

2es



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

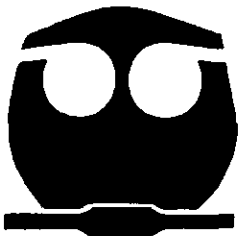
FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

CONSTRUCCION DE VECTORES DE CLONACION

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
GEORGINA HERNANDEZ MONTES



MEXICO, D. F.

1999

280264

TESIS CON 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 AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE CLONACIÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

GEORGINA HERNÁNDEZ MONTES

**ASESORES: DR. MIGUEL ANGEL CEVALLOS GAOS
M. EN IBB. JUAN MAURICIO TÉLLEZ SOSA**

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof.	MARISOL LOPEZ LOPEZ
Vocal	Prof.	ALICIA CERVANTES PEREDO
Secretario	Prof.	MIGUEL ANGEL CEVALLOS GAOS
1er Suplente	Prof.	ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES
2o Suplente	Prof.	MARIA EUGENIA TORRES MÁRQUEZ

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno

Asesor del tema



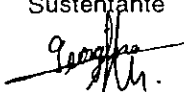
Dr. MIGUEL ANGEL CEVALLOS GAOS

Supervisor técnico



M.en IBB. JUAN MAURICIO TÉLLEZ SOSA

Sustentante



GEORGINA HERNÁNDEZ MONTES

Este trabajo fue desarrollado bajo la dirección del Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos y la asesoría del M en IBB Juan Mauricio Téllez Sosa en el laboratorio III dentro del Programa de Evolución Molecular del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México

A mi papá por ser un ejemplo de fuerza, constancia y creatividad

a mi mamá por su infinito amor, su apoyo y su fortaleza,

a mis hermanos Aarpar, Fer y Mary por enseñarme el valor de la familia y por su cariño

a mis amigos Juan y Verónica por su amistad incondicional, por estar siempre ahí

gracias a todos por su amor, su confianza y por compartir conmigo esta maravillosa aventura que es la vida.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer a MAC por permitir que me integrara a su grupo de trabajo y por asesorarme en esta etapa de mi formación.

Este trabajo se pudo lograr gracias a la colaboración y amistad de mis compañeros de laboratorio: Nora, Angie, Lupita, Vero, Angeles, José, Charly, Vic, Gama y muy especialmente a Javier y Miguel por revisar mi trabajo, por su ayuda y por su apoyo.

Quiero agradecer especialmente a Juanito por aceptar el reto de asesorarme, por sus consejos, su gran paciencia, su amistad así como por compartir conmigo un poco de su manera de hacer y ver la ciencia.

A todas las personas que de una u otra forma me facilitaron amablemente el proceso administrativo, también quiero agradecer a Marisol y Alicia por sus atinadas observaciones acerca de mi trabajo.

También quiero agradecer a los escolapios por apoyarme siempre y por su amistad a pesar del tiempo y la distancia: Ale, Baci, Estela, Yadis, Andrés, Tavo, Hugo, Mis y Edgar. También a Jessica y Rodolfo por su amistad durante la carrera. Así mismo quiero agradecer a Victor Ugalde por su amistad y por ser un buen ejemplo como profesor y como persona.

Quiero agradecer profundamente a la UNAM por abrirme las puertas al mundo de la ciencia y la cultura. Muy especialmente agradezco a mi querida Facultad de Química y al CIFN por permitirme hacer lo que mas me gusta.

*Un problema que vale la pena resolver seguramente,
exigirá semanas y meses sin ningún progreso,
altibajos entre la esperanza y la mas negra sensación de desesperación.*

Judson

INDICE

Antecedentes.....	1
Mecanismos de replicación plasmídica.....	2
Regulación de la replicación plasmídica.....	2
Segregación y partición de los plásmidos.....	5
Los plásmidos y la evolución bacteriana.....	6
Información codificada en plásmidos.....	8
Los plásmidos como herramientas.....	8
Grupo IncP.....	10
Grupo IncQ.....	11
Planteamiento del problema.....	15
Objetivos.....	16
Metodología.....	17
Cepas bacterianas y plásmidos.....	17
Conjugación bacteriana.....	20
Preparación de células competentes.....	20
Transformación de células competentes.....	21
Purificación de DNA genómico.....	21
Purificación de DNA plasmídico.....	21
Reacciones de restricción y ligación.....	21
PCR de colonia.....	23
Reacción pk.....	24
Resultados.....	25
Discusión y conclusiones.....	32
Figuras.....	37
Medios y soluciones.....	48
Bibliografía.....	50

ANTECEDENTES

En un gran número de especies bacterianas se han encontrado elementos genéticos extracromosómicos que pueden replicar autónomamente y a los cuales se les ha llamado plásmidos.

Los plásmidos generalmente son circulares, aunque también existen plásmidos lineales en diferentes especies bacterianas como *Borrelia*, *Streptomyces*, *Thiobacillus*, *Rhodococcus* y hasta en *Escherichia coli*. El tamaño puede variar desde unas cuantas kilobases como el RSF1010 que mide 8.9 kb, hasta los megaplásmidos de *Rhizobium meliloti* de 1.7 y 1.4 megabases (Mb) (Honeycutt *et al.*, 1993; Margolin y Long, 1993) que incluso llegan a ser del tamaño del genoma de otras bacterias, por ejemplo el genoma de *Haemophilus influenzae* mide 1.8 Mb (Fleischmann, *et al.*, 1993) o el de *Mycoplasma genitalum* que mide 0.58 Mb (Fraser, *et al.*, 1995).

Antiguamente se creía que los plásmidos codificaban para características que pueden ser opcionales en el sentido de que únicamente incrementan la capacidad de su hospedero para adaptarse a un medio ambiente específico, como por ejemplo, la resistencia a antibióticos o la capacidad para metabolizar compuestos aromáticos. Sin embargo, desde hace algunos años se ha descubierto que los plásmidos pueden codificar funciones esenciales ya que al intentar "curar" el plásmido, el hospedero no logra sobrevivir en las condiciones en las cuales originalmente lo hacía.

Ahora bien, para que el plásmido pueda llevar a cabo sus funciones es necesario que se replique y que se herede. La replicación es el proceso mediante el cual una molécula de DNA de doble cadena se duplica idénticamente.

La replicación autónoma es una característica fundamental de los plásmidos, sin embargo, no son del todo independientes ya que necesitan que su hospedero le provea de ciertas proteínas que en algunos casos pueden ser la DNA polimerasa, la DNA girasa, la DNA ligasa, la DNA primasa o DNA helicasa, además de que deben sincronizar su replicación con el crecimiento y la división celular de su hospedero.

La replicación plasmídica puede ser potencialmente regulada a diferentes niveles: a nivel de inicio de la replicación, de elongación o de terminación de la síntesis de DNA; pero se tiene evidencia que el control actúa principalmente sobre la iniciación y específicamente sobre el inicio de la síntesis de la cadena líder.

En la mayoría de los plásmidos, las funciones que confieren la capacidad de mantenerse autónomamente están agrupadas dentro de una región de 1 a 3 kilobases (kb) conocida como replicón básico (Summer, 1996), aunque también existen otros plásmidos como los de *Rhizobium* que pueden tener un replicón básico hasta de 5 kb.

La replicación inicia en un sitio conocido como el origen (*ori*) que se define como la posición en la cuál la primera desoxirribosa se adiciona a la cadena líder del primero de RNA. La mayoría de los plásmidos tienen un solo origen, sin embargo, también existen plásmidos que contienen orígenes múltiples, aunque la mayoría de las veces solamente uno es activo *in vivo*. No se sabe exactamente la razón de contener múltiples orígenes pero se sugiere que orígenes secundarios pudieran ser usados en hospederos exóticos o bien para incrementar su rango de huésped (Brook 1993).

MECANISMOS DE REPLICACIÓN PLASMÍDICA

Para la replicación de los plásmidos se proponen dos mecanismos generales que son:

- Replicación Teta.- En este modelo se postula que las dos cadenas de DNA se abren en la región *ori* creando una estructura como la letra griega θ . En este mecanismo un primero de RNA inicia la replicación la cual puede ser en una o ambas direcciones alrededor del plásmido; en el primer caso, la horquilla de replicación se mueve alrededor del plásmido hasta regresar al origen, mientras que en el segundo las dos horquillas se mueven una en dirección contraria a la otra hasta completar la replicación. Este mecanismo lo emplean los plásmidos como el RK2, F, P1 y los del tipo ColE1 (monodireccionales), así como para los cromosomas bacterianos (bidireccionales), (Summer, D.K. 1996).

- Replicación por círculo rodante.- En este mecanismo una cadena se corta en la región del *ori* y el extremo 3' OH libre sirve como primero para iniciar la replicación, la cadena desplazada puede servir como molde para otra molécula de DNA de doble cadena. Esta replicación procede alrededor del círculo. Entre los plásmidos que replican de esta forma se incluyen el pUB110, el pC194 y pIJ101 (Espinoza *et al.*, 1995).

Los plásmidos mantienen un número constante de copias bajo condiciones definidas de crecimiento. Basado en su número de copias un plásmido puede clasificarse como estricto o de bajo número de copias (de 1 a 2 copias por célula) tal es el caso del plásmido F; y como relajado o de alto número de copias (de 10 a 110 copias por célula) como el plásmido pBR322 (16 copias) o el pIJ101 (de 40 a 300 copias por célula). El número de copias va a depender de la regulación de la replicación, que se ejerza sobre dicho plásmido (Summer 1996).

REGULACIÓN DE LA REPLICACIÓN

Existen varias formas de regulación que se han encontrado en diversos plásmidos y a continuación mencionaré los más representativos.

Regulación de la replicación por RNA: plásmidos derivados del ColE1.

En este modelo la replicación se regula por pequeños RNA's codificados por el plásmido. Este mecanismo está basado en la síntesis y procesamiento del primero de RNAII el cual mide aproximadamente 700 pares de bases (pb) y se encuentra a 555 pb río arriba del *ori*. El primero de RNAII forma un híbrido con la cadena de DNA molde alrededor del *ori* en un proceso llamado acoplamiento. Una vez que el RNAII se acopla, se corta por una RnasaH en el *ori*, liberando un extremo 3'OH que sirve como primero para la síntesis de DNA, catalizada por la enzima PolII y luego por la enzima DNA polimerasa III (PolIII). (Snyder and Champness 1997).

Ahora bien, dentro del gene para la RNAII también esta codificada una pequeña molécula de RNA que se transcribe en dirección opuesta y a la que se le denomina RNAI. Esta molécula es complementaria al RNAII y por lo mismo pueden aparearse formando una doble hélice, la cual interfiere con el procesamiento del RNAII y por ende con la replicación. (Snyder and Champness 1997).

Adicionalmente, el plásmido tiene un gene que codifica para una proteína conocida como Rop que ayuda a mejorar el apareamiento entre RNAI y RNAII. En la figura 1 se muestra el modelo propuesto para este tipo de replicación. (Snyder and Champness 1997)

Regulación de la replicación por iterones

Se ha visto que plásmidos tales como el pSC101, el RK2, R6K, P1, F o el R1 muestran características comunes en sus orígenes de replicación. Básicamente todos ellos contienen una región rica en A-T y algunas secuencias de DNA repetidas en forma directa o inversa entre si, conocidas como iterones de las cuales se deriva este nombre. Los iterones son típicamente de 17 a 22 pb de largo (Lewis and Helinsky, 1993) y existen entre 3 a 7 copias en la región *ori*. (Snyder and Champness 1997).

Un ejemplo para ilustrar el modelo de regulación por iterones es el del plásmido pSC101, que contiene en su región de origen un gene *repA* el cual codifica para la proteína RepA que se requiere para iniciar la replicación y tres iterones R1, R2 y R3 a través de los cuales RepA regula el número de copias. Esta proteína sirve como un activador positivo de la regulación, mientras el hospedero le proporciona otras proteínas esenciales para la replicación. (Snyder and Champness 1997).

La regulación por iterones actúa por dos mecanismos generales. En uno de ellos RepA interactúa con los iterones de la región del origen favoreciendo la apertura de la doble cadena en la

región rica en A-T y por otro lado reprime su propia síntesis al unirse a su región promotora, reprimiendo de esta manera la transcripción de su gene. Así al haber una mayor cantidad de plásmidos, la cantidad de proteína RepA también aumenta y en consecuencia hay mayor posibilidad de que la replicación se vea disminuida.(Snyder and Champness 1997)

En el segundo mecanismo, llamado "esposamiento", los iterones de las otras copias del plásmido se asocian entre sí ayudados por RepA y previniendo así su replicación, teniendo como consecuencia una disminución en su número de copias. En la figura 2 se muestra un modelo para este tipo de regulación.(Snyder and Champness 1997)

Regulación de la replicación por RNA y proteína: plásmido R1

La regulación de la replicación del grupo IncFII (ver más adelante grupos de incompatibilidad) de los cuales el R1 es un buen representante se regulan por RNA pero sólo de manera indirecta.(Snyder and Champness 1997)

El plásmido R1 tiene un gene que codifica para una proteína de inicio de la replicación llamada RepA. El gene *repA* puede ser regulado a partir de 2 promotores, uno de esos promotores llamado p_{copB} , transcribe el gene *repA* y *copB* haciendo un mRNA que puede ser traducido a las proteínas RepA y CopB; el otro promotor, p_{repA} , está dentro del gene *copB* y codifica sólo para la proteína RepA. Como el promotor p_{repA} se reprime por CopB, éste se transcribe inmediatamente después de que el plásmido entra a la célula y antes de que una proteína CopB sea sintetizada. La cantidad sintetizada de RepA sirve para llegar a su número de copias, posteriormente el promotor p_{repA} , se reprime y el gene *repA* sólo puede ser expresado por el promotor p_{copB} .(Snyder and Champness 1997)

Una vez que el plásmido ha alcanzado su número de copias, la regulación de la síntesis de RepA y quizá la replicación del plásmido se regula por un RNA llamado CopA. Este RNA afecta la estabilidad del mRNA de p_{copB} ya que se aparea con este, debido a que tienen bases complementarias. La RNAlII reconoce este complejo formado por las dos cadenas de RNA y las hidroliza. La desestabilización del RNA mensajero por CopA asegura que la replicación del plásmido R1 depende de la concentración de este RNA. En la figura 3 se ilustra el mecanismos de este tipo de regulación.(Snyder and Champness 1997)

SEGREGACIÓN Y PARTICIÓN DE LOS PLÁSMIDOS

Una vez resuelto el problema de copiar el material genético es necesario que este material se distribuya entre toda la descendencia para que pueda preservarse, pues no basta con que un plásmido pueda replicar eficientemente para que toda la descendencia pueda tener por lo menos una copia del material genético. También es necesario llevar a cabo otros procesos como una distribución adecuada en cada célula hija (segregación). Esta distribución puede ser de dos formas:

-Partición activa.- Este modelo de partición se propone para plásmidos de bajo número de copias e implica la existencia de una maquinaria celular de partición. Este mecanismo puede ser por equipartición que involucra la distribución de exactamente la mitad de las moléculas plasmídicas en cada célula (de hecho se propone como un modelo análogo a la mitosis en células eucariontes).

-Distribución pasiva o aleatoria.- Como su nombre lo indica los plásmidos se distribuyen al azar en las células hijas y es por ello que este modelo se propone para plásmidos de alto número de copias para que por probabilidad le corresponda por lo menos una copia a cada célula.(Summer, 1996).

INCOMPATIBILIDAD

Muchas bacterias tienen más de un tipo de plásmidos, estos pueden coexistir establemente dentro de la célula y permanecer así durante muchas generaciones. Sin embargo, no todos los tipos de plásmidos pueden coexistir juntos dentro de un mismo hospedero y esto se debe básicamente a que interfieren unos con otros en los mecanismos de replicación o partición.

La incapacidad que tienen 2 o más replicones para ser heredados establemente dentro de una misma línea celular en ausencia de presión selectiva se conoce como incompatibilidad y se dice que ambos pertenecen a un mismo grupo de incompatibilidad.

Esta propiedad se ha utilizado para clasificar a los plásmidos y por eso se habla de grupos o familias de incompatibilidad Inc (Novick, 1987). Cada grupo se designa por una letra del alfabeto y algunos grupos se subdividen poniendo un número o una letra griega como IncFI, IncFII o IncI α .

LOS PLÁSMIDOS Y LA EVOLUCIÓN BACTERIANA

Los plásmidos juegan un papel crucial en la evolución bacteriana ya que proveen un gran reservorio de información genética, la cual es accesible casi a cualquier especie bacteriana en cualquier hábitat. La transferencia de estos plásmidos puede ser por tres caminos: pasivamente por transformación o transducción y activamente por medio de conjugación. En seguida describiré brevemente cada uno de ellos.

Transducción

En la transducción, el DNA se transfiere de una célula a otra con la participación de un virus, esta transferencia puede tener lugar de dos formas, la primera es llamada transducción especializada que ocurre sólo en virus temperados (se les denomina así a los virus que no matan a la bacteria una vez que la infectan). En este caso un grupo específico de genes del huésped se integra directamente en el genoma viral, muchas veces sustituyendo a algunos genes virales y cuando el virus entra en estado lítico se lleva consigo dichos genes y los transfiere a una célula receptora durante la lisogenia. En el segundo caso, llamado transducción generalizada, los genes del huésped quedan como parte de una partícula viral madura en lugar del genoma viral o además de él. Se ha encontrado que la transducción tiene lugar en una gran variedad de bacterias.

Transformación.

La transformación genética es el proceso por el cual el DNA libre se incorpora a la célula receptora y provoca un cambio genético. El ejemplo más conocido es el de *Haemophilus influenzae*.

En este proceso se requiere que las células sean aptas para que el material genético se incorpore a la célula, a esta característica se le conoce como competencia. En los laboratorios se induce la competencia por un tratamiento con cloruro de calcio (CaCl_2) 0.1 M. La transformación se utiliza para proporcionarle ciertas características que la bacteria no poseía tales como la resistencia a algún antibiótico o la expresión de alguna proteína de nuestro interés.

Conjugación

La conjugación bacteriana es un proceso de transferencia de material genético de una célula a otra, requiere de un contacto célula-célula y la protección del material genético intercambiado en el medio ambiente (Heinemann, J. A. 1992).

Para que la conjugación se lleve a cabo se necesita una célula receptora del material genético y una célula donadora (que es la portadora del plásmido conjugativo). El plásmido provee a la célula de ciertas capacidades como son, la producción, ensamble y erección del pili (estructura polipeptídica y superficial que se requiere para la transferencia de la información). En la conjugación el pili es de gran importancia ya que está involucrado en la agregación celular entre las bacterias participantes, así como en transducción de señales y transporte de DNA (solo en Gram-).

Para que tenga lugar la transferencia de DNA es necesario que se lleve a cabo la replicación y para describir este proceso existe un modelo que propone que la doble cadena circular se abre y una de las cadenas se transfiere mientras la otra se esta copiando dentro de la célula donadora, una vez transferida la otra cadena, ésta sintetiza a la cadena complementaria dentro de la célula receptora. Si los genes del plásmido pueden expresarse dentro de la receptora, ésta pronto se convertirá en donadora y podrá transferir el plásmido a otras células receptoras.

Por último, es importante mencionar que debido a la existencia de elementos genéticos extracromosómicos movilizables se puede dar el fenómeno de transferencia horizontal, el cual se define como la movilización y posterior estabilización de información genética de un organismo a otro; se propone que dicho fenómeno ha contribuido ampliamente al proceso evolutivo en una gran variedad de organismos puesto que les proporciona ventajas para su sobrevivencia. Aunque el impacto evolutivo de este intercambio genético entre los diferentes reinos es difícil de evaluar, al juzgar por algunas evidencias (como es la dispersión de los genes que codifican para las resistencias a antibióticos) todo parece indicar que en cientos de años de evolución, la transferencia horizontal ha tenido un papel clave en la organización de todos los genomas procariontes (Amabile-Cuevas *et al* 1992). Sin embargo, existen muchas limitaciones dentro de cada bacteria para que un DNA exógeno se pueda establecer, como son los sistemas de restricción y modificación que constan de proteínas capaces de reconocer un DNA ajeno y eliminarlo.

Por otro lado, algunas veces las condiciones internas de la célula no permiten que las proteínas codificadas por el DNA recién introducido, y que son indispensables para el mantenimiento estable del plásmido, puedan ser funcionales.

En resumen, para que un plásmido pueda replicar y mantenerse dentro de una bacteria y más aún, para que la bacteria pueda expresar algunas características no propias de ella, se requiere que una serie de eventos y condiciones se conjuguen de una manera armoniosa. Lo que hace interesante a este fenómeno es que aún especies bacterianas alejadas, tanto filogenéticamente como en sus hábitats, puedan replicar material genético en común.

INFORMACIÓN CODIFICADA EN PLÁSMIDOS

Dado que muchas bacterias exhiben una gran variedad de rutas metabólicas, su estudio y posterior aplicación puede ser de interés científico, agrícola, médico, comercial y ambiental.

Entre estas características podemos mencionar la habilidad de *Rhizobium* para fijar nitrógeno, la de *Thiobacillus* para oxidar hierro y azufre y la capacidad de *Pseudomonas* para metabolizar compuestos aromáticos tales como naftaleno, fenol, xileno y compuestos halogenados.

Una característica del género *Rhizobium* es la existencia de una gran cantidad de DNA extracromosómico. El plásmido simbiótico o pSim lleva la información necesaria para ejecutar la fijación de nitrógeno en simbiosis (Martínez *et al.*, 1990), así como la nodulación y los genes involucrados en la especificidad del hospedero (García-de los Santos, *et al.*, 1996). Existen además otros plásmidos con funciones desconocidas llamados plásmidos crípticos; sin embargo, algunas investigaciones han revelado que estos plásmidos contienen información esencial que confiere ventajas y desventajas en la célula hospedera. Por ejemplo, algunos de estos plásmidos están relacionados con la producción de melanina (Cubo *et al.*, 1988), en la cepa CFN42 los plásmidos p42b (150 kb) y p42d (390 kb) son esenciales para para la simbiosis ya que su carencia impide la formación de nódulos o su correcto desarrollo. Trabajos posteriores (García de los Santos y Brom 1997) demostraron que las cepas carentes del plásmido p42b son incapaces de nodular ya que en este plásmido se encuentran codificadas las funciones de síntesis de lipopolisacáridos que participan en la formación del nódulo y de la membrana externa de las células bacterianas (Cava *et al.*, 1989; Brom *et al.*, 1991; y García-de los Santos, y Brom, S. 1997).

LOS PLÁSMIDOS COMO HERRAMIENTA EN LA BIOLOGÍA MOLECULAR

Además de su importancia biológica, los plásmidos son una herramienta muy valiosa en la genética molecular.

Poco antes de que la estructura del DNA fuera elucidada por Watson y Crick (1953) un plásmido (en ese entonces conocido como factor F) jugó un papel clave en el descubrimiento de la conjugación bacteriana así como de la fertilidad y posteriormente en la demostración de que la recombinación genética también ocurre en procariontes (trabajo hecho por Lederberg y Tatum 1946). Posteriormente Lederberg y Hayes (1952-1953) demostraron que el plásmido F tiene la capacidad de transferirse de una bacteria a otra.

Los estudios del plásmido F y sus derivados F' *lac* llevaron a François Jacob y sus colaboradores a acuñar el concepto de operón, que está relacionado con el control de la expresión

genética (1961); así como el modelo del replicón (1963) para la propagación del DNA.

A medida que la biología molecular se siguió desarrollando, también lo hizo la investigación en plásmidos.

El primer origen de replicación de DNA aislado y estudiado proviene de los plásmidos (Timmin *et al* 1975; Lovett y Helisnki, 1976) ; y las primeras evidencias de existencia y mecanismos de partición en bacterias resultaron de la investigación sobre la segregación plasmídica.

Por otro lado, el estudio de la replicación del plásmido ColE1 por Tomizawa y colaboradores en 1981 los llevó al descubrimiento del RNA antisentido y la primera demostración de que el RNA antisentido puede controlar la expresión génica.

También algunas de las primeras evidencias de la existencia de un sistema de modificación y restricción provienen de las investigaciones en el plásmido por Watanabe, T. y colaboradores en 1966 (Stanley N. Cohen 1993).

Pronto, todos estos trabajos sobre plásmidos hicieron posible la construcción de vectores con fragmentos de plásmidos naturales principalmente de *E.coli* para poder propagar y manipular secuencias de DNA.

Los vectores plasmídicos contienen esencialmente tres características comunes que son: un replicador, un marcador seleccionable y sitios de clonación. El replicador es como ya se había mencionado anteriormente un fragmento de DNA el cual contiene codificadas las funciones necesarias para su replicación; el marcador seleccionable es necesario para saber si el plásmido está presente en la célula (generalmente son genes que codifican para una resistencia a antibióticos y esta característica es dominante frente a la sensibilidad a antibióticos); y el sitio de clonación es una secuencia de DNA que es reconocida por una endonucleasa de restricción (cuando la secuencia tiene sitios de reconocimiento para varias enzimas se llama "fmsr") y se usa para introducir en este sitio el DNA extraño sin que interfiera con la capacidad de replicar del plásmido, además se busca que los sitios de restricción que se encuentran en esta secuencia sean únicos en el plásmido (Sambrook, *et al.*, 1989).

Plásmidos de amplio rango de hospedero.

Los plásmidos pueden ser de amplio o estrecho rango de hospedero, es decir pueden replicar en un gran número de bacterias o solamente en una. Evidentemente los de mayor uso son

los plásmidos de amplio rango de hospedero (BRH) pues han servido como modelos para el diseño de vectores de clonación.

Algunos ejemplos de este tipo de plásmidos son:

Plásmido	Grupo de inc.	Tamaño (Kb)	Fenotipo
RK2, RP1, RP4 R68, R18	P-1	60	Ap ^R , Km ^R , Tc ^R y Tra ⁺
RSF1010, R300B R1162	P-4/Q	8.9	Su ^R , Sm ^R , Tra ⁻ , Mob ⁺
Sa	W	29.6	Km ^R , Cm ^R , Sp ^R , Su ^R , Tra ⁺
pVS1	-	30	Hg, Su ^R , no replica en <i>E.coli</i>
RMS149	P6	54	Cb ^R , Gm ^R , Sm ^R y Su ^R
pJP4	P.1	52	Hg
pWWO	P-9	117	Crecimiento en tolueno o xileno.

Tabla modificada de Franklin 1985.

A continuación describiré brevemente algunos vectores de los mencionados en la tabla y sus derivados, para conocer un poco más acerca de sus propiedades e importancia.

Plásmidos del grupo IncP

Un grupo muy importante dentro de los plásmidos de amplio rango de hospedero son los plásmidos del grupo IncP y sus representantes más importantes son los plásmidos RK. El plásmido RK2 se aisló de *Klebsiella aerogenes*, mide 56.4 Kb y se le han identificado algunos sitios esenciales para la replicación (Thomas, C. M., 1981), presenta también resistencia a

kanamicina, a tetraciclina y a ampicilina. En la figura 4 se muestra un mapa del plásmido RK2, la nomenclatura usada en dicho mapa son: *oriV* (origen de replicación), *tra* (región requerida para transferirse durante la conjugación), *trf* (región específica para funciones en trans), *rlx* (sitio de corte en cadena sencilla por algunos reactivos tales como la pronasa). Este plásmido presenta la desventaja de ser muy grande por lo que puede presentar problemas para establecerse o transformarse, además de que tiene tres resistencias lo que hace difícil su contraselección.

De este plásmido se tienen varios derivados tal como el pRK290 que se muestra en la figura 5.

Plásmidos del grupo IncQ

Otro grupo de plásmidos de amplio rango de hospedero son los RSF1010, R300B y R1162; estos son tres vectores de 8.9 kb de longitud, no conjugativos, son multicopia y codifican una resistencia a estreptomicina y sulfonamidas.

En el caso específico del plásmido RSF1010 se conoce su mapa funcional el cual incluye sitios de restricción disponibles para experimentos de expresión génica, sitios de unión para la RNA polimerasa, genes para resistencia a estreptomicina y a sulfas, gene de movilización, tres genes que codifican para proteínas de replicación (Rep A, B y C) y los orígenes de replicación y transferencia.

En la figura 6 se muestra un mapa de restricción que indica en donde se encuentran cada uno de los sitios de corte para las enzimas de restricción, así como genes de interés para poder usarlo como herramienta tales como el gene de resistencia a estreptomicina, también se indica donde se encuentran los genes de *repA*, *repB* y *repC*, así como el sitio *mob* para la movilización del plásmido; en común con otros vectores de amplio rango de hospedero el RSF1010 tiene pocos sitios de restricción apropiados para la expresión génica.

Debido a que este plásmido posee pocos sitios de restricción que pueden ser usados para clonar segmentos de DNA se le han adicionado otros sitios y otros marcadores que lleven resistencia a otros antibióticos y así se han obtenido los derivados pKT210 en los cuales se utilizaron los sitios *PstI* para sustituir el fragmento que antes se encontraba ahí por otros fragmentos (Bagdasarian *et al* 1981). Estas construcciones se muestra en la figura 7.

Otros plásmidos muy utilizados son el pBR325 y sus derivados. Estos plásmidos se desarrollaron en la década de los setentas (Bolívar *et al* 1977), buscando diseñar vehículos de clonación que contaran con 2 y 3 marcadores, que en este caso son la resistencia a cloramfenicol,

ampicilina y tetraciclina, así como algunos sitios de restricción dentro de los mismos genes; además se buscaba que fueran de fácil manipulación y múltiples usos. Estos plásmidos se utilizaron ampliamente durante muchos años, sin embargo, estos plásmidos presentan algunas desventajas: debido a que tienen los sitios de restricción dentro de los genes de las resistencias, al clonar un fragmento de DNA, es necesario analizar muchas colonias para encontrar cuales presentan la sensibilidad al antibiótico y así obtener una clona que tenga la información deseada; además estos plásmidos no son movilizables lo que restringe su uso pues sólo pueden ser usados en bacterias transformables.

Viendo las limitaciones dentro de estos sistemas, se desarrollaron otros vectores que ofrecían mayores ventajas. Tal es el caso de los plásmidos pSUP's los cuales son derivados del plásmido pBR325 (Simons, R., Priefer, U. y Pühler, A. 1983.). En la figura 8 se muestra la construcción de algunos de ellos. Estos vectores presentan las mismas características que el pBR325 pero llevan además un sitio *mob* obtenido del plásmido RP4 que les permite ser movilizables de una bacteria a otra. Sin embargo, la única ventaja real frente a los anteriores es que pueden ser movilizables, pero siguen careciendo de un "fmsr" que haga más fácil clonar fragmentos y se tiene que seguir buscando la sensibilidad al antibiótico, además al tener tres marcadores dentro del mismo plásmido se hace difícil su contraselección cuando se quiere transferir a otra bacteria.

En la búsqueda de mejores vectores se desarrollaron otros plásmidos derivados del pBR322 que son de amplio uso; a este vector se le conoce como pUC19 (Yanich-Perron *et al.*, 1985). El plásmido pUC19 posee una longitud de 2,686 pb, tiene un origen de replicación tipo ColE1, tiene una resistencia a ampicilina, el gene *lacZ*, un elevado número de copias (más de 150) y además un fragmento con múltiples sitios de restricción (fmsr) con 13 sitios de restricción. Como se puede observar, estos vectores presentan mayores ventajas que los pSUP's pues tienen una longitud menor, cuentan con un fmsr (por lo que ya no es necesario clonar dentro del gene de resistencia) dentro del gene *lacZ* lo que hace más fácil su selección pues presenta selección azul/blanco en presencia de IPTG y X-gal y presenta un solo marcador. Sin embargo, no es movilizable lo que sólo permite su uso en bacterias transformables además de que el marcador no es muy bueno porque los antibióticos que tienen anillos betalactámicos son fácilmente hidrolizables.

Como era de esperarse, también del plásmido pUC19 se hizo un derivado que es de amplio uso al cual se le llamó pBluescript (Alting-Mess, *et al.*, 1992); este vector tiene muchas ventajas ya que además de contar con la misma resistencia del pUC19 y el gene *lacZ* para la selección azul/blanco, tiene un polinker con 8 sitios más de restricción, cuenta con un origen de replicación del fago filamentoso f1 lo que hace posible obtener DNA de cadena sencilla que se puede usar para hacer mutagénesis sitio dirigida o para secuenciación. Se pueden hacer proteínas de fusión con la

β -galactosidasa, tiene promotores T3 y T7 que flanquean el *fmsr* por lo que los transcritos así obtenidos pueden usarse en estudios de expresión o para el estudio de ribozimas *in vitro*. Sin embargo, tiene un marcador poco eficiente por lo que ya se había mencionado y no es movilizable. En la figura 10 se muestra un mapa físico.

Ahora bien, como ya se había mencionado antes, los plásmidos tienen un rango de huésped y no pueden replicar en cualquier microorganismo. Dada la importancia económica y científica de las Rhizobiaceas por su capacidad de fijar nitrógeno, se han desarrollado algunos vectores capaces de replicarse dentro de estos microorganismos y a continuación mencionaré algunos.

Poco se conoce acerca de los mecanismos de replicación y estabilidad de los plásmidos de *Rhizobium*. Sin embargo, vectores derivados de replicones de amplio rango de hospedero tales como el RK2 y el RSF1010 han sido utilizados para transferir información a las cepas de *Rhizobium* de una forma estable (Simon y Priefer 1990). Pero este sistema tiene sus limitaciones dado que no replica en *Rhizobium* y sólo sirve para hacer mutagénesis por transposición o para observar fenómenos de recombinación.

Los intentos por solucionar este problema dieron como resultado el desarrollo de vectores derivados de plásmidos crípticos.

Para crear vectores capaces de replicar en *Rhizobium*, se han usado los replicones nativos de estas bacterias. Tal es el caso de los vectores derivados del pTM5; estos vectores se construyeron utilizando la región replicadora del plásmido pHc23a de la cepa UPM-Hc23 de *Rhizobium* sp (Hedysarum) (Mozo *et al.*, 1988) y se clonaron en el pSUP202. En la figura 11 se muestra como se construyeron dichos vectores.

Estos vectores tienen las ventajas de ser movilizables y tener un buen marcador para *Rhizobium*, que es la resistencia a tetraciclina, además de que cuentan con dos orígenes de replicación uno que funciona en cepas de *E. coli* y otro que funciona en *Rhizobium* y *Agrobacterium*. También presentan una buena estabilidad en diferentes hospederos, sin embargo, presentan la desventaja de tener un elevado peso molecular y pocos sitios de restricción. (Mozo *et al.*, 1990).

También se han diseñado vectores utilizando regiones replicadoras de otros plásmidos como es el caso de los plásmidos derivados del pJM100 (Mercado-Blanco *et al.* 1993). El plásmido pJM100 fue construido clonando un fragmento de 4.8 kb del plásmido pRmeGR4a (de *Rhizobium meliloti*) dentro del pSUP202 como se muestra en la figura 10. Este plásmido presenta un sitio *mob*, un gene que codifica para la resistencia a cloramfenicol, otro gene para resistencia a tetraciclina y 2 orígenes de replicación, uno del tipo ColE1 y otro obtenido del plásmido

pRmeGR4a (Mercado-Blanco y Olivares 1993)

Posteriormente utilizando este vector como base se construyeron algunos derivados como se muestra en la figura 12.

Posteriormente se desarrollaron otros plásmidos más pequeños que utilizaron como base el vector pBluescript, al cual además del origen de replicación del plásmido de *Rhizobium* también se le introdujo un sitio *mob* derivado de un plásmido RK2 y el gene *nptI* de un Tn903, dando como resultado un plásmido de 9.9 kb como se muestra en la figura 13. Este plásmido presenta la desventaja de perder varios sitios de restricción debido a que es ahí donde se clonan todos los fragmentos de interés.

Otros vectores han sido desarrollados, sin embargo, los que acabo de mencionar se encuentran entre los más representativos y utilizados; como se puede observar cada uno cuenta con sus particularidades que los hacen útiles para diferentes necesidades. Sin embargo es necesario seguir diseñando vectores que sean más eficientes como herramientas las en biología molecular.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La replicación y expresión de fragmentos de DNA en algunas bacterias puede volverse problemática en caso de no contar con un vector que ofrezca un marcador apropiado, un origen de replicación de amplio rango de hospedero o bien un peso molecular bajo. Aunque los vectores antes descritos ofrecen buenos marcadores, así como capacidad de mobilizarse, algunos no proveen la capacidad de replicarse en los *Rhizobia* tal como el pBluescript o los pSUP y los que lo hacen, tienen un peso molecular muy elevado como en el caso de los pTMS y sus derivados o bien tienen un *fmsr* disminuido como es el caso del pJMB40. Es por eso que viendo la necesidad de contar con vectores que nos provean de una serie de marcadores fácilmente intercambiables, que sean movilizables de una bacteria a otra, que tengan dos orígenes de replicación (uno para *E. coli* y otro para *Rhizobium*) es decir que sea un plásmido de tipo bireplicón, y que conserven el mayor número de sitios de restricción dentro del *fmsr*, así como un marcador para selección azul/blanco en presencia de IPTG y X-gal, se decide diseñar y construir una serie de vectores de clonación que nos permitan manipular información genética dentro de las bacterias de nuestro interés.

OBJETIVOS

Construir dos colecciones de vectores cuyas características sean:

A

1. Ser movilizables.
2. Tener una serie de resistencias a los antibióticos tetraciclina, kanamicina, cloramfenicol, estreptomina y gentamicina.
3. Tener selección de colonias azul y blancas en presencia de IPTG y X Gal.
4. Tener un origen de replicación de *E.coli*
5. Tener un fmsr con un adecuado número de sitios de restricción.
6. Tener un tamaño pequeño (7 kb).
7. Tener por lo menos 16 sitios de restricción dentro del fmsr.
8. Tener un elevado número de copias (mas de 100) en *E.coli*.

B.

Todas las características anteriores además de un origen de replicación de *Rhizobium meliloti*.

Todo esto con la finalidad de obtener un vector que pueda usarse para:

- Movilizar información genética por conjugación de una bacteria a otra.
- Intercambiar los marcadores en experimentos de subclonación.
- Replicar DNA dentro de *Rhizobium*.
- Mapear genes.
- Expresar DNA de cadena sencilla en *E.coli* para utilizarlo como templado para secuenciación o para experimentos de mutagénesis sitio dirigida.
- Monitorear la trascipción de algun gene unido al promotor del gene *lacZ*
- Expresar proteínas de fusión en *E.coli*.

METODOLOGÍA

Las cepas de *E.coli* se cultivaron a 37 °C en LB (apendice 1). Las cepas de *Rhizobium* se cultivaron a 30 °C en PY (apéndice 1).

En los casos necesarios se utilizaron los siguientes antibióticos a las concentraciones indicadas: tetraciclina (Tc) a 10 µg/mL, carbenicilina (Cb) a 100 µg/mL, estreptomycin (Sm) a 100 µg/mL, gentamicina (Gm) a 30 µg/mL, cloramfenicol (Cm) a 30 µg/mL, kanamicina (Km) a 30 µg/mL y neomicina (Nm) a 30 µg/mL. El X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol β-D -galactósido) se utilizó a 20 mg/mL y el IPTG (isopropil-β-D tiogalactopiranosido) a 200 mg/mL.

En la tabla 1 se muestran las cepas y los plásmidos utilizados para este trabajo.

Tabla 1.

Cepas y plásmidos	Descripción	Referencia
Cepas		
<i>E.coli</i>		
DH5α	F ⁻ , hsdR17, thi-1, gyrA, (LacZYA-argF), supE4 4, recA1, (F80dA lacZ M15), relA	Hanahan, 1983.
HB101	F ⁻ , leu proA2, lacY, rspL20, recA13, Str ^r	Boyer, <i>et al.</i> , 1969.
S17-1	Tp-Sm, pro, res ^r , mod	Simon, <i>et al.</i> , 1983.
<i>Rhizobium</i>		
CE3	CFN42, Sm ^r , Nal ^r	Noel, <i>et al.</i> , 1984.
GRM8	Derivada de GR4, curada de pRmeGR4a y pRmeGR4b	Mercado-Blanco y Olivares, 1993.
Plásmidos		
pBC SK	Cm ^r , lacZ, ori del ColE1	Stratagene.
pRK2013	tra ⁺ , Km ^r , ori del ColE1	Figurski y Helinsky, 1979.

pBSL128	Apr, Km ^R	Mikhail F Alexeyev <i>et al.</i> , 1995.
pBSL142	Apr, Gm ^R	Mikhail F Alexeyev <i>et al.</i> , 1995.
pBSL193	Tc ^R , Cb ^R	Takeshita <i>et al.</i> , 1987 and Bartolomé <i>et al.</i> , 1991.
pBSL119	Apr, Cm ^R	Takeshita <i>et al.</i> , 1987 and Bartolomé <i>et al.</i> , 1991.
pBSL175	Cm ^R , Sm ^R	Pretkin and Krisch 1984.
pSUP5011	Cm ^R , Ap ^R , Km/Nm ^R <i>mob.</i>	Simon, R. 1984.
pSUP202	Cm ^R , Tc ^R , Ap ^R ColE1	Simon, R. 1984.
pGing	Tc ^R , <i>lacZ</i> , ColE1	Este trabajo.
pGMoT	Tc ^R , <i>mob</i> , <i>lacZ</i> , ColE1	Este trabajo.
pGMoK	Km ^R , <i>mob</i> , <i>lacZ</i> , ColE1	Este trabajo.
PGMoC	Cm ^R , <i>mob</i> , <i>lacZ</i> , ColE1	Este trabajo.
pGMoG	Gm ^R , <i>mob</i> , <i>lacZ</i> , ColE1 Nm ^R .	Este trabajo.
pGMoS	Sm ^R , Sp ^R , <i>mob</i> , <i>lacZ</i> ColE1.	Este trabajo.
pMOSBlue	Apr, <i>lacZ</i>	Amersham pharmacia.
pCAP's	Apr	Amersham pharmacia.

pJMB40	Ap ^R , Km ^R , lacZ	Mercado-Blanco y Olivares, 1993.
pMayGe	pSUP202, replicón básico de pSim de <i>R.meliloti</i>	Este trabajo.
pGMoTli	pGMoT, replicón básico de <i>R. etli</i>	Este trabajo.
pGMoTH	pGMoT, replicón básico de pSim de <i>R.meliloti</i> .	Este trabajo.

Cassettes

ΩTc	2.2kb, sitios <i>NheI</i> , <i>BssHII</i> y <i>MluI</i> .	Mikhail F Alexeyev <i>et al.</i> , 1995.
ΩKm	2.0kb, sitios <i>BglII</i> , <i>NcoI</i> , <i>NheI</i> , <i>BssHII</i> y <i>MluI</i> .	Mikhail F Alexeyev <i>et al.</i> , 1995
ΩGm	1.6kb, sitios <i>EcoRV</i> , <i>BglII</i> , <i>NheI</i> , <i>BssHII</i> y <i>MluI</i> .	Mikhail F Alexeyev <i>et al.</i> , 1995.
ΩCm	1.7kb, sitios <i>NcoI</i> , <i>NheI</i> , <i>BssHII</i> , <i>MluI</i> .	Mikhail F Alexeyev <i>et al.</i> , 1995.
ΩSm	2.1kb, sitios <i>SphI</i> , <i>NheI</i> , <i>BssHII</i> y <i>MluI</i> .	Mikhail F Alexeyev <i>et al.</i> , 1995.

Conjugación bacteriana

Cruza triparental

La conjugación se hizo de forma triparental haciendo una mezcla de cultivos de células donadoras, receptoras y cooperadoras, en proporción 2:1:1 respectivamente. Esta mezcla se realizó en medio PY para el caso de *Rhizobium* y LB en caso de *E.coli*, sin presión selectiva y se dejó a 30 °C (para el primer caso) y a 37 °C (para el segundo caso) durante toda la noche. Posteriormente se lavó con 2 ml de medio LB líquido para después hacer diluciones 10^{-2} , 10^{-4} y sembrar 100 µl de cada dilución en medios de selección. Posteriormente se incubó a 30 °C en períodos de 2 a 4 días hasta la aparición de colonias transconjugantes (para *Rhizobium*) y a 37 °C en periodos de 24hrs. horas para *E.coli*.

Cruza biparental

Los experimentos en forma biparental se hicieron mezclando los cultivos de células donadoras (S17-1) y receptoras en proporción 1: 2. Esta mezcla se realizó en medio PY para el caso de *Rhizobium* y LB en caso de *E.coli*, sin presión selectiva y se dejó a 30°C (para el primer caso) y a 37 °C (para el segundo caso) durante toda la noche. Posteriormente se lavó con 2 ml de medio LB líquido para después hacer diluciones 10^{-2} , 10^{-4} y sembrar 100 µl de cada dilución en medios de selección. Posteriormente se incubó a 30°C en períodos de 2 a 4 días hasta la aparición de colonias transconjugantes (para *Rhizobium*) y a 37 °C en periodos de 24hrs. horas para *E.coli*.

Preparación de células competentes por cloruro de calcio

Las cepas de interés se crecieron en 10 mL de LB en agitación a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, 1 mL de cada cultivo se inoculó en 100 mL de LB y se creció en agitación a 37 °C hasta alcanzar una D.O.₅₄₀ de 0.45 unidades. El cultivo se centrifugó durante 5 min a 10, 000 rpm en un rotor Beckman tipo JA'14, en seguida la pastilla se resuspendió en 50 mL de CaCl₂ 0.1 M frío y se incubó en hielo durante 30 min. Después las células nuevamente se centrifugaron durante 5 min a 10, 000 rpm y la pastilla se resuspendió en 8.7 mL de CaCl₂ 0.1 M frío y 1.3 mL de glicerol al 100%. Posteriormente se hicieron alícuotas de 200 µL en microtubos y se mantuvieron en congelación a -70 °C. (Modificado de Sambrook *et al.*, 1989).

Transformación de células competentes

A 200 μ L de células competentes previamente descongeladas pero mantenidas en hielo, se les agregó 100 ng de DNA plasmídico de interés y se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente se sometió la mezcla a un choque térmico durante 2 min a 42°C. Después se agregó 1 mL de LB y se mantuvo en agitación a 37°C durante 1 hora. Posteriormente se sembró en el medio selectivo, usualmente 3 cajas con 200 μ L de cultivo cada una, y se incubó a 37°C hasta obtener colonias transformantes (Modificado de Sambrook *et al.*, 1989).

Purificación de DNA genómico

Cuando fué necesario extraer DNA genómico se utilizó el estuche comercial de Amersham "DNA/RNA Isolation Kit-USB" siguiendo las indicaciones del fabricante.

Purificación de DNA de plásmido por lisis alcalina

Se partió de un cultivo saturado de 2 mL en LB de la cepa con el plásmido de interés. Se centrifugó (en una microcentrífuga Eppendorf 5415C) a velocidad máxima (14, 000 rpm) por 2 min. y el paquete celular se resuspendió en 0.5 mL de solución amortiguadora TE (50 : 20). Posteriormente se centrifugó a velocidad máxima por 20 s. y se resuspendió en 100 μ L de la solución I, a esta solución se agregó 200 μ L de la solución II y se mezcló por inversión. Después se incubó en hielo durante 5 min. se agregaron 150 μ L de la solución III y se mezcló por inversión. Seguido a esto se incubó en hielo durante 5 min., posteriormente se centrifugó a velocidad máxima por 10 min. Al sobrenadante se le añadió 0.3 mL de fenol saturado y 0.3 mL de cloroformo, la mezcla se agitó y se centrifugó a velocidad máxima por 10 min. Posteriormente se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se repitió el paso anterior. Después a la fase acuosa se le adicionó 1 mL de etanol absoluto y se incubó a -60 °C durante 10 min. Posteriormente se centrifugó a velocidad máxima por 10 min. y se descartó el sobrenadante. A la pastilla de ácidos nucleicos se le agregó 0.5 mL de etanol al 70%, enseguida se centrifugó a velocidad máxima por 5 min. y se descartó el sobrenadante. La pastilla se secó en una centrifuga speed-vac (Savant DNA110) durante 4 min y se disolvió en 40 μ L de agua.

Reacciones de restricción y ligación

Para las reacciones de restricción se mezclaron de 2.5 a 10 unidades de la enzima de interés (Amersham Life Science) con 1 μ g de DNA en solución amortiguadora y se incubó durante 4 hrs. a la temperatura recomendada por los fabricantes. Posteriormente el análisis de restricción se

determinó en corrimientos electroforéticos en geles de agarosa al 1% TAE (amortiguador Tris-Acetato-EDTA). Cuando fue necesario los fragmentos de DNA se purificaron directamente del gel empleando el estuche comercial "DNA purification System" de Promega.

Para las reacciones de ligación se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (Amersham Life Science) 1U por 1µg de DNA en solución amortiguadora para ligación. La reacción se incubó a 16 °C durante toda la noche.

Digestiones parciales

Las digestiones parciales se hicieron variando la cantidad de enzima, se hicieron varios stocks con las siguientes concentraciones: 0.5, 1, 2 y 4 unidades de enzima/µL.

DNA (30ng)	1µL
Agua grado HPLC	7µL
Amortiguador 10X	1µL
Enzima	1µL

Estas digestiones se realizaron durante 10 minutos a 37 °C.

Reacción de PCR (1)

Se preparó una mezcla de reacción con los siguientes reactivos:

Agua grado HPLC	36 µL
Amortiguador 10 X	5 µL
Mezcla de bases trifosfatadas (10mM)	4 µL
Oligonucleótido WTC1 (5 pmol/µL)	2 µL
DNA molde (pBSL193) (30ng)	0.5 µL
Taq polimerasa (1U/µL)	0.5 µL

La reacción se llevo a cabo con las siguientes condiciones:

1 ciclo 5min 95 °C.

	1 min	95 °C.
30 ciclos	1 min	55 °C.
	1 min	72 °C.
1 ciclo	5 min	72 °C.

Reacción de PCR (2)

Se preparó una mezcla de reacción como sigue:

DNA molde (pJMB40) (30ng)	1 µL
Oligo up (5 pmol/µL)	3 µL
Oligo low (5 pmol/µL)	3 µL
Mezcla de bases trifosfatadas (10mM)	10 µL
Amortiguador 10 X	5 µL
Mg (M)	5 µL
Agua grado HPLC	22 µL
Taq polimerasa(1U/µL)	1 µL

La reacción se llevo a cabo bajo las siguientes condiciones:

1 ciclo	5 min	95 °C.
	1 min	95 °C.
30 ciclos	1 min	60 °C.
	1.5 min	72 °C.
1 ciclo	5min	72 °C.

PCR de colonia

Se tomó una colonia bacteriana grande y se resuspendió en 200 µL de Tris-EDTA 10:1/NaCl 10mM. Se calentó durante 10 min a 95 °C. Se centrifugó durante 2min a 10,000 rpm en la microcentrífuga. Se tomaron 10 µL como templado para el PCR

Reacción pk* (para clonar en el pMOSBlue)

Amortiguador 10 x	1 μ L
DTT (100mM)	0.5 μ L
Enzima pk	1 μ L
DNA (50ng)	5 μ L
Agua	2.5 μ L

Se incubó a 22°C durante 40 minutos, posteriormente se centrifugó para concentrar toda la mezcla de reacción y se calentó a 75°C por 10 minutos para inactivar a la enzima, se enfrió en hielo por 2 minutos y se centrifugó para coleccionar toda la mezcla de reacción.

* pk : polinucleotido cinasa

RESULTADOS

Elección del plásmido base para la construcción de vectores

Para la construcción de vectores de clonación fue necesario elegir un plásmido base que cumpla con ciertas características tales como un tamaño pequeño y que tenga un buen marcador genético para así solamente adicionarle algunas características que lo hagan superior a los ya existentes.

Para este propósito, se eligió como base el plásmido pBC SK+ porque tiene varias características que lo hacen ventajoso: tiene un *fmsr* con un amplio número de sitios de restricción (21) diseñado para optimizar el número de procedimientos de clonación, incluyendo clonación direccional, mapeo genético, deleciones unidireccionales de longitud predecible y transcripción mediada por las polimerasas de T3 y de T7. Además sirve para hacer secuenciación de doble cadena de DNA y para obtener una proteína de fusión β -galactosidasa. También tiene un origen de replicación del fago filamentoso f1 que permite la preparación de DNA de cadena sencilla que puede utilizarse como molde para mutagénesis sitio-dirigida y un origen de replicación ColE1 para que replique en *E.coli*. Tiene selección azul/blanco, es de bajo peso molecular (3400 pb) y alto número de copias (más de 100), tiene un gene que codifica para resistencia a cloramfenicol el cual puede ser removido del plásmido ya que contiene dos sitios únicos de restricción para la enzima *Dra* I. En la figura se muestra un mapa de este plásmido.

Una vez seleccionado el plásmido base de los vectores, se eliminó el gene que confiere la resistencia a cloramfenicol el plásmido digiriendolo con *Dra* I ya que dentro del gene para cloramfenicol existen 2 sitios de restricción.

Obtención del cassette Ω Tetraciclina

Para obtener el gen que codifica para la resistencia a tetraciclina, se diseñó un oligonucleótido que tiene los siguientes sitios de restricción. Dado que este oligonucleótido se diseñó sobre una región invertida repetida que bordea el gene de interés un sólo oligonucleótido es suficiente para obtener un producto de PCR.

5'-TTT AAA AGA TCT ACG CGT CGA TCC GGT GAT TG-3' WTC I
Dra I *Bgl* II *Mlu* I

Se decidió obtener el gene que codifica para la resistencia a tetraciclina por medio de PCR para adicionarle sitios de restricción útiles. Dentro de la estrategia planeada, cada sitio tiene un

objetivo, solamente se puso un sitio *Bgl*III para generar sitios compatibles con los extremos de un fragmento *mob* (ver mas adelante) y poder clonarlo fácilmente, el sitio para *Mlu*I servió para poder sacar el cassette Ω Tc e intercambiarlo por otros cassettes Ω y los sitios *Dra*I son para hacerlos compatibles con los sitios lineales del plásmido pBC SK +.

Con el oligonucleótido antes mencionado se obtuvo un producto de PCR a partir del plásmido pBSL193 que contiene el cassette Ω Tc. El producto se purificó de un gel de agarosa de bajo punto de fusión. En la figura 15 se muestra una electroforesis en gel en la cual se corrió el fragmento de DNA amplificado. En esta foto se muestra un marcador de peso molecular el cual consiste de 12 fragmentos de tamaños entre 1018 pb y 12216 pb, además de esos 12 fragmentos hay otros que van desde 75pb a 1636 pb. El fragmento amplificado mide 2196 pb, por lo tanto se espera una banda con un tamaño aproximado de 2 kb.

Construcción de pGing

El plásmido pBC SK+ deletado del gene que codifica para la resistencia a cloramfenicol y el producto de PCR se ligaron (como se indica en la metodología); posteriormente el producto de ligación se transformó en células DH5 α . Las células transformantes se seleccionaron en medio LB con tetraciclina, en presencia de IPTG y X-gal, con la finalidad de detectar a las bacterias que portan el plásmido con la construcción esperada. También se verificó que la resistencia a tetraciclina fuera acompañada por una sensibilidad a cloramfenicol.

El plásmido obtenido se llamó pGing. Dicho plásmido fue digerido con *Bgl*III para constatar que el plásmido tiene el peso molecular esperado. En la figura 16 se muestra la construcción esperada.

Obtención del sitio *mob*

Se decidió obtener el fragmento *mob* que se encuentra dentro del plásmido pSUP5011 (que es un derivado del pBR325 (Simon, *et al.*, 1983)), pero como este plásmido es de bajo número de copias la cantidad de DNA plásmido obtenido era muy baja, por lo que se decidió clonar el sitio *mob* en otro plásmido de mayor número de copias llamado pCAP's.

El pCAP's es un vector suicida que contiene un gene mutante para la proteína CAP (proteína activadora de catabolitos) que le confiere letalidad a *E.coli*, además presenta una resistencia a ampicilina, tiene un *fms*r de 14 sitios únicos de restricción, un tamaño de 3.1 kb y un

elevado número de copias . En la figura 17 se muestra un mapa del plásmido

Una vez que se obtuvo el fragmento *mob* a partir del pSUP5011, se ligó con el plásmido pCAP's previamente linearizado con *BamHI* y se transformó en células DH5 α , la selección en este plásmido fué resistencia a carbenicilina.

De este plásmido (llamado pmob's) se cortó el sitio *mob* con *BamHI* y se purificó de un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1%. En la figura se muestra un foto de la electroforesis en gel donde se corrió la digestión del pCAP's con *BamHI* para liberar el fragmento *mob*.

Construcción de pGMoT

Debido a que pGing tiene dos sitios de restricción para *BglII*, el plásmido fué digerido parcialmente con *BglII*; para encontrar las condiciones ideales se realizaron varios ensayos variando unidades de enzima y tiempos de digestión.

Una vez que se obtuvo el plásmido parcialmente digerido (ver metodología) se ligó con el sitio *mob* y se transformó en células S17-1. A pesar de que el fragmento *mob* esta bordeado por sitios *BamHI*, puede ligarse con sitios *BglII* porque son sitios compatibles

A GATCT
T CTAGA
BglII

G GATCC
C CTAGG
BamHI

y como se puede observar las bases complementarias pueden aparearse.

Como esta construcción no tiene un fenotipo que nos permita reconocer las moléculas recombinantes, las células S17-1 se conjugaron con células DH5 α y se seleccionó en medio LB NaI²⁰Tc¹⁰ (debido a que las células S17-1 son sensibles al ácido nalidíxico y las DH5 α que no conjugaron son sensibles a tetraciclina) en presencia de IPTG y X-gal; así se asegura que el plásmido seleccionado tiene un sitio *mob* funcional, tiene la selección azul/blanco y la resistencia a Tc.

Obtención de otros marcadores

Para conseguir otros marcadores de resistencia a antibióticos se extrajo DNA plasmídico de

cada uno de los plásmidos que contenían cassettes Ω y se digirieron con *MluI* (ver metodología).

Los cassettes Ω son genes que codifican para una resistencia a antibióticos y que están flanqueados por señales de paro para la transcripción, pero la característica principal por la que fueron elegidos es porque poseen pocos sitios de restricción dentro del gene, además de que dicho gene está bordeado por sitios *MluI*. En la figura 19 se muestran los mapas de los cassettes utilizados.

Una vez obtenido el fragmento esperado, se purificó de un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Por otro lado, el pGMoT se digirió con *MluI* para sacar el cassette Ω Tc y poderlo intercambiar por otros cassettes. Cada uno de los cassettes por separado se ligó al pGMoT linealizado y se transformó en células DH5 α ; se seleccionó de acuerdo con las resistencias y marcador azul/blanco en presencia de X-gal e IPTG. Así se construyó la colección de plásmidos movilizables con diferentes resistencias que se muestran en la figura 20.

Para comparar la eficiencia de conjugación de los plásmidos construidos con los ya existentes se hicieron cruza biparentales entre las cepas S17.1 como donadoras de cada uno de los plásmidos y las células DH5 α como receptoras. La tranconjugantes se seleccionaron de acuerdo a la resistencia que contiene cada plásmido y la resistencia a ácido nalidíxico que es propia de las bacterias DH5 α .

Los resultados fueron:

Plásmido	Transconjugantes (μ os/ mL)	Eficiencia de conjugación
pSUP202	3.5×10^7	3.4×10^{-4}
pJMB40	1.7×10^5	2.1×10^{-2}
pGing	-	-
pGMoG	4.5×10^7	9.3×10^{-3}
pGMoC	9.5×10^4	1.3×10^{-5}
pGMoK	1.3×10^7	7.9×10^{-3}

Obtención del replicón básico de *Rhizobium meliloti*

La cepa GR4 de *Rhizobium meliloti* contiene en su plásmido pRmeGR4a, un replicón básico que tiene un solo gene que codifica para la proteína de inicio de la replicación (RepC). Dicha región codificante se encuentra dentro de 1850 pb, que es la mínima región reportada para que este replicón sea funcional (Comunicación personal Mercado-Blanco). En la figura 21 se muestra un mapa físico de la región.

Para conseguir el replicón básico del pRmeGR4 fue necesario diseñar el par de oligonucleótidos para amplificar un producto de PCR (utilizando el plásmido pJMB40 como molde); estos oligonucleótidos se muestran a continuación:

CGG GAT CCC ACG GAG ATG ACA GGC GR4 up
*BamH*I

CGG GAT CCT TCA CCA TCG CAA GGC GR4 low
*BamH*I

Este producto se usó para clonarlo en el pGMO y así poder obtener un plásmido capaz de replicarse en *E. coli* y *Rhizobium*.

Dichos oligonucleótidos contienen sitios de restricción para *BamH*I y servirán para ligarse con los sitios *Bgl*II.

Debido a que la cantidad de DNA fue muy baja, se decidió clonar este producto en un vector intermediario que es el pMOSBlue.

El pMOSBlue es un vector que está linearizado con la enzima *EcoRV*, que corta sobre el gene de la β galactosidasa y que es un marcador para selección azul/blanco en presencia de IPTG y X-gal, tiene extremos romos, una resistencia a ampicilina, y además tiene un alto número de copias.

Para clonar el fragmento deseado, se "trató" el producto de PCR (ver metodología), se ligó con el pMOSBlue y se transformó.

Una vez obtenido el producto de la ligación, este se transformó en células DH5 α y se seleccionaron las colonias blancas en presencia de IPTG y X-gal. A 10 de estas colonias se les amplificó un producto de PCR con los oligonucleótidos GR4 low y GR4 up y de aquellas que

mostraron un fragmento de DNA amplificado con el peso esperado en una electroforesis en gel (ver figura 22). Se seleccionó una colonia y se extrajo DNA plasmídico por la técnica de lisis alcalina. Este DNA fué digerido con *Bam*HI y se purificó el inserto con el peso esperado. En la figura 22 se muestra una electroforesis en gel.

Construcción del pGMoXH

Para construir la colección de vectores pGMoXH se eligió el plásmido pGMoT ; éste fue digerido con *Bgl*II debido a que el gene de resistencia a tetraciclina tiene un sitio de corte cerca del inicio del gene. Una vez que se hizo la digestión, se purificó la banda que corresponde al peso del vector linearizado. Posteriormente se ligó con el replicón básico del plásmido pRmeGR4a; esto se pudo realizar gracias a que los sitios *Bam*HI y *Bgl*II son compatibles y esto tiene una ventaja ya que una vez ligadas estas 2 secuencias, ambos sitios se pierden y el sitio *Bam*HI dentro del *fmsr* sigue quedando como único.

Debido a que la construcción no tiene forma de seleccionarse, el DNA resultante de la ligación, se transformó en células S17-1, se sembró en medio de selección y se hizo una reacción de PCR de colonia de una muestra de 10 colonias tomadas al azar, utilizando los oligonucleótidos GR4 low y GR4 up .

De las colonias que amplificaron producto de PCR se puso un cultivo de 12 horas y se hizo una cruce biparental utilizando a las cepas CE3 y GRM8 como receptoras.

Como es necesario contar con controles dentro del experimento se hicieron otras construcciones que a continuación se describen:

- En el plásmido pSUP202 se clonó el origen de replicación del plásmido pRmeGR4a dentro del sitio *Bam*HI y se verificó que el inserto estuviera dentro del plásmido por medio de PCR. Posteriormente se buscaron clonas que tuvieran clonado este origen de replicación en ambos sentidos y para esto se realizaron digestiones parciales con *Hind*III (a este plásmido se le llamó pMayGe). Este control se hizo con la finalidad de verificar si efectivamente este origen de replicación funciona independientemente del vector.

- En el plásmido pGMoT se clonó el replicón básico del plásmido simbiótico de *Rhizobium etli*; este plásmido (llamado pGMotli) se transformó en la células S17-1 para posteriormente hacer una cruce biparental con *Rhizobium etli* y verificar que el vector funciona, es decir que puede movilizarse, transferirse y estabilizarse en otra célula.

- Por último se utilizó el plásmido pJMB40 el cual es un plásmido movilizable y tiene el origen de replicación del plásmido pRmeGR4a de *Rhizobium meliloti*.

Con cada uno de estos plásmidos más dos candidatos de la construcción esperada se hicieron cruza biparentales las cuales se inocularon por duplicado para obtener una cuenta de colonias que fuera representativo.

Resultados para la cepa CE3

Plásmido	Transconjugantes ($\mu\text{s}/\text{mL}$)	Eficiencia de conjugación
pMayGe1	4.7×10^6	7.6×10^{-3}
pMayGe2	--	--
pJMB40	4.12×10^7	3.5×10^{-2}
pGMotli	--	--
pGMoTH1	--	--
pGMoTH2	--	--

Resultados para la cepa GRM8

Plásmido	Transconjugantes ($\mu\text{s}/\text{mL}$)	Eficiencia de conjugación
pMayGe1	1.49×10^3	3.23×10^{-4}
pMayGe2	8.45×10^4	3.8×10^{-2}
pJMB40	2.5×10^6	0.675
pGMotli	--	--
pGMoTH1	--	--
pGMoTH2	--	--

Se realizó también una digestión con *MluI* debido a que corta al vector en dos sitios y en una orilla del origen de replicación insertado, esto con la finalidad de conocer la orientación de los fragmentos. La construcción se muestra en la figura 23.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Dada la utilidad de los vectores plasmídicos en investigación sobre biología molecular en el presente trabajo se describe la construcción de dos familias de vectores, la primera denominada como pGMo y que se muestra en la figura 20, presenta las siguientes características: son movilizables, poseen la selección azul/blanco en presencia de IPTG y X-gal, poseen un cassette Ω que les confiere la resistencia a un antibiótico, conserva integro el polilinker original, con 21 sitios de restricción, tienen un origen de replicación tipo ColE1, un origen de replicación del fago filamentosos f1.

La segunda familia presenta las mismas características que la familia pGMo, pero además tiene un origen de replicación perteneciente al plásmido pRmeGR4a, el cual es un plásmido críptico de la cepa GR4 de *Rhizobium meliloti* y que en estudios realizados (Mercado -Blanco y Olivares 1993) ha mostrado tener un alto grado de estabilidad en cepas de *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* *bvs.viciae*, *phaseoli*, *trifoli* y en *Agrobacterium tumefaciens*; además de que este origen de replicación es el más pequeño encontrado dentro de la familia de las Rhizobiaceas.

Para construir la primera familia de vectores, se quitó la resistencia del plásmido base (pBC SK) y se clonó un cassette Ω tetraciclina; dicho cassette se obtuvo como producto de PCR, utilizando un oligo como cebador que se diseñó específicamente para este trabajo. Posteriormente se introdujo un sitio *mob* para hacer movilizable a este vector, este sitio fue obtenido del pSUP5011.

De acuerdo con los resultados obtenidos de los vectores construidos, estos tienen la capacidad de movilizarse con una eficiencia similar a la del pSUP202 pero presentan la ventaja de tener el gene de la β -galactosidasa que permite seleccionarlos por las colonias azul/blanco en presencia de IPTG y X-gal, además de que el hecho de presentar una sola resistencia permite utilizarlos y poder contraseleccionarlos en presencia de otro plásmido de la misma familia.

En el caso de la segunda familia solamente se pudo obtener un vector el cual tiene clonado el origen de replicación de *R. meliloti*, esto se determinó levantando un producto de PCR, posteriormente se hizo una digestión con una enzima que corta en tres sitios del vector y así se pudo determinar la orientación de los fragmentos clonados.

Una vez realizado esto, el vector se movilizó de la cepa S17.1 hacia la cepa DH5 α obteniendo células transconjugantes, para asegurarse que el vector conserva la capacidad de

movilizarse, pero dichas transconjugantes no se ponen de color azul en presencia de IPTG y X-gal a las 24 horas; sin embargo, se ponen azules una vez que se resiembran. Las células que hospedan este plásmido presentan deficiencias en su crecimiento, deficiencias que no se observan en células que hospedan a los vectores de la familia pGMO.

De estas transconjugantes se seleccionó una colonia, de la cual se extrajo DNA y se transformó en células S17.1, de estas transformantes se seleccionó una colonia la cual se conjugó con la cepa GRM8 de *Rhizobium meliloti*.

Simultáneamente se realizaron los controles del experimento

- Dentro del pSUP202 se clonó el replicón básico del plásmido pRmeGR4a, en ambas orientaciones, para saber si la orientación influye en la replicación del vector construido. Según los resultados, en las 2 cepas pudo replicar este plásmido en una dirección y solo pudo hacerlo en la GRM8 en las 2 direcciones.

- Se clonó en el plásmido pGMOt el origen de replicación del plásmido simbiótico de *Rhizobium etli* (que mide 5.6 kb), para evaluar la capacidad del vector independientemente del origen de replicación que porte. Como se observó en los resultados en ninguna de las 2 cepas hubo transconjugantes.

- Se hicieron cruces con el plásmido pJMB40 para comprobar que el plásmido con el origen de replicación de *R. meliloti* puede movilizarse y replicarse.

Según los resultados, podemos concluir que el vector es incapaz de replicar dentro de las cepas de *Rhizobium* ya que el plásmido puede movilizarse de células S17.1 a DH5 α lo que descarta la posibilidad de que por tener un fragmento adicional, el plásmido no se movilice; el hecho de que el pMayGe pueda replicar tanto el de *R. etli*, como el de *R. meliloti* descarta la posibilidad de que la conjugación no se haya podido llevar a cabo, así como la posibilidad de que el fragmento seleccionado sea incapaz de replicar. Esto pudiera deberse a que el replicón básico esta clonado en una de las orillas del gene que codifica para la resistencia al antibiótico sin embargo el hecho de que el origen de replicación de *R. etli* también sea incapaz de replicar en el mismo vector aun estando clonado en el polilinker nos habla de que pudiera existir algún problema en el diseño de la construcción.

Otra observación importante es que las cepas de *E. coli* que portan el pGMOtH presentan deficiencias en su crecimiento lo que sugiere que la estancia de dicho plásmido dentro de la célula esta afectando alguna función relacionada con el crecimiento.

Para mejorar el pGMoTH se podrían seguir algunas sugerencias como :

- Cambiar el sitio de inserción del origen de replicación al polilinker o tal vez a un lado del fragmento *mob*.
- Cambiar el sitio *mob* por uno más pequeño para que el vector tenga un menor tamaño y sea más fácil su manipulación.

Otras actividades adicionales a este trabajo sería investigar acerca de porque se presenta un crecimiento deficiente en las bacterias portadoras del pGMoTH; podrían hacerse estudios para saber si este plásmido una vez que es capaz de replicar en las Rhizobias en vida libre también es capaz de hacerlo durante la nodulación, para así contar con una herramienta más en el estudio de la genética de estas bacterias.

FIGURAS

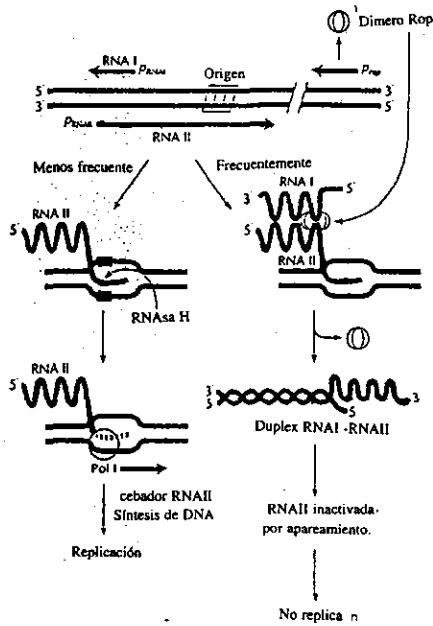


Figura 1. Modelo de regulación de la replicación por RNA.

Figura modificada de Snayder y Champness 1997.

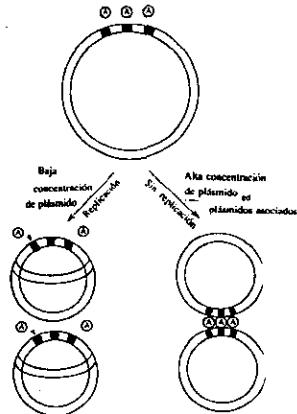


Figura 2. Modelo de regulación de la replicación por iterones.

Tomada modificada Snayder y Champness 1997.

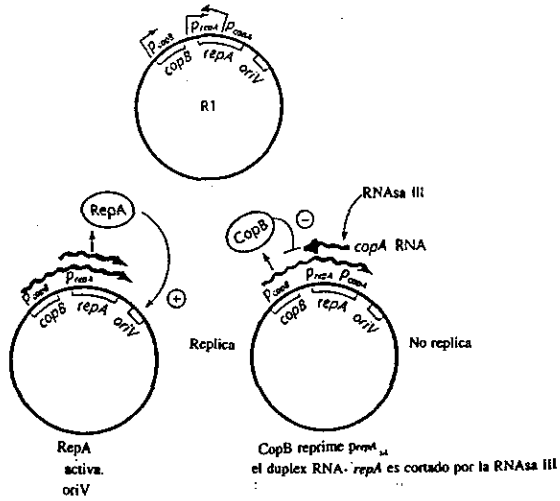


Figura 3. Modelo de regulación de la replicación por RNA y proteínas.
Figura modificada Snayder y Champness 1997.

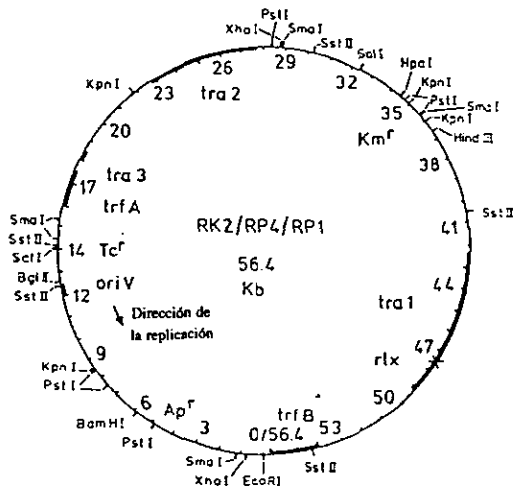


Figura 4. Mapa físico de plásmido RK2/RP4/RP1.
Figura tomada de Thomas Christopher M. 1980.

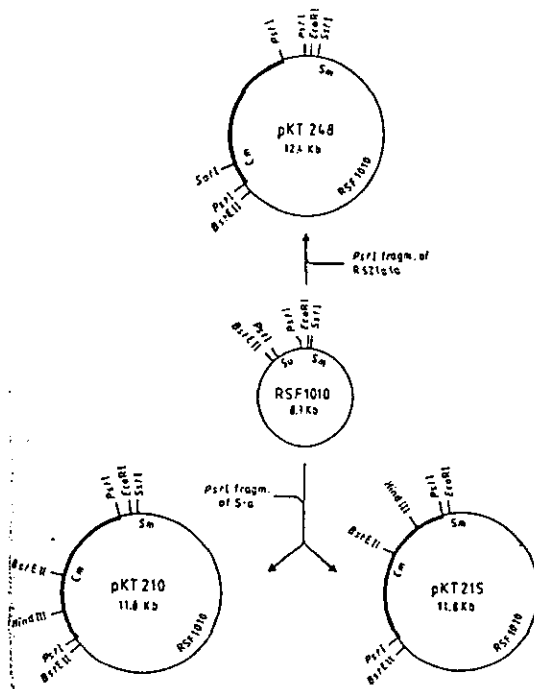


Figura 7

Figura tomada de Bagdasarian *et al.*, 1981.

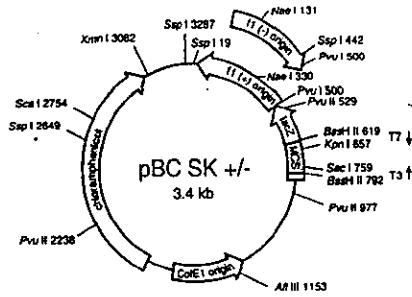


Figura 10. Mapa físico del pBluescript
 Figura modificada de Alting-Mees 1992.

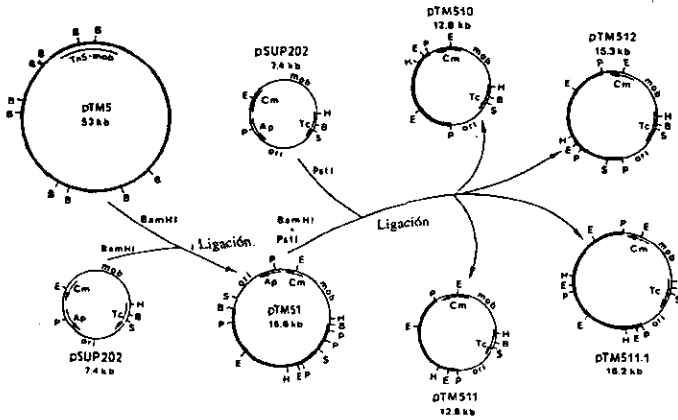


Figura 11. Derivados del pTM5.
 Figura tomada de Mozo Teresa *et al.*, 1990.

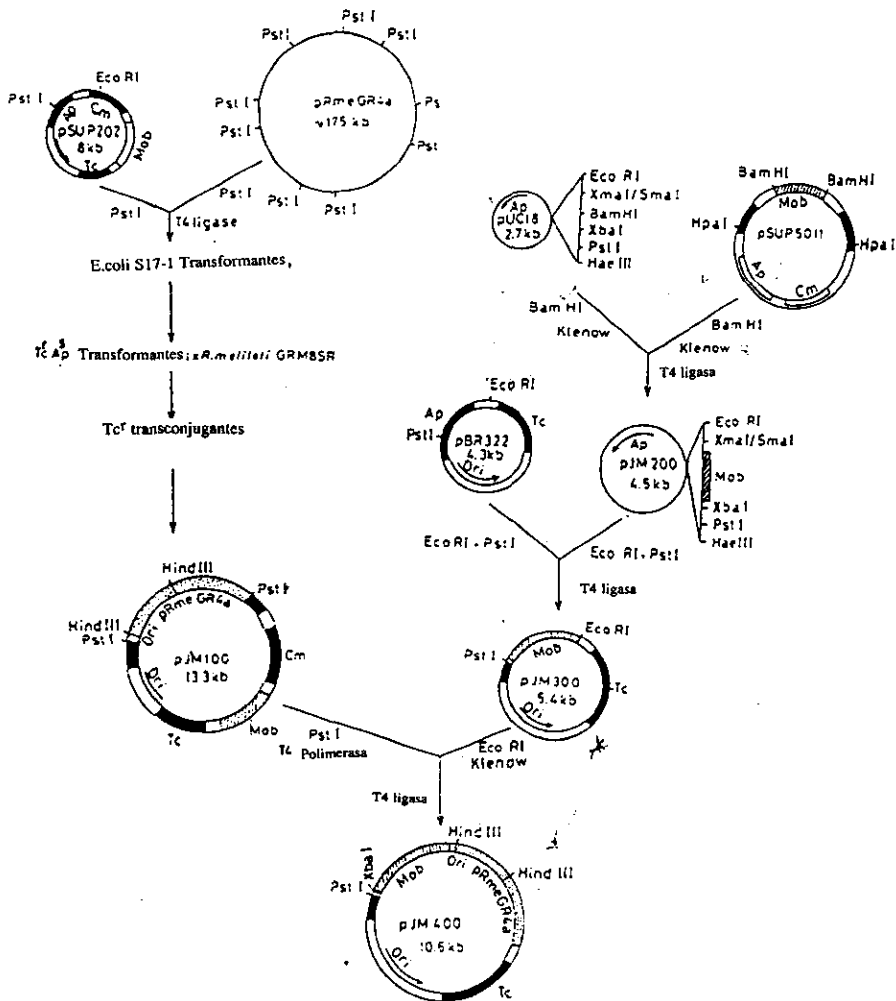


Figura 12. Construcción de los plásmidos pJM.

Figura tomada de Mercado-Blanco y Olivares 1993.

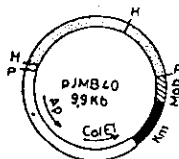


Figura 13. Mapa físico del plásmido pJMB40.

Figura tomada de Mercado-Blanco y Olivares 1993.

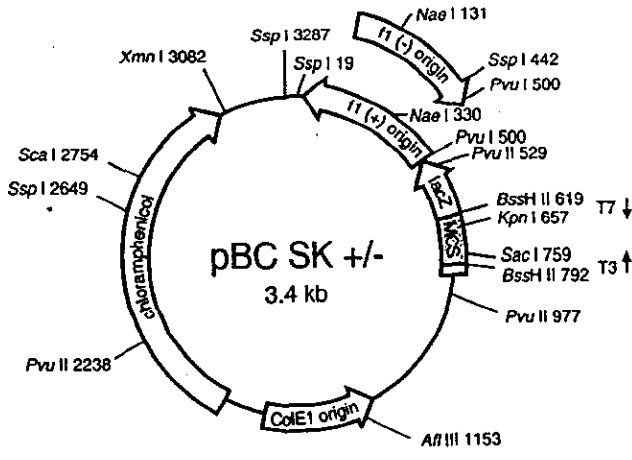


Figura 14. Mapa físico del plásmido pBC S/K +/-
 Figura tomada del Stratagene

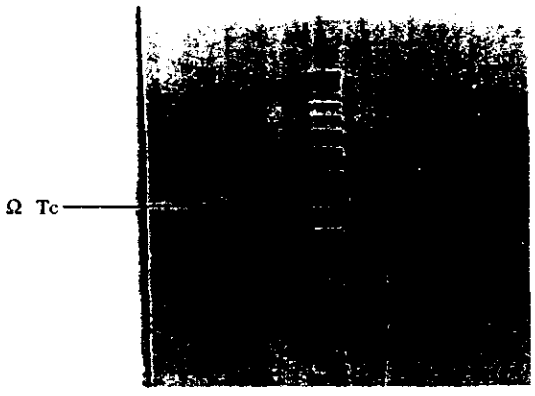


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa del cassette Ω tetraciclina

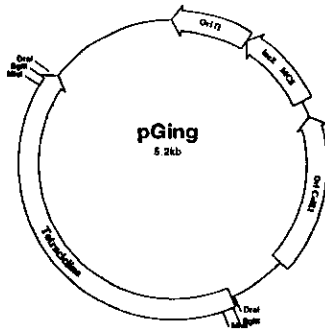


Figura 16. Mapa físico de pGing.

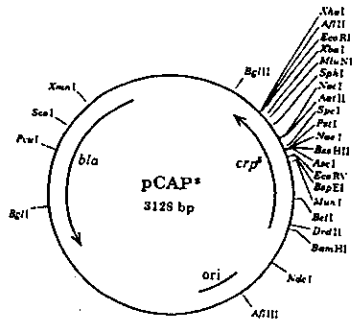


Figura 17. Mapa físico del pCAP's
Tomado de Amersham LIFE Science Kit

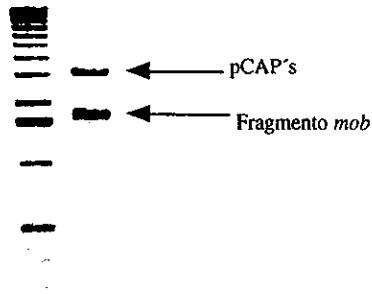


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión con *BamH* I del pmob's

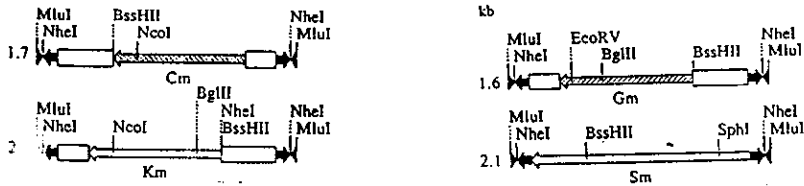


Figura 19. Representación de los cassettes Ω

Figura tomada de Alexeyed *et al.*, 1995

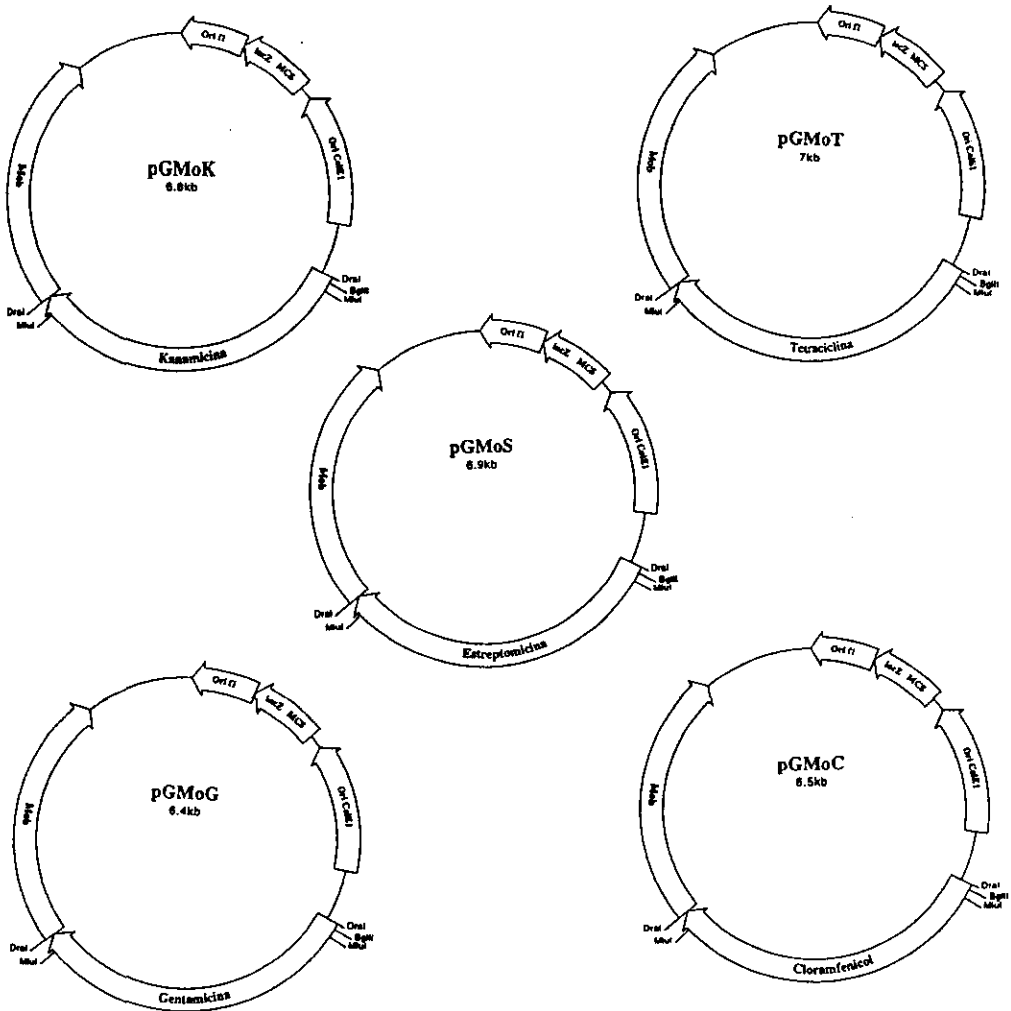


Figura 20. Mapas de la familia de vectores pGMo



Figura 21. Mapa del replicón básico del plásmido pRmeGR4a

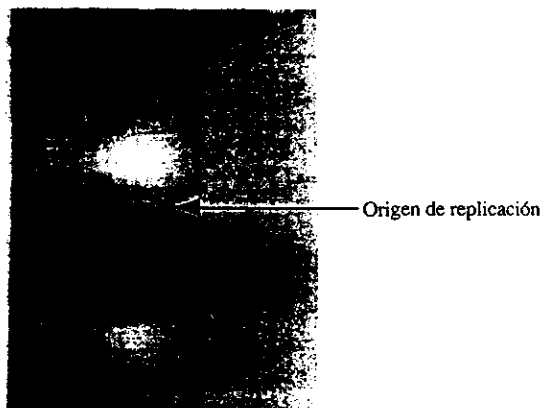


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa del replicón básico del plásmido pRmeGR4a

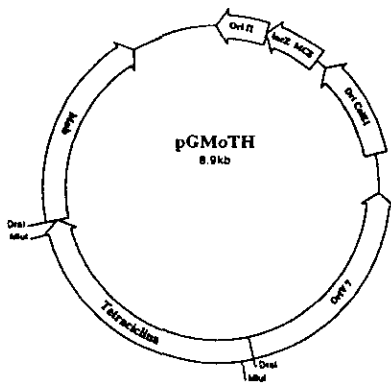


Figura 23. Mapa físico del pGMoTH

MEDIOS Y SOLUCIONES

LB

Peptona de caseína	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	10g
Agua c.b.p.	1000mL

(sólido: agar bacteriológico 15 g)

PY

Peptona de caseína	5g
Extracto de levadura	3g
Agua c.b.p.	1000mL

(sólido: agar bacteriológico 15g)

Solución 1

Glucosa 0.5 M	10.0mL
EDTA (pH=8) 0.5 M	2.0mL
Tris-HCl (pH=8) 2M	1.2mL
Agua	86.7mL

Solución 2

NaOH 10N	2mL
SDS 20% (w/v)	5mL
Agua	93mL

Solución 3

Acetato de potasio 5M	60mL
Agua	40mL

TE

EDTA	0.5M	4mL
Tris	2.5M	2mL
Agua		94mL

TAE 10%

Trizma-base	4.8g.
Acido acético	1.1mL
EDTA (pH8) 0.5M	20mL
Agua c.b.p.	1000mL

TAE 1%

TAE 10%	100mL
Agua c.b.p.	1000mL

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

BIBLIOGRAFÍA

- Amábile-Cuevas, C. F., and Chicurel, M. E. (1992) Bacterial plasmids and gene flux, *Cell* 70:189-199 .
- Altting-Mees, M.A., Sorge, J.A. and Short, J.M. (1992) pBluescript: multifunctional cloning and mapping vectors. *Methods Enzymol.* 216:483-495.
- Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N. and Croughan T. P. (1995) Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and *in vitro* deletion/insertion mutagenesis. *Gene.* 160:63-67.
- Bagdasarian, M., Lurz, R., Rückert, B., Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M.M., Frey, J., and Timmis, K.N. (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors. II Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene.* 16:237-247.
- Bolívar, F., Rodríguez, R. L., Greene, P. J., Betlach M. C., Heyneker, H. L., and Boyer, H. W. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II A multipurpose cloning system. *Gene.* 2:95-113.
- Brom, S., García-de los Santos, A., Stepkowsky, T., Flores, M., Davila, G., Romero, D., and Palacios, R. (1992) Different plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriology.* 174:5183-5189
- Brook, T. D. and Madigan, M. T. (1993) *Microbiología*. Prentice Hall Hispanoamericana. New Jersey pp
- Cohen, S. N. (1993) Bacterial plasmids: their extraordinary contribution to molecular genetics *Gene.* 135:67-76.
- Cava, J. R., Elias, P. M., Turowski, D. A., and Noel, D. K. (1989) *Rhizobium leguminosarum* CFN42 genetic regions encoding lipopolysaccharide structures essential for complete nodule development on beans plants. *J. Bacteriology.* 171:8-15
- Ditta G., Schmidhauser, T., Yakobson, E., Lu, P., Liang, X., Finlay, D. R., Guiney, D. and Helinski, D.R. (1985) Plasmid related to the broad host range vector, pRK290. Useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid.* 13:149-153
- Espinoza, M., Del Solar, G., Rojo, Fernando and Alonso, J. (1995). Plasmid rolling circle replication and its control. *FEMS Microbiol. Lett.* 111-120
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., et al. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science.* 28:496-512.
- Franklin, C. F. (1985) Broad host cloning vector for gram negative bacteria. DNA cloning. vol 1 a practical approach. D.M. Glover. IRC Press. 165-184.

- Fraser, C. M., Gocayne, J. D., White, O., Adams, M. D., Clayton, R. A., Fleischmann, R. D., Built, C. J., Kerlavage, A. R., Sutton, G., Kelley, J. M., et al. (1995) The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalum*. *Science*. 20:397-403.
- García-de los Santos, A., Brom, S. (1997) Characterization of two plasmid-borne *lpsb* loci of *Rhizobium etli* required for lipopolysaccharide synthesis and for optimal interaction with plants. *The am. phytopathol. soc.* 10:891-902.
- García-de los Santos, A., Brom, S., and Romero, D. (1996) *Rhizobium* plasmid in bacterial-legume interactions. *Word journal of microbiology*. 12:119-125.
- Griffin, H. G. and Griffin Annette Griffin M. (1994) PCR Technology Current Innovations. 1-27 .CRS Press Inc.
- Honeycutt, R. J., McClelland, M., and Sobral, B.W. (1993) Physical map of the genome of *Rhizobium meliloti* 1021. *J.Bacteriology*. 175:6945-6952.
- Lovett, M. A. and Helinski, D. R. (1976) Method for the isolation of the replication region of bacterial replicon: construction of a mini-F'Km plasmid. *J.Bacteriology*. 127:982-987
- Maloy, S. R., Cronan, J. E. Jr. and Freifelder D. (1994) Microbial Genetics. Jones and Barlett Publishers. USA . 213-237
- Margolin, W., and Long, S. R. (1993) Isolation and characterization of DNA replication origin from the 1700 kilobases-pair symbiotic megaplasmid pSym of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriology*. 175:6553-6561.
- Mercado-Blanco, J., and Olivares, J. (1993) Stability and transmissibility of de cryptic plasmids of *Rhizobium meliloti* GR4. *Arch microbiol*. 160:477-485
- Mercado-Blanco, J. and Olivares, J. (1994) The large nonsymbiotic plasmid pRmeGR4a of *Rhizobium meliloti* GR4 encodes a protein involved in replication that has homology with the RepC protein of *Agrobacterium* plasmids. *Plasmid*. 32:75-79.
- Mozo, T., Cabrera, E. and Ruiz-Argüeso T. (1990) "Isolation of the replication DNA region from *Rhizobium* plasmid and examination of its potential as a replicon for Rhizobiaceae cloning vectors." *Plasmid*. 23:201-215.
- Novick, R. P. (1987) Plasmid incompatibility. *Microbiol. rev.* 51:381-395.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T., (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold spring harbor laboratory, NY.
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983) Vector plasmids for in vivo and in vitro manipulations of Gram negative bacteria. Molecular genetics of the bacteria-plant interaction. pp 90-106.
- Simon, R., and Priefer, U. (1990) Vector technology of relevance to nitrogen fixation research. In: Gresshoff PM ed molecular biology of symbiotic nitrogen fixation. CRC Press Boca Raton FL pp 13-49.

Snyder, L., and Champness, W. (1997) Molecular genetics of bacteria. Ed. ASM Press USA 105-126.

Stratagene (1995) Stratagene cloning systems:Product catalog. Pp 330.

Summer, D. K. (1996) The biology of plasmid. Blackwell Science.USA.pp 1-200

Thomas, C. M. (1981) Molecular genetics of broad host range plasmid RK2.*Plasmid*. 5:10-19.

Timmis, K., Cabello, F., and Cohen, S.N. (1975) Cloning and characterization of replication regions of complex plasmid genomes. *Proc.Nat Acad Sci*. 72:2242-2246

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vector and host strain: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. 33:103-119.