ward, J.M., and Hopwood, D.A. (1980). DNA cloning in *Streptomyces*: resistance genes from antibiotic-producing species. *Nature.* 286:525-527
70. Ward, J.M., Janssen, G.R., Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., and Bibb, M.J. (1986). Construction and characterisation of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as iniciador. *Mol. Gen. Genet.* 203:468-478
71. Wright, L.F., and Hopwood, D.A. (1976). Identification of the Antibiotic Determined by the SCP1 Plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology.* 95:96-106
72. Wu, X., and Roy, K.L. (1993). Complete Nucleotide Sequence of a Linear Plasmid from *Streptomyces clavuligerus* and Characterization of Its RNA Transcripts. *Journal of Bacteriology.* 175:37-52
73. Zaman, S., Radnedge, L., Richards, H., and Ward, J.M. (1993). Analysis of the site for second-strand initiation during replication of the *Streptomyces* Plasmid pIJ101. *Journal of General Microbiology.* 139:669-676
74. Zotchev, S.B., and Schrempf, H. (1994). The Linear *Streptomyces* plasmid pBL1: analyses of transfer functions. *Mol. Gen Genet.* 242:374-382
75. Zotchev, S.B., Saldatova, I.L., Orekhov, V.A., and Schrempf, H. (1992). Characterization of a linear extrachromosomal DNA element (pBL1) isolated after inter-specific mating between *Streptomyces bambergiensis* and *Streptomyces lividans*. *Res. Microbiol.* 143:839-845

83

LIBRO DE REGISTRO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACION DE LOS GENES DE
TRANSFERENCIA Y DISEMINACION DEL
PLASMIDO pJVI DE *Streptomyces phaeochromogenes*

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

p r e s e n t a

VICTOR RIVELINO JUAREZ GONZALEZ



DIVISION DE ESTUDIOS
PROFESIONALES

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

Mexico, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron el pasante(s) Juárez González Victor Rivelino

con número de cuenta 8955259-5 con el Título: _____

Identificación de los genes de transferencia y diseminación del plásmido pJV1 de Streptomyces phaeochromogenes NRRL B3559.

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Biólogo

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Dr.	Luis	Servín González	
Director de Tests			
Biol.	Miguel Angel	Neneses Pérez	
Biol.	Carlos A.	Castillo Pompeyo	
Dr.	René de Jesús	Cárdenas Vázquez	
Suplente			
M. en C.	María Elena	Calderón Segura	
Suplente			

AGRADECIMIENTOS.

A el Dr. Luis Servín por su incalculable apoyo y permitirme junto con Clementina Castro, conocer el plásmido pJV1 así como a la bacteria *Streptomyces lividans*.

A mis sinodales, Carlos Pompeyo, Miguel Angel Meneses, René Cardenas y María Elena Calderón, por sus valiosos comentarios y puntos de vista.

Muy especialmente a toda mi familia, así como amis compañeros y amigos de laboratorio y Faculataad de Ciencias.

A todos mis amigos y cuates que trabajan.

Al Instituto de investigaciones Biomedicas y a la U.N.A.M. por todo lo que me brindo.

DEDICATORIAS

**Dedico muy especialmente todo este trabajo a mis padres, por todo el apoyo que me
brindarán constantemente**

INDICE

	Núm. pag
INTRODUCCION.....	(3)
OBJETIVOS.....	(18)
MATERIAL Y METODOS.....	(19)
- PREPARACION DE ESPORAS DE STREPTOMYCES.....	(19)
- COSECHA DE LAS ESPORAS.....	(19)
- OBTENCION DE MICELIO PARA TRANSFORMACION.....	(19)
- TRANSFORMACION.....	(20)
- EXTRACCION DE DNA Y CONFIRMACION DE LA ESTRUCTURA DE LOS PLASMIDOS (" minipreps").....	(21)
- PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA EN GELES DE AGAROSA DE BAJO PUNTO DE FUSION (LMP).....	(23)
- TRATAMIENTO CON LA FOSFATASA ALCALINA.....	(24)
- EXTRACCION CON FENOL/CLOROFORMO.....	(24)
- CRUZAS GENETICAS.....	(25)
- DILUCIONES DE LAS ESPORAS Y CUANTIFICACION DE LAS MISMAS..	(25)
- CUANTIFICACION DE LA TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS Y DE LA MOVILIZACION DEL CROMOSOMA.....	(26)
- DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE FORMACION DE "POCKS".....	(26)
- MANIPULACION DE DNA.....	(26)
- MEDIOS DE CULTIVO Y BUFFERS.....	(27)
- CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS.....	(31)
RESULTADOS.....	(33)

- DELECCIONES E INSERCIONES DE LOS DERIVADOS DEL pJV1.....	(33)
- DETERMINACION DE LA EXISTENCIA DE UN SISTEMA KIL-KOR EN EL PLASMIDO pJV1.....	(37)
A) ELIMINACION DEL SITIO DE Bpu1102I.....	(37)
B) DELECCION DEL INTERVALO ScaI-Bpu1102I.....	(38)
C) DELECCION DEL INTERVALO Bpu1102I-EcoRI.....	(38)
DISCUSION.....	(39)
CONCLUSIONES.....	(46)
BIBLIOGRAFIA.....	(48)

INTRODUCCION.

Características generales del género *Streptomyces*.

Los *Streptomyces* son bacterias Gram positivas, caracterizadas por la formación de dos tipos de micelio, el vegetativo y el aéreo (Chater, 1984; Schauer et al, 1987). Su hábitat natural es el suelo y a diferencia de otros grupos de bacterias presentan un alto contenido de guanina (G) y citosina (C) en su DNA, de alrededor del 73%. Presentan un ciclo de diferenciación muy complejo, (Fig.1) en donde el micelio vegetativo penetra y solubiliza la materia orgánica empleando enzimas hidrolíticas, las cuales son secretadas al medio externo, como son proteasas, amilasas, lipasas, etc (Gusek y Kinsella, 1992). Una vez agotados los nutrientes se desarrolla un micelio aéreo, el cual posteriormente se fragmenta dando lugar a la formación de esporas. Se sabe que para la formación del micelio aéreo ocurre una lisis del micelio vegetativo, el cual de este modo sirve de nutriente al micelio aéreo (Gusek y Kinsella, 1992).

De estas bacterias se han aislado una amplia variedad de antibióticos, vitaminas, enzimas y metabolitos secundarios de importancia industrial, médica, etc. Cerca de 6000 antibióticos de origen microbiano han sido caracterizados, de los cuales más del 60% son producidos por los miembros del género *Streptomyces* (Gusek y Kinsella, 1992), teniendo aplicaciones quimioterapéuticas en la medicina humana, la medicina veterinaria, la agricultura y la industria pesquera; algunos de los muchos ejemplos que hay son el cloranfenicol (*Streptomyces venezuelae*) empleado para el tratamiento de la tifoidea, la mitomicina (*Streptomyces caespitosus*) empleada para el tratamiento del cáncer, la neomicina (*Streptomyces fradiae*) para tratamientos intestinales y la tetraciclina (*Streptomyces aureofaciens*), la cual presenta amplias aplicaciones clínicas (Okanishi y Manome, 1980; Okanishi et al, 1980; Gusek y Kinsella, 1992).

La mayor cantidad de genes de síntesis y resistencia, para la producción de antibióticos, se encuentran en los cromosomas de estas bacterias, salvo un caso muy particular como es el SCP1; este plásmido presenta los genes de síntesis y genes de resistencia para la producción del antibiótico metilenomicina (Wright y Hopwood, 1976; Kinashi, et al 1987; Kinashi y Murayama, 1991).

La mayor parte de las especies estudiadas de *Streptomyces*, presentan un mapa genético circular. Por medio de geles de electroforesis de campos pulsados (empleados para la separación de grandes moléculas de DNA y para poder diferenciar entre formas circulares y lineales), fue

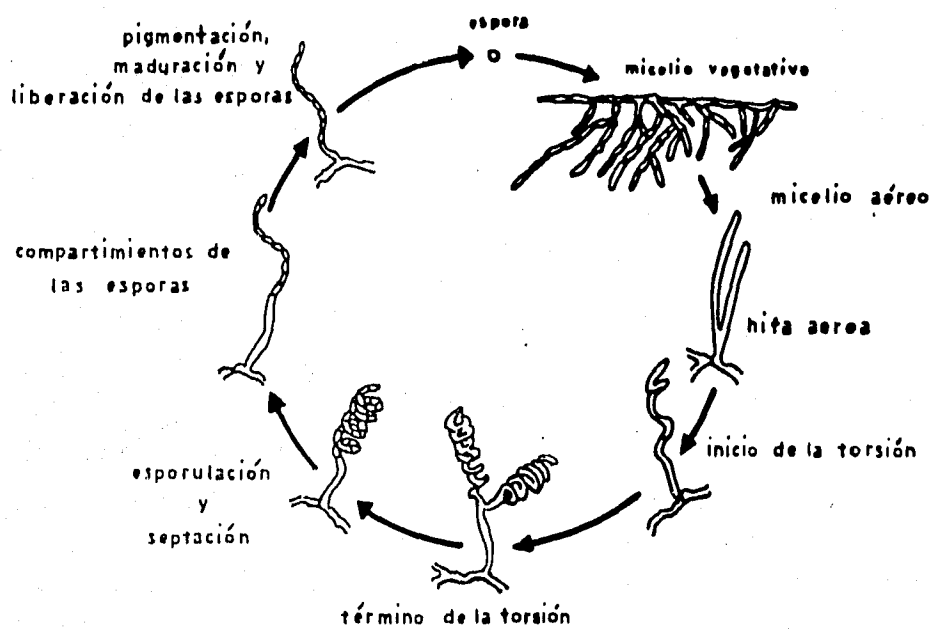


Fig.1 Ciclo de vida de los Streptomyces
Gusek y Kinsella, 1992.

posible demostrar que hay especies de *Streptomyces* que presentan un cromosoma lineal. Los cromosomas lineales han sido reportados, entre otras, para las especies: *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces lividans* (Chen et al, 1993b).

El DNA cromosómico de *Streptomyces lividans* 66 presenta una estructura lineal con dos terminales libres idénticas, cada terminal (telómero) lleva una proteína unida covalentemente. Aparentemente este tipo de asociaciones entre proteínas y telómeros tienden a circularizar la molécula in vivo (Chen et al, 1993b).

El DNA cromosómico de *Streptomyces coelicolor* A(3)2 presenta 8 Mb de DNA lineal, con la presencia de proteínas terminales en los extremos (Lin et al, 1993). La presencia de cromosomas lineales en otras especies de *Streptomyces* sugiere que la linearización del cromosoma podría ser común en este género de bacterias (Lin et al, 1993).

Plásmidos de Streptomyces.

Las bacterias, además del DNA cromosómico, presentan material genético extracromosómico, dentro del que destacan los plásmidos, se sabe que estos son pequeñas moléculas de DNA extracromosómico de tamaño variable, que generalmente son circulares aunque también se presentan los lineales.

En los *Streptomyces* se han aislado y caracterizado una amplia variedad de plásmidos; estos presentan un rango de tamaño de <4 a >200kb y el número de copias presente por célula, es desde una a más de cien. Todos los plásmidos físicamente caracterizados son moléculas de doble cadena de DNA; la mayor parte son moléculas de DNA covalentemente cerradas (ccc DNAs), sin embargo algunos son lineales.

Propiedades de los plásmidos de Streptomyces.

Numerosos plásmidos han sido aislados de los *Streptomyces* y analizados en detalle (Hopwood et al, 1986; Kataoka et al, 1991a; Kieser et al, 1982), etc. La mayoría de estos plásmidos presentan características en común. Una de las más significativas características es la presencia de genes involucrados en los eventos de transferencia intermicelial de plásmidos (genes *tra*) y de diseminación de los mismos a lo largo del micelio receptor (genes *spd* del inglés "spread"). Estos genes son los únicos requeridos para la conjugación de estos organismos

(Kataoka et al, 1991a). Estos plásmidos presentan pocos genes involucrados en la transferencia a diferencia de las bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, donde un mayor número de genes son los responsables de la transferencia.

Como producto de las funciones de transferencia los plásmidos de los *Streptomyces* presentan la capacidad de movilizar genes cromosómicos de la célula donadora, hacia la célula receptora del plásmido. Esto es llevado mediante eventos de recombinación genética entre el DNA del plásmido con regiones del cromosoma, pasando por conjugación este material genético a otra célula sin el plásmido (Holloway, 1979). En la célula hospedera el gen acarreado por el plásmido es incorporado en una región del nuevo cromosoma, mediante otro evento de recombinación. De esta manera el cromosoma tiene un nuevo gen funcional y el plásmido permanece libre en el citoplasma de la bacteria (Holloway, 1979).

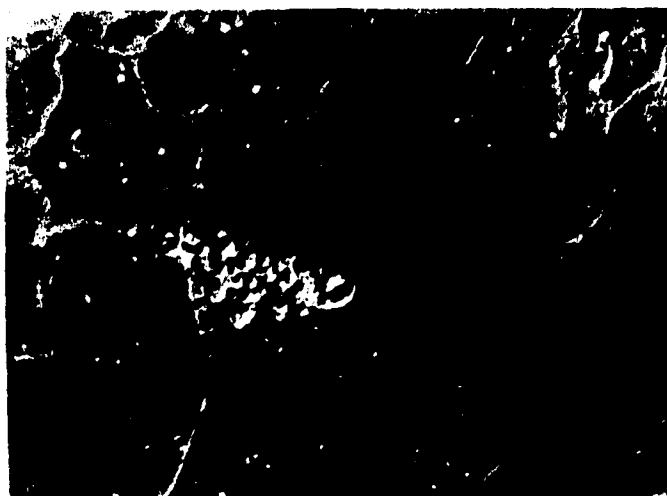
La mayoría de los plásmidos de *Streptomyces* presentan la capacidad de formar "pocks", (Fig.2) fenómeno también conocido como zigosis letal (LTZ). Los "pocks" son zonas circulares, visibles a simple vista, de 1 a 4 mm de diámetro; estos son formados por la adquisición del plásmido. El plásmido adquirido por la cepa receptora provoca una inhibición del crecimiento y la esporulación en la misma, (Bibb et al, 1977, Bibb et al, 1978, Bibb et al, 1980; Murakami et al, 1983; Hopwood et al, 1983 y Hopwood et al, 1986).

Algunos plásmidos de *Streptomyces* presentan el sistema Kil-Kor, como producto de las funciones de transferencia del plásmido, el producto del gen *kor* desempeña dos funciones, ya que se autoregula y regula (a nivel transcripcional) la expresión de los productos formados por los genes *kil* (Stein et al, 1989).

Replicación por el mecanismo del círculo rodante.

Los plásmidos pequeños circulares de alto número de copias de *Streptomyces*, normalmente se replican por círculo rodante (Fig.3). En este mecanismo participan 3 elementos principales, que son: el origen más (*ori +*), la proteína de replicación (*Rep*) y el origen menos (*ori -*).

El mecanismo del círculo rodante comienza con la síntesis de la proteína de replicación (*REP*) codificada por el plásmido, la cual reconoce una secuencia específica del DNA a la que se le denomina el *ori +* (Koepsel et al, 1985; Novick, 1987, 1989; Thomas et al, 1990 y de la



pocks

Fig 2. Morfología de los pocks formados por el plásmido pJV1 en *Streptomyces lividans*.

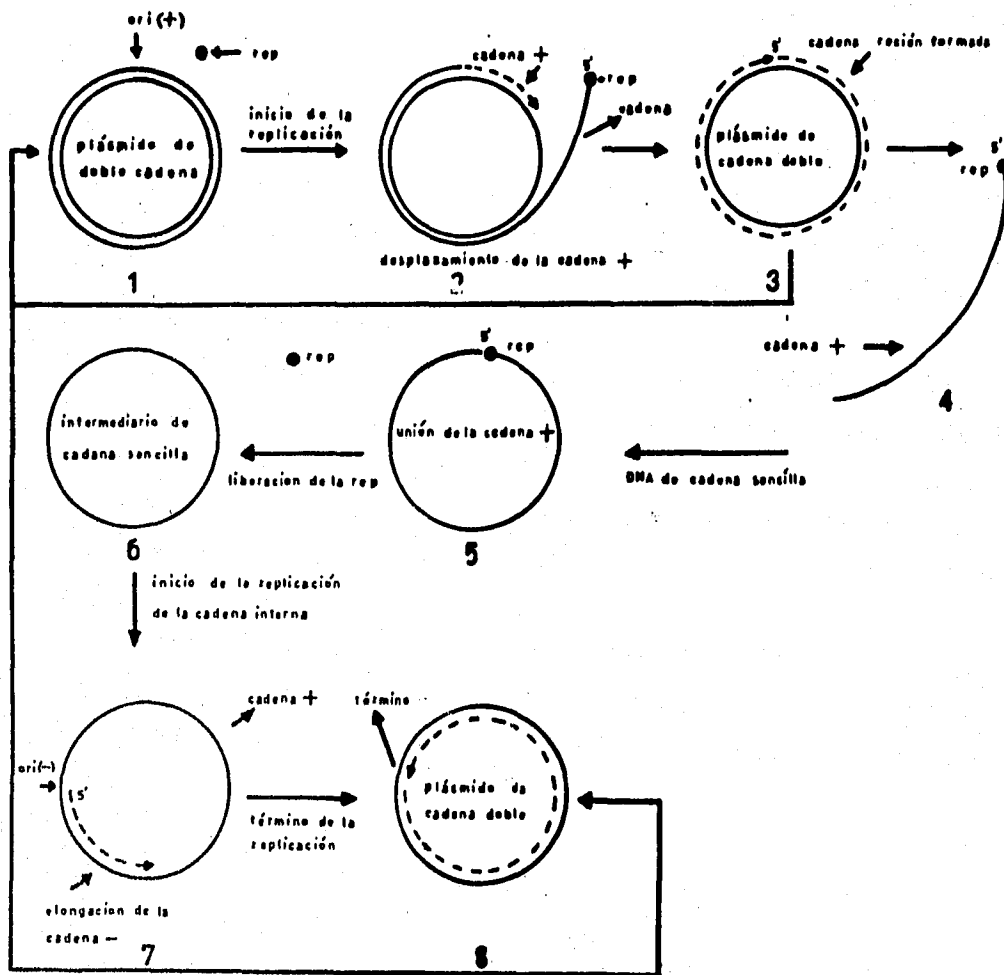


Fig.3 Estados principales de la replicación por el mecanismo del círculo rodante, en plásmidos con alto número de copias en *Streptomyces*, por Gruss y Ehrlich, 1989.

Campana et al, 1990). En esta zona la proteína Rep introduce un corte o "nick" y se pega en el extremo 5' terminal provocando el desplazamiento de la cadena externa o hebra positiva (del Solar et al, 1993; Gruss y Ehrlich, 1989). A medida que se desplaza la cadena externa de manera simultánea se da la síntesis de una copia de la misma, por medio de las DNA polimerasas celulares. La cadena externa o hebra positiva continúa desplazándose, al mismo tiempo que se genera una copia de la misma, hasta llegar al mismo sitio donde inició la replicación, en el cual la proteína Rep introduce un segundo corte y circulariza a la cadena positiva desplazada (del Solar et al, 1993; Gruss y Ehrlich, 1989). De esta forma se obtiene un plásmido de doble cadena y un intermediario de cadena sencilla, para obtener la síntesis de la cadena interna o negativa, esta es iniciada en una región diferente y específica del intermediario de cadena sencilla circularizado. A esta región se le ha denominado el ori (-), esta zona es considerada como el sitio de iniciación para conversión del DNA de cadena sencilla (ssDNA) a DNA de cadena doble (dsDNA), del Solar et al, (1987); Gruss y Ehrlich, (1989). La RNA polimerasa celular reconoce a este sitio introduciendo un primero de RNA dejando el extremo 3' terminal, el cual es reconocido por la DNA polimerasas de la célula, comenzando la replicación de la cadena interna en dirección 5'-3', ésta continúa replicándose hasta completar la hebra interna y de esta manera obtener un segundo plásmido de cadena doble, y terminar un ciclo productivo de replicación.

Los únicos elementos indispensables para que un plásmido pueda replicarse son la proteína Rep y el ori (+). Los plásmidos que carecen del ori (-) son funcionales, aunque la replicación es menos eficiente y acumulan gran cantidad de intermediarios de cadena sencilla (Gruss y Ehrlich, 1989).

Plásmidos lineales:

Este tipo de plásmidos presentan las siguientes características:

En sus extremos se encuentran flanqueados por una serie de secuencias de nucleótidos denominadas secuencias terminales invertidas repetidas (TIRs). Los extremos terminales 5' llevan proteínas unidas covalentemente vía residuos de fosfato, mientras que los extremos terminales 3' presentan grupos OH libres. Los plásmidos lineales presentes en estas bacterias, son diferenciados por el tamaño en plásmidos pequeños (<4 a <30kb) y plásmidos gigantes (>100 a >300kb).

Plásmidos pequeños:

Se han caracterizado plásmidos lineales como el pSLA2 formado por 12 Kb (Hayakawa et al, 1979a; Hayakawa et al, 1979b).

El plásmido pSCL1, fue aislado originalmente de la cepa *Streptomyces clavuligerus*; ya fue secuenciado completamente (Wu y Roy, 1993), se encuentra formado por 11.696 Kb de longitud con un contenido de G+C de 72% el cual es característico de los DNAs de *Streptomyces* y presenta 900 pb terminales invertidas repetidas; la secuencia terminal de la izquierda es idéntica en los primeros 690 pb a la secuencia terminal de la derecha, por lo que algún cambio o variación en esta región podría dañar el mecanismo de replicación.

En los extremos terminales 5' de ambas cadenas, se han encontrado proteínas unidas covalentemente.

De los 8 ORFs (marcos de lectura abiertos) predichos con base en la secuencia, solo dos presentan una similitud significativa y posible homología con algunas de las proteínas conocidas para el plásmido pIJ101; éstas son las siguientes:

La secuencia de aminoácidos encontrada para el producto del ORF-L (249 aminoácidos) del pSCL1, presenta un 45.5% de identidad en 231 aminoácidos a la secuencia de aminoácidos encontrada para la proteína KorA del pIJ101, esta similitud también se manifiesta en el tamaño. Lo anterior sugiere que este plásmido presente posiblemente un sistema kil-kor y que el producto del ORF-L forme una proteína reguladora (represor). El producto formado por el ORF-L no solo muestra un alto grado de similitud con el producto del gene *korA* del plásmido pIJ101, sino también es similar a un número muy alto de proteínas reguladoras que presentan un motivo hélice-vuelta-hélice (Wu y Roy, 1993). Se conoce que este sitio específicamente interactúa con una región muy particular del DNA del plásmido (Brennan y Matthews, 1989).

Por otra parte el ORF-4 formado por 327 aminoácidos, presenta un patrón de hidrofobicidad con 4 hélices transmembranales, esto es muy similar a lo conocido para la proteína SpdB del pIJ101 involucrada en la diseminación del plásmido, la cual contiene 3 fuertes dominios hidrofóbicos. Sin embargo poco es lo conocido sobre la formación de "pocks" del pSCL1 en *Streptomyces clavuligerus* y no se puede predecir si el ORF-4 está involucrado en una función semejante a la diseminación del plásmido (Wu y Roy, 1993).

El pBL1 es un plásmido conjugativo aislado de la cepa *Streptomyces bambergensis*, se encuentra formado por 43 kb y presenta la capacidad de formar "pocks".

La región involucrada en la transferencia está comprendida en una secuencia de 5.7 kb. Al realizar el análisis sobre esta secuencia se encontraron 6 posibles ORFs: El ORF-2 codifica para una proteína (338 aminoácidos) esencial de la transferencia, la cual está regulada negativamente por el producto del ORF-6 (118 aminoácidos); estos productos son muy similares al patrón determinado para la transferencia del pSN22 como son: El gen principal de la transferencia intramicelial (*traA*) y el gen regulador del *traA* (*traR*) por (Kataoka et al, 1991a). Mutaciones realizadas en la secuencia del ORF-1, afectan la formación de "pocks" y reducen la frecuencia de transferencia. La proteína formada por este ORF presenta 2 motivos hélice-vuelta-hélice (HTH) los cuales son muy semejantes a los encontrados para las proteínas reguladoras de tipo activador (Breennan y Matthews, 1989).

Mutaciones en el ORF-5 provocan reducciones en el tamaño de los "pocks", así como en la frecuencia de transferencia, este producto ayuda a la diseminación del plásmido a lo largo de las hifas receptoras.

Las proteínas encontradas para los dos genes "spread" del pIJ101 presentan muy poca homología con el producto del ORF5. Estos genes desempeñan funciones muy importantes en la diseminación y transferencia de este plásmido (pBL1).

Al analizar el ORF-4 se encontró lo siguiente: Un contenido bajo de G+C en comparación al localizado en el DNA de los otros ORFs, así como la presencia de dos codones raros TTA (Zotchev et al, 1992). El ORF-4 se transcribe y su expresión puede estar regulada por el producto del gen *bldA*, del cual se conoce la codificación de un solo leucil-tRNA que reconoce codones UUA, ya que el gen *bldA* desempeña un papel muy importante en la regulación de la expresión de genes que contienen codones TTA, los cuales son raramente encontrados en los *Streptomyces* (Chater, 1989).

Al realizar mutaciones en el ORF-7 la eficiencia en la transferencia no se afecta, por lo que el producto de este ORF no es importante en la transferencia del plásmido.

Al efectuar el análisis de la secuencia sobre el plásmido pBL1, muestra que al menos 5 genes están involucrados en las funciones de transferencia y la formación de "pocks" del plásmido.

El ORF-5 reduce el tamaño de los "pocks" y la transferencia; mientras que los ORFs importantes en la eficiencia en la transferencia son ORF2 y ORF3 (Zotchev et al, 1992).

El plásmido SLP2 fue aislado de la cepa de *Streptomyces lividans* 66, está formado por 50 kb, se transfiere por conjugación y presenta la capacidad de formar "pocks". Por electroforesis de campos pulsantes se detectó esta molécula, al analizar la secuencia en sus extremos se encontraron 44 pb terminales invertidas repetidas, donde las 12pb terminales de ambos extremos son idénticas a los encontrados para el pSLA2 y SCP1 (Chen et al, 1993a).

Plásmidos Gigantes:

Son denominados así por su enorme tamaño, el SCP1 es un claro ejemplo de ello (Fig.4). Fue aislado originalmente de la cepa *Streptomyces coelicolor* M138, este plásmido se encuentra formado por 350 Kb (Kinashi y Murayama; 1991).

Se analizaron las secuencias de nucleótidos de las terminales invertidas repetidas (TIRS) en ambos extremos determinándose el tamaño de ambas, el cual es de 81 Kb. En ambos extremos de las secuencias terminales 5' se encuentran proteínas unidas covalentemente, para evitar que el DNA sea degradado durante la replicación del plásmido (Kinashi et al, 1991).

Se encontró una secuencia de inserción en la terminal invertida repetida de la región derecha (Fig.4.1) por Kinashi et al, (1992) por lo que se ha propuesto que el SCP1 se encuentra presente en tres formas en *Streptomyces coelicolor*:

- Puede encontrarse libre en el citoplasma celular, teniendo una replicación autónoma.
- Puede encontrarse libre en el citoplasma celular, conteniendo un fragmento del cromosoma y replicarlo.
- Puede encontrarse integrado en una región específica del cromosoma, replicándose cada que lo haga el cromosoma.

Los plásmidos circulares:

Son los plásmidos más frecuentemente encontrados en los *Streptomyces*. Algunos se replican por el mecanismo del círculo rodante; todos son conjugativos y presentan la capacidad de movilizar marcadores cromosómicos (cma) durante el evento de transferencia.

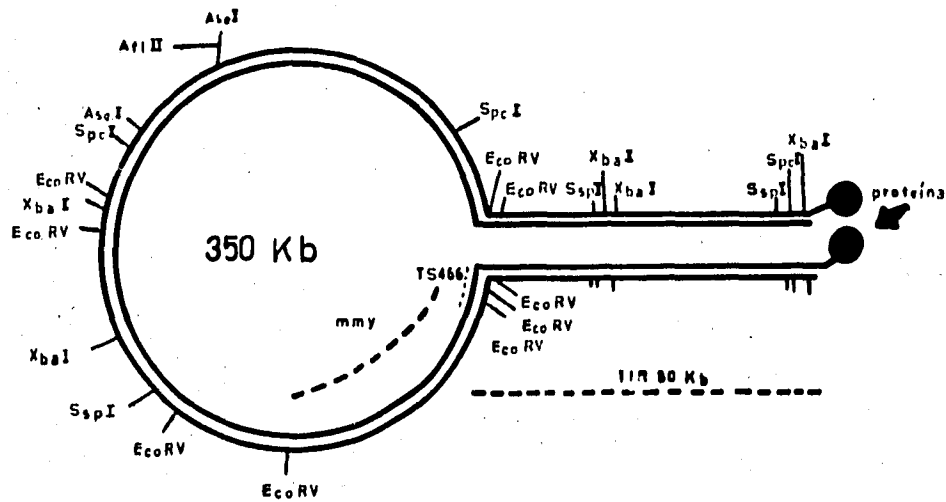


Fig.4 Mapa físico del plásmido SCP1, por Kinashi y Murayama, 1991.

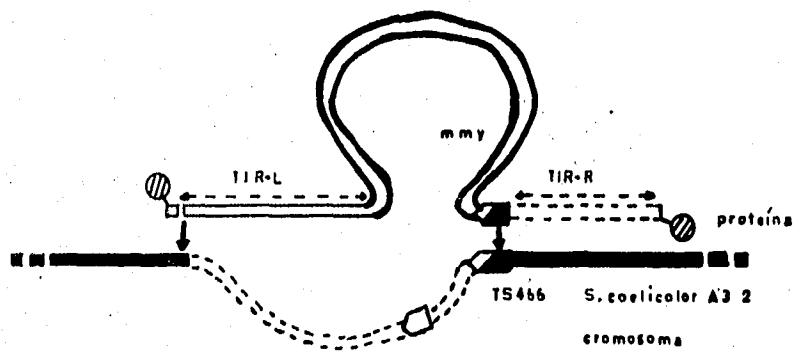


Fig. 4.1 Integración del plásmido SCP1 y las secuencias terminales invertidas repetidas, por Kinashi et al, 1992.

Estos plásmidos son divididos en base al número de copias que tienen por cromosoma en plásmidos con bajo número de copias y plásmidos con alto número de copias (multicopia).

Plásmidos con bajo número de copias:

El SCP2* (Fig.5) es un plásmido aislado de la cepa *Streptomyces coelicolor A(3)2*, el mapa físico de este plásmido fue determinado por Lydiate et al, (1985). El SCP2* se encuentra formado por 31,4 kb. Por medio de mutaciones (deleciones), se analizó la región responsable de la transferencia. Se encontraron 5 genes involucrados en ésta: *traA*, *traB*, *traC*, *traD* y *spd*, localizados en una región de 9 kb y formando un operón.

El gen *traA* es esencial para la transferencia principal del plásmido, así como para la movilización de marcadores cromosómicos (*cma*), dicho gen codifica para una proteína de 442aa. Mientras que el gen *traB* codifica una proteína de 137aa, mutaciones realizadas en este gen y en el gen *traD* reducen la frecuencia de transferencia y la movilización de marcadores cromosómicos (Brolle et al, 1993).

Mutaciones en los genes *spd*, presentan un efecto similar al producido en los *spd* del pIJ101, con una clara reducción en el tamaño de los pocks, pero sin afectar la *cma*. El SCP2* se transfiere con una alta frecuencia (100%), además de presentar la capacidad de formar "pocks".

Plásmidos con alto número de copias:

La región esencial de estos plásmidos comprende el origen de replicación (*ori* +) y la proteína *Pep*, como lo mínimo en requerimientos para que un plásmido sea funcional.

Los plásmidos de *Streptomyces* tienen además de la región esencial, genes involucrados en la transferencia (genes *tra*) y diseminación del plásmido (genes *spread*), estos genes son los responsables de la conjugación del plásmido entre cepas. El evento de conjugación bacteriana es un proceso de transferencia del material genético de una célula donadora del plásmido a otra célula receptora del mismo.

Las regiones de transferencia ya han sido identificadas en algunos plásmidos multicopia de *Streptomyces* como son:

El pIJ101 (Kendall y Cohen, 1988) y el pSN22 (Kataoka et al, 1991a), en los cuales muy pocos genes son los responsables de la transferencia de los plásmidos. También dichas regiones ya

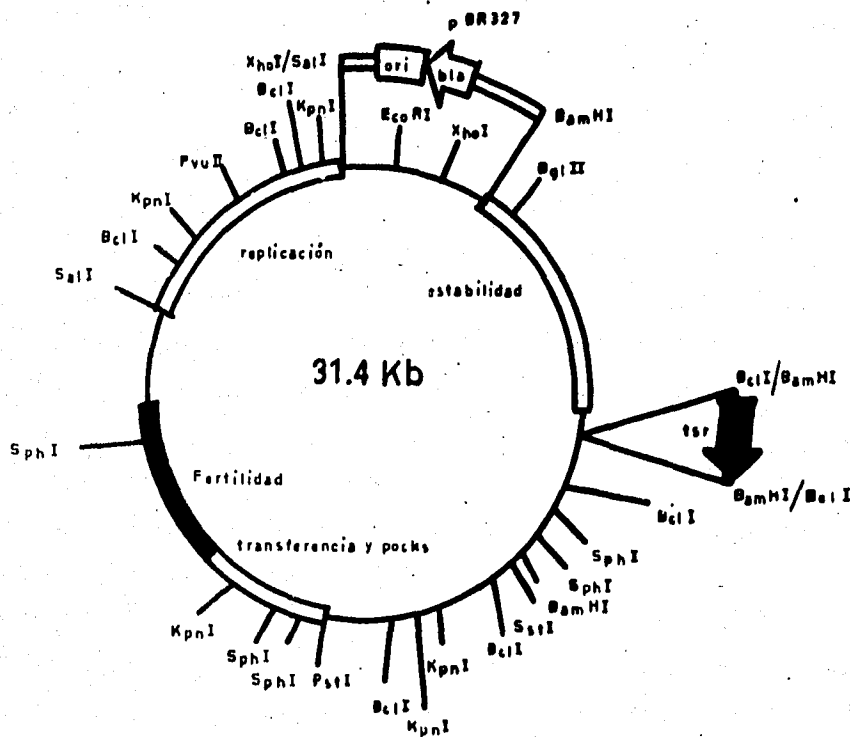


Fig.5 Mapa físico del plásmido SCP2*
 por Lydiate et al, 1985.

han sido identificadas en plásmidos que se integran en sitios específicos del cromosoma, entre los que destaca el pSAM2 (Hagege et al, 1993b).

El plásmido pSAM2 puede mantenerse funcionalmente en la célula a través de dos formas, es decir puede encontrarse integrado en el cromosoma o estar de manera libre en el citoplasma, donde llega a tener 10 copias por célula (Hagege et al, 1993a).

Una característica fenotípica muy particular de los plásmidos de *Streptomyces* producto de las funciones de transferencia es la relacionada con la formación de "pocks" o zigosis letal (LTZ) por Hopwood et al, 1983. Estos "pocks" no son otra cosa que zonas de inhibición del crecimiento y esporulación en la cepa receptora causada por la adquisición del plásmido (Hopwood et al, 1984). Se ha sugerido que la formación de "pocks", es una manifestación de la transferencia intramicelial del plásmido dentro del micelio de un cultivo receptor, después de la transferencia primaria o intermicelial del micelio donador (Hopwood y Wright, 1973; Hopwood et al, 1983; Hopwood et al, 1986).

Existe un sistema identificado en los plásmidos de *Streptomyces* conocido como Kil-Kor, el cual se encuentra involucrado en la transferencia de los plásmidos, en donde los genes *kil* desempeñan funciones específicas en la letalidad, una vez que el plásmido pasa a la cepa receptora. Por otra parte el gen *kor* sintetiza productos que se hayan involucrados en el control de la expresión del fenotipo Kil siendo por tanto la proteína Kor un inhibidor de la expresión de los productos formados por los genes *kil* (Kendall y Cohen, 1987).

Los plásmidos con alto número de copias, son los plásmidos mas estudiados de los *Streptomyces*; en ellos destacan: Los plásmidos integrativos, los cuales se integran en regiones muy específicas del cromosoma como: el SLP1 (Brasch et al, 1993) y el pSAM2 (Boccard et al, 1989a). Y los plásmidos que se encuentran en el citoplasma celular de la bacteria, denominados plásmidos libres como: el pIJ101 (Hopwood et al, 1981), el pSN22 (Kataoka et al, 1991a) Y el pJV1 (Bailey et al, 1986).

Plásmidos integrativos:

Estos plásmidos tienen una región de nucleótidos muy conservada denominada (*attP*), la cual es homóloga a una región presente en el cromosoma denominada (*attB*); por entrecruzamiento estos dos sitios de reconocimiento se pueden unir.

Los genes *int* codifican proteínas, que le permiten al plásmido integrarse al cromosoma en estas regiones, de esta forma el plásmido queda incorporado en una región específica del cromosoma. Los plásmidos integrativos presentan genes que sintetizan productos para el mantenimiento del plásmido y para la liberación del mismo (genes *xis*).

Características del plásmido SLP1.

El SLP1 es un elemento genético aislado del cromosoma de *Streptomyces coelicolor* A3(2), (Fig.6) se encuentra formado por 17.2 Kb. El análisis de la secuencias nucleótídicas involucradas en los mecanismos de inserción y liberación del plásmido en el cromosoma bacteriano, demostraron la presencia de 2 ORFS contenidos en una región de 2.2 Kb. El ORF formado por el gen *int* de 1.365 Kb, codifica una proteína básica de 50.6 kDa, esta proteína presenta una secuencia de aminoácidos similar a la familia de proteínas integrasas. El ORF6 codifica para una proteína básica de 7.1 kDa, la secuencia de aminoácidos formada por esta proteína, es muy similar a las secuencias de aminoácidos encontradas para proteínas excisionasas presentes en otros sistemas de recombinación (Brash et al, 1993). El análisis funcional de estos genes presentan una alta similitud con la secuencia de aminoácidos derivada para las proteínas recombinasas.

Los mecanismos de recombinación mediados por el SLP1, son el sitio *attP* (del plásmido) con el sitio *attB* (del cromosoma), los cuales comparten una región homóloga de 112 pb. El evento de integración forma dos nuevos sitios que son: el sitio de la izquierda (*attL*) y el sitio de la derecha (*attR*), por Omer y Cohen, (1984, 1986).

Características del plásmido pSAM2.

El pSAM2 es un elemento originalmente aislado de *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877, (Fig.7) presenta una longitud de 11 kb. Este plásmido presenta la capacidad de transferirse por conjugación y la capacidad de poder integrarse en sitios específicos del cromosoma de la cepa receptora (Smokvina et al, 1991). El pSAM2 puede mantenerse en dos formas diferentes en *Streptomyces*, ya sea integrado en el cromosoma o libre en el citoplasma celular donde llega a tener 10 copias por cromosoma (Hagege et al, 1993a). El sitio específico de integración fue localizado (Boccard et al, 1989a; Boccard et al, 1989b); el fragmento importante

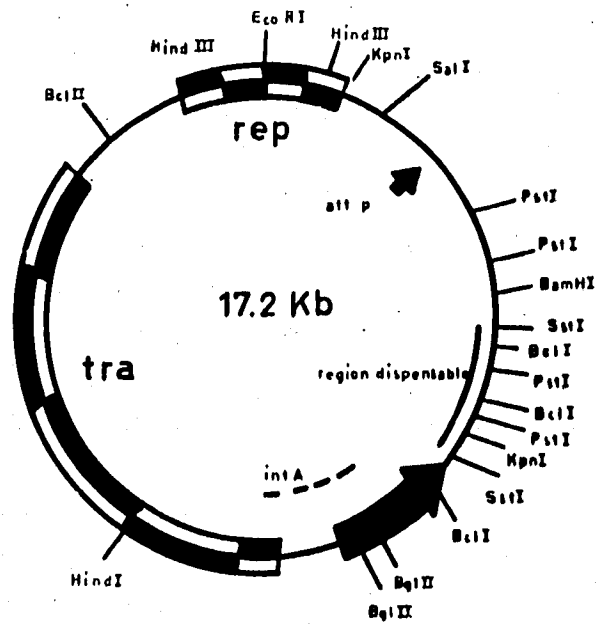


Fig.6 Mapa físico del plásmido SLP1, por Brash et al, 1993.

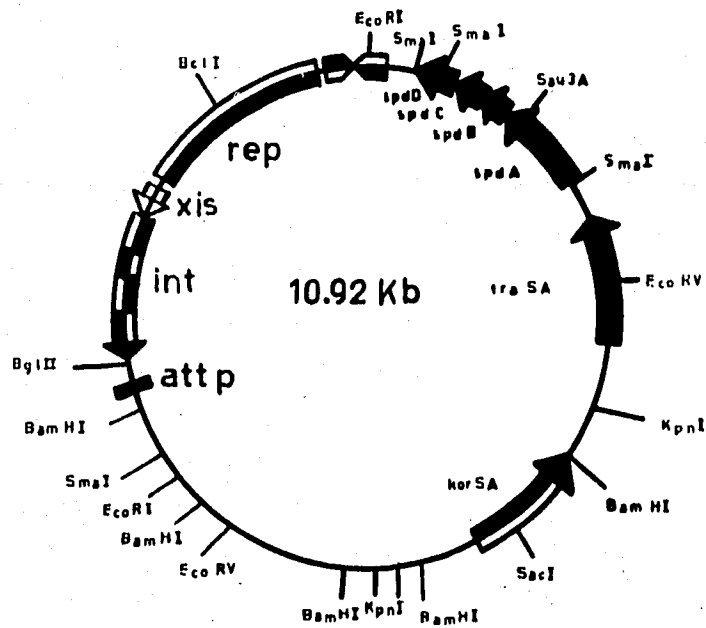


Fig.7 Mapa físico del plásmido pSAM2, por Smokvina et al, 1991.

para el evento de integración, se encuentra contenido en 2.3 kb el cual contiene los genes de integración (*int*), que codifican para una proteína integrasa, los genes (*xis*) que codifican para una proteína excisionasa y el sitio para el reconocimiento del plásmido (*attP*). Se conoce que el evento de recombinación ocurre a través de las 58 pb presentes en el sitio *attP* (pSAM2) y *attB* del cromosoma (*Streptomyces lividans*). Este plásmido puede integrarse también en sitios específicos del genoma de *Streptomyces lividans* y *Streptomyces coelicolor*.

Cuando el pSAM2 se encuentra libre en el citoplasma se replica de manera autónoma, se transfiere con una alta eficiencia, presenta la capacidad de movilizar marcadores cromosómicos y forma "pocks".

El mapa funcional de este plásmido fue determinado por Smokvina et al. (1991); al analizar la secuencia, se encontraron 7 ORFs los cuales son transcritos en la misma dirección y son los siguientes:

El gen encargado de la transferencia principal del pSAM2 es *traSA*, el cual sintetiza una proteína de 306 aa; esta proteína tiene algo de similitud a nivel de secuencia de aminoácidos, con la proteína Tra del pIJ101. El producto de *traSA* es esencial para la transferencia intermicelial del plásmido y formación de "pocks". En el pSAM2 se identificaron cuatro ORFs: *spdA* (224aa), *spdB* (58aa), *spdC* (51aa) y *spdD* (104aa), los cuales son los encargados de la transferencia intramicelial. Los cuatro genes son leídos en la misma dirección; parece haber acoplamiento traduccional, ya que el codón de término de un gen y el codón de inicio del siguiente gen, están separados por pocos nucleótidos, de tal manera que las secuencias Shine-Dalgarno se encuentran muy cercanas al término del gen anterior. Mutaciones en los genes *spread*, influyen en el tamaño de los "pocks", en la eficiencia de la transferencia y son requeridos para una transferencia intramicelial (Hagege et al, 1993b). El sistema Kil-Kor también se encontró en este plásmido, ya que el producto del gen *korSA*, puede controlar la expresión de los productos del gen *traSA* (Hagege et al, 1993b), y una cepa sin *korSA* no es viable.

Plásmidos libres:

La mayor parte de este tipo de plásmidos, caracterizados físicamente, se replican por el mecanismo del círculo rodante y son plásmidos multicopia. Dentro del género *Streptomyces* son los plásmidos más estudiados, en la mayoría de los casos han sido desarrollados como vectores de

clonación, por ejemplo: el pIJ101 (Deng et al, 1988), el pSN22 (Kataoka et al, 1991) y el pJV1 (Bailey et al, 1986).

Características del plásmido pIJ101.

El pIJ101 (Fig.8) es un plásmido circular, multicopia (300 copias por cromosoma), el cual fue aislado originalmente de la cepa de *Streptomyces lividans* ISP 5434, este plásmido está formado por 8.830 Kb presentando una composición de G+C de 72.98%, lo cual es característico del DNA de *Streptomyces* (Kieser et al, 1982).

La secuencia completa de este DNA ya ha sido determinada (Kendall y Cohen, 1988). Se han identificado varios genes que se encuentran involucrados en la transferencia del plásmido y asociados con la presencia de "pocks". Además ciertos genes desempeñan funciones específicas en la letalidad de la cepa receptora del plásmido (genes *kil*), mientras que para otros su función radica en codificar productos que controlan la expresión del fenotipo *kil* (genes *kor*). Los productos formados por los genes *kor* regulan negativamente su propia expresión, así como a la expresión de los genes de tipo *kil* a nivel transcripcional (Kendall y Cohen, 1987; Stein et al, 1989; Stein y Cohen, 1990).

Al analizar la secuencia del pIJ101 se encontraron 7 ORFS o marcos de lectura abiertos, los cuales se identificaron y correlacionaron con las propiedades fenotípicas específicas. Dos de los ORFS encontrados (*korA-korB*) codifican para proteínas represoras que controlan la expresión de varios promotores encontrados en otros genes en el plásmido. Las secuencias predichas de aminoácidos para estos ORFS no muestran regiones de homología con algunas otras proteínas represoras conocidas; aunque las secuencias de aminoácidos encontradas presentan un motivo (hélice-vuelta-hélice), el cual es común para proteínas que se pegan a regiones específicas del DNA.

En cuanto a las funciones de transferencia se localizaron cuatro ORFS: el primero codifica para una proteína Tra de 77 KDa, mutaciones hechas en regiones de este gen afectan la transferencia primaria del plásmido (Kendall y Cohen, 1988). Mediante inserciones se ha demostrado que los otros 3 ORFS (*spdA*, *spdB* y *kilB*) codifican proteínas involucradas en la diseminación del plásmido; éstas presentan tres fuertes dominios hidrofóbicos, lo que sugiere que

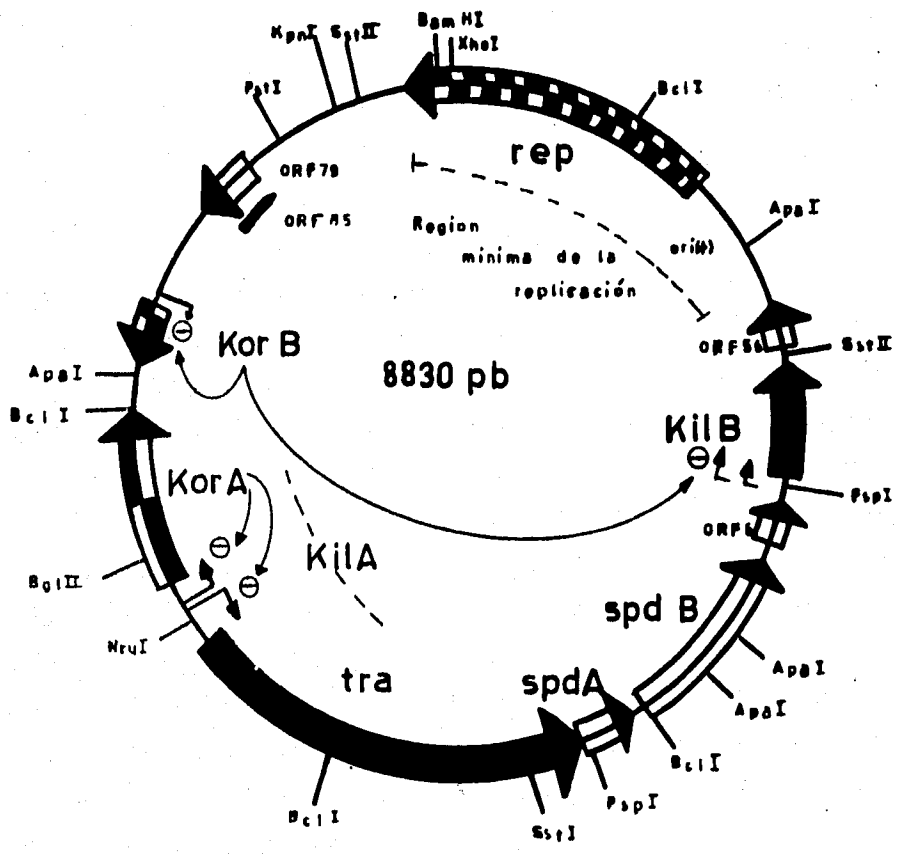


Fig.8 Mapa físico del plásmido pIJ101 por Kendall y Cohen 1988.

pueden estar asociadas a la membrana ayudando a la diseminación de los plásmidos a todo lo largo de las hifas.

El pIJ101 se transfiere con una alta frecuencia (100%) además de presentar la capacidad de movilizar marcadores cromosomales presentes en la cepa hospedera.

El pIJ101 se replica por el mecanismo del círculo rodante, ya se identificaron las siguientes regiones: el ori (+), la proteína de replicación (450 aminoácidos) y el ori (-) por Kendall y Cohen, (1988) y Zaman et al, (1993).

Características del pSN22.

El pSN22 es un plásmido multicopia el cual se aisló originalmente de la cepa *Streptomyces nigrifaciens*, (Fig.9) se encuentra constituido por 11 Kb (Kataoka et al, 1991a). Este plásmido ya fue secuenciado completamente, al realizar el análisis estructural y funcional sobre las regiones involucradas en la transferencia, se identificaron cinco genes, dos de los cuales se encuentran implicados en la transferencia (*traA* y *traB*) y otros en la formación de "pocks" (*spd*). La transferencia intermicelial se encuentra controlada por el gen *traB* de este plásmido, aumentando la fusión celular en la cual se da un contacto entre los micelios de la cepa donadora y receptora del plásmido favoreciendo la fusión entre células (Kataoka et al, 1991a). Por otra parte el gen *traA* promueve la transferencia intramicelial del plásmido una vez que el plásmido ha pasado al micelio receptor, además *traA* es esencial para la formación de "pocks", lo que sugiere que la cantidad apropiada de producto de este gen inhibe el crecimiento de las células del micelio receptor durante la transferencia del plásmido, manifestándose la existencia de zonas circulares de inhibición del crecimiento y la esporulación.

Los genes responsables de la diseminación o spread (*spdA* y *spdB*) facilitan el movimiento de los plásmidos a todo lo largo del micelio receptor (Kataoka et al, 1991b). Las mutaciones efectuadas en estas zonas, afectan el tamaño de los "pocks".

El gen *traR* forma un producto (Kor) regulador tanto de si mismo, como de los productos formados por los genes *kil* (*TraA* y *TraB*), de tal manera que mutaciones realizadas en *traR* son letales para la célula, manifestandose de esta forma la expresión del fenotipo Kil.

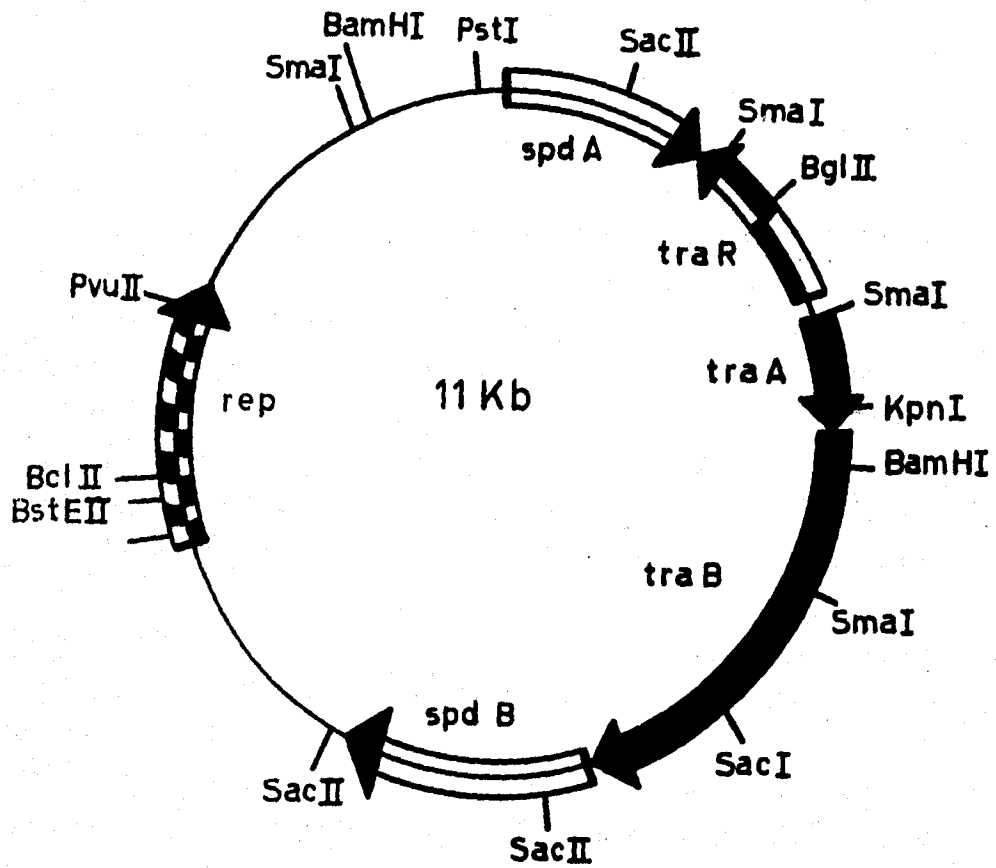


Fig.9 Mapa físico del plásmido pSN22, por Kataoka et al, 1991.

El pSN22 se replica por el mecanismo del círculo rodante, la región esencial mínima para la replicación se encuentra localizada en un fragmento de 1.9 Kb (Kataoka et al, 1994a), en donde se localiza un gen para una proteína Rep y un ori(+) prácticamente idénticos a los del pIJ101.

Características del pJV1.

El pJV1 es un plásmido multicopia, (Fig.10) que fue aislado originalmente de la cepa *Streptomyces phaeochromogenes* NRRL B3559 (Doull et al, 1983). Se encuentra formado por 11.14 Kb de longitud, se replica por el mecanismo del círculo rodante a través de intermediarios de cadena sencilla, es un plásmido multicopia (150 copias por célula) y presenta la capacidad de formar "pocks" (Bailey et al, 1986).

El pJV1 ya fue secuenciado completamente (Servín et al, 1994). El análisis de la secuencia ha demostrado que existe homología de las regiones *tra* y *spd* con las del pSN22. El análisis hecho sobre la región esencial del pJV1 identificada por Bailey et al, (1986) reveló la presencia de un ORF que codifica la proteína (Rep), la cual está formada por 523 aminoácidos. Este análisis efectuado sobre la región esencial (Servín, 1993) mostró un modo de organización similar, al reportado para el plásmido pIJ101 (Kendall y Cohen, 1988), encontrándose que las secuencias de aminoácidos que componen las proteínas (Rep), tienen una identidad del 30% aproximadamente. La proteína Rep del pJV1 presenta un motivo muy conservado, que es muy similar al reportado para todas las proteínas (Rep), el cual contiene una tirosina involucrada en hacer un "nick" en el origen de replicación (ori +). El ori (+) también fue identificado, se encuentra comprendido entre 3368pb-3438pb y se conoce también el sitio exacto para iniciar la replicación (Servín, 1993). Aún no se conoce la secuencia que forma el origen menos.

Se encontraron ORFs equivalentes a los genes *traR*, *traA*, *traB* del pSN22. También existe homología significativa en la región de los genes *spd*. Con excepción de *traR*, todos se encuentran alineados en la misma dirección y posiblemente están constituyendo un operón, al igual que en el pSN22. Curiosamente el pJV1 parece carecer de un gene *spdA* que se encuentra en el pSN22. A pesar de que el pJV1 y el pSN22 muestran gran similitud a nivel de los genes *tra* y *spd*, la similitud de las proteínas Rep es mucho más baja, ya que la proteína Rep del pSN22 solo muestra un 30% de identidad con la del pJV1, pero un 98% con la del pIJ101. Esto parece ser un fenómeno muy similar al encontrado por otros plásmidos que se replican por intermediarios de

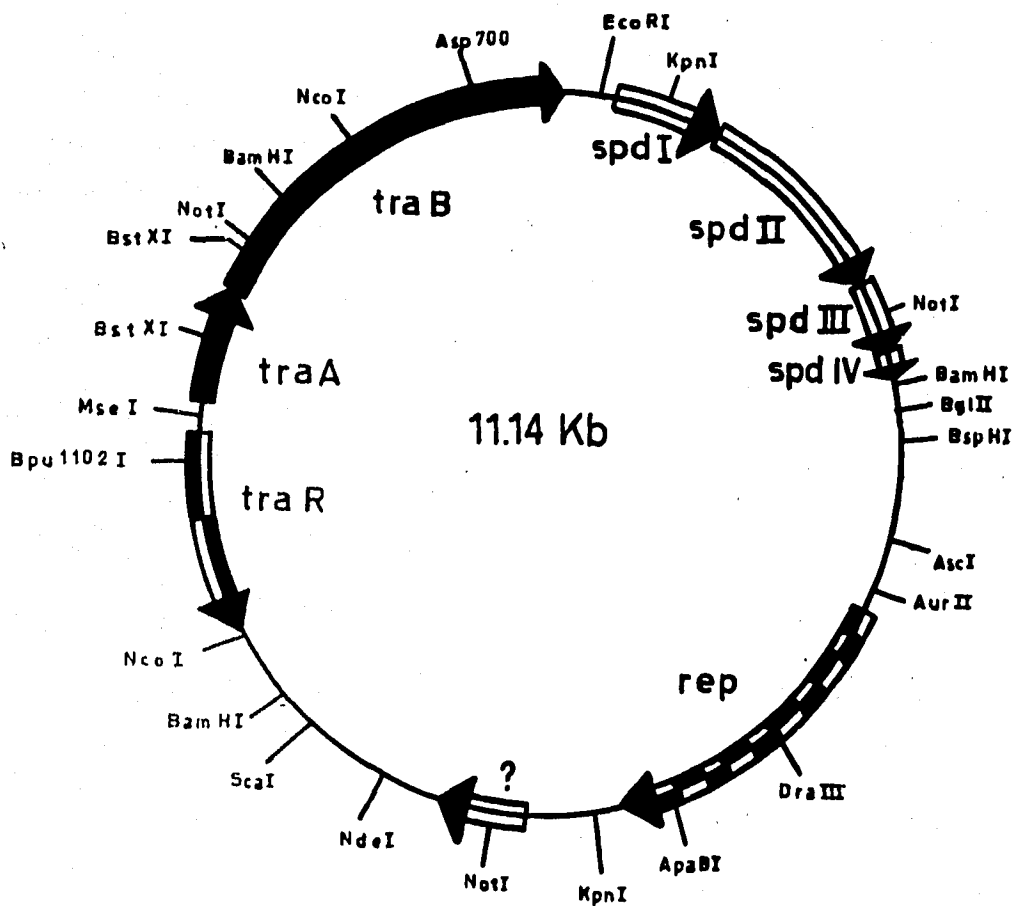


Fig.10 Mapa físico del plásmido pJV1, por Bailey et al, 1986.

cadena sencilla, los cuales presentan una estructura modular (Gruss y Ehrlich, 1989); de esta forma el pSN22 parecería estar formado por un módulo de genes *tra* y *spd* similar al del pJV1 y un módulo Rep similar al del pIJ101, (Servín et al, 1994).

Los genes responsables de la transferencia intermicelial, la transferencia intramicelial y diseminación o (spread) del pJV1 codifican para proteínas muy similares a las del pSN22, además de presentar una alta similitud entre las regiones intercistronicas, (Servín et al, 1994).

Aunque ya se tienen identificados por homología, los genes involucrados en la transferencia y diseminación del pJV1, no se conoce si el funcionamiento de estos es parecido a los del pSN22, tampoco se sabe si se presenta un sistema Kil-Kor. Estos últimos puntos son el principal tema de estudio de este trabajo.

Objetivos.

1. Caracterizar los genes de transferencia en el plásmido pJV1 de *Streptomyces phaeochromogenes*.
2. Comprobar la localización y función de los genes de transferencia (*tra*) y diseminación (*spd*) del pJV1.
3. Comprobar la localización y función de los genes responsables del fenotipo Kil-Kor del pJV1.
4. Demostrar la habilidad de recombinación cromosomal del pJV1.

MATERIAL Y METODOS.

Preparación de esporas de *Streptomyces*.

Las cepas de *Streptomyces lividans* se purificaron realizando estrias sucesivas en cajas de Petri conteniendo el medio rico R5, de manera que se obtuvieran colonias aisladas después de varios días de incubación a 29 °C, las cuales se dejaron esporular completamente. Para obtener cantidades suficientemente elevadas de esporas se tomaron con un asa estéril las esporas de una colonia aislada y se resuspendieron en un volumen pequeño (aproximadamente 0.5 ml) de agua desionizada estéril, el cual se distribuyó en la superficie de una o varias cajas de Petri de medio rico R5, a este último se le adicionaron además los requerimientos de cada cepa. De esta forma se obtuvo un crecimiento confluyente, el cual después de varios días de incubación esporuló abundantemente. Las cepas utilizadas de *Streptomyces lividans* fueron la TK64 (pro-2, str-6) y la cepa TK54 (his-2, leu-2, spc-1) por Bailey et al, (1986).

Cosecha de las esporas.

- Se agregaron 10 ml de agua desionizada estéril a cada caja de Petri y las esporas fueron raspadas con un asa estéril. La suspensión de esporas se tomó con una pipeta de 10 ml y se filtró a través de tubos con algodón estéril.
- Se agregaron otros 5 ml de agua estéril a la caja, para extraer las esporas que se hubieran quedado en la caja, y este volumen fue también filtrado a través de algodón.
- Las esporas filtradas se colectaron por centrifugación en tubos estériles de tapón de rosca, se lavaron con 5 ml de agua estéril, se volvieron a centrifugar y finalmente se resuspendieron en 1 ml de glicerol al 20% estéril.
- Las esporas se mantuvieron en viales a -20 °C, hasta utilizarse.

Obtención de micelio para transformación.

Para preparar el micelio a ser transformado, se utilizaron matraces de 250 ml con un resorte de acero inoxidable en el fondo, para obtener una buena dispersión del micelio. Se colocaron en el matraz 25 ml de medio YEME con 34% de sacarosa, MgCl₂ 5mM y glicina 0.5%, y se inoculó el medio con 0.2 ml de esporas concentradas. El cultivo se incubó con agitación vigorosa durante dos días a 29 °C. Posteriormente el cultivo de cada matraz es vertido

en tubos de plástico estériles con capacidad de 40 ml, añadiendo 10 ml de una solución estéril de sacarosa al 10.3%, y el micelio fue cosechado por centrifugación a 5000 rpm durante 12 min. El sobrenadante se eliminó y el micelio se resuspendió en 15 ml de sacarosa al 10.3% estéril y fue centrifugado bajo las condiciones mencionadas con anterioridad. El sobrenadante fue desechado y al tubo se agregaron 6 ml de la solución de sacarosa, el micelio se resuspendió en este volumen y se dividió en 3 tubos limpios y estériles a los cuales se les adicionaron 2 ml de la solución de sacarosa al 10.3% por tubo. Estos tubos se centrifugaron a 3500rpm durante 10 min, los sobrenadantes se desecharon y los tubos con los pellets de micelio fueron almacenados en el congelador a -20 °C, hasta el momento de ser utilizados.

Transformación.

Para la transformación bacteriana se preparó el buffer P como describen Hopwood et al, (1985), con la diferencia de que se dejó reposar 1 hora, después de añadir todos los componentes, y se filtró a través de un filtro Millipore de 0.45 µm de poro, para eliminar cualquier material precipitado.

- Un tubo con micelio de la cepa TK64 fué descongelado a temperatura ambiente mezclando suavemente con golpes del dedo. Se agregó una solución estéril de lisozima 1mg/ml en buffer P al tubo con micelio, resuspendiendo con una pipeta de 5 ml, para homogenizar la muestra. El tubo con la mezcla se incubó a 29 °C, y cada 20 min se tomaron muestras para observarlas en un microscópio de contraste de fase, hasta que la mayor parte del micelio se hubiera transformado en protoplastos.

- Posteriormente se tomó todo el volumen con la pipeta y se filtraron los protoplastos a través de algodón estéril, el cual se lavó con 5 ml de buffer P, para bajar la mayor cantidad de protoplastos que hubieran quedado atrapados en el filtro de algodón.

- El volumen total fue pasado a un tubo estéril y los protoplastos fueron centrifugados a 3500 rpm durante 10 min.

- El sobrenadante se decantó y los protoplastos se resuspendieron suavemente con los nudillos, se adicionaron 5 ml de buffer P para lavar y nuevamente se centrifugaron bajo las mismas condiciones.

- Nuevamente se decantó el sobrenadante y el "pellet" de protoplastos, se resuspendió suavemente. A los protoplastos resuspendidos se les adicionó el DNA en un volumen pequeño (generalmente 10 ml) e inmediatamente se añadió 0.5 ml de PEG 1000 al 25% (W/V) en buffer P. Se mezcló subiendo y bajando 4 ó 5 veces toda la mezcla con una pipeta Pasteur y posteriormente se adicionaron 5 ml de buffer P y se volvió a centrifugar bajo las condiciones mencionadas con anterioridad.
- Se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió suavemente con los nudillos, agregando 500 µl del buffer P, realizándose diluciones hasta 10⁻².
- Los protoplastos, ya sea concentrados o diluidos se distribuyeron en cajas de medio rico R2YE, previamente deshidratado, con ayuda de agar suave de transformación (2.5 ml por caja).
- Se dejó solidificar el agar suave a temperatura ambiente y se incubaron las cajas a 29 °C.
- El antibiótico fue agregado 18 hrs después del término de la transformación, para seleccionar las colonias transformantes. Con la excepción de las colonias que fueron transformadas con el plásmido silvestre, a las cuales no se les agregó el antibiótico.

Extracción de DNA y confirmación de la estructura de los plásmidos ("minipreps").

- 1.- Cada una de las distintas colonias transformantes de la cepa TK64 (con los plásmidos) de *Streptomyces lividans*, fueron crecidas en forma de sectores en cajas con medio R5 con 50 µg/ml de thioestreptona. Las cajas fueron incubadas a 29 °C hasta tener completamente esporulados los sectores.
 - * Para las colonias transformantes de la cepa TK64 con el plásmido silvestre, no se adicionó el antibiótico (thioestreptona) a las cajas con medio rico R5.
- 2.- Se cosecharon las esporas con un asa estéril y se inocularon en tubos estériles con 2.5 ml de medio Luria (LB) y 2.5 µl de thioestreptona, incubando con agitación constante durante 3 días a 29 °C.
- 3.- Se pasaron los diferentes cultivos a tubos eppendorf previamente etiquetados, los cuales se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min. Se eliminó todo el sobrenadante con una trampa de vacío.

- 4.- Se resuspendieron los "pellets" de micelio en 100 μ l de buffer TE25mM (Tris-Cl 25mM, EDTA 25mM pH8) y la lisozima a una concentración de 2mg/ml.
- 5.- Las muestras fueron incubadas por lo menos media hora a 37 °C, hasta que el micelio se apreciara visiblemente lisado, dando un aspecto translúcido y viscoso.
- 6.- Se adicionaron 200 μ l de una solución fresca de NaOH 0.2N, SDS 1%, y se mezclaron bien los tubos por inversión vigorosa, hasta observar una mezcla transparente, homogénea y viscosa. Las muestras fueron incubadas durante 10 min en hielo.
- 7.- Se adicionaron 150 μ l de acetato de potasio 3M pH4.8, mezclando bien por inversión, hasta perder la viscosidad y apreciar un precipitado blanco. Se incubó durante 15 min en hielo.
- 8.- Se añadieron 400 μ l de fenol/cloroformo (1:1), agitando 30 seg en vórtex y centrifugando 2 min a 14,000 rpm.
- 9.- Se pasó la fase acuosa a otro tubo eppendorf limpio previamente etiquetado y se agregó 1 ml de etanol absoluto frío. Posteriormente se dejó precipitar 5 min a temperatura ambiente.
- 10.- Se centrifugó 10 min a 14,000 rpm, desechándose el sobrenadante con una trampa de vacío evitando llevarse la pastilla o "pellet".
- 11.- El pellet se resuspendió en 50 μ l de buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM pH8), adicionándose 150 μ l de acetato de sodio 4M pH6, mezclando bien por inversión. Se incubó una hora a -20 °C.
- 12.- Se centrifugó 10 min a 14,000 rpm en la microfuga; se pasó el sobrenadante a un tubo eppendorf limpio, al cual se agregaron 200 μ l de isopropanol, dejando precipitar la muestra durante 10 min en hielo.
- 13.- Se centrifugó 10 min a 14,000 rpm en la microfuga; eliminando todo el sobrenadante con una trampa de vacío. Se resuspendió el pellet en 45 μ l de buffer TE10mM, se añadieron 5 μ l de acetato de sodio 3M pH6 y 125 μ l de etanol absoluto frío; dejando precipitar la muestra por 10 min en hielo.
- 14.- Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. Eliminando todo el sobrenadante con una trampa de vacío.
- 15.- El pellet fue secado y resuspendido en 25 μ l de buffer TE 10mM.
- 16.- Se comprobó el patrón de restricción de cada una de las "minipreps", empleando las enzimas adecuadas para cada caso en particular.

* Para las colonias transformantes de la cepa TK64 con el plásmido silvestre (pJV1), se inocularon en tubos con LB sin el antibiótico.

Purificación de fragmentos de DNA en geles de agarosa de bajo punto de fusión (LMP).

- 1.- Después de efectuar la electroforesis de las muestras y teñir el gel en una solución de bromuro de etidio 3µg/ml, se iluminó con luz ultravioleta (uv) de onda larga y se cortó la banda de interés.
- 2.- La rebanada de agarosa se colocó en un tubo eppendorf y se fundió 65-70 °C durante 10 min.
- 3.- Se calculó el volumen de la agarosa fundida y se agregó 1/10 de volumen de NaCl 5M, mezclando perfectamente, dejando la muestra otros 5 min en el mismo baño.
- 4.- Se puso la agarosa fundida 5 min en otro baño a 37 °C, al terminó de los cuales se adicionaron al tubo con el DNA 2/3 de volumen de fenol saturado con NaCl 5M (precalentado a 37 °C), se agitó de inmediato la muestra con el DNA y el fenol saturado en vórtex durante 30 seg.
- 5.- Se centrifugó inmediatamente durante 5 min a 14,000 rpm, y se pasó la fase acuosa a un tubo eppendorf limpio previamente etiquetado.
- 6.- Al fenol se le añadieron 45 µl de buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM pH8) y 5 µl de NaCl 5M y se agitó en vórtex.
- 7.- Se centrifugó 2 min a 14,000 rpm y se mezcló la fase acuosa con la del paso 5.
- 8.- Se adicionó un volumen de fenol/cloroformo (1:1) a la fase acuosa, se agitó durante 15 seg en el vórtex y se centrifugó 2 min a 14,000 rpm.
- 9.- Se pasó el sobrenadante a un tubo limpio y se repitió el paso anterior, pero solo con cloroformo.
- 10.- Se pasó el sobrenadante a un tubo eppendorf limpio y se añadieron 10 µg de tRNA y un volumen de isopropanol (no se añadió tRNA a los DNAs que serían desfosfatados, con fosfatasa alcalina posteriormente).
- 11.- Los DNAs se mantuvieron a -20 °C por lo menos 2 hrs.
- 12.- Las muestras fueron centrifugadas en la microfuga, durante 10 min a 14,000 rpm; se extrajo todo el isopropanol con una micropipeta.
- 13.- Se secó el pellet a 50 °C durante 15 min.
- 14.- Se resuspendió la muestra en un volumen adecuado de buffer TE 10mM.

Tratamiento con la fosfatasa alcalina.

- La reacción de la fosfatasa alcalina se llevó a cabo en un volumen de 50 μ l totales. Se utilizó el buffer proporcionado por el proveedor de la enzima (Boehringer-Mannheim).
- 1 μ l de la fosfatasa alcalina se agregó los primeros 20 min a la mezcla a 37 ° C.
- Se agregó otro μ l de la fosfatasa alcalina a la mezcla y se dejó otros 20 min a 37 ° C.
- Para inactivar la fosfatasa alcalina, se empleó la extracción con fenol/cloroformo, como se describe a continuación.

Extracción con fenol/cloroformo.

- En un eppendorf se agregó una mezcla de 50 μ l de TE 10mM con el DNA del plásmido, a la cual se adicionaron 50 μ l de una solución de fenol/cloroformo (1:1); el tubo fue pasado por vórtex durante 30 seg.
- La muestra se centrifugó en la microfuga 3 min a 14,000 rpm. Se pasó la fase acuosa a otro eppendorf y se agregaron 50 μ l de fenol/cloroformo (1:1), el tubo fue pasado por vórtex durante 30 seg.
- Al tubo inicial que queda con los 50 μ l de fenol/cloroformo, se agregaron 50 μ l de TE10mM, para extraer lo más que se pueda de DNA, la muestra fue pasada por vórtex durante 30 seg.
- Los tubos se centrifugaron en la microfuga 3 min a 14,000 rpm.
- Se pasó la fase acuosa del segundo tubo a un tercer tubo con 50 μ l de cloroformo, dando vórtex 30 seg, mientras que la fase acuosa del primer tubo, se pasó al segundo dando vórtex 30 seg.
- Ambos tubos se centrifugaron 3 min a 14,000 rpm.
- La fase acuosa del tercer tubo fue pasada a un cuarto tubo, mientras que la fase acuosa del segundo tubo se pasó al tercer tubo, se aplicó vórtex 30 seg y nuevamente se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 min.
- Se pasó la fase acuosa del tercer tubo y se agregó con los 50 μ l presentes en el cuarto tubo. A los 100 μ l totales se agregaron: 1 μ l tRNA, 10 μ l acetato de sodio 3M y 100 μ l de isopropanol, mezclando por inversión el tubo.

- La muestra se puso a precipitar en el congelador a -20°C por 2 hrs. Se centrifugó 10 min en la microfuga a 14,000 rpm.
- Se extrajo el sobrenadante con una punta estéril y el pellet fue resuspendido en 20 μl de TE 10mM a 50°C durante 15 min.
- Se corrió 1 μl de este volumen en un gel de agarosa de alto punto de fusión (1%), para saber qué tanto DNA fue recuperado.

Cruzas genéticas.

Cruza control.

Se agregaron 20 μl de esporas concentradas de la cepa TK64 y 20 μl de esporas concentradas de la cepa TK54, en una caja de medio R5 con histidina y leucina. Se agregaron 200 μl de agua para facilitar el plateo de las esporas, las cuales se esparcieron sobre la caja con un asa de vidrio estéril. Las cajas fueron incubadas a 29°C durante 5 días, al término de los cuales las esporas de la crusa fueron cosechadas y almacenadas en una solución de glicerol al 20% a una temperatura de -20°C .

Cruzas con los distintos derivados del pJV1.

Se realizaron de la misma forma que la crusa control, solamente que una de las dos cepas (normalmente la TK64) contenía alguno de los derivados del pJV1.

Diluciones de las esporas y cuantificación de las mismas.

Las esporas de los *Streptomyces* son resistentes a los cambios osmóticos, por lo que las diluciones fueron realizadas en agua desionizada estéril.

Se tomaron 10 μl de esporas concentradas y se diluyeron en 990 μl de agua estéril; siendo ésta la dilución 10^{-2} . Apartir de esta dilución se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} , pasando por vórtex cada dilución, para homogenizar las muestras.

Para la cuantificación de las colonias, las diferentes diluciones se agregaron en volúmenes de 100 μl por duplicado, en cajas con medio R5 con histidina y leucina. Las cajas fueron incubadas a 29°C hasta poder contar las colonias presentes en cada dilución, empleando un plumón indeleble.

Cuantificación de la transferencia de plásmidos y de la movilización del cromosoma.

Para determinar la transferencia del plásmido se hicieron diluciones de las esporas resultantes de las cruzas, hasta 10^{-6} . Normalmente la cepa donadora fue la TK64 (Stm R) y la receptora fue la TK54 (Spc R). De esta forma, para conocer la frecuencia de transferencia se dividió el número de colonias obtenidas en medio MMCY con espectinomicina y thioestreptona entre el número de colonias obtenidas en el mismo medio pero únicamente con espectinomicina. Para la cruzada recíproca se utilizó estreptomina en lugar de espectinomicina. Para cuantificar la movilización de marcadores cromosómicos se dividió el número de colonias obtenidas en medio mínimo con espectinomicina y leucina (sin histidina) entre la suma de las colonias obtenidas en medio MMCY sin antibióticos. De esta forma se midió el paso del marcador His⁺ de la cepa TK64 a la cepa TK54.

Determinación de la capacidad de formación de "pocks".

La manera por la que se pudieron visualizar los "pocks" fue la siguiente. Se agregaron 10 μ l del concentrado de esporas de la cepa TK64 con la dilución 10^{-6} (200 μ l) de la cepa TK64 con el plásmido, en cajas con medio R5. Con un asa de vidrio se espatularon estas esporas por toda la superficie de la caja y se incubaron a 29 °C durante 5 días, al término de los cuales se apreciaron los "pocks" en el crecimiento de tipo confluyente. De esta forma se aisló el plásmido silvestre (pJV1).

Manipulación de DNA.

Deleciones con enzimas de restricción.

- Con el empleo del mapa de restricción y el análisis de la secuencia del plásmido pJV1, se planearon diversas deleciones con enzimas de restricción para la localización y función de los genes de transferencia, los genes responsables de la diseminación y los genes involucrados en la manifestación del fenotipo Kil-Kor.
- Se comprobaron las digestiones enzimáticas en geles de agarosa al 1%/Buffer TBE teñidos con bromuro de etidio 3 μ g/ml.
- Se corrieron las digestiones en geles de agarosa 1% y geles de agarosa de bajo punto de fusión 0.6%, de estos últimos se purificaron las bandas de interés con el método mencionado con anterioridad.

- Para los extremos no cohesivos, se hicieron extremos romos para lo cual se empleó la enzima Klenow.
- Los plásmidos se ligaron con la enzima ligasa T4, a temperatura ambiente por lo menos 12 hrs.
- Los DNAs fueron almacenados en 25 μ l de buffer TE 10mM a -20° C.

Medios y buffers.

a) Medios de cultivo y soluciones.

Los diferentes medios de cultivo empleados en este trabajo, se esterilizaron en el autoclave a 120° C y 15 libras de presión, durante 20 minutos.

La esterilización de las soluciones de antibióticos, se hizo por filtración, a través de filtros millipore de 0.45 μ m de poro.

MM (medio mínimo)	100 ml agua desionizada por botella
	0.1 ml elementos menores (estériles) por botella
	1.5 g agar (por botella)

Soluciones accesorias que se agregan al medio mínimo después de esterilizarlas en el autoclave.

(NH ₄) ₂ SO ₄ 20%-----	1ml
MgSO ₄ .7H ₂ O 0.6%-----	1ml
Glucosa 50%-----	1ml
Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ 1M pH7.2-----	1ml
Elementos menores-----	0.1ml

Elementos menores:

ZnSO ₄ .7H ₂ O-----	0.1%
FeSO ₄ .7H ₂ O-----	0.1%
MnCl ₂ .4H ₂ O-----	0.1%
CaCl ₂ -----	0.1%

MMCY Se le añaden además de lo anterior:

Casaminoácidos 20%-----	1ml
-------------------------	-----

Extracto de levadura 10%----- 1ml

R2YE Sacarosa----- 103g
K₂SO₄----- 0.25g
MgCl₂.6H₂O----- 10.12g
Glucosa----- 10g
Difco casaminoácidos----- 0.1g
Agua desionizada----- 800ml

* Poner 2.2g de agar a cada una de las botellas.

* Agregar de medio 80 ml por botella.

** Soluciones que se agregan después de autoclavar.

KH₂PO₄ 0.5%----- 1ml
CaCl₂.H₂O 3.68%----- 8ml
L-Prolina 20%----- 1.5ml
TRIS-HCl 3% pH7.2 ----- 10ml
Trazas R5----- 0.2ml
CuSO₄ 2mM----- 0.2ml
NaOH 1N----- 0.2ml
Extracto de levadura 10%----- 5ml

* Agitar cada que se agregue una nueva solución.

R5 (Medio sólido en el cual esporulan muy bien los *Streptomyces*).

K₂SO₄----- 0.25g
MgCl₂.6H₂O----- 0.12g
Glucosa----- 10g
Difco casaminoácidos----- 0.1g
Trazas sin autoclavar----- 2ml

Difco extracto de levadura----- 5g

Trisma Base----- 3g

**** Aforar a 1 Lt con agua desionizada.

Ajustar el pH7.2 con HCl

Poner 100 ml de medio por botella.

Agregar a cada una de las botellas 1.5 g de agar.

** Soluciones que se agregan después de autoclavar:

KH_2PO_4 ----- 1ml

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ----- 0.4ml

L-Prolina 20%----- 1.5ml

NaOH 1N----- 0.2ml

CuSO_4 2mM----- 0.2ml

* Agitar cada que se agregue una nueva substancia.

YEME (Medio empleado para crecimiento de micelio, cual fué usado para posteriores transformaciones).

Extracto de levadura----- 0.3g

Bacto-peptona----- 0.5g

Extracto de Malta----- 0.3g

Dextrosa----- 1.0g

Sacarosa----- 34g

* Aforar a 100 ml con agua desionizada.

* Después de esterilizar agregar la siguiente solución.

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1M----- 0.125ml

Glicina 10%----- 0.625ml

Luria(LB)

Bacto triptona-----	10g
Extracto de levadura-----	5g
NaCl-----	10g

* Ajustar a pH 7 y aforar a 1 Lt con agua desionizada.

* Acada una de las botellas agregar 1.5 g de agar y 100 ml del medio.

LB con Sacarosa (para la extracción de los plásmidos).

Bactotriptona-----	1%
NaCl-----	1%
Extracto de levadura-----	0.5%
Sacarosa-----	30%

Ajustar el pH 7.2 y aforar a 100 ml con agua desionizada.

** Los tiempos para el secado en la campana de flujo laminar varian según el medio de cultivo empleado: el medio R2YE (para la transformación de protoplastos de *Streptomyces*) se necesitan de 3 a 4 hrs de secado; para los medios como el R5 (para la esporulación de los *Streptomyces*), MM, MMCY (para las cruza genéticas) y LB (para la extracción de los plásmidos), se emplean de 15 a 20 min de secado.

Buffer P (empleado para el mantenimiento osmótico de los protoplastos durante la transformación).

Sacarosa-----	103g
MgCl ₂ .6H ₂ O-----	2.02g
K ₂ SO ₄ -----	0.125g

* Aforar a 400 ml distribuir este volumen en botellas de 40 y 60 ml para esterilizarlas.

** Agregar después de esterilizar las siguientes soluciones.

	40 ml	60 ml
Trazas R5	100 µl	150 µl
KH ₂ PO ₄ (0.5%)	0.5 ml	0.75 ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O (3.68%)	5.0 ml	7.5 ml
Tris,HCl (3%, pH7.2)	5.0 ml	7.5 ml

* Todo el material (vasos de precipitados, probetas, etc.) debe estar bien limpio y enjuagado varias veces con agua destilada y desionizada, para eliminar cualquier resto de detergente.

TABLA I. CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS.

Cepa	Antibiótico	Auxotrofías
<i>Streptomyces lividans</i> TK64	Estreptomina ^R	pro-2
<i>Streptomyces lividans</i> TK54	Espectinomicina ^R	his-2, leu-2

Plásmido	Características
pJV1	(Silvestre formado por 11.14Kb de longitud).
PB2	(Se encuentra formado por 10.5Kb, carece de los genes de diseminación (spread) y presenta un origen híbrido).
PB53	(Se encuentra formado por 12.8Kb; al pB2 se le incorporaron los genes spread, provenientes del pJV1).
pB50	(El gene de <i>tsr</i> , se encuentra insertado en el sitio único de <i>BglII</i> del pJV1).
PB57	(Fragmento de <i>BamHI</i> de 5.7Kb del pB50 recircularizado, sin genes <i>tra</i> y <i>spread</i>).
pB58	(Delección del fragmento de <i>NcoI</i> del pB50, eliminando los genes <i>tra</i>).
pB59	(Delección del fragmento de <i>BstXI</i> del pB50, eliminando el final del gen <i>traA</i> y el principio del gen <i>traB</i>).
pB75	(Inserción del gene <i>tsr</i> , en el sitio único de <i>Asp700</i> del pJV1, con lo que se interrumpe el gen <i>traB</i>).
pB76	(El pB50 digerido con <i>BpuI102I-EcoRI</i> , la banda de mayor tamaño se trató con la enzima "Klenow", con esta mutación se quitaron los dos genes <i>tra</i>).

Tabla I. Nos muestra las cepas de *Streptomyces lividans* que fueron empleadas como cepas hospederas para los experimentos de clonación, así como los distintos derivados del pJV1. La cepa donadora de los plásmidos fue la TK64, mientras que la cepa empleada como receptora fue la TK54; con la excepción de la cruce realizada al inverso, en donde los papeles se invirtieron.

*** Se utilizó como control negativo, una cruce la cual no contenía plásmidos.

Cruzas genéticas.

Las características de los distintos derivados del pJV1 radicadas en la formación de "pocks", en la eficiencia de transferencia y la movilización de genes cromosomales, fueron llevadas acabo con las características de las cepas empleadas y plásmidos, lo cual se aprecia en la tabla Núm.I, con esto se crearon las siguientes condiciones, seleccionándose en cada una de ellas una característica en particular.

TABLA II.

Condición	Colonias que son capaces de crecer
MMCY	Total de las colonias TK64-TK54 con y sin plásmidos.
MMCY+thio	Solo crecen las colonias que presentan el plásmido con la resistencia al antibiótico (thiostreptona).
MMCY+thio+Str	Solo crecen las colonias de TK64 con plásmido.
MMCY+thio+Spc	Solo crecen las colonias de TK54 con plásmido.
MMCY+Spc	Crecimiento de todas las colonias de la cepa TK54 con y sin plásmido.
MMCY+Str	Crecimiento de todas las colonias de la cepa TK64 con y sin plásmido.
MM+Spc+Leu	Solo crecen colonias recombinantes, producto de la movilización de genes cromosómicos entre ambas cepas.

Tabla II. Nos muestra las diferentes condiciones empleadas, para hacer los estudios cuantitativos de los diferentes derivados del pJV1.

RESULTADOS

DELECCIONES E INSERCIONES DE LOS DERIVADOS DEL pJV1.

Con el empleo del mapa de restricción (Fig.11) y el análisis de la secuencia (Fig.12) del pJV1, se planearon diversas mutaciones con enzimas de restricción para determinar la localización y función de los genes responsables de la transferencia, los genes encargados de la diseminación, así como los genes involucrados en la manifestación del fenotipo Kil-Kor del pJV1.

Aislamiento del plásmido silvestre.

El pJV1 fue introducido a *Streptomyces lividans* (cepa TK64) por transformación en cajas con medio R2YE. Las cajas fueron incubadas a 29 °C hasta observar los "pocks". Se picaron con palillos estériles las zonas centrales de los "pocks" y se sectorizaron en cajas con medio R5, las cuales se incubaron a 29 °C hasta que los sectores se encontraran bien esporulados. Las esporas se rasparon con un asa estéril y se inocularon en tubos con 2.5 ml de LB con sacarosa, incubados a 29 °C por 3 días. A las diferentes muestras se les realizaron minipreparaciones para la obtención del plásmido y se digirieron con la enzima *Bam*HI. Esta enzima corta al pJV1 en 3 fragmentos de diferente peso molecular: 4.6, 3.6 y 2.5 Kb.

Aislamiento del plásmido pB50.

Este plásmido presenta la inserción de un fragmento de *Bc*II de 1.1 Kb que contiene el gen de resistencia a thioestreptona (*tsr*) en el sitio único de *Bg*III del pJV1 (Fig.13), lo cual facilitó la cuantificación de la presencia del plásmido por selección de colonias resistentes al antibiótico.

El pB50 fue introducido a la cepa TK64 por transformación en cajas con medio R2YE y thio, las cuales se incubaron a 29 °C hasta observar una esporulación total de las colonias transformantes. Las colonias se cosecharon con palillos estériles y se sectorizaron en cajas con medio R5 + thio. Las cajas se incubaron a 29 °C hasta tener bien esporulados los sectores. Se inocularon las esporas en tubos con 2.5 ml de LB y 2.5µl de thio, los cuales se incubaron a 29 °C durante 3 días. Se realizaron minipreparaciones a las diferentes muestras y se digirieron con

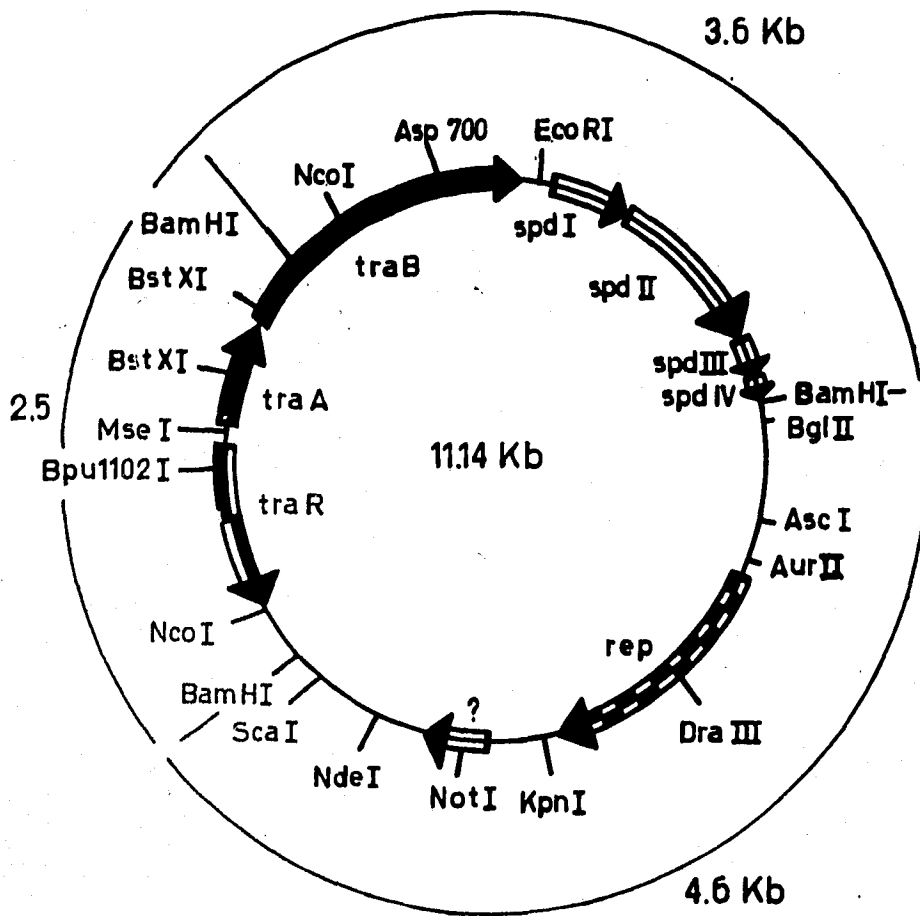


Fig.11 Mapa físico del plásmido pJV1, por Bailey et al, 1986.

EcoRI

1 GAATTCACGCTCAAGCGCGTGTGAATCGGCCCGCACACCGGCCCGCACACCGGCCCGCACACCGGCCCGCACAGCAAGCGGGCCGA

101 CCCGGAGGCAACCGGATCGGCCAGACCGACCGAGAAACCGGTGAAGCCGAGCCCCAGTATCCGGCCCTCGGGCCAGATCACCGACGCGGAGCT
FM N A E P Q Y P A L G R Q I T D A E L

201 CCTCGCCGACTCCTGCCCCAGACCGCCCGCCGGCGAGCCACCGCCCGGCCCGCCCGGTCCCGGTCGGCCCGCCCTCGAGGTTGCCGG
L A A L L P D T A A G A E P T A P A A P V P V A P P V L D V A A

301 CTCCTGGAGCTGGCCCGGTGAGGCGCTCTGGAGGCGACCGTCCAGGCCAGGCCCGCCCGGTCCCGGCGGAAGACAAGTTGCTCTCGGGCCGCTCT
L L E L A R R Q G A L E A T V Q A Q A A P V P A E D K L S S G P L

401 CTCCCCTGGCCCGGTCACCGCGTGGCCCGTCCGGATCGGCCCGGCCACCGTCTCTCGGGTGGGCGCTGACCTCTCGCCCGGGAGCCGC
S P R W A A G T A V A A V G I G A G T L L L G W A L D L L A A G A A

501 CGCCGTCATGGCCGGATCAGGCCCGCCCGCCGATGCTCATCGTCCGGCCCGTCTGGTCCGCTCGCCCTCGGGCCCGCTCCAAGACCGGCAACGAC
A V M A G I S A A A P M L I V G A V L V A A L L G R R S K T G N D

601 GGGTTCGAGATCAGCCAGACCATCACCCAGACCATCACCCAGACCGTCAAGGCGCGTGGCCCGGCGGTAAGCTCGACACCGCCAGCGAGGTGGCCAGGC
G F E I T Q T I T Q T I T Q T V K G G G R R End

701 GGAGCGCGTGTCCAGCTCGTGGATCATGCTCTCGGCCCGTCCGCTTCTCGGTCCCTCAGGTCACCCCGCTCGTCAGCGGGTCAACCCGGACGAG
E R V L Q L V W I I V F G A V A F S V L T V T P L V Q R V T P D E

801 TGGACTGGACCGCTGGTCTCCCGTCTTCCGACACCGCGTCTCATCGTCCGAGTCCGACTCGATCGTCCCGCCCTCGACGGCCCGCCCG
W D W T A W L L P V V S D T A V V I V V R V D S I V A R L D G R P

901 GCGGATGGCCCGCTCTCCCGTGGCTCACCGCCGATGACCGTCTCTCAACGTGGGCGACTCGATGCTCAAGAACGACTGGTGGCGGTCCGGGT
G G W P A F L R W L T G G M T L L L N V G D S H L K N D W V G V G V

1001 CCACCGGTCCGCCCTGTGCTCATCGTCAACCGCCAGGCGCCCTCGGTCGCCCGCCGGATCACACAGGCGGTCCGCCCATCGACCGTGGAGCGG
H A V A P V L L I V T A E A A L G W R R A I T Q A V A R I D R E R

1101 GCGAAGAGCGGAGCGGAGGACCGTGGAGCGGAGGCCCGGAGAGGCGCTCACGGGCCGAGCAGAAGCCCGTCAGGAGGCGGAGCGGCGAGCGCG
A E E R E R Q D R E R Q A R E E R S R A E Q K A R Q E A E Q A E R

1201 AGGTCAGGAGCGGCTGGCCGAGGAGCGGAGGCGGCGGCGGAGCGTGGAGCGGAGCGTGGAGCGGAGGCGGAGGCGGAGGCGGAGGCGGAG
E R Q E R L A E E R E R R A A A E R E R Q R E H E A K L A R E E R E

1301 GTACCCCGCCCGATCGAGGAGGCGGCGGAGGCGGCGGAGGCGGCGGAGGCGGCGGAGGCGGCGGAGGCGGCGGAGGCGGAGGCGGAGGCGGAG
Y A A R I E Q E R A E R E A A R E Q A A R E D A A R Q R K E E Q E

1401 CGAGCGACCGGCTCCCGGTGAGCAGGACGAGAAAGCCGAGCGTGGAGCGCAAGGACAAGGAGGCGGCGGAGGCGGCGGAGGCGGCGGAGGCGGAG
R A D R L R R E Q D E K A E R E R K D K E A A Q A A E R A R K A A

1501 AHGCCCGCCGTACGCCCCCGCGTGGCGCGCTGTGAGCACGCCCGCCCGCGTGGAGCGCCCGTGGAGCGCCCGTGGAGCGCCCGTGGAGCGCCCGT
E A R R T A P P V S A A V S T P R P A V S A T V S T P A P E A A H D

1601 CSTCCCGGCGGGAAGAGTTCGCGGTGGACAAAGCGCTCATGGTCTGCGCGAGCGCACTCCGGATGGCGGCTCACAGCGCCAGATCGTCCGCGTC
V P D A K K K L P V D K A L M V L A D A L R D G R S Q R Q I V A L

1701 ACCGGCAGGAGTCCCGGTGGTCCGAAAGCACTGCCAGGCGCTCACGTCCGCAAGGAGGTCAGGAGGTCCGAGCATGAGCACCGCACTGATCGC
T G R S S G W V A K H C Q A L T S G K K A E E V A A End

1801 CGGCACGCGAGGTGAAGCGGAGATCGCCCGACCGACTCCAAGACCGGCTGCTTCTGGCCTTCTGGGCGCGTGGTGGCCGAGCGCTGGACACCA
A H A E V K A E I A R T D S K T G L L L A F V G A V M A G A W T T

1901 GCGAAGGACCTCCGCTCACCTCCCGGTACCTCGTGGCGGTGCTGGCCTCGCGTCTCTGGTCCGCGCGGGCTCCGCTCCAGGCGGTCCGCC
A K D L P L T L P A Y L V G G A G L A L L L V A A G L A L Q A V R

2001 CCAACCTCGGCGCGCGCGGCTTCACTCTGGCGACCTCACCCCGCAGCAGCTCGTCCGACCACCGAACTCGGACCTCGCCCGGACATCGT
P N L G G G R G F I L W A T L T P Q Q L V A T T E T R D L A A D I V

2101 CGGCCTGGCCGGATTGCCGTCGCAAGTTCGTGCTCTGGCGCGCGGTGACCTCGTCTCGCCGCGGGCGCTTCTCTCGTCCGCGGCTGATC
G L A R I A V A K F V L L R R A V D L V L A A G A F L L V A A L I

2201 GTTCTCGGAGGTCCCTGTGACCCGCGCGGACAGAGCAGAACGGCTACGCGGGCCACCGCGCGCAGAGCACGCCGACGACCGCACCGCAACGCG
V L G G A L End

IM T R P G Q K Q N G Y A G H R P Q S T A D D R T G N N A
IV →

2301 TCGGGCCACGAGGCCCGACACCACCGCAAGGCCAAGGGCCCAAGGCCTCTGACCCGACACAGCCCGCGGATCCACCGCGGGGCTCTCTCG
R G H E A P D T T R K P K G P K A S End

BamHI

2401 GCCTCCAAAGTCACACAGCCCTCGCACAGTTCCTGGACTTTCTGGACCCCTACGCGCGGGCGGTCCGACAGCCCTCGGCCACCGCAACGAA
BglII

2501 CGCCCCCTCGCCCCAGTTCGCCCCGGGGACCGTCAAGATCTGGCCCGCGACGTACTGCTACGTGAGACCCCGCCCGCGCTGACCAGCAGCA
2601 AGGACCGCAGATGAACTCATGAGACCCCTACGCGCGCGGGACCGGTAAACGCTGGGCCGCCACTCCGTCATACAGCCGAGAGAGAGAGAC
2701 CGCACAGTGGCACAGAGGCACTCCGAGCAGGGGAACAACCGCCCGCAGCGCCTACGCTCGGAGACGGCGGGCCGACCTCCAAAGGAGGAAT
2801 GCCCCGTCGCGCCAGTTCGCTCGCCGACCCAGCCCGACTTCCCGGACTGTGGTCTGGCGGAACCCCGACGCGCTTCTTCCGCTGCGCTGGG
2901 GCTACTCGCAGAGCTCGCCGCGCGCCGTGTGGTGGAGCTGGTACTCACACAGGAGCACGCCGACGTCTGCTCTGACGACGGTGGGCGCTC
3001 TGAGGCATCGCGCGCGAGCCACGCGTGAAGCGGGGATGCGCGAGGATCTACCCGACAACTCCAGAAAAAGGAAAGCCAGGGGTCTAATCCCT
3101 GACCGCTTCTGACGTCACCCGCTACCAACCAAGGACTCGTCTGTGTCCAGCGTAAGGAGCGTTTGGCTCCGCAACCCCTCTTTGATCGGGCGC
3201 CGACTCAGTCCGCGCGCGGCTCCCGCGGGCCCGGTTGCCGCTGGCGCGCCCTCACGATCACCCCGCAAGGAGCCAGGAGTTTCTGCTCCGA
3301 GGCCTGCAAGAGCGCGCGCGGGCCGGAAGCCGCGGACCGAGCCCGAGGCGCGCGTGGAGACCGCCCTGGCAAAAAGGAGGCTAGTAAA
3401 GGGTTGACAGAGTTTCCACCCCGCACTGACCAAGCACTTTCCGGAAGTGGCAGTCTGGGAGGAACGGGAGAGTCCGAGAGGGCGGACCCCTTCGG
3501 AACAGACCACAAGGCGCGCGGACCGTGGCTAGCCCGTACCAGGGCCGCAAGGTGCTCAACCGGGTCTCCGGATCGACCGCTCGGGCGGTCCGG
IM L N R V S G I D A C G G C G
IV →

3601 GCGCGGGTCTCGACCCGACCCGCGTGTACTACGCAAGTCCGCGGTGGGTACGTCGTCAGATCGGCTGGTCCGCTCGGGCGGATCTGGTTC
R R V L D P D T G V I Y A K S S R G Y V V T I G L V R C G R I W F

3701 TGCCCGGATGCTCTCGCGATCCGCGTGGCCGACCGAGGAGATCAAGACCGGTGCTCTGGGCACCTCCGCGCGCGGACGCTCGCCGTGTCG
C F E C S S A I R R G R T E E I K T G A L R H L A A G G T L A V V

3801 TCCTCACCCCGGATAACCAAGACCCGACCTCGACAGCCTGTCGCGCGCTCTGGGGCGGCTCTCTGGACGACAAGGGCGCGCGTCTCGA
V L T A R H N Q T T D L D S L V A A L W G G P L L D D K G A P V L D

3901 CCGGTCGGCAAGCCCGCGCGCGGTGCCTACAGCGGATGCTCAGGCCCGCGCTTCTACGCGCGCTGAGGCCCGCGCACCGGAAGGAC
R S G K P R R A P G A Y Q R M L T A P A F Y G R P E A R R T R K D

4001 GGAACCGAGTACGTCGCGTCCGCTGAGGACCGCATCCGCCACCGGATCGGCTACATCGGATGGTCCGCGCGGTGAGGTACCCCGTCCAGAAGAAGC
G T Q Y V R P A E D G I R H R I G Y I G M V R A A E V T R S K K N

4101 GTTACCACCCCACTCAACCTGCTGGTCTTCTCGGGGGGAGCTCTTGGCACCCGGCCAAAGGTGACGTCGTCGGACACTTTGAGCCCTCCGAGAC
G Y H P H L N L L V F L G G E L S G T P A K G D V V G H F E P S E T
4201 GGACCTGGGGGACTGGGAGGACTGCTCCGGGAGATGTGGGGGGGGCCCTCAAGCGGGCTGACCCCAAGTTGAGCCCTCGACCGACTCGGACACCCCC
D L G D W E D W L R E M W A G A L K R A D P K F E P S T D C D T P
4301 GGCTGCAAGTCAAGGGCAAGGGCCACGGCGTGTGGTCTCGATCGTCCGGTCAGCTGACGACGTCGCGCTGATCGAGTACCTCACCAGAACCCAGGACG
G C K C K G K G H G V M V S I V R S A D D V A L I E Y L T K N Q D
4401 GGAAGCGAGAGCGGCCGACTCCGTGACCCAGGACCTCGAAGCCGCGCGCAGCTGCGATGGAGACCGCCGCTCGACTCCAAGACCGGCCGGGGCCG
G K R E R P D S V D Q D L E A A G A A M E T A R L D S K T G R G R
4501 GAAGTCCATGACCGCGTCCAGATCCTTACCGACTGTGGGACATCGAGTCCGCGGGCTCGACCCCGACATGGCCGAGGGCTACGGCAGCCGGAAGCAG
K S M T P F Q I L Y R L W D I E V A G L D P D M A E G Y G T P K Q
4601 CTGCGCGCTGGTGGGCCAGTACGAGGAGCCCTCCGCGGACGACGCGGATCGAGTGGACCGAGGCTCGCGCGGACGTCGACCTCGACCGGTGACG
L R A W W A Q Y E E A L A G R R A I E W T R G L R R H V D L D G D
4701 ACGACGAGGAGACCGACCTCCAGTACGTCACGAGCCGGAGGCGCGCGCTCGACCGTGGCGTGTCTCCCTCACCTCCGACCGGATGCCCTGGTGTGCGG
D D E E T D L Q Y V Y E P E A A P L D G G V V L T S D A M R L V V G
4801 AGCCGACGCTGAACCTCGACCTCGACGACGTCGTCGCGCGGAGGCGTACTACTCCGCGGTTGACGTCGTCACCGGCTCGGAGGACGTCGGGATCACGTCG
A D A E L D L D D V V R A E A Y Y S A V D V V T G L G G R A D H V
4901 CGGGTCCGTACCGCCGAGGAACCTCGGGAGGTGCAAGGAGTGTGTTCGCGCGGACCGAAGCCGCGGAGGAGGACGGCCAGCGCCGAATCCGGG
R V A T A E E L A E V Q E V L F A R T Q E R A E E S R R Q R R I A
5001 AGCAGGAGGCGGAGCGCCGCGCGCATCGGAACCGGAGGAGCTCGCGCGGTGCTCGGGTCTGCTCGTACGGCAGCGCGCGGACGACGAGGACGACTC
E H E A E Q A A A H R K R Q E L A R C L G L L V R Q R G G T Q D D S
5101 GCGCGCGGACAACCTCGTCCGCGACATCCACGCGAAGCGGTGACGACAACCCCGGTTGTGCGCCCGACCGTCCCGGTCGACGCGGAAAACCGCGGCT
A A D H F V A H I H A N R End-----> <-----
5201 GACCGAGGCGGCGGCGTAACTGTAACAGTTACCTAATACTCGCTCCGTCCTACTCGGAGAAGCCCGGGCCGAGAGTCCGGCGCCACGAT
-----><-----
5301 GACGGGCGCTCGATCCGCTCCGAGACTCCACCCAGTCCAGGTCGCGCTCGATCGCGGTCAGCGGACGCTTATCTCGCTCCGGATCTGGACA
5401 TCGGGCGCTCGCGGAGAGGGCGTGTGTGTCTCATGGCGCAGTCTCCGTCGCGTGAAGCGGTACGCTTCCGCGCGGACTTCGTGTGACCTGAG
5501 CGGTCAACCTCAGGCATCAGCAATGCCCTCGGGTCCGACGCCCCCGGAAAGGTTGTCGAAGGGTGCACAGTCCCGGTGCACACCGCTGCACGCG
5601 AGCCGTATGGCCCGCCATACCTTGGTACTTCGGGAGCGTGTACCGGTGCAAGCCCGCGCTCGACCTGGTGGAGTACATCTCGTGAACCTTCG
5701 TGAACCGTCTACCGCGCGGTGCAACGGTCTCTCGCGTGTGTGTGCGCTCTCGTGAACCGCGGTTCTCGTGCATTTGGTGTGGCGGATGAG
M W A N S
5801 TTCGAGCGGTA:TCCTGGTGGTCTCGTGTGCTGATCGCGGCGCGCTGTTGGTCCGGCATGAACGGGACCCAGGACACGAGCAGCCACCGAGTTC
S S A Y S W S S S C S I A A A L V G P G M H G D Q E H E Q P T E F
5901 GCACAGATCGAAGCGCGGATGATCCGACTGCGCTCACCGAGGAGGAGTGGCGGAGCTGATCGACACCGGCGGAGTGCCTGCCTCGCTCGCGCGT
A Q I E A R M I R T A L T D E E W A E L I E H R P S L P A S L A A
6001 ACGAGCGGTGGGAGGCGGAGTCAAGGAGGCGGGTACCGTGGCGCGGCGGACGTAAGGCGCGGCGATTCTGGTACCGTCTCCTGGTGTG
Y E R W E A E V E T K A G End
6101 TCATCGCGCGCGGCGCACCTCATAGCGTCCGCGCGAGCTCCGCGACTCGGATCACGGGACGAGTCCGAGCGCTCCGCGCGAGATCGCGGTG
6201 ATGGCGACGGCGGTGATCGCCAGGATCGCGAGCCCGAGCACCGCGAGGCGCAAGGGCGTACGGGTGATGGGCAITGGTGTCTCCTGGTGTGAGCA

6301 AAAAGTCTCCGCCCGGACGGGACGGGTGGTCCGTAGGTTGGAGGACGGGTACTTAGGCCGCAAGTCACGTCTCCACCCCTTAGCGGGGGCTCGA
6401 CCGGTCGAGACAGTGAAGGGGCTATCGCGCCCTCCGCTCCCATATG^{3'}CGGATTGCAGCGGAACCTCCCTAGACCATTTCGGCGCGGTCCGGCTCGC
6501 CCGGCGCGTCTGCACGGTCCGGCACACCGTCCGTAGGGCCCAAGAGGGCTCACCAACGGGTAGGGAGTCGAATGCTCGGTCTGCTCCAGGGATGGTTG
6601 GTAGGACGGCTGGAGGGCGGGACCGAGGTTTGGAGACTTTGGGACCGTCTACGCGCGCGGGCGCGTGGGCGACCGGTCCGGTCTGTCATCCGGCC
6701 GGGCGCGCGCGGAGCGCGGGCGGAGACAGAGCGGGCCCGCGGCTCGGGCCCGCGGCCCGGAGGGCCCGCTTGATGGATAGGAAAGTTGTACC
6801 GCGCCCTTCGAGGGCCCCAGGTCGTCCGCATACGGTCGACCCATGACGTACGACACCCCGGAGACGGCGAGGGCGACCCGCTGTCCGCGTGGTGC
6901 GGAGCCCGATGCAGCAGCCCGCACAGCCCGCGCGAGTACTGCCCGCGCTCTGGCCGACGCGCGCTACGAGGACAGCGCCCTCCGTGAGGCC
7001 AGCGGAAGCGGTGGTAGCCGCTCTCGCAAGGCCGCTCTCCGCACTTCCGTTTCGTACGTGACGATGCGCCGACTCCTCCGATCCGTCACGTGACGA
7101 AACGTTGCGCTCCCGGATCCCCAGCTAGTCGGCCGGTGGTGGTCCCGTGGCGAAGTCCCGCGCCTCCGAAGGAACAGCCCGCGTGGCGAGGG
7201 ATGGGTTTGTGTGACGGCGGATCGCGGACCGGTGCCCGGGACGGCCCGCAGCGCTGGGATCAGCTCGACTGCCTTAGCCACATCGCGGTAGCAGCTG
7301 CTCCCTCAGCCCGAGACGGGGGTGCGGTCCGCTCAGCGCCCGTCTGGTTCGACGGCGGGGTACGGCCCGCCCGCCACTCCCGGCCCGCAGAGC
7401 GCGGTTTAGCGCCGTCACCCACCCCTCCCGCGTCAAGCGCTTTGCCCGCCGAGCGGCCCGCAGCCGCGCACCGGCGTCCACGAGGATTACGG
7501 ACCTTGGCGCCCTCCCGTACGGTCGGAGAGCGTGAAGAAGCCCGCCAGCGCCCGCGGGGGCGGTATGTCAGGGGTGAGGAAGGTCACTCGCC
7601 ATGGGACCCCGGGCGGGGGGTAGACCTCTCCAGTACCCAGTCCCTCTCGTCTGTTGGAAGGTACGGTGGTACCATGACGGCGACAGCGG
m p v r a g p a y v d e w y g l a r e d d h f t v t t v m v a v a s
7701 AGTGGGCGGAGCGTGCATCTCCAGCGCGCCAGCTCGTCTGGGAGCCCTGGCGTGGCGTGGCGGGTCTCTGGCCCTTACGACCTCGCGCCGGTGG
h p p a d i e l a a l e d q a a q r a h a t r q g k v v e r g t r
7801 CTCGTTAGAGCTGTCGAAGTCCGCGACCATCCGCTCGTCCGCGCGAGTCCGGCACGGCGCGGAGGTGTCGGGGGTAGACGAGACCGCGAGC
e t y l q d f q a v m r e d q g l e p v a a v t h p p y v s v g v
7901 GAGGAGGCTTGTCTGTCGACCGGAAGACCGGATCGCGATCACGGCTCGTCCCGGGTCCAGGTCCAGCGCGCGCAGACCTCCGGTCTGACGCG
s s p k d d q r f v r i r l v a e d g p e l d l a a c v e p d y v s
8001 AGCGTGCATGACCCGGTGGCGGAGGAGTCTCTCCGGTGGTACCGCTTCCGTTCTTGGCCATACGGTCCGACCGGTCCCGCGCGGTGATGACGAT
r q m v r h g s s t e g p a y r k g n k a m r d i r d a g t i v i
8101 CCGGACTTCGCCACGACGGTCCCGACCGCCCGCGTGAAGTACCGAGTCCCGCGCTTGGACACAGCCAGAGCACGGCTCACGGTCTTGGCAGCGGAG
p a k a v v t g l a g r s t v l g v r k i v a i a r s v t k a a v
8201 TCGAAGTGTGGCGATGTCGGTACCGAGGGAGTGCCTCGCCCGCGGAGTTCGCGCGCTTATGACGCGACCGGTAGTCTCAGCGACCGTCTCGGT
d f q q r i d t v s p l a d g p a l e g a k i r s r y h e a v d a y
8301 ATCCCGCGCCCTGTCCTGTATGCCATGACTCCTCTGTTGTCGGATCAACCGTCAATGTCGAAGGTACATCAATGACCCCTCCGAAGGTACATCCTT
g a q q a r y a m
8401 GCGTGGTGGTCTCTCATGTACCTCAGGACGTCGCCAAGGTGCTTAAGTACCTAGTGGCGGACTGATGTGTACCTTCGTCGAGAGGTGAGTCACTG
fM
8501 GCAACCAGGAATGTCGCCCGCAGCGGGCCAGACCCGCAACCACTCGTGGCCAGAGCGCGCACGGCAACAAGTTCGGGGATCCCGTGCCTTCGCTG
A T R N V P P Q Q G Q T R N T T R G Q S A H G N K F A D A G A F A

8601 GCGGTCTCTCGGGCGGATGGGCGGAGCTTGTCCGCCGATCAACCTCACGGTCAACTCGGGTGGCGGCGGGGGCGGTGAGTCCCCCGCCCTCGCG
G G L L G A M G G S F V P P I N L T V N S G G G R G G Q S P A A S R

8701 TACGCCCACTTCATGCTGGGGAGCCGACGTTCCGCTCGACCGATGACGTCCGCAACTACTGCAACGGCGTCCGGCTCTGATGCTCCAGTGGCGATC
T P H F M L G E P T F A S T D D V R N Y C N G V R A L M L Q C A I
BstXI

8801 GAGCTCGGATGGGCGCAAGATCCTGGAGGCGGGCTCGCCAGGCCAGCGCTCCGGACGACACCCCGATCCAGCGGAAGCTCCGCGGATGAAG
E L A M G A K I L E A R L A Q A Q P L P D D T P I Q A K L R A M K

8901 TCGCCCGAAGCTCAAGCGCGCGCGGACCGCCACCGCGCGGAGAACGGCTCGCCGCTACGGCGCTTCCAGCGTGTAGTACGCGGACCTGAT
V G R K L K R A A D G A T A A A K N A V A A Y G A F Q R E Y A D L M

9001 GCGTCCGCCCCCAAGCAGCGTCCGGCCAGACACCCCGTTCAGTTCTGAGGAGGCGAGCGTCATGGTGGAGAACACTCAGCAGCAGGACCGCTCCCG
R P R P K Q R P A Q T T P F Q F End EM V R N T Q Q Q D G L P
traB→

9101 GCCGTCACTCTGACCGGAGCACTTCAAGGGCTGGGCTGGCACGTGACCAAGCGTTCGTCCCGCCGTGGGCGTCCGCGTTCACCGTCTGGCGG
A V T S Y G S T F K A W A H H V T K P F V P P W A V A G V T G L A

9201 GCGCGGGCCAACTCCTGTGGCAGGGCTCGCCCTGGGCGGGCTCGGCTCACCCCTCGGGTGGTCCGCTCACCGGCGCAGCTGGGCGGGGGGT
G G G A N L L W Q G S P W A G V G L T L G S V A L T G A T W A A G V
BstXI

9301 GAAGACCGGTCCGACGGCGCTCCTCACTCCGCATCACCGTGGCGGGCGCTCGGCTGGAGCAGCGGGCGCGATCAGCGGGCGCTCTCCGGCCCG
K T G R Q R R L H S A I T V A A A S A W T T A A A I S G P L S G P

9401 CTCGCCGACCTACCTGATGGGCGGCGGGTCTCGCGCTCTCTGGAACATCCGCGGCTCCTCGCGCGGGATGGCGAGAGCTCCGGCGAGTCCGG
L P D L Y L M G G A V L A L S W N I R R V L A A G H A E T S G E S

9501 CGGACAGGGCCCTCATGGAGAGGTCCGGCTGGCCCGCACCTCCTCAAGAACGTCAAGGTGGAGCGGAACAGGTGACCGCTCGTACGAGCTCCGGC
A D K G L M E K V G L A R T L L K N V K V E P N K V T A S Y E L P A
BamHI

9601 GGGGAGCTCACCAACGACGACTGGGCAAGCGCGGACCGGATCGCTCCGGCTCGACGTCGCCACACGGCCATCCGGATCCAGCAGATCCGGAC
G E L T N D D L G K A R D R I A S A L D V P T T A I R I Q H D P D

9701 TCGCCCGGGCGGACGATGCTCATCGTCCCGAGGACATGCTCAAGACCGGACGATCGCCCGGGCCGTAAGCAGCGGGCGAGTCCGTGGAGTCC
S A R R G R I V I V P E D M L K T P T I W P G P Y A P G E S V E V

9801 CGCTCGGATCGGGCTACGACGAGCGTCCGACCTCGTCTCGCGCTCCTGGCCGCATCCAGTCTGGTATGGGATGACCGCTCCGGCAAGAC
P L R I G V Y C D G A D L V L P L L A A I H V L V M G M T G S G K T

9901 CGAGGGCGCCCTCGACCTCTGCTCGAACTCTACCCCGCGGACGTCGTGGTCTGCTCGCGGACGGCGCAAGAGCGCCAGGACTCCAGCCGCTG
E G A L D L L E L F T R R D V V V W L A D A A K S G Q D F Q P L
NcoI

10001 CTCGCCGATCGGACTGGGCGCGCTCGACACCCCGTCCGGCGCGCGGATGGTCCCGCGCTCCAGGCGCTCATCCCTGCCGCTACGGCTGGCTGCGTG
L P A M D W A A L D T P S A A A M V A A V Q A V I P A R T A W L R

10101 ACCACGGCTACCGGGCTGGGAGGCGCGCGCGCGGCGCAGACCAACCGGGCGACTCTGCGCAAGGACGCGCGCTCGGCTGGGACGGGAT
D H G Y R A W E A A A A R R Q T N P A H S C R K D G R A C G C D G M

10201 GGCTACTCTGCTCGCTGGTTCGAGGAGCGCGAAGCTCCTGCGGAGCTGGGCGACGAGTGTTCACCGCATCGCCAGGAGCCCGTCCGCGGGC
A Y L L A W F E E A A K L R E L G D D V F T G I A Q E A R S A G

10301 GTCTCGCTCGTCTGATGACGCGCGCTCCGGTACCAGCTCTCCACCGACAGGGGAGCGCTCCCGCGCCATGTGCTTCGGAGTGAAGGGG
V S L V Y S M Q R A S G Y Q L S T D T R A S L P A A M C F G V K G

10401 ACGACCGCTCGTCCGCTCGCGGAGGAGGTGCTCGACGCGGGCGGACCGCGCGGCTGGGCGAACAAGCGCAAGGGCTACGTGACCTCGTCCCGC
D D A S F A L P E E V L D A G A D P A A W G N K R K G Y V Y L V S A

.Asp7001 .

10501 CGAGGTGGACGAGGACCTGCACGCCACCCCGGCGCACCTTCTGGACCGGCCCGTCGGGCGAGTACGAGCGGATGGCGGAGTACGTGGTGAAGCAGTTC
 E V D E D L H A T P A R T F W T G P S G E Y E R M A E Y V V K Q F

10601 GCGAAGCTCCGGGCCCGCTGGACGCCCTCACCGCGGCGCCCGGAGAAGGCCGTGGGGAGTCTTCACCCGCGCGCGAGCGGGCCCTCGGCAACC
 A N V R A A L D A V T A G A A E K A V G E F F T R R R E R A L G N

10701 AGGCTGCCTGACCTCGGCGTGGAAACCGACCGGCGACCCGCTCCTCGATGGTCTCGCGGAGCAGGAGTCCGCCAGGGCGTCCGCCCGCTCGTCGACGA
 Q A A S T S A S E P T G D P L L D G L A E Q E S A Q A V A A L V D E

10801 GGAGGACCAAGGAGCTCGACGTCAACCGACCTCGACCCCGTGGAGACGGACATCGCTCTCCCGCGGCCAAGCCAGCCCGAGGAGGCCCGCGAGCTC
 E D Q E L D V T T D L D P V E T D I A L P A A K P S P E E A R E L

10901 CTGGAGACATGGTCCGATGCTCCCGGGTCCGCCCGGACGGTCCGGTCAAGGACCTCGGCCGTACCTGGAGCAGCTCGGCCGGACCGGAGCT
 L E D M V A M L A G V G P G T V A V K D L G P Y L E Q L G R D R S

11001 GGGTCTCCAAGCAGATGCCGGATGGCTCCGAGGGCGGCTCCGCCCGACCGCGAACAGGGCGTCTACCGCCTGGTGCCCGTCCCGCGCGGCGTG
 W V S K Q M S R M A S E G R L A P T A E Q G V Y R L V P V L A A A End

11101 ACCGCCCGCACCCCGCACACCCCGCACAGCCGCACAGCGC

Fig 12. Secuencia de nucleótidos completa del plásmido pJV1. La secuencia está numerada a partir de la primera base del único sitio de reconocimiento para la enzima *EcoRI*. Se muestran las secuencias de aminoácidos de la proteína de replicación (Rep); así como las proteínas responsables de la transferencia (TraA y TraB); las proteínas responsables de la diseminación del plásmido (SpdB1, SpdB2, SpdB3 y SpdB4), las proteínas involucradas en la manifestación del fenotipo Kil-Kor (TraA, TraB y TraR) y una proteína de función desconocida (codificada entre los nucleótidos 5787 y 6038)

Se marcan en la secuencia de nucleótidos, los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción con las cuales se realizaron las mutaciones mencionadas en el texto. Las secuencias de reconocimiento para las enzimas se encuentran subrayadas.

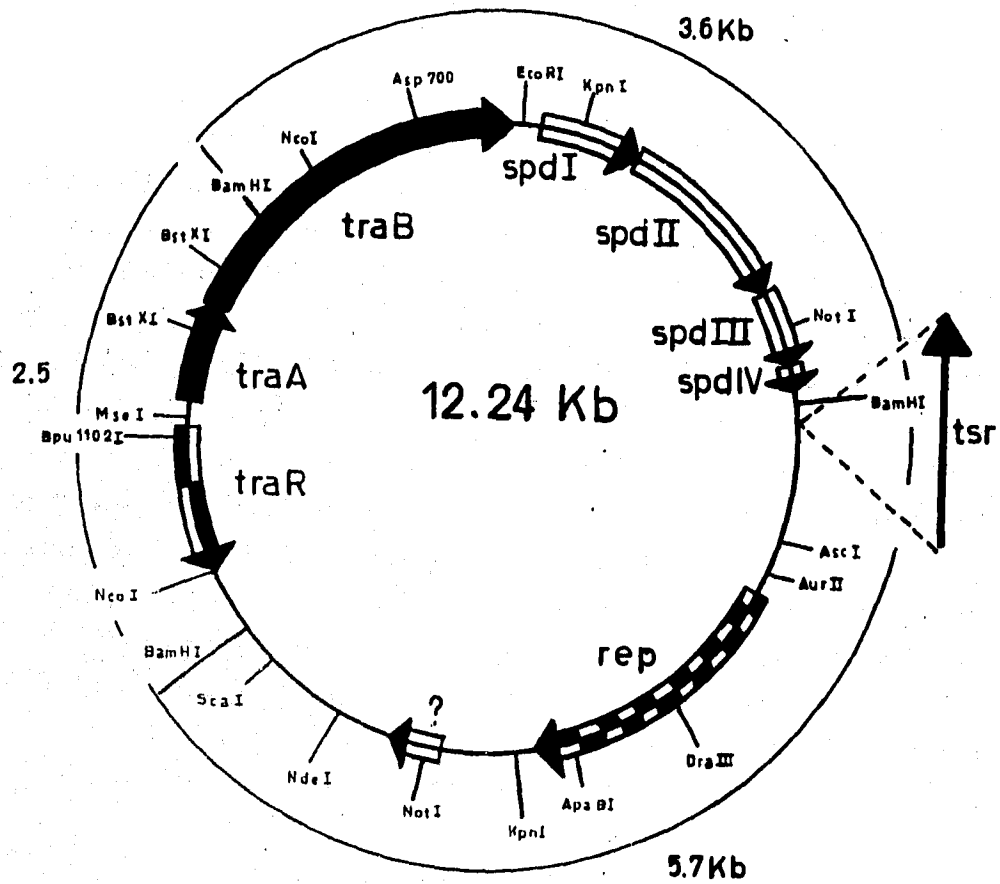


Fig.13 Mapa físico del plásmido p B50.

*Bam*HI para comprobar la presencia del plásmido. El patrón de bandas es similar al encontrado en el plásmido silvestre, solo que la banda de 4.6 Kb es de 5.7 Kb por la presencia del gen *tsr*.

* El pB50 también se introdujo por transformación a la cepa TK54.

** En las diferentes cruzas hechas con este plásmido, se observó la formación de los "pocks".

Aislamiento del plásmido pB2.

Este plásmido contiene un origen de replicación híbrido y fue generado *in vivo* al cointegrar al pJV1 silvestre con el vector pIJ486 (derivado del pIJ101, Ward et al, 1986), en sus sitios únicos de *Eco*RI (Servin, 1993). El pB2 posee, por lo tanto, una parte proveniente del pJV1 (comprendida entre el inicio de replicación y el sitio de *Eco*RI), que incluye los posibles genes *tra*, y otra proveniente del pIJ486 (comprendida entre el sitio *Eco*RI hasta el origen de replicación), que incluye al gen *tsr*, la cual sustituye a los posibles genes *spd* del pJV1 (Fig.14). El pB2 fue introducido a la cepa TK64 por transformación en cajas con medio R2YE + thio. Las cajas se incubaron a 29 °C hasta tener una esporulación total. Las colonias transformantes fueron sectorizadas con palillos estériles en cajas con medio R5 + thio incubadas a 29 °C hasta tener los sectores bien esporulados. Las distintas muestras se inocularon en tubos con medio LB + thio, incubados a 29 °C durante 3 días en agitación constante. A las diferentes muestras se les realizaron minipreps, las cuales se digirieron con *Bam*HI, ya que el pB2 presenta dos sitios de reconocimiento para ésta enzima, el patrón de bandas es el siguiente: una banda de 8 y 2.5 Kb.

En el pB2 se realizó una cruce entre las cepas (TK64 y TK64 con el pB2), para la observación de los "pocks", pero no se observaron los "pocks".

Aislamiento del plásmido pB53.

Al plásmido pJV1 se realizaron digestiones dobles con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI, para la extracción del fragmento que contenía los genes *spd*, el patrón de estas digestiones es el siguiente, son 4 bandas de diferente peso molecular: una banda 4.65, 2.5, 2.3 y 1.35 Kb. La digestión total fue corrida en un gel de agarosa LMP 0.6% (12 volts, por 14 hrs), para separar y aislar la banda de 2.3 Kb que contiene los genes *spd*.

Al plásmido pB2 de igual manera se realizaron digestiones dobles, solo que las enzimas empleadas fueron *Eco*RI y *Bg*III. La inactivación de las enzimas fue por extracción con

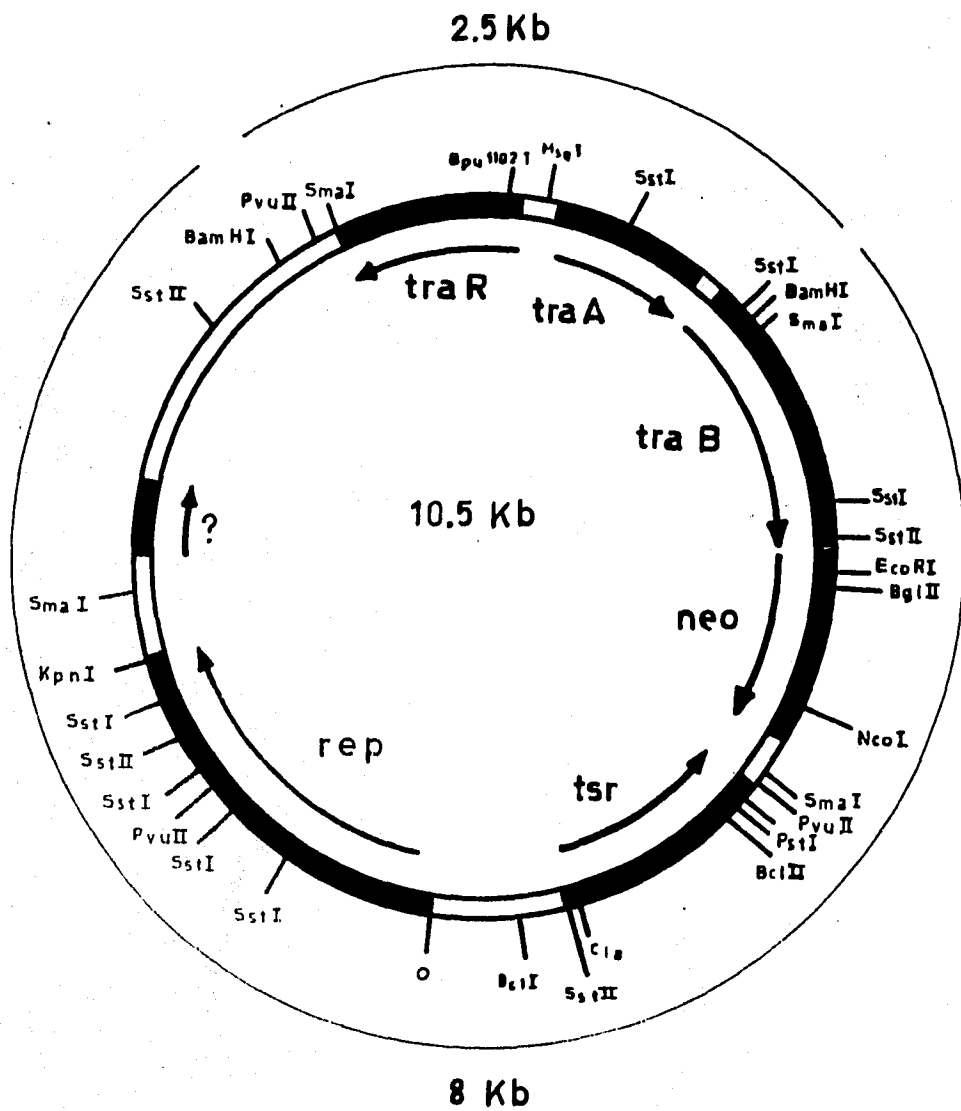


Fig.14 Mapa físico del plásmido pB2, por Servín, 1993.

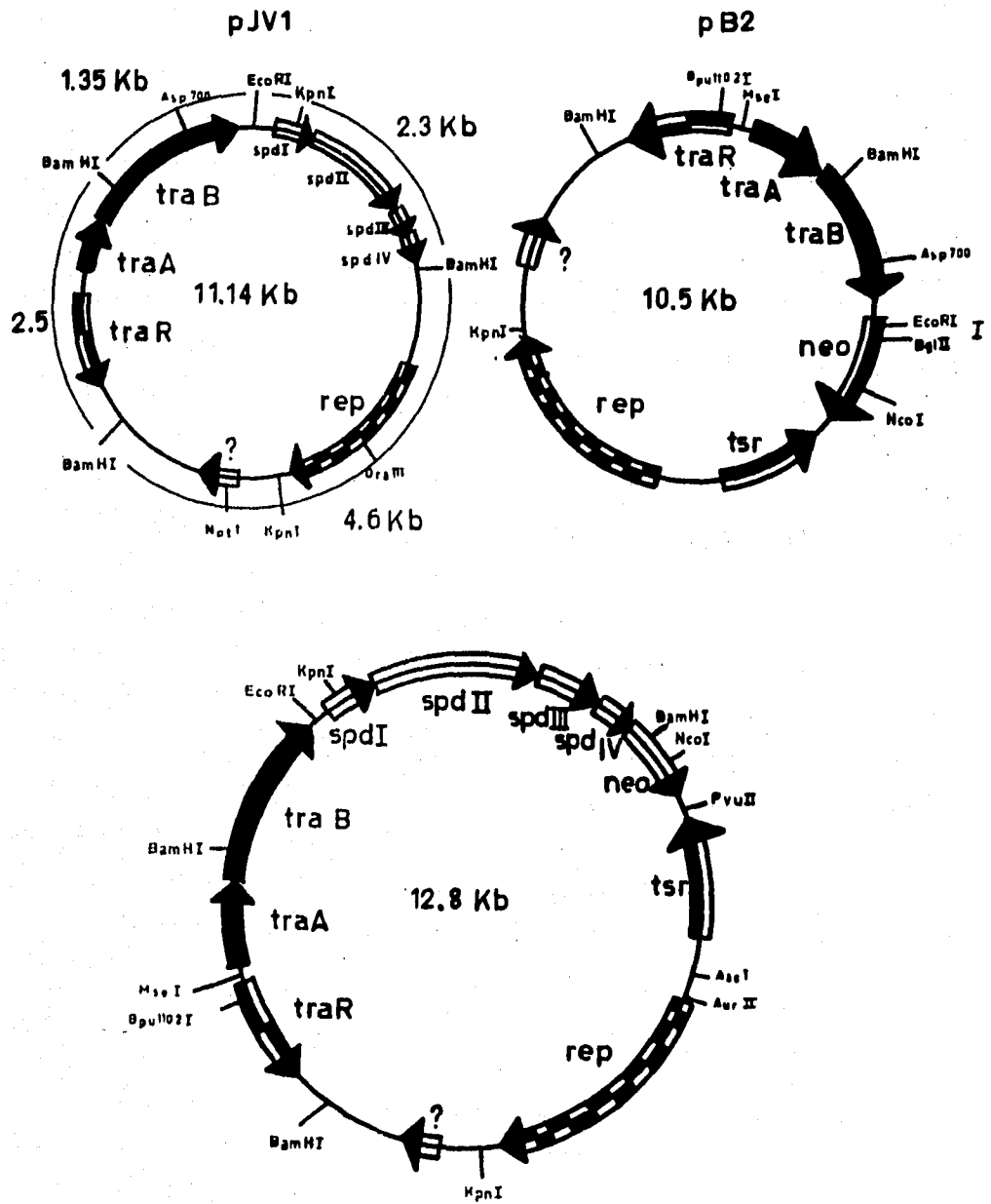


Fig.15 Mapa físico del plásmido pB53.

fenol/cloroformo. Los extremos que dejan estas enzimas no son compatibles, por lo que se esperaba que casi todo el fragmento se ligara con la banda de 2.3 Kb. La mezcla de ligación se introdujo por transformación a la cepa TK64 en cajas con medio R2YE + thio las cuales se incubaron a 29 °C hasta tener bien esporuladas las colonias. Se cosecharon las esporas y se inocularon en cajas con medio R5 + thio a 29 °C hasta llegar a una esporulación total. Se cosecharon las esporas y fueron inoculadas en tubos con medio LB + thio a 29 °C durante 3 días. A las diferentes muestras se les realizaron minipreps y se digirieron con las siguientes endonucleasas para comprobar la estructura del plásmido: *Sst*I, *Bam*HI y *Pst*I.

Al plásmido en el que el fragmento *Eco*RI-*Bam*HI que contiene la región *spd* se había ligado con el fragmento *Eco*RI-*Bgl*II del pB2 se le llamó pB53 (Fig.15).

* Se realizó una cruz entre las cepas (TK64 y TK64 con el pB53), para la observación de los "pocks" y sí se observaron.

Aislamiento del plásmido pB57.

El pB50 fue digerido con la enzima *Bam*HI y la digestión total fué corrida en un gel LMP (12 volts, por 14 hrs), para el aislamiento de la banda de mayor peso molecular (5.7 Kb). La banda aislada corresponde a la región esencial del pB50 y lleva incluido el gen de resistencia a thio. La banda se purificó y se ligaron los extremos cohesivos para circularizar el fragmento. La mezcla de ligación fue introducida a la cepa TK64 por transformación en cajas con medio R2YE + thio las cuales se incubaron bajo las mismas condiciones. Las colonias se tomaron con palillos estériles y se sectorizaron en cajas con medio R5 + thio incubadas bajo las mismas condiciones. Las esporas se cosecharon con un asa estéril y se inocularon en tubos con medio LB + thio. Se realizaron minipreps a todas las muestras y fueron digeridas con *Bam*HI.

Al plásmido que tenía la estructura deseada (fragmento recircularizado), se le llamó pB57 (Fig.16).

Aislamiento del plásmido pB58.

El plásmido pB50 fué digerido con la enzima *Nco*I, lo que genera una deleción de 2.5 Kb que abarca los genes involucrados en la transferencia. La digestión total, se corrió en un gel LMP (12 volts, por 14hrs). Se aisló la banda de mayor tamaño (9 Kb) y dicho fragmento fue

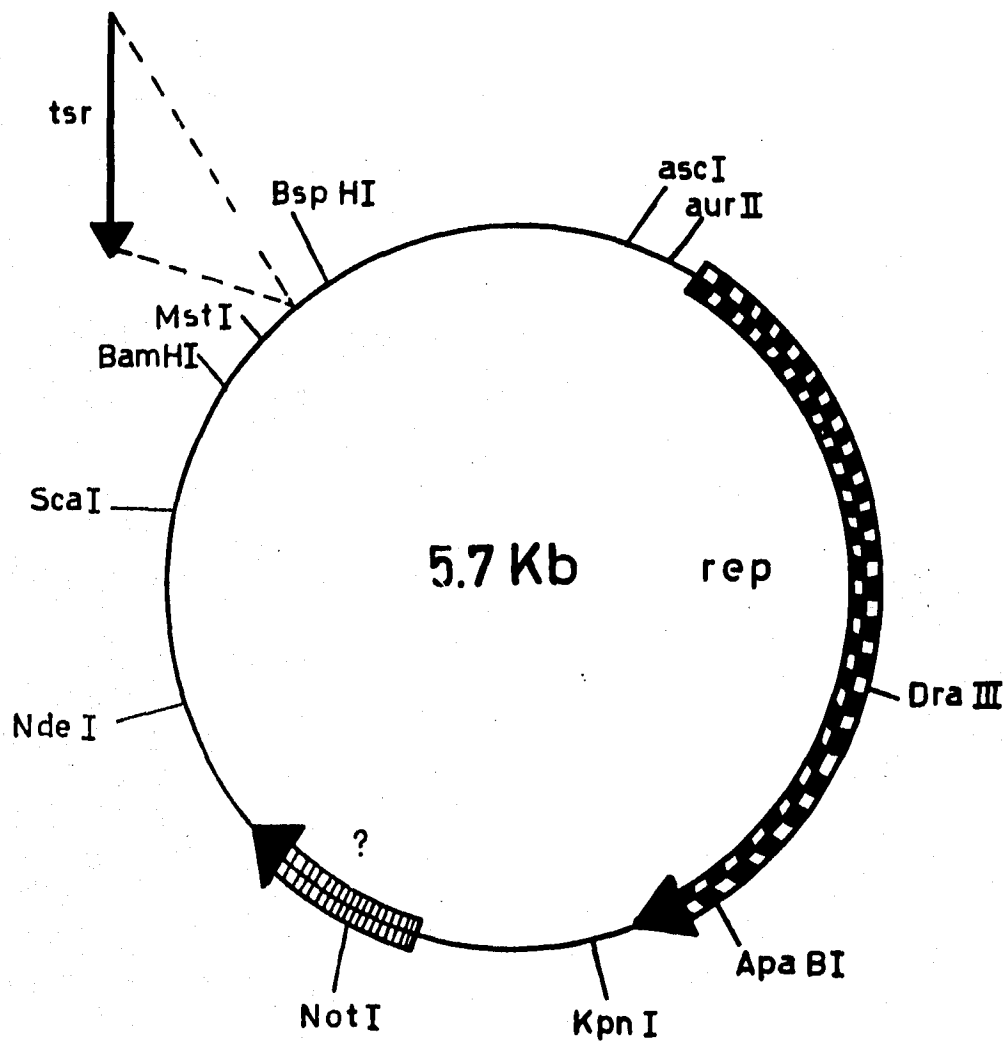


Fig.16 Mapa físico del plásmido pB57.

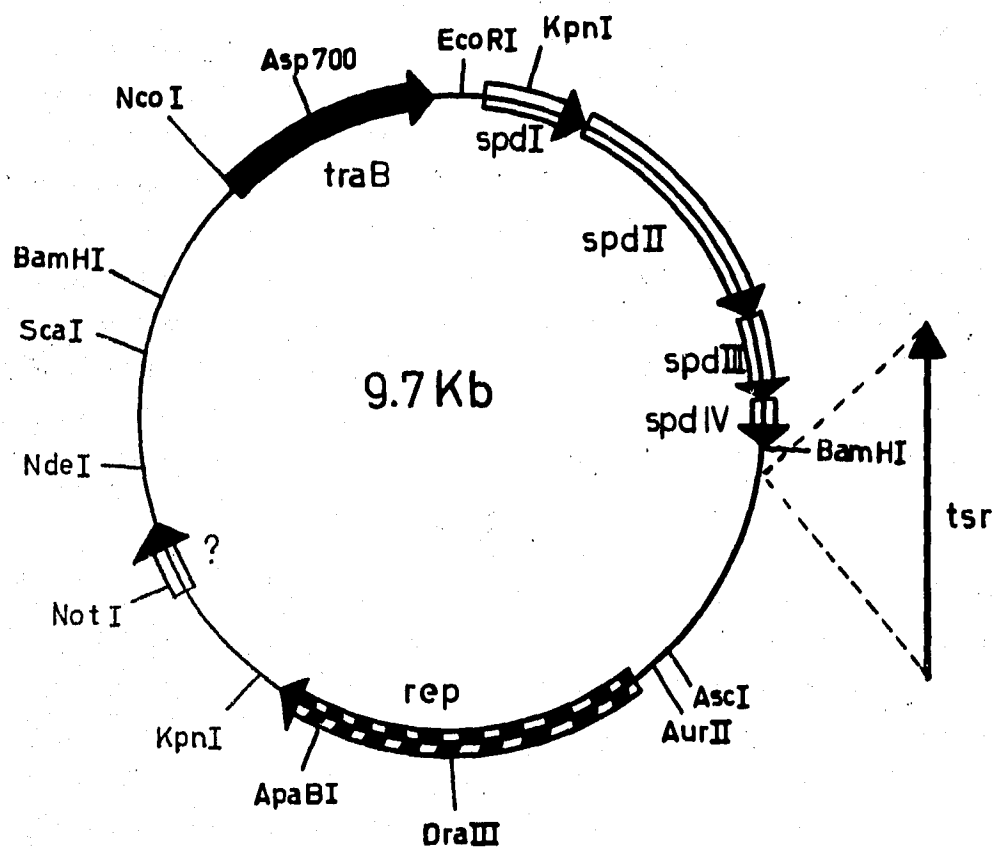


Fig.17 Mapa físico del plásmido pB58.

recircularizado con la ligasa T4. La ligación se introdujo a la cepa TK64 por transformación en cajas con medio R2YE, las cuales se dejaron esporular a 29 °C. Las esporas se cosecharon con palillos estériles y se inocularon en cajas sectorizadas con medio R5 + thio a una temperatura de 29 °C. Las esporas se cosecharon con un asa estéril y se inocularon en tubos con LB + thio por 3 días. Se realizaron minipreps a las diferentes muestras, las cuales fueron digeridas con *Bam*HI.

Al plásmido que contenía la deleción del fragmento *Nco*I de 2.5 Kb se le llamó pB58 (Fig. 17).

Aislamiento del plásmido pB59.

El plásmido pB50 fué digerido con la enzima *Bst*XI, eliminando un fragmento de 500 pb que comprende parte del gen *traA* y el principio del gen *traB*. Se corrió la digestión total en un gel LMP 0.6% (12 volts, por 14hrs), se purificó y recircularizo la banda de mayor tamaño, con la ligasa T4. La ligación fue introducida a la cepa TK64 por transformación en cajas con medio R2YE + thio incubadas a 29 °C hasta obtener las colonias transformantes bien esporuladas. Las esporas fueron cosechadas e inoculadas en cajas sectorizadas con medio R5 + thio las cuales se incubaron a 29 °C hasta obtener los sectores bien esporulados. Se cosecharon las esporas y se inocularon en tubos con LB + thio por 3 días. Se realizaron minipreps a todas las muestras y se digirieron con la enzima *Bam*HI.

Al plásmido que tenía la deleción del fragmento de *Bst*XI se le llamó pB59 (Fig. 18).

Aislamiento del plásmido pB75.

El plásmido pJV1 fue digerido con la enzima *Asp*700I (que deja extremos romos), la cual corta en un solo sitio dentro del gen *traB*. Por otro lado se obtuvo un fragmento de 1.1 Kb de *Bc*II, que contiene el gen de *tsr*, del pIJ702, y se trató con la Klenow para hacer romos los extremos y permitir la ligación con el pJV1 digerido con *Asp*700I. La ligación del pJV1 con el gen *tsr* fue introducida a la cepa TK64 por transformación en cajas con medio R2YE + thio a 29°C hasta que las colonias se encontraron bien esporuladas. Las colonias de esporas se cosecharon e inocularon en cajas sectorizadas con medio R5 + thio a 29°C. Las esporas se cosecharon e inocularon en tubos con medio LB+thio por 3 dias a 29°C. Se realizaron minipreps a todas las muestras y se digirieron con *Bam*HI, encontrando el siguiente patrón: una banda de 2.5 y 2 bandas de 4.6 Kb.

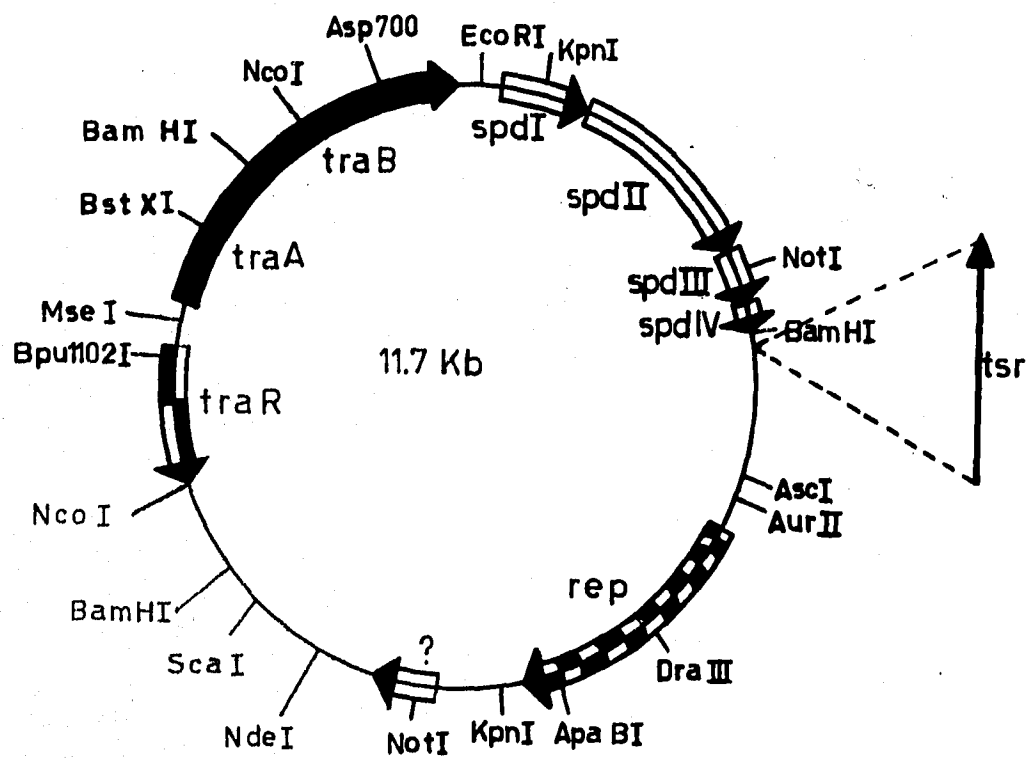
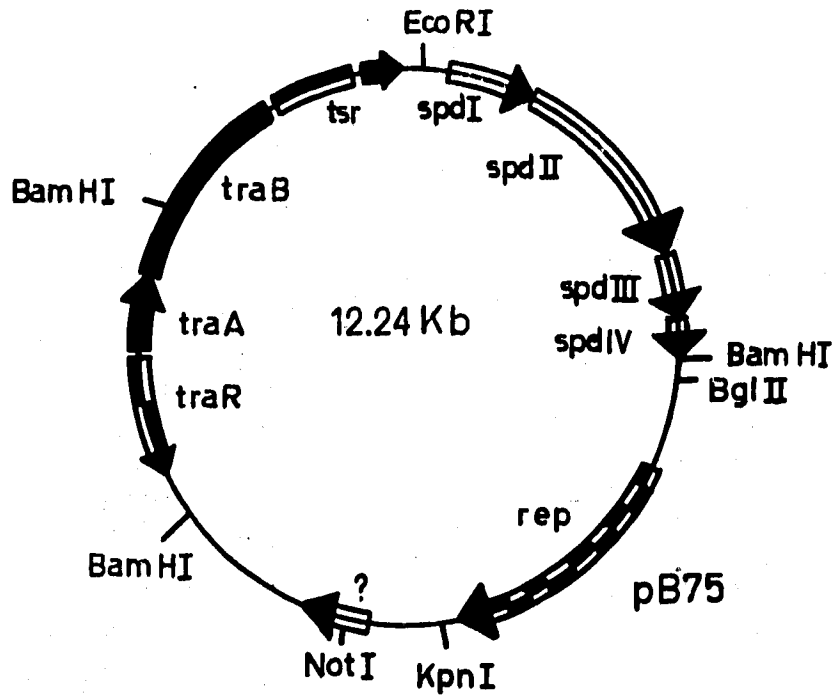


Fig.18 Mapa físico del plásmido pB59.



pIJ702

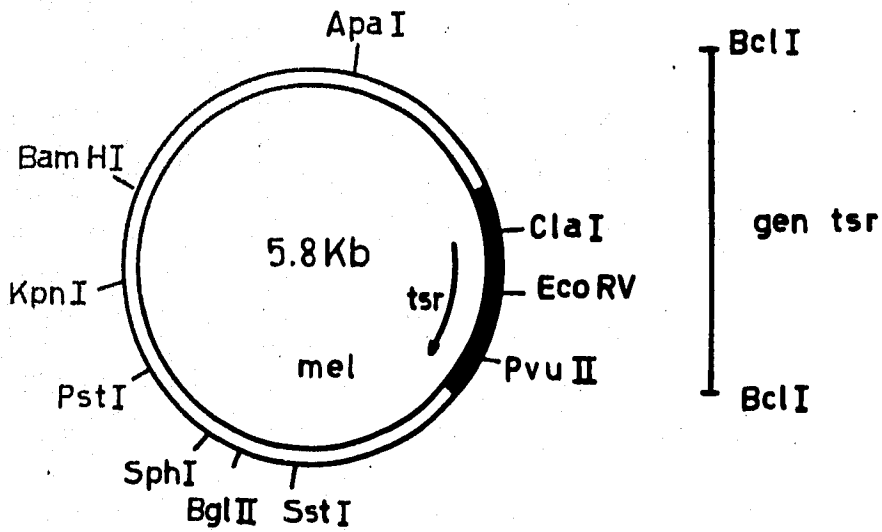


Fig.19 Mapa físico del plásmido pB75.

TABLA III

PLASMIDO	POCKS	CARACTERISTICAS	FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA	FRECUENCIA DE RECOMBINANTES
NINGUNO	-	control	0	0
pJV1	+	silvestre	1	5.2×10^{-6}
pB50	+	gen <i>tsr</i> en sitio de <i>Bgl</i> II	0.82	11.6×10^{-6}
pB2	-	sin genes <i>spread</i>	9×10^{-5}	4.4×10^{-5}
pB53	+	pB2 + genes <i>spread</i>	0.52	2.4×10^{-5}
pB57	-	fragmento <i>Bam</i> HI 5.7 kb del pB50	$<10^{-7}$	$<10^{-7}$
pB58	-	delección del fragmento <i>Nco</i> I	$<10^{-7}$	$<10^{-7}$
pB59	-	delección del fragmento <i>Bst</i> XI	2.5×10^{-7}	1.04×10^{-6}
pB75	-	inserción de <i>tsr</i> en <i>Asp</i> 700I	7.3×10^{-5}	1.2×10^{-5}
pB50	+	crusa inversa	0.81	2.97×10^{-6}

Tabla III Representa los datos sobre las frecuencias de transferencia y recombinación, así como la formación de pocks, en los diferentes derivados del plásmido pJV1 por medio de cruza genéticas.

Al plásmido con esta inserción del gen *tsr* en *traB* se le llamó pB75 (Fig.19).

Determinación de la existencia de un sistema Kil-Kor en el plásmido pJV1.

Con base en la secuencia del plásmido pSN22, la cual es muy parecida a la del pJV1 en los genes *tra*, podría presentarse un sistema Kil-Kor similar al de dicho plásmido, en el cual el producto del gen *traR* provee la función Kor y los productos de los genes *traA* y *traB* las funciones Kil.

La única enzima para la cual existe un sitio único dentro del gen *traR* en pJV1 es la enzima *Bpu1102I*, por lo tanto se siguieron tres estrategias basándose en dicha enzima.

A) Eliminación del sitio *Bpu1102I*.

El pB50 fue digerido con la enzima *Bpu1102I*, que interrumpe el inicio del gen *traR*. Se checó 1 µl de la digestión en un gel de agarosa 1%. El resto de la digestión fue corrida en un gel LMP 0.6% (14hrs a 12 volts). Se purificó la banda de mayor tamaño y fue recircularizada con la ligasa a temperatura ambiente, después de eliminar los extremos cohesivos por medio de tratamiento con Klenow, lo cual genera una mutación al insertarse un aminoácido de más. Este plásmido fue incorporado al sistema de *Streptomyces* por transformación en cajas con medio R2YE y antibiótico (thio) incubadas a 29 °C hasta obtener las colonias bien esporuladas. Las colonias transformantes se sectorizaron en cajas con R5 + thio a 29 °C hasta que se encuentren bien esporuladas. Se cosecharon las esporas y fueron inoculadas en tubos con LB+thio durante 3 días. A todas las muestras se les realizaron minipreps y fueron digeridas con la enzima *BamHI*, comparando el tamaño de los fragmentos con el marcador de peso molecular.

Se observó que algunos plásmidos daban el patrón normal de bandas con *BamHI*, mientras que otros daban un patrón correspondiente a un plásmido más pequeño (Fig.20). Al checarlos con *Bpu1102I* se observó que los que daban el patrón normal con *BamHI* si se digerían con *Bpu1102I*, debido a que el tratamiento con Klenow no fue 100% eficiente, mientras que los más pequeños si habían perdido el sitio de *Bpu1102I* (Fig. 21).

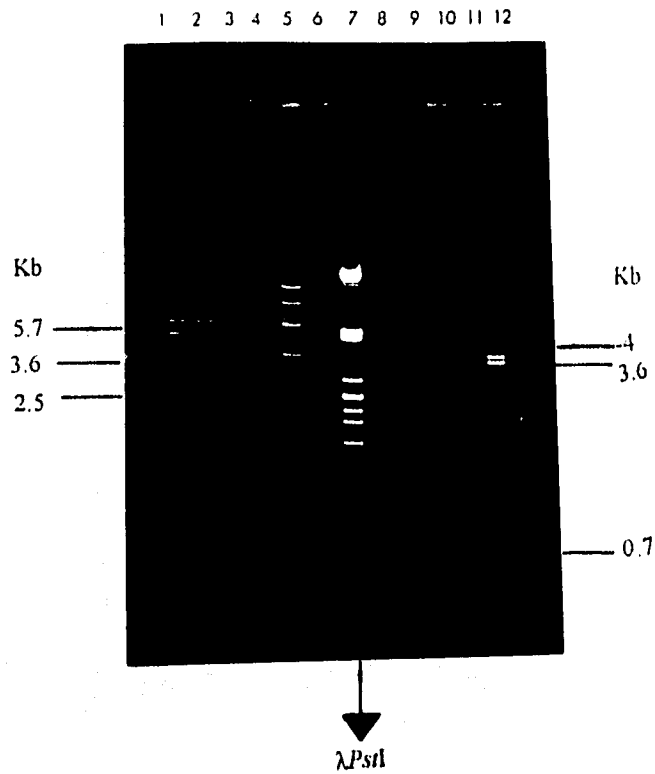


Fig.20. Gel de agarosa de alto punto de fusión (1%), por electroforesis se corrieron las muestras con los plásmidos mutados en el sitio de *Bpu*11021, los cuales fueron digeridos con *Bam*HI y *Sst*I. Las muestras con el DNA en los carriles 1-6 fueron digeridos con *Bam*HI, en el carril 7 esta el marcador de peso molecular ($\lambda PstI$) y finalmente los carriles 8-12 son las mismas muestras solo que digeridas con *Sst*I. Las muestras con el DNA en los carriles 5 y 6, digeridas con *Bam*HI dan el patrón normal de bandas (5.7, 3.6 y 2.5Kb); mientras que las muestras de los carriles 1-4 la banda de 2.5Kb disminuye de tamaño. La muestra de DNA en el carril 12 digerida con *Sst*I da el patrón normal de bandas de un plásmido que no tienen mutado el sitio de *Bpu*11021, mientras que las muestras de los carriles 8-11 la banda que contiene el sitio *Bpu*11021 mutado es más pequeña.

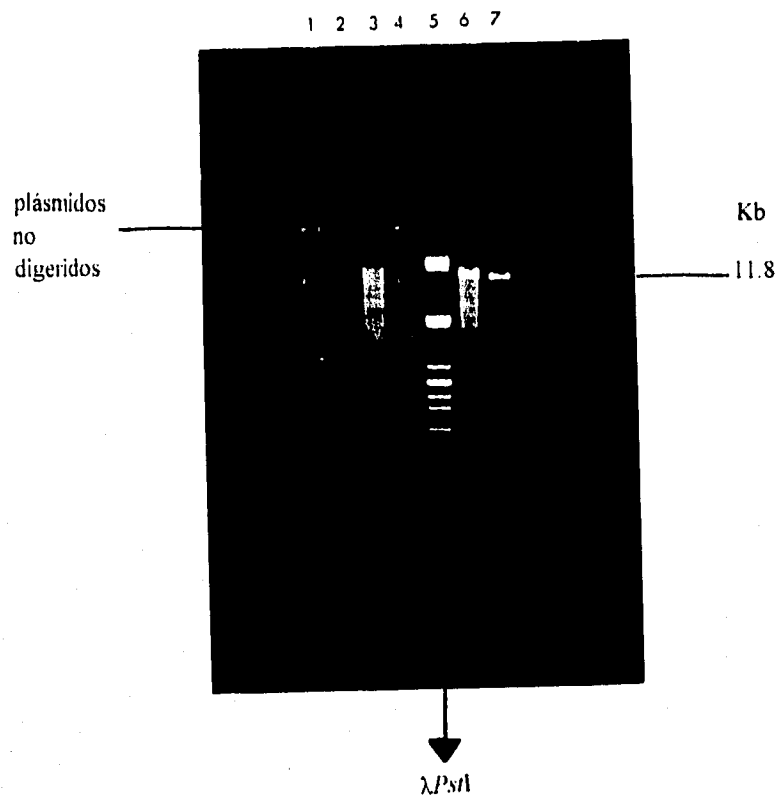


Fig.21. En el gel de agarosa al 1%, por electroforesis se corrierón los plásmidos que llevan mutado el sitio *Bpu*1102I; los cuales fuerón digeridos con la misma enzima para comprobar que realmente tienen mutado el sitio. Las muestras con el DNA en los carriles 1-4 no fuerón digeridos con la enzima, por lo que estos plásmidos si perdieron el sitio de *Bpu*1102I, mientras que los DNAs en los carriles 6 y 7 si fuerón digeridos con la enzima, presentando una banda de 11.8 Kb en ambas muestras, por lo que estos plásmidos no perdieron el sitio de *Bpu*1102I. En el carril 5 se encuentra en marcador de peso molecular ($\lambda PstI$).

B) Delección del intervalo *ScaI-Bpu1101I*.

Al plásmido pB50 se le realizó una digestión doble, empleando las enzimas *Bpu1102I* y *ScaI*, lo cual eliminaría el gen *traR* sin tocar *traA* y *traB*. Se checó 1 μ l de la digestión total en un gel de agarosa 1%, el resto de la muestra fué corrida en un gel LMP (12 volts por 14 hrs). Se extrajo la banda de mayor tamaño, la cual fue ligada durante 10 hrs a temperatura ambiente, después de tratarla con Klenow.

De la ligación total se transformaron 10 μ l en la cepa TK64 sobre cajas con medio R2YE + thio las cuales se incubaron a 29° C. Al analizar las minipreps de las colonias resultantes se observó que todas daban plásmidos de un tamaño menor a lo esperado, en los que se había perdido espontáneamente *traA* y *traB* (Fig. 22).

C) Delección del intervalo *Bpu1102I-EcoRI*.

Al plásmido pB50 se le realizó una digestión doble con las enzimas *Bpu1102I* y *EcoRI*, lo cual eliminaría los genes *traA* y *traB* y el inicio de *traR*. Se checó 1 μ l de la digestión en un gel de agarosa 1%. El resto de la digestión fue corrida en un gel LMP 0.6% (12 volts, por 14 hrs). Se extrajo la banda de mayor tamaño, la cual fue ligada durante 12 hrs a temperatura ambiente, después de tratarla con Klenow. El plásmido con esta delección se llamó pB76 (Fig.23). Por transformación fue incorporado este plásmido a la cepa Tk64 sobre cajas con medio R2YE + thio incubadas a 29° C. Se observó que todas las colonias dieron plásmidos del tamaño esperado.

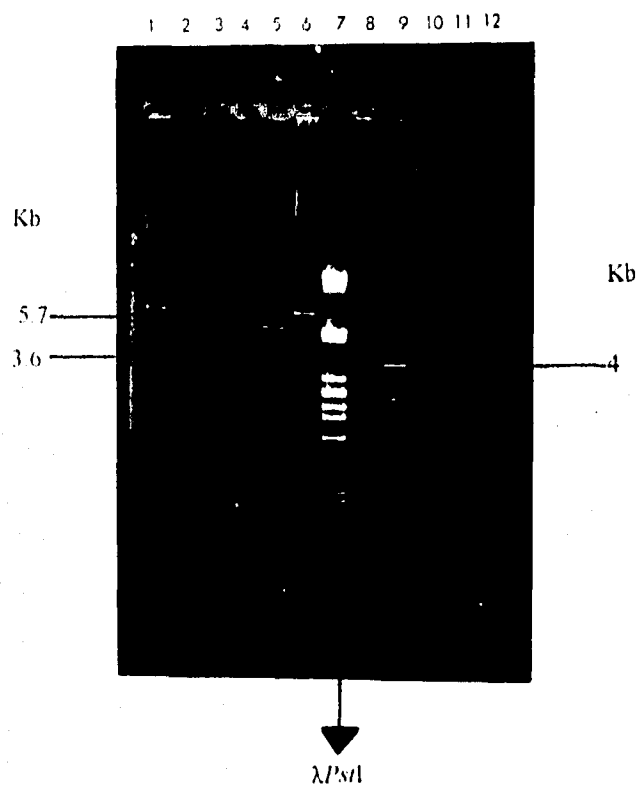


Fig.22. En el gel de agarosa al 1%, se corrierón por electroforesis las muestras que tienen los plásmidos mutados en los sitios *Bpu*11021-*Sca*I.

- Las digestiones a la izquierda del marcador de peso molecular fuerón hechas con *Bam*HI;
- mientras que las muestras de la derecha se tratarón con *Sst*I.
- Todas las muestras dierón tamaños menores a los esperados.

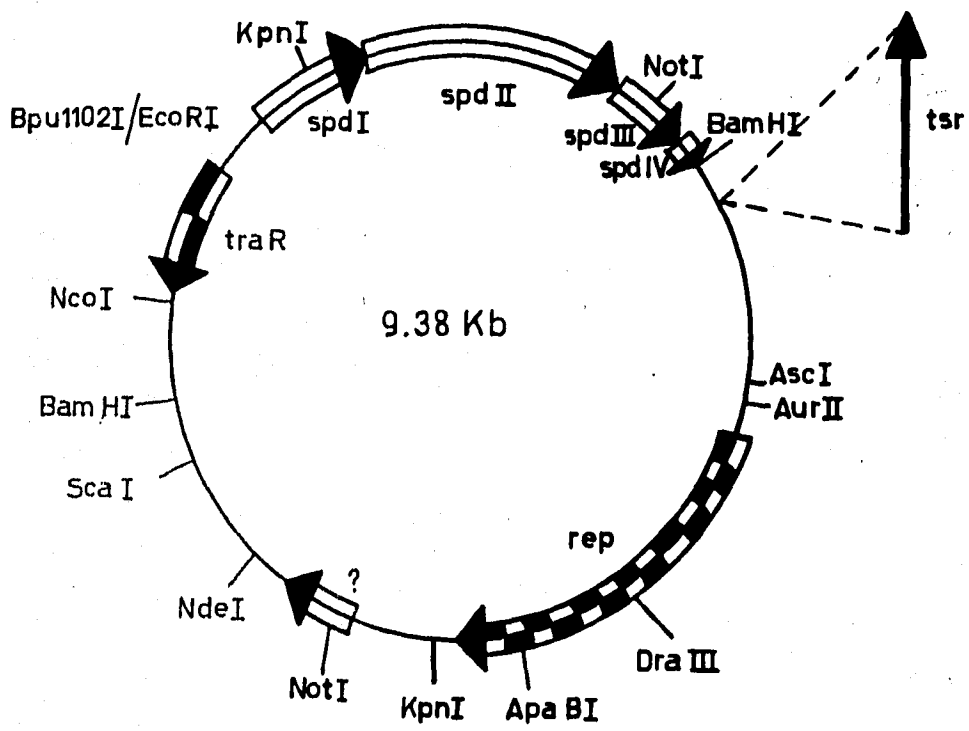


Fig.23 Mapa físico del plásmido pB76.

DISCUSION.

Nosotros reportamos aquí el análisis funcional y estructural de los genes involucrados en los mecanismos de transferencia y diseminación del plásmido pJV1 mediante el empleo de mutaciones en diferentes regiones del plásmido.

Los resultados obtenidos sobre las frecuencias de transferencia del plásmido y el paso de marcadores cromosómicos (frecuencia de recombinantes) se observan en la tabla III. El dato obtenido sobre la frecuencia de transferencia del control negativo fue cero, lo cual era esperado ya que estas cepas carecen de cualquier plásmido. Todos los datos obtenidos de las mutaciones en los diferentes genes involucrados en los mecanismos descritos con anterioridad se compararon con el dato control.

El plásmido silvestre (pJV1) presenta una frecuencia de transferencia a la cepa receptora de 100%, lo que es igual a una frecuencia de 1, por lo que este plásmido se transfiere con una alta eficiencia de una cepa hacia otra, por medio de la conjugación bacteriana. La alta eficiencia en la transferencia también ha sido encontrada en otros plásmidos libres con alto número de copias como son el pIJ101 (Kendall y Cohen, 1987, 1988) y el pSN22 (Kataoka et al, 1991a). En los plásmidos que se encuentran integrados en regiones específicas del cromosoma también se ha medido la frecuencia de transferencia, entre los que destaca el pSAM2 aislado de *Streptomyces ambofaciens*, del cual se sabe que cuando se encuentra libre en el citoplasma celular se replica de manera autónoma y se transfiere con una alta eficiencia de 100% al igual que lo hacen los plásmidos libres con alto número de copias.

Los dos datos obtenidos sobre la frecuencia de transferencia del pB50 de 0.82 (82%) (TK54, receptora del plásmido) y 0.81 (81%) (TK64, receptora del plásmido) se encuentran muy cercanos al 100% obtenido para el plásmido silvestre, por lo que el pB50 es un plásmido que se transfiere también con alta eficiencia; al parecer la inserción del gen *tsr* en el sitio único de *Bgl*II del pJV1 no afecta la transferencia del plásmido, ya que la inserción de este gen se encuentra en una región no codificadora para algún gen importante en el mantenimiento del plásmido o para la transferencia misma. La presencia del gen *tsr* en el pB50, tiene la ventaja de que permite seleccionar las colonias que contienen el plásmido, mediante la resistencia al antibiótico.

El plásmido pB2 carece de una región de 2.3 Kb que contiene a los genes *spd*, involucrados en la diseminación del plásmido a lo largo del micelio receptor. El dato obtenido sobre la frecuencia de transferencia del pB2 fue de 9×10^{-5} , es decir 100 mil veces menor a los datos encontrados en los plásmidos mencionados con anterioridad; este resultado muestra una enorme baja en la transferencia del plásmido, lo cual posiblemente sea atribuido a la falta de los genes *spd* (*spread*) y a la presencia del origen híbrido.

Al analizar el dato obtenido para el plásmido pB53, que es el pB2 con los genes *spd* reintroducidos, se observó que la frecuencia de transferencia aumentó a 0.52 (52%). Al incorporar los genes *spd* nuevamente en el pB2 se pudo demostrar que la ausencia de ellos ocasiona una enorme baja en la transferencia del plásmido; aunque la transferencia no fue tan eficiente como en los plásmidos (pJV1 y pB50) de alguna manera la presencia del origen híbrido del pB2 pudiera interferir, en que la transferencia no sea muy eficiente.

La mayor parte de las deleciones fueron realizadas en el plásmido pB50, por la presencia del gen *tsr* lo cual facilitó la expresión y selección de aquellas colonias que presentaran al plásmido con el gen de resistencia ante el antibiótico (thio).

La deleción de 500 pb entre los dos sitios *Bst*XI en el pB50, formando el plásmido pB59, interrumpió el final del gen *traA* y el principio del gen *traB*; el dato encontrado para la frecuencia de transferencia del pB59 es $< 10^{-7}$, dicho valor se encuentra muy cercano a cero de transferencia. Aunque se sintetiza la mayor parte de la proteína TraA el producto formado por el gen *traB* no existe. Al parecer ésta es la proteína más importante para la transferencia intermicelial del plásmido durante el evento de conjugación bacteriana del pJV1.

Una deleción mayor de 2.3 Kb fue llevada a cabo en el pB50 para la interrupción de todo el sistema involucrado en la transferencia intermicelial, como son los genes *traA*, *traB* y *traR*. Este sistema se encuentra localizado entre los dos sitios *Nco*I-*Nco*I, el dato encontrado para el plásmido pB58 es $< 10^{-7}$, dicho valor es muy cercano a cero de transferencia, además de ser igual al encontrado para el pB59.

Las deleciones de los fragmentos internos de *Bst*XI y *Nco*I han afectado claramente la transferencia de los derivados del pJV1; si comparamos los datos obtenidos para los plásmidos pJV1 y pB50 en los cuales la transferencia fue 100% y 82% respectivamente, mientras que en los plásmidos pB59 y pB58 disminuye a $< 10^{-7}$.

La delección de todo el sistema responsable de la transferencia y diseminación de las poblaciones de plásmidos, fue llevada en el pB50 formando el plásmido pB57 de 5.7 Kb, este pequeño vector se encuentra formado por la región esencial y el gen *tsr*, la frecuencia de transferencia encontrada en pB57 fue $<10^{-7}$ este valor es nuevamente muy cercano al cero de transferencia, lo sorprendente es que el valor esperado para este caso en particular debió de ser cero absoluto; ya que el plásmido pB57 carece del operón involucrado en la transferencia y en la diseminación de las poblaciones de plásmidos. Por lo que las pocas colonias que aparecieron en los medios de selección seguramente fueron colonias revertantes, estas colonias además de ser más pequeñas en comparación a las colonias normales, por alguna razón tienen la capacidad de revertir la mutación y pueden crecer en los medios de selección.

En el plásmido pB75, el dato obtenido sobre la frecuencia de transferencia fue 7.3×10^{-6} este valor es mayor al encontrado en las otras mutaciones realizadas en los genes *tra* de los plásmidos pB57, pB58 y pB59 ($< 10^{-7}$). El claro aumento que se presenta en la frecuencia de transferencia para este vector (pB75) posiblemente sea debido a una complementación de los productos formados por los genes *tra*. Como la mutación fue llevada al término del gen *traB* la mayor parte de la proteína TraB es sintetizada y su funcionalidad se encuentra complementada por el producto del gen *traA*, el cual sí se sintetiza completamente. El producto formado por el gen *traA* y la proteína TraB mutada en su parte final por la inserción del gen de *tsr*, provoca que se manifieste la transferencia, por pequeña que sea esta.

Con todo lo anterior podemos mencionar que los genes involucrados en la transferencia intermicelial del pJV1 son *traA* y *traB*, la ausencia de ambos provoca una baja en la transferencia del plásmido pJV1. Al parecer el gen más importante en la transferencia intermicelial del pJV1 es *traB*, por el dato obtenido en el plásmido pB75; aunque se encuentra funcional el producto del gen *traA* y se sintetiza la mayor parte de la proteína TraB, es claro que esta última debe ser sintetizada completamente para que la transferencia aumente al 100%. Por lo que el producto del gen *traA* solo complementa al producto del gen *traB*. Para apoyar un poco más estos fundamentos, lamentablemente no se pudo realizar una mutación sólo en el gen *traA*, para comprobar qué tan importante es su producto en la transferencia del pJV1.

Para que se pueda obtener una frecuencia de transferencia muy eficiente en los plásmidos con alto número de copias, los genes involucrados en la transferencia intermicelial del plásmido no

deben estar mutados, como sucedió con los plásmidos pJV1 y pB50. Reportes muy similares se han descrito para los plásmidos pIJ101 (Kendall y Cohen, 1988), pSN22 (Kataoka et al, 1991a), SCP2* (Brolle et al, 1993) y pSAM2 (Smokvina et al, 1991), en donde la frecuencia de transferencia encontrada fue de 100%.

Durante la cuantificación de las colonias presentes en las diferentes condiciones de selección presentes en la tabla II, para el plásmido pJV1 así como para los diferentes derivados del mismo, el número de colonias recuperado de la cepa TK54 fué mayor que el número de colonias encontrado para la cepa TK64, para lo cual fué necesario realizar una cruce al inverso empleando un plásmido que presenta una frecuencia de transferencia muy elevada, como lo es el pB50, con la finalidad de comprobar si la recuperación de un número mayor de colonias pertenecientes a la cepa TK54, es debido a la presencia del plásmido o a las características propias de la cepa de *Streptomyces lividans*. En la cruce inversa se encontró nuevamente un mayor número de colonias recuperado por parte de la cepa TK54 en las diferentes condiciones de selección, lo cual sugiere que esta cepa forma un mayor número de colonias que crecen y esporulan más rápido que las colonias formadas por la cepa TK64, la cual forma colonias que crecen y esporulan más lentamente. Los resultados demostraron que el mayor número de colonias encontrado de la cepa TK54, es debido a características particulares de la cepa. Por otra parte la frecuencia de transferencia obtenida en la cruce inversa con el pB50 fue 81%, este dato es similar al encontrado para el mismo plásmido en la cruce mencionada con anterioridad.

Como producto de las funciones de transferencia existen plásmidos en los *Streptomyces* que presentan la capacidad de movilizar genes presentes en el cromosoma de la célula donadora hacia la célula receptora del plásmido.

En cuanto a la frecuencia de recombinantes que refleja la capacidad del plásmido de movilizar al cromosoma (CMA), los datos se muestran en la tabla III. Para la determinación de esta característica se emplearon los fenotipos de las cepas de *Streptomyces lividans* mostrados en la tabla I, en donde la cepa TK64 es Prof⁻, Str^R, mientras que la cepa TK54 es Hist⁻, Leu⁻ y Spc^R.

La frecuencia de recombinantes obtenida para el control negativo es de cero ya que esta cruce no contiene ningún plásmido. Todos los datos sobre la frecuencia de recombinación fueron comparados con el control. Los datos obtenidos sobre la frecuencia de recombinación (CMA), para el plásmido pJV1 fue de 5.2×10^{-6} . Este valor es aproximadamente la mitad del encontrado

para el pB50 (11.6×10^{-6}), lo que refleja que ambos plásmidos presentan la capacidad de movilizar genes cromosómicos (*cma*), de la célula donadora (TK64) hacia la célula receptora (TK54) con eficiencia similar. Previos estudios mutacionales en las regiones de transferencia de los plásmidos pIJ101 (Kendall y Cohen, 1988), pSN22 (Kataoka et al, 1991a) y SCP2* (Brolle et al, 1993) demostraron que estos diferentes plásmidos presentan la habilidad de movilizar genes cromosómicos (*cma*).

El plásmido pB2, aunque presentó una frecuencia de transferencia disminuida unas 100 mil veces, en comparación a las frecuencias encontradas para los plásmidos pJV1 y pB50; el valor obtenido sobre la frecuencia de recombinantes fue 4.4×10^{-6} , el cual es muy similar al encontrado para los plásmidos pJV1 y pB50; por lo que la ausencia de los genes *spd* no afecta la capacidad del pB2 sobre la movilización de genes cromosómicos. Reportes muy similares han sido descritos para los plásmidos pIJ101 (Kendall y Cohen, 1988), pSN22 (Kataoka et al, 1991a) y SCP2* (Brolle et al, 1993) donde se mutagenizaron los genes *spd*. Al obtener las frecuencias de recombinantes de los plásmidos mutados y al compararlas con los plásmidos silvestres, esta no se encontraba afectada. En el plásmido pB53 la frecuencia de recombinación encontrada es 2.4×10^{-5} , este valor es mayor al encontrado en los plásmidos mencionados en la tabla III, por lo que de alguna manera la presencia de todo el sistema *spd* nos muestra un pequeño aumento del *cma*.

En el caso de los plásmidos pB57 y pB58 que presentan mutaciones en los genes *tra*, el dato obtenido sobre la frecuencia de recombinantes fue $<10^{-7}$ en ambos plásmidos. Mutaciones realizadas en los sistemas Tra de los plásmidos pIJ101 (Kendall y Cohen, 1988), pSN22 (Kataoka et al, 1991a) y SCP2* (Brolle et al, 1993) afectaron la capacidad de movilización del cromosoma, es decir estos plásmidos, al tener mutados los genes responsables de la transferencia primaria, no presentan la capacidad de movilización del cromosoma, por lo que los genes *tra* tienen dos funciones: se encuentran involucrados en la transferencia primaria y son esenciales para la movilización del cromosoma (*cma*). El valor obtenido para ambos plásmidos (pB57 y pB58) debió de dar cero ya que los genes involucrados en la movilización del cromosoma no existen, seguramente las pocas colonias que se encontraron en las cajas de selección de recombinantes fueron revertantes.

Como se aprecia el plásmido pB59 sí presenta *cma* (1.04×10^{-6}) aunque tiene mutados los genes *tra* en diferentes regiones, la síntesis de la mayor parte de los productos de los *traA*,

posiblemente son los responsables de la movilización del cromosoma. Lo mismo sucedió con el plásmido pB75 aunque tiene mutado el gen *traB* en su parte final, presenta un valor de 1.20×10^{-6} , la frecuencia de recombinación de este vector es mayor a la encontrada en pB59, la presencia de la proteína TraA y la mayor parte de la proteína TraB se encuentran involucradas en la movilización del cromosoma.

En los plásmidos de *Streptomyces* se ha identificado una característica fenotípica como producto de las funciones de transferencia, denominada zigosis letal o formación de "pocks". Se han identificado y caracterizado a través de estudios genéticos los genes responsables de esta función denominados genes *spd* responsables de la diseminación y formación de los "pocks". Este fenotipo ha sido observado en los plásmidos pIJ101 (Kendall y Cohen, 1988), pSN22 (Kataoka et al, 1991b; Kataoka et al, 1994a), SCP2* (Brolle et al, 1993) y en los plásmidos integrativos como el pSAM2 (Smokvina et al, 1991, Hagege et al, 1993b), en los cuales ya se han sido identificado los genes involucrados en la formación de los "pocks". En el caso de los plásmidos pJV1, pB50 y pB53 se observó la formación de "pocks", los cuales son visibles a simple vista, los "pocks" observados en estos plásmidos, son muy similares en tamaño, morfología y coloración. El plásmido pB2 no forma "pocks" ya que no presenta los genes *spd* los cuales están involucrados en la formación de "pocks".

En los plásmidos con alto número de copias de los *Streptomyces* se ha identificado un sistema de genes involucrado en la transferencia denominado Kil-Kor, en donde los genes *kil* desempeñan funciones específicas en la letalidad en ausencia del gen *kor* que forma la proteína represora de los *kil*. El fenotipo Kil-Kor ha sido identificado en los plásmidos: pIJ101 (Kendall y Cohen, 1987; Stein et al, 1989; Stein y Cohen, 1990; Tai y Cohen, 1993, 1994), pSN22 (Kataoka et al, 1994a). En el plásmido pJV1 se comprobó la presencia de los genes involucrados en dicho sistema, a través de mutaciones en las regiones Tra del pB50.

Los resultados demostraron que las cepas que adquirieron el plásmido pB50 mutado con *Bpu1102I*, se encontraron colonias crecidas en las cajas con medio de selección. La mayoría conservaban el sitio *Bpu1102I* y correspondían al plásmido silvestre, mientras que las que carecían del sitio *Bpu1102I* (y por lo tanto tenían mutaciones en *traR*) habían perdido parte de los genes *traA* y *traB* espontáneamente, sugiriendo que un plásmido con *traR* mutado y *traA* y *traB* normales no es viable.

El plásmido mutado de *EcoRI-Bpu1102I* (delección de los *tra*), las colonias encontradas en el medio, pudieron hacerlo ya que sus plásmidos que adquirieron carecen de los genes responsables del fenotipo Kil. Aunque estos plásmidos presentan un frecuencia de transferencia sumamente baja, las células que los adquieren presentan la capacidad de crecer.

En el caso de la mutación del pB50 digerido con *Bpu1102I-ScaI* la eficiencia de transformación de estas colonias fue sumamente baja. Con esta mutación se deletó el gen *traR* dejando los 2 genes *tra* (*traA* y *traB*) que al parecer son los genes involucrados en la manifestación del fenotipo Kil. Esta baja en la frecuencia de transformación fue debida a la ausencia del gen *traR* (*kor*, que sintetiza la proteína reguladora de la expresión de los genes *kil*), de tal manera que la mayor parte de las colonias transformantes murieron por el plásmido que obtuvieron. Resultados muy similares han sido demostrados en los vectores que carecen del gen *kor*, solo que en la eficiencia de colonias transformantes no obtuvieron colonias en el medio, mientras que en el pB50 sí se encontraron algunas, lo cual podría deberse a una serie de rearrreglos que sufrió el plásmido, es decir que las colonias observadas contenían plásmidos sin el gen *kor* pero además perdieron ciertas porciones de los genes *kil*, lo cual permitió la sobrevivencia de colonias que no presentan genes *kor*, pero tampoco genes *kil*.

Esto fue confirmado por digestiones realizadas sobre las pocas colonias que aparecieron en el medio, los patrones de restricción se muestran en las fotografías de los plásmidos.

Con todo lo anterior, podemos mencionar que los genes involucrados en la expresión del fenotipo Kil-Kor presentes en el pJV1 son: *traA* y *traB* (*kiIA* y *kiIB*), mientras que el gen *traR* (*kor*); el mismo patrón de genes fue encontrado en el plásmido pSN22 por Kataoka et al, (1991a).

La regulación de los genes *tra* del pJV1 y pSN22, es muy similar al que se presenta en los genes *tra* del plásmido pIJ101. La función del producto del gen *traR* en los plásmidos pJV1 y pSN22, es muy probablemente la misma a la del KorA en el pIJ101, en donde su funcionalidad es autorepresora y represor del operón Tra. En el plásmido pSN22 son *traA*, *traB*, *spdA*, *spdB* (*spdB1*, *spdB2*, *spdB3* y *spdB4*), por Kataoka et al, (1994a); en el pIJ101 son *tra*, *spdA* y *spdB*, por Kendall y Cohen, (1988), finalmente en el pJV1 son *traA*, *traB*, *spd* (*spdI*, *spdII*, *spdIII* y *spdIV*). No se ha encontrado en el pJV1 al igual que en el pSN22, el segundo sistema Kil-Kor analogo a los genes (*kiIB* y *korB*) del pIJ101 (Tai y Cohen, 1994).

CONCLUSIONES.

1. Se identificaron y analizaron los genes responsables de los mecanismos de transferencia, movilización cromosómica (cma), diseminación, formación de "pocks" y el sistema Kil-Kor del plásmido pJV1 de *Streptomyces phaeochromogenes*.
2. Los plásmidos derivados del pJV1 fueron clonados sin ningún problema, en las cepas de *Streptomyces lividans*.
3. Los genes responsables de la transferencia primaria o intermicelial, así como encargados de la movilización de genes cromosómicos presentes en el pJV1 son: *traA* y *traB*.
4. Los genes responsables de la transferencia secundaria o intramicelio (diseminación), así como encargados de la formación de los "pocks" en el pJV1 son: los *spread* (*spdI*, *spdII*, *spdIII* y *spdIV*). Este sistema de genes es muy similar al que se presenta en el plásmido pSN22. Curiosamente el pJV1 carece de un *spd* presente en el plásmido pSN22 (*spdA*).
5. Al igual que otros plásmidos con alto número de copias, entre los que destacan el pIJ101 y pSN22, el pJV1 presenta una frecuencia de transferencia muy eficiente (100%).
6. La presencia de mutaciones (delecciones e inserciones) en las regiones codificadoras de los genes responsables de la transferencia del pJV1 afectan la transferencia y la movilización de genes cromosómicos (cma).
7. La carencia de los genes *spd* (responsables de la diseminación del plásmido a lo largo del micelio receptor) en el pB2 afecta la frecuencia de transferencia disminuyéndola hasta unas 100,000 veces, sin afectar la capacidad de movilización del cromosoma (cma). Mientras que en el pB53, la transferencia aumentó hasta un 52% al reintegrar los genes *spd*.
8. La presencia de mutaciones en los genes *spd* del pJV1 afectan la formación de los "pocks", pero no alteran la capacidad de movilización del cromosoma (cma); datos muy similares han sido reportados en los plásmidos: SCP2*, pIJ101 y pSN22.
9. Los genes responsables de la manifestación del fenotipo Kil-Kor presentes en el pJV1 son: *kilA* (*traA*) y *kilB* (*traB*), estos genes son seguramente regulados por el producto del gen *traR* (Kor), ya que ninguna célula es capaz de sobrevivir en ausencia del represor de los *kil* si éstos están presentes. Datos muy similares han sido reportados en los plásmidos pSN22 y pIJ101, por Kataoka et al, (1994) y Cohen et al, (1989).

10. Debido al parecido significativo del patrón de genes que determinan la replicación, transferencia, diseminación, formación de "pocks", *cma* y la manifestación del fenotipo Kil-Kor, en los plásmidos pJV1, pSN22 y pIJ101, se ha propuesto que estos plásmidos presentan una organización modular.

BIBLIOGRAFIA.

1. Bailey, C.R., Bruton, C.J., Butler, M.J., Chater, K.F., Harris, J.E., and Hopwood, D.A. (1986). Properties of in vitro recombinant derivatives of pJV1, multi-copy plasmid from *Streptomyces phaeochromogenes*. *J. Gen. Microbiology*. 132:2071-2078
2. Bibb, M.J., Freman, R.F., and Hopwood, D.A. (1977). Physical and genetic characterisation of a second sex factor SCP2, for *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Gen. Genet.* 154:155-166
3. Bibb, M.J., and Hopwood, D.A. (1981). Genetic studies of the fertility plasmid SLP2 and its SLP2* variants in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* 126:427-442
4. Bibb, M.J., Schotlel, J.L., and Cohen, S.N. (1980). A DNA cloning system for interspecies gene transfer in a antibiotic-producing *Streptomyces*. *Nature*. 284:526-531
5. Bibb, M.J., Ward, J.M., and Hopwood, D.A. (1978). Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. *Nature*. 274:398-400
6. Bocard, F., Pernodet, J.L., Friedmann, A., and Guérineau, M. (1988). Site-specific integration of plasmid pSAM2 in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces ambofaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 212:432-439
7. Bocard, F., Smokvina, T., Pernodet, J.L., Friedman, A., and Guérineau, M. (1989a). Structural Analysis of loci involved in pSAM2 site-specific integration in *Streptomyces*. *Plasmid*. 21:59-70
8. Bocard, F., Smokvina, T., Pernodet, J.L., Friedman, A., and Guérineau, M. (1989b). The integrated conjugative plasmid pSAM2 of *Streptomyces ambofaciens* is related to temperate bacteriophages. *EMBO J.* 8:973-980
9. Brasch, M.A., Pettis, G.S., Lee, S.C., Cohen, S.N. (1993). Localization and Nucleotide Sequences of Genes Mediating Site-Specific Recombination of the SLP1 Element in *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology*. 175: 3067-3074
10. Brennan, R.G., and Matthews, B.W. (1989). The helix-turn-helix DNA-Binding motifs. *J. Biol. Chem.* 264:1903-1906
11. Brolle, D.F., Pape, H., Hopwood, D.A., and Kieser, T. (1993). Analysis of the transfer region of the *Streptomyces* plasmid SCP2*. *Molecular Microbiology*. 10:157-170
12. Chater, K.F. (1984). Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. *Microbiological Development*. 89
13. Chater, K.F. (1989). Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. *Science*. 5:372-377.
14. Chen, C.W., Lin, Y.S., Kieser, H.M., and Hopwood, D.A. (1993b). The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 appears to be linear. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 17:291-297
15. Chen, C.W., Yu, T.W., Lin, Y.S., Kieser, H.M., and Hopwood, D.A. (1993a). The conjugative plasmid SLP2 of *Streptomyces lividans* is a 50kb linear molecule. *Molecular Microbiology*. 7:925-932
16. Clewell, D.B. (1993). *Bacterial Conjugation*. Plenum Press. N.Y. 293-308.

17. de la Campana, A.G., Puyet, A., and Espinosa, M. (1990). Illegitimate recombination occurs between the replication origin of plasmid pC194 and a progressing replication fork. *J.Mol.Biol.* 213:247-262
18. del Solar, G., Moscoso, M., and Espinosa, M. (1993). Rolling circle-replication plasmids from Gram-positive and Gram-negative bacteria: a wall fall. *Molecular Microbiology*. 8:789-796
19. del Solar, G., Puyet, A., and Espinosa, M. 1987. Initiation signals for the conversion of single stranded to double stranded DNA forms in the Streptococcal plasmid PLS1. *Nucleic Acids.Res.* 15: 5561-5580
20. Deng, Z., Kieser, T., and Hopwood, D.A. (1988). "Strong incompatibility" between derivatives of the *Streptomyces* multi-copy plasmid pIJ101. *Mol.Gen.Genet.* 214:286-294
21. Doull, J.L., Vining, L.C., and Stuttard, C. (1983). A cryptic plasmid in the chloramphenicol-producing actinomycete, *Streptomyces phaeochromogenes*. *FEMS Microbiology Letters*. 16:349-352
22. Gruss, A., and Ehrlich, S.D. (1989). The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids. *Microbiol.Rev.* 53:231-241
23. Gusek, W.T and Kinsella, J.E. (1992). Review of the *Streptomyces lividans*/Vector pIJ702 System for Gene cloning. *Critical Reviews in Microbiology*. 18:247-260
24. Hagège, J., Pernodet, J.L., Friedmann, A., and Guérineau, M. (1993a). Mode and origin of replication of pSAM2, a conjugative integrating element of *Streptomyces ambofaciens*. *Molecular Microbiology*. 10:794-812
25. Hagège, J., Pernodet, J.L., Sezonov, G., Gerbaud, C., Friedmann, A., and Guérineau, M. (1993b). Transfer functions of the conjugative integrating element pSAM2 from *Streptomyces ambofaciens*: Characterization of a Kil-Kor system associated with transfer. *Journal of Bacteriology*. 175:5529-5538
26. Hayakawa, T., Otake, N., Yonehara, H., Tanaka, T., and Sakaguchi, T. (1979a). Isolation and Characterization of plasmids from *Streptomyces*. *Journal Antibiotic*. 32:1348-1350.
27. Hayakawa, T., Tanaka, T., Sakaguchi, K., Otake, N., and Yonehara, H. (1979b). A linear plasmid-like DNA in *Streptomyces* sp. Producing lankasidin group antibiotics. *J.Gen.Appl.Microbiol.* 25:255-260
28. Holloway, B.W. (1979). Plasmids That Mobilize Bacterial Chromosome. *Plasmid*. 2:1-19
29. Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiat, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., and Schrepf, H. (1985). *Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual*. Norwich: John Innes Foundation.
30. Hopwood, D.A., Hintermann, G., Kieser, T., and Wright, H.M. (1984). Integrated DNA sequences in three *Streptomyces* form related autonomous plasmids after transfer to *Streptomyces lividans*. *Plasmid*. 11:1-16
31. Hopwood, D.A and Kieser, T. (1993). *Bacterial Conjugation*. Clewell, B. Plenum Press, N.Y. 293-310.

32. Hopwood, D.A., Kieser, T., Lydiate, D.J., and Bibb, M.J. (1986). Streptomyces plasmids: Their biology and use as cloning vectors. In "The Bacteria: A Treatise on Structure and Function" (S.W. Queener, and L.E. DAY, Eds) 9:159-220. Academic Press, Orlando, F.C.
33. Hopwood, D.A., Kieser, T., Wright, H.M., and Bibb, M.J. (1983). Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66. *Journal of General Microbiology*. 129:2257-2269
34. Hopwood, D.A., Thompson, C.J., Ward, J.M., Kieser, T., and Wright, H.M. (1981). Progress in the development of plasmid cloning vectors for *Streptomyces*. In: Schlesinger, D. (ed). *Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington DC. 376-379
35. Hopwood, D.A., and Wright, H.M. (1973). Transfer of a plasmid between *Streptomyces* species. *Journal. Gen. Microbiology*. 77:187-195
36. Kataoka, M., Kiyose, Y.M., Michisui, Y., Horiguchi, T., Seki, T., and Yoshida, T. (1994). Complete Nucleotide Sequence of the *Streptomyces nigrifaciens* plasmid, pSN22: Genetic Organization and Correlation with Genetic properties. *Plasmid*. 32:55-69
37. Kataoka, M., Kuno, N., Horiguchi, T., Seki, T., and Yoshida, T. (1994). Replication of the *Streptomyces* plasmid pSN22 through single-stranded intermediates. *Mol. Gen. Genet.* 242:130-136
38. Kataoka, M., Seki, T., and Yoshida, T. (1991). Five Genes Involved in Self-Transmission of pSN22, a *Streptomyces* plasmid. *Journal of Bacteriology*. 173:4220-4228
39. Kataoka, M., Seki, Y., and Yoshida, T. (1991b). Regulation and Function of the *Streptomyces* plasmid pSN22 Genes Involved in Pock Formation and Inviability. *Journal of Bacteriology*. 173:7975-7981
40. Kendall, K.J., and Cohen, S.N. (1987). Plasmid Transfer in *Streptomyces lividans*: Identification of a Kil-Kor System Associated with the Transfer Region of pIJ101. *Journal of Bacteriology*. 169:4177-4183
41. Kendall, K.J., and Cohen, S.N. (1988). Complete Nucleotide Sequence of the *Streptomyces lividans* Plasmid pIJ101 and Correlation of the Sequence With Genetic Properties. *Journal of Bacteriology*. 170:4634-4651
42. Kieser, T., Hopwood, D.A., Wright, H.M., and Thomson, C.J. (1982). pIJ101, a multi-copy broad host range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectors. *Molecular and General Genetic*. 185:223-228
43. Kinashi, H., and Murayama, S.M. (1991). Physical Characterization of SCP1, a Giant Linear Plasmid from *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*. 173:1523-1529
44. Kinashi, H., Murayama, S.M., and Hanafusa, T. (1991). Nucleotide sequence analysis of the unusually long terminal inverted repeats of a giant linear plasmid, SCP1. *Plasmid*. 26:123-130
45. Kinashi, H., Murayama, S.M., and Hanafusa, T. (1992). Integration of SCP1, a giant linear plasmid, into the *Streptomyces coelicolor* Chromosome. *Gene*. 115:35-41
46. Kinashi, H., Shimaji, M., and Sakai, A. (1987). Giant linear plasmids in *Streptomyces* which code for antibiotic biosynthesis genes. *Nature*. 328:454-456

47. Koepsel, R., Murray, R., Rosenblum, W., and Khan, S. (1985). The replication initiator protein of plasmid pT181 has sequence-specific endonuclease and topoisomerase-like activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:6845-6849
48. Lin, Y.S., Kieser, M.H., Hopwood, D.A., and Chen, C.W. (1993). The Chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Molecular Microbiology.* 10:923-933
49. Lydiate, D.J., and Hopwood, D.A. (1981). Genetics studies of the fertility plasmid SCP2 and its SCP2* variant in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* 126:427-442
50. Lydiate, D.J., Malpartida, F., and Hopwood, A.D. (1985). The *Streptomyces* plasmid SCP2*: its functional analysis and development into useful cloning vectors. *Gene.* 35:223-235
51. Murakami, T., Nojiri, C.H., Toyama, H., Hayashi, E., Yamada, Y., and Nagaoka, K. (1983). Pock forming plasmids from antibiotic-producing *Streptomyces*. *Journal of antibiotic.* 36:429-434
52. Ning Tai, T.S., and Cohen, N.S. (1993). The Active form of the KorB protein Encoded by the *Streptomyces* plasmid pIJ101 Is a processed product That Binds Differentially to the Two Promoters It Regulates. *Journal of Bacteriology.* 175:6996-7005
53. Novick, R. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* 51:381-395
54. Novick, R. (1989). Host-plasmid interactions affecting plasmid replication and maintenance in Gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiological.* 43:537-565
55. Omer, Ch.A., and Cohen, S.N. (1984). Plasmid formation in *Streptomyces*: Excision and integration of the SLP1 replicon at a specific chromosomal site. *Mol. Gen. Genet.* 196:429-438
56. Omer, Ch.A., and Cohen, N.S. (1986). Structural Analysis of plasmid and Chromosomal Loci Involved in Site-Specific Excision and Integration of the SLP1 Element of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology.* 166:999-1006
57. Okanishi, M., and Manome, T. (1980). Isolation and characterization of plasmid DNAs in actinomycetes. *Journal of antibiotics.* 33:88-91
58. Okanishi, M., Manome, T., and Umezawa, H. (1980). Isolation and characterization of plasmid DNAs in Actinomycetes. *J. Antibiotic.* 33:88-91
59. Pernodet, J.L., Simonet, J.M., and Guérineau, M. (1984). Plasmids in different strains of *Streptomyces ambofaciens*: free and integrated form of plasmid pSAM2. *Mol. Gen. Genet.* 198:35-41
60. Servin, L.G. (1993). Relationship between the Replication Functions of *Streptomyces* Plasmids pJV1 and pIJ101. *Plasmid.* 30:131-140.
61. Servin et al, (1994). Aun no publicado.
62. Shauer, A., Ranes, M., Santamaria, R., Gujjarro, J., Lawlor, E., Mendez, C., Chater, K., and Losic, R.K. (1987). Visualizing Gene Expression in Time and Space in the Filamentous Bacterium *Streptomyces coelicolor*. *Science.* 240:762-766
63. Smokvina, T., Boccard, F., Pernodet, L.J., Friedmann, A., and Guérineau, M. (1991). Functional Analysis of the *Streptomyces ambofaciens* Element pSAM2. *Plasmid.* 25:40-52

64. Stein, D.S., and Cohen, N.S. (1990). Mutational and functional analysis of the *korA* and *korB* gene products of *Streptomyces* plasmid pIJ101. *Mol Gen Genet.* 222:337-344
65. Stein, D.S., Kendall, K.J., and Cohen, S.N. (1989). Identification and Analysis of Transcriptional Regulatory Signals for the *Kil* and *Kor* Loci of *Streptomyces* plasmid pIJ101. *Journal of Bacteriology.* 171:5768-5775
66. Tai, T.J., and Cohen, N.S. (1993). The Active Form of the *korB* Protein Encoded by the *Streptomyces* Plasmid pIJ101 Is a Processed Product That Binds Differentially to the Two Promoters It Regulates. *Journal of Bacteriology.* 175:6696-7005
67. Tai, J.T., and Cohen, S.N. (1994). Mutations that affect regulation of the *korB* gene of *Streptomyces lividans* plasmid pIJ101 alter plasmid transmission. *Molecular Microbiology.* 12:31-39
68. Thomas, C.D., Projan, S., Kumar, C., and Carleton, S. (1990). Replication control for pT181, an indirectly regulated plasmid. *J. Biol. Chem.* 265:5519-5530
69. Thompson, C.J., Ward, J.M., and Hopwood, D.A. (1980). DNA cloning in *Streptomyces*: resistance genes from antibiotic-producing species. *Nature.* 286:525-527
70. Ward, J.M., Janssen, G.R., Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., and Bibb, M.J. (1986). Construction and characterisation of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as iniciador. *Mol. Gen. Genet.* 203:468-478
71. Wright, L.F., and Hopwood, D.A. (1976). Identification of the Antibiotic Determined by the SCP1 Plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology.* 95:96-106
72. Wu, X., and Roy, K.L. (1993). Complete Nucleotide Sequence of a Linear Plasmid from *Streptomyces clavuligerus* and Characterization of Its RNA Transcripts. *Journal of Bacteriology.* 175:37-52
73. Zaman, S., Radnedge, L., Richards, H., and Ward, J.M. (1993). Analysis of the site for second-strand initiation during replication of the *Streptomyces* Plasmid pIJ101. *Journal of General Microbiology.* 139:669-676
74. Zotchev, S.B., and Schrempf, H. (1994). The Linear *Streptomyces* plasmid pBL1: analyses of transfer functions. *Mol. Gen Genet.* 242:374-382
75. Zotchev, S.B., Saldatova, I.L., Orekhov, V.A., and Schrempf, H. (1992). Characterization of a linear extrachromosomal DNA element (pBL1) isolated after inter-specific mating between *Streptomyces bambergiensis* and *Streptomyces lividans*. *Res. Microbiol.* 143:839-845