

03088

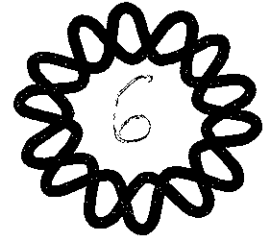


UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



**Diseño y construcción de sistemas genéticos  
para la regulación concertada de genes  
cromosomales en *Escherichia coli***

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

Presenta:

**Beatríz Palmeros Sánchez**

Cuernavaca, Morelos

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



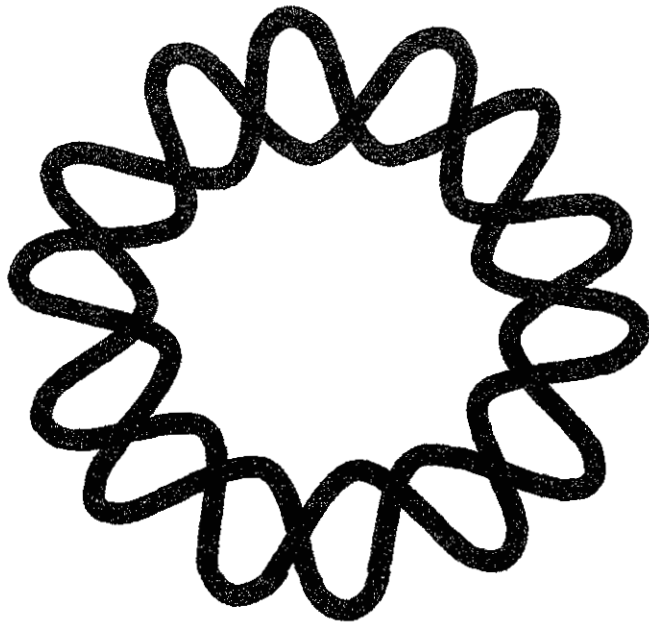
**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

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

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

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

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN



**ESTE TRABAJO DE TESIS SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA U.N.A.M., BAJO LA ASESORÍA Y DIRECCIÓN DE LOS DRES. FRANCISCO G. BOLÍVAR ZAPATA Y FERNANDO VALLE BAHEZA. Y, SE CONTÓ CON EL APOYO ECONÓMICO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) A TRAVÉS DE LA BECA 114530, Y DE LA COMPAÑÍA GENENCOR INC.**

## AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS

A todos y cada uno de los miembros del jurado por la revisión de este trabajo, así como por sus valiosos comentarios y sugerencias. A los Drs. Francisco Bolívar y Fernando Valle por su asesoría, apoyo y dirección de este trabajo; a Paco Bolívar por la confianza y paciencia que me permitió llegar al final. A los Drs. Gabriel Guarneros Peña y F. Xavier Soberón Mainero, que además de participar como cotutores de este proyecto doctoral, siempre aportaron ideas y críticas constructivas no solo para el desarrollo del mismo sino para mi formación académica.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Soberón, con quien inicié este viaje fantástico al que llamo "hacer investigación" y para el cual, además, me facilito el equipaje..... Gracias Gloria por tu confianza y amistad.

Al personal técnico y administrativo del laboratorio Bolívar-antes Valle/ahora Gosset que con su trabajo de todos los días nos ayudan a salir adelante y a alcanzar nuestras metas. Un profundo agradecimiento a Mercedes Enzaldo "Mechita" por las mil y una soluciones, los muchos geles de secuencia y los varios cientos de cajas que preparó para que pudiera realizar mis experimentos. Además, un reconocimiento al compromiso y respeto que tiene tanto por su trabajo como por el nuestro.

A todos mis compañeros de laboratorio y de estudio, a los de ayer y a los de ahora, a los unos y a los otros, porque cada uno de ellos de una u otra forma me ha enseñado algo..... Un agradecimiento aparte a cada amiga y amigo de hoy y de siempre, y a los que no necesito nombrar de manera individual, porque cada cual sabe lo que significa para mí. GRACIAS por su amistad, entusiasmo, apoyo, cariño, consejos..... por estar y ser como son, Uds. hacen las diferencias de cada día vivido.

## DEDICATORIAS

*A JULIETA..... MI MADRE,*

*A MI FAMILIA,*

*A LA CIENCIA*

*AI CONOCIMIENTO Y A LA CONCIENCIA*

*Y DESDE LUEGO QUE.....*

*¡ A LA VIDA !*

“ CON FRECUENCIA, UNO ENCUENTRA SU DESTINO  
SIGUIENDO LAS VEREDAS QUE TOMAMOS PARA EVITARLO “

LA FONTAINE  
EN “ FABLES ”

POR ESO TENGO QUE VOLVER  
A TANTOS SITIOS VENIDERS  
PARA ENCONTRARME CONMIGO  
Y EXAMINARME SIN CESAR,  
SIN MÁS TESTIGO QUE LA LUNA  
Y LUEGO SILBAR DE ALEGRÍA  
PISANDO PIEDRAS Y TERRONES,  
SIN MÁS TAREA QUE EXISTIR,  
SIN MÁS FAMILIA QUE EL CAMINO

PABLO NERUDA

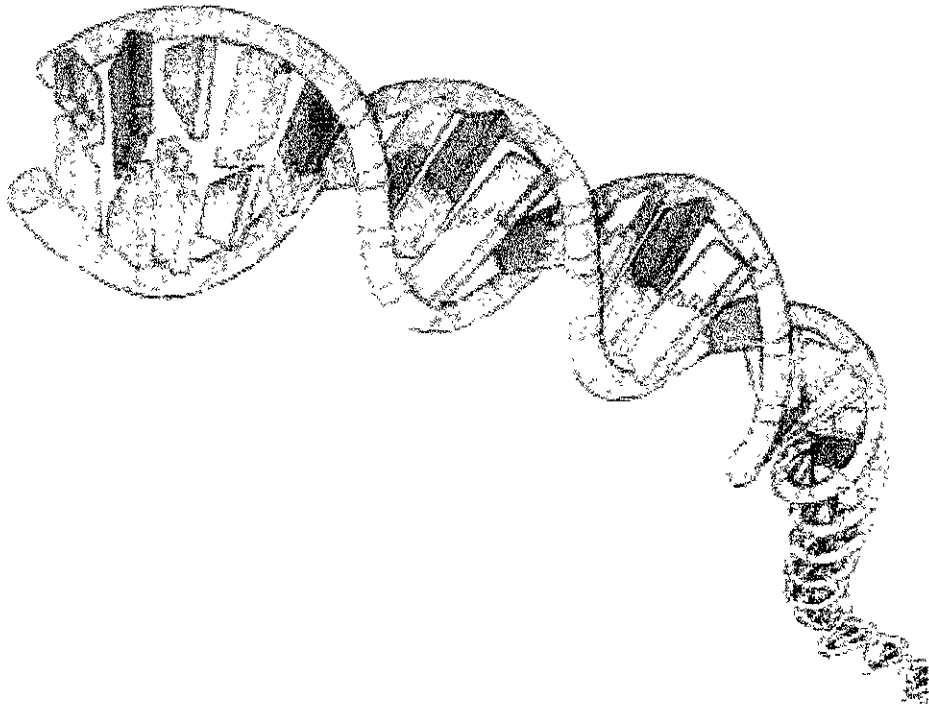
FIN DE MUNDO (EL VIENTO)

# INDICE GENERAL

	PÁG.
<b>I. RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	4
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	6
<b>III. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE SISTEMAS DE RECOMBINACIÓN Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA</b>	12
<b>IV. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN</b>	30
<b>V. OBJETIVOS:</b>	
Objetivos Generales	41
Objetivos Particulares	41
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	43
<b>VII. RESULTADOS:</b>	55
<b>VII-A. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS EN ARTÍCULOS PUBLICADOS</b>	56
a) A family of removable cassettes designed to obtain antibiotic-resistance-free genomic modifications of <i>Escherichia coli</i> and other bacteria	57
b) pBRINT-T <sub>s</sub> : a plasmid family with a temperature-sensitive replicon, designed for chromosomal integration into the <i>lacZ</i> gene of <i>Escherichia coli</i>	68
c) Improvement of the pBRINT-T <sub>s</sub> plasmid family to obtain marker -free chromosomal insertion of cloned DNA in <i>E. coli</i>	76
<b>VII-B. RESULTADOS ADICIONALES</b>	80
a) Construcción y caracterización de un sistema genético para eliminar genes de resistencia a antibióticos	81
b) Construcción y mejoramiento de una familia de vectores termo-sensibles para obtener inserciones cromosomales en <i>E. coli</i>	85
c) Construcción y caracterización de un sistema genético para regular de manera simultánea y concertada diferentes genes en <i>E. coli</i> :	
c.1. Construcción y caracterización de los promotores $P_{RM}$ mutante ( $P_{RMUD}$ ) y $P_{RM}$ silvestre ( $P_{RMWT}$ )	86
c.2. Construcción de los casetes para regular la expresión genética utilizando los promotores $P_{RM}$ del bacteriófago lambda	91
c.3. Construcción del casete de regulación de la expresión genética	



con el promotor $P_L$ del bacteriófago lambda	92
c.4. Obtención del sistema genético para expresar el gen que codifica la proteína reguladora $cI$ del bacteriófago lambda.	94
c.5. Regulación de la expresión del gen $lacZ$ a partir de los promotores $P_L$ y $P_{RM}$ silvestre y mutante del bacteriófago lambda	96
<b>VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	102
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b>	111
<b>X. ANEXOS</b>	122
Anexo A. Abreviaturas	123
Anexo B. Números asignados a las secuencias de los plásmidos depositadas en "EMBL Nucleotide Sequence Database"	128
Anexo C. Solicitudes de envío de los plásmidos construidos por diferentes laboratorios	133



# RESUMEN

I

El presente trabajo de investigación se enmarca dentro del desarrollo de herramientas moleculares que permitan lograr la modificación de genes a nivel del cromosoma bacteriano, y se inició como una respuesta a la necesidad de eliminar los problemas asociados a la presencia de plásmidos multicopia y también a los genes de resistencia a antibióticos que permanecen en el genoma de las bacterias modificadas genéticamente. Este hecho, además de que implica la dificultad para seleccionar modificaciones adicionales que se requieran incorporar a un microorganismo previamente modificado, también dificulta la aceptación de estas cepas en procesos de producción, no sólo por la presencia de genes heterólogos, sino también por el incremento en la posibilidad de que se lleve a cabo la dispersión y transferencia horizontal de estos genes (Mikkelsen *et al.*, 1996).

En este trabajo se desarrolló un conjunto de herramientas moleculares que permiten modificar directamente genes en el cromosoma bacteriano, sin dejar marcadores de resistencia a antibióticos en las cepas modificadas. Este sistema se basa en el uso de la recombinasa Cre del bacteriófago P1 y sus secuencias blanco o sitios de recombinación *loxP* (Sauer, 1994b), así como en la utilización de plásmidos que sólo pueden replicarse en un fondo genético determinado o bajo condiciones de crecimiento específicas (Kaniga *et al.*, 1991; Kornberg and Baker, 1992; Miller and Mekalanos, 1988). Para lograr lo anterior, se construyeron tres casetes de resistencia escindibles colocando un sitio *loxP* y sitios de clonación múltiple (MCS) a cada lado de los genes *cat*, *aacC1* y *ntpII* que codifican para la resistencia a cloranfenicol (Cm), gentamicina (Gm) y kanamicina (Km), respectivamente. Al mismo tiempo, se construyó el vector pJW168 para expresar la recombinasa Cre de forma controlada. El sistema genético se caracterizó, se probó y se validó interrumpiendo los genes *lacZ* y *galE* de *Escherichia coli* por la inserción *in vitro* de uno de los casetes construidos (Cat2). Una vez que los genes interrumpidos se insertaron en el cromosoma de la cepa W3110T<sup>+</sup> de *E. coli* por medio de recombinación homóloga doble, los genes de resistencia fueron eliminados eficientemente por medio de recombinación sitio-específica después de expresar la recombinasa Cre. De esta manera los marcadores de resistencia a antibiótico fueron removidos, mientras que los genes *lacZ* y *galE* quedaron interrumpidos por un sitio *loxP* remanente y sin la permanencia del gen de resistencia a antibiótico. Así, el sistema Cre/*loxP* del fago P1 permitió eliminar el marcador de resistencia a antibiótico después de utilizarlo para seleccionar las células con la(s) modificación(es) deseada(s). Este sistema genético se ha utilizado con éxito para

obtener remociones, interrupciones génicas e inserciones cromosomales en varias cepas de *E. coli* y en otras especies de bacterias Gram-negativas.

En este trabajo, también se planteó un nuevo enfoque en la modificación y mejoramiento genético de cepas que se utilizan en procesos industriales para la obtención de algún compuesto de origen biológico. Además de las modificaciones que se incorporan a un microorganismo para interrumpir una(s) vía(s) metabólica(s) que compite(n) por intermediarios metabólicos necesarios para la síntesis del compuesto de interés; en este esfuerzo se contempló una forma de redistribuir los flujos de carbono en las vías del metabolismo bacteriano, modificando la regulación de la expresión de uno o varios genes involucrados en algunos de los pasos clave del metabolismo central de *E. coli*, como por ejemplo los genes *pyA* y *pykF* que codifican las isoenzimas que catalizan la conversión del fosfoenolpiruvato a piruvato en la vía glicolítica.

Utilizando los promotores  $P_L$  y  $P_{RM}$  y el represor  $cI$  del bacteriófago lambda (Gussin *et al.*, 1983; Roberts and Devoret, 1983), así como los casetes removibles de resistencia a antibióticos construidos en la primera parte de este trabajo, se diseñaron y construyeron un grupo de casetes que permiten sustituir el promotor silvestre de uno o mas genes específicos por uno de los promotores del bacteriófago lambda, con la finalidad de regular la expresión de dichos genes a través de la proteína reguladora  $cI$  (Ptashne, 1992). La caracterización y análisis de la expresión genética a partir de los casetes de expresión construidos, se llevó a cabo utilizando como modelo a la proteína  $\beta$ -galactosidasa. Para esto, el gen estructural *lacZ* se fusionó *in vitro* con cada uno de los promotores construidos, y se cuantificó la actividad enzimática de  $\beta$ -Gal en condiciones de inducción y represión. Como resultado de este trabajo, se construyó un grupo de herramientas moleculares para modificar y controlar pasos clave en el metabolismo de *E. coli*, con el propósito de redirigir los flujos de carbono hacia la sobreproducción de metabolitos con interés industrial.

La información y los resultados experimentales obtenidos y presentados en este trabajo, se utilizaron para escribir y publicar tres artículos en revistas internacionales con arbitraje. Así mismo, hay información relevante que no ha sido publicada y que también forma parte de esta tesis, y con la cual se piensa integrar al menos otro artículo.

## A B S T R A C T

The present experimental work is framed on the area of the genetic modification encoded on the bacterial chromosome, and it began as an answer to the necessity to eliminate the problems associated with the presence of multicopy plasmids and of multiple resistance genes on genetically modified bacteria. This strategy not only permits the use of markers to select additional modifications into a previously modified microorganism, but the important advantage of enabling the construction of strains that are accepted for large scale production of recombinant products since heterologous genes have a lower probability of being dispersed by horizontal transfer (Mikkelsen *et al.*, 1996).

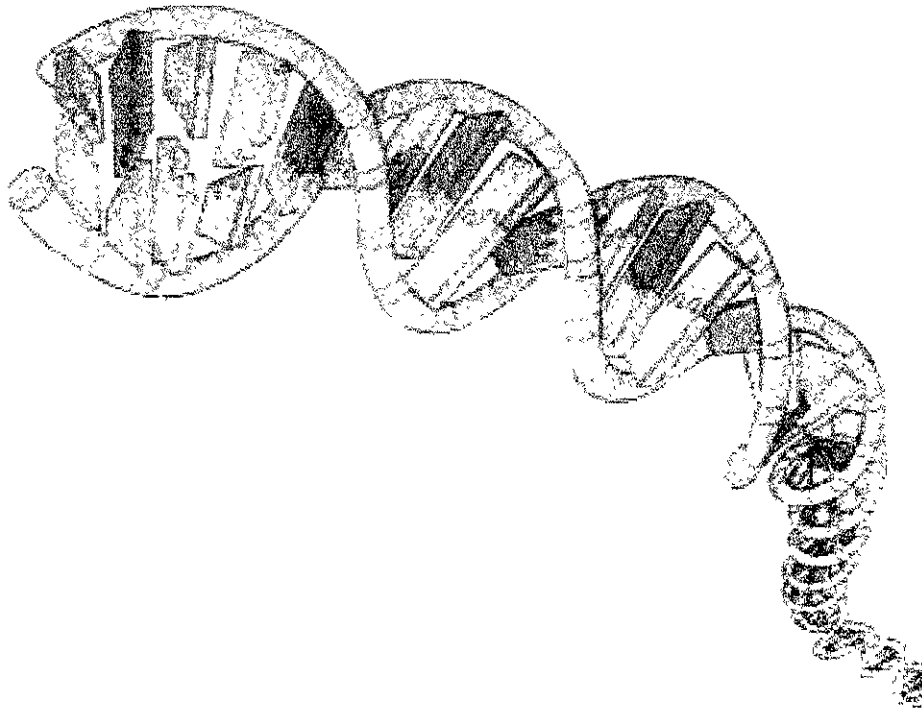
In this work, a group of molecular tools was developed to modify genes in the bacterial chromosome without leaving antibiotic resistance markers in the modified strain(s). This system is based on the use of the Cre recombinase of the bacteriophage P1 and their target sequences or *loxP* sites (Sauer, 1994b), as well as on the utilization of plasmids that would only replicate in special backgrounds or under specific growth conditions (Kaniga *et al.*, 1991; Kornberg and Baker 1992; Miller and Mekalanos, 1988). Three removable antibiotic resistance cassettes were constructed placing a *loxP* site and a polylinker (MCS) in each side of *cat*, *aacC1* and *ntpII* genes, which encode for resistance to chloramphenicol (Cm), gentamycin (Gm) and kanamycin (Km), respectively; and also, pJW168 vector was constructed to express the Cre site-specific recombinase. To test and validate the constructed system, the *lacZ* and *galE* genes of *Escherichia coli* were interrupted *in vitro* by insertion of one constructed cassette (Cat2); once the interrupted genes were inserted into the *E. coli* W3110T<sup>+</sup> genome by double homologous recombination, the resistance gene was efficiently excised by site-specific recombination after expressing Cre. Thus the antibiotic resistance markers were removed, and the *lacZ* and *galE* gene remained interrupted by the retained *loxP* site. The Cre/*loxP* system from phage P1 allows removing the antibiotic resistance marker after using them to select the cells with the desired modification(s). This genetic system has been used with success to obtain genetic deletions, interruptions and chromosomal insertions in several strains of *E. coli* and other Gram-negative bacteria species.

In addition, we also generated new approach to the genetic modification and improvement of strains to be used in the production of different compounds at an industrial scale such as aromatic compounds, enzymes, therapeutic agents, proteins, etc.

This strategy is based on the generation of mutant strains with an interrupted metabolic pathway, which competed for the consumption of the metabolic precursors for the biosynthesis of the compound of interest. We also contemplated the redistribution of the carbon flows in the metabolic pathways through the modification of the expression of gene(s) involved in some of the key steps of *E. coli* central metabolism, such as genes encoding pyruvate kinase isoenzymes, PykA and PykF, which catalyzes the conversion of phosphoenolpyruvate to pyruvate on glycolysis pathway.

Utilizing the  $P_L$  and  $P_{RM}$  promoters and the  $cI$  repressor from bacteriophage lambda (Gussin *et al.*, 1983; Roberts and Devoret, 1983), as well as the removable antibiotics resistance cassettes constructed in the first part of this work, we have designed and constructed a group of expression cassettes that allow the substitution of a wild type promoter of a specific gene by one of the bacteriophage lambda promoters, with the purpose of regulating the expression of these gene through the  $cI$  regulatory protein (Ptashne, 1992). We have utilized the protein  $\beta$ -galactosidase as model to evaluate the genetic expression from the constructed cassettes. For this, the *lacZ* structural gene was fused *in vitro* with each constructed promoter. The regulation of the genetic expression starting from the mentioned promoters was determined by measuring the  $\beta$ -Gal enzymatic activity in induced and repressed conditions.

The information and experimental results obtained and presented in this work were utilized to write and to publish three scientific papers on international journals with arbitration. Also, we have additional information that is presented in this thesis, which could be published as an additional article at least.



# INTRODUCCIÓN

II

Hasta la primera mitad de este siglo, el conocimiento general que se tenía de los sistemas biológicos era a escala macromolecular. El descubrimiento, en la década de los 50s, de la estructura de doble hélice de la cadena del DNA (Watson and Crick, 1953), llevó a la determinación de que la información genética en todo ser vivo está dada en la secuencia de pares de bases en esta molécula; este hecho, señaló el inicio formal del conocimiento de los sistemas biológicos a nivel molecular (Biología Molecular). Las implicaciones de la estructura del DNA dilucidadas en los años siguientes, junto con el descubrimiento de los procesos en los cuales está involucrada esta molécula, así como la identificación y aislamiento de enzimas que tienen como sustrato al DNA, culminaron con el desarrollo de la ingeniería genética o tecnología del DNA recombinante, al inicio de los años 70s (Cohen *et al.*, 1973).

Desde su inicio, la tecnología del DNA recombinante se constituyó como una herramienta de investigación poderosa que ha coadyuvado a revolucionar el estudio y el manejo de los genes. La investigación en este campo avanza a una velocidad impresionante, por lo que proporciona recursos nuevos y mejores que llevan a generar una cantidad importante de conocimiento básico que a su vez permite un mejor entendimiento del funcionamiento de la célula viva a nivel molecular. Debido a que es posible aislar fragmentos de material genético que llevan genes específicos, unirlos a un vector molecular e introducirlos a una célula receptora donde pueden mantenerse y replicarse en grandes cantidades, ahora no sólo es factible realizar un análisis estructural y funcional detallado de los genes por separado, sino que también se pueden realizar modificaciones específicas en ellos. Así, la Ingeniería Genética puede definirse como el conjunto de técnicas y herramientas moleculares que permite el aislamiento, caracterización y modificación de genes, con la finalidad de efectuar el análisis genético de un organismo o lograr su mejoramiento para un fin determinado.

Como se mencionó, la tecnología del DNA recombinante se ha utilizado para el aislamiento de genes específicos y la expresión de éstos en una gran variedad de células huésped para producir proteínas y diversos compuestos con aplicaciones en el área médica, industrial, farmacéutica y alimenticia, tales como insulina, hormona del crecimiento, aminoácidos, interferón, etc. Además, esta metodología permite producir proteínas con modificaciones específicas en su estructura-función, para lo cual por lo general se utiliza uno de los dos métodos siguientes: **A.** En primer lugar, se identifica y aísla el gen que codifica la proteína de interés para alterarlo *in vitro* por medio de técnicas



de mutagénesis sitio-dirigida; y finalmente, el gen modificado se introduce en un huésped adecuado para expresarlo y obtener la nueva proteína que lleva los cambios deseados. **B.** Por medio de ingeniería genética, se combinan secciones de genes que codifican para los motivos que les confieren características diferentes o mejoradas a las proteínas que los portan, con la finalidad de obtener proteínas híbridas que ahora presentan propiedades nuevas.

Desde el punto de vista de la investigación básica, la facilidad con la que se pueden aislar y amplificar regiones delimitadas del genoma de cualquier ser vivo, ha sido muy útil para dilucidar, entre otras cosas, el funcionamiento básico de las vías metabólicas y la regulación de la expresión genética durante el ciclo de vida de las células. En microorganismos, los diferentes sistemas que perciben la disponibilidad de nutrientes y/o la presencia de condiciones de crecimiento favorables o adversas en el medio, coexisten en una red múltiple de regulación global que permite modular los mecanismos de control específicos para cada gen (Neidhardt, 1987). Debido a que el control de la expresión genética es un proceso complejo que involucra varios pasos, la capacidad de realizar modificaciones específicas en el material genético para alterar la regulación genética de algún(os) gen(es) en particular, ha permitido estudiar el papel de este gen o genes y su efecto sobre el funcionamiento global de la célula.

Por otra parte y desde el punto de vista de la investigación aplicada, a través de la modificación o ingeniería genética de vías metabólicas ha sido posible alterar el metabolismo celular, obligando a las células a sobre-producir metabolitos de interés, tales como compuestos aromáticos, enzimas, etc. (Bogosian *et al.*, 1990; Flores *et al.*, 1996). En los últimos años, las tecnologías utilizadas para la producción de algunos fármacos, así como de compuestos químicos empleados como materia prima para generar otros productos con valor agregado mayor, tienden a ser sustituidas por el empleo de organismos y en particular microorganismos modificados genéticamente como maquinarias biosintéticas. Lo anterior ha permitido cambiar los métodos y estrategias de producción a nivel industrial, los cuales en este caso, conllevan el empleo de condiciones de fermentación altamente específicos. Así, los procesos químicos tradicionales están siendo sustituidos por procesos nuevos, que además de emplear microorganismos recombinantes, pretenden ser una alternativa más amigable para el ambiente, porque minimizan y en algunos casos eliminan la producción de los compuestos contaminantes generados en los procesos de síntesis química. Resumiendo, muchos de los esquemas de

producción novedosos utilizados actualmente se sustentan en la aplicación de la ingeniería genética, mediante el aislamiento de genes específicos, su caracterización, modificación y expresión en organismos homólogos o heterólogos, desarrollando microorganismos con capacidades biosintéticas nuevas o mejoradas.

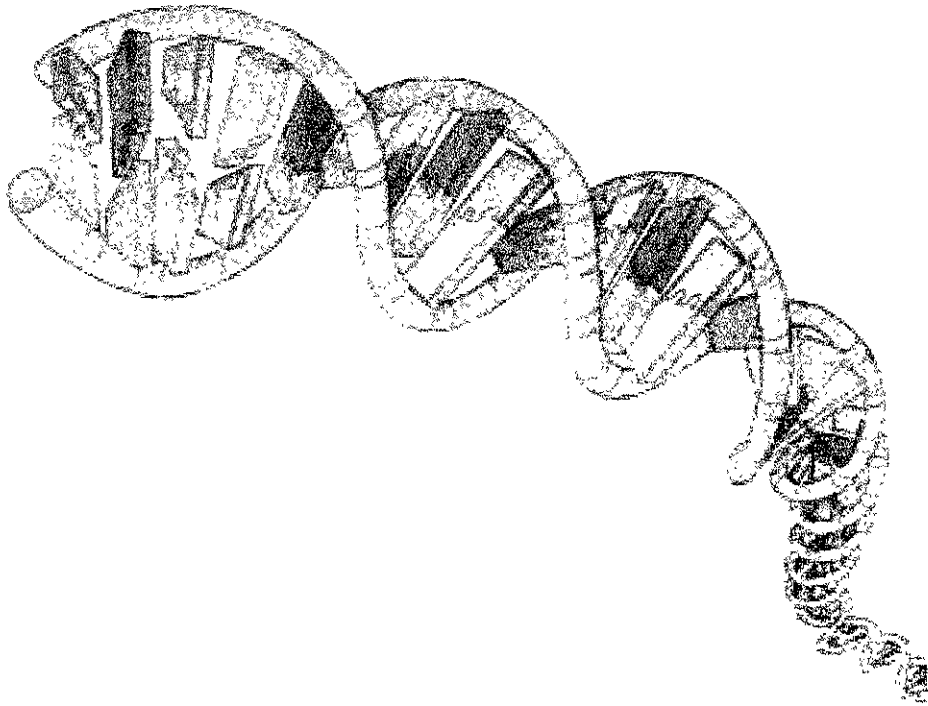
A pesar de que los pasos requeridos durante la clonación de un gen en particular (purificación de cromosoma o plásmido, restricciones y modificaciones, hibridaciones, inmuno-detecciones, síntesis de oligonucleótidos, etc.) se han vuelto rutinarios y se cuenta con numerosas enzimas de restricción-modificación del DNA e infinidad de estuches que permiten manipular el material genético de cualquier organismo, el diseño y desarrollo de estrategias y proyectos de clonación molecular y expresión de genes en diferentes huéspedes y en diferentes *loci* cromosomales, aún son retos específicos que hay que resolver de forma individual para lograr el desarrollo exitoso de cualquier proyecto de investigación, tanto básico como aplicado.

Lo que se ha descrito líneas arriba, de alguna manera sustenta el hecho de que muchos de los avances significativos alcanzados en diferentes actividades científicas, son el resultado del diseño y utilización de herramientas y métodos novedosos. En este sentido, el Comité de los Premios Nóbel ha reconocido los esfuerzos realizados en el desarrollo de técnicas y herramientas, precisamente porque éstas poseen un enorme poder de transformación sobre algún campo de la investigación que influye directamente en varios aspectos de la Ciencia. Algunos de los científicos e investigadores galardonados con Premios Nóbel en diferentes áreas son: **A.** En Química en 1993, Kary B. Mullis por inventar el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y Michael Smith por el método de mutagénesis sitio-dirigida basada en oligonucleótidos; en 1991, Richard R. Ernst por su contribución al desarrollo de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear de alta resolución (NMR); en 1982, Sir Aaron Klug por desarrollar el microscopio electrónico cristalográfico y elucidar la estructura de complejos biológicamente importantes formados de ácidos nucleicos y proteínas; en 1980, Paul Berg por estudiar la bioquímica de los ácidos nucleicos pero en especial el DNA recombinante, y Walter Gilbert y Frederick Sanger por desarrollar los métodos para determinar la secuencia de bases en el DNA; en 1960, Willard F. Libby por el método para determinar la edad utilizando carbono-14; en 1952, Archer J.P. Martin y Richard L.M. Synge por inventar la cromatografía de partición. **B.** En Física en 1986 a Ernst Ruska por su trabajo en óptica electrónica y por diseñar el primer microscopio electrónico; en 1953 a Frederik Zernike

por demostrar el método de contraste de fase, pero especialmente por inventar el microscopio basado en esta metodología. **C.** En Medicina y Fisiología en 1979 a Alan M. Cormack y Sir Godfrey N. Hounsfield por desarrollar la tomografía computarizada; en 1977 a Rosalyn Yalow por desarrollar el método de radioinmunoensayo (<http://www.nobel.se/index.html>).

Un ejemplo del papel que tienen las técnicas y herramientas en el desarrollo de las ciencias, es la publicación del primer borrador del genoma humano (Lander *et al.*, 2001, <http://www.nature.com/genomics/human/index.html>; Venter *et al.*, 2001, <http://www.sciencegenomics.org/content/vol291/issue5507/>), la cual provocó un impacto enorme en el ámbito científico debido a las repercusiones que tendrá, a corto y mediano plazo, en el conocimiento sobre la especie humana. Éstos primeros resultados, se lograron gracias al esfuerzo conjunto de diferentes grupos de investigación amalgamados en dos consorcios: Human Genome Project (HGP) y Celera. La búsqueda de la secuencia del genoma humano y de otros organismos, no sólo pretende conocer la información genética contenida en ellos, sino que su objetivo final es descifrar y entender su funcionamiento de manera global; y utilizar el conocimiento adquirido para tratar de solucionar, entre otras cosas, problemas relacionados con la salud. Los resultados obtenidos hasta ahora, se deben en gran parte al apoyo de metodologías novedosas que se han desarrollado en paralelo con el vertiginoso avance del conocimiento, iniciado con el descubrimiento de la estructura de doble hélice del DNA por Watson y Crick hace apenas 50 años. Entre estas metodologías destacan: la secuenciación automatizada; la electroforesis en “campos pulsados” (pulsed field electrophoresis); la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); el desarrollo de vectores YACs (yeast artificial chromosome) y BACs (bacterial artificial chromosome) para clonar fragmentos muy grandes de DNA cromosomal; la electroforesis capilar; la técnica de micro-hileras (microarrays); la secuenciación capilar; el desarrollo del algoritmo de computo BLAST que sirve para alinear secuencias y comparar genes; GRAIL y ESTs (Expressed Sequence Tag) para encontrar genes y genes expresados; los programas de interpretación automática de datos de secuencia, phred, y para ensamblar secuencias, phrap (Roberts *et al.*, 2001). Además, de otras técnicas como: la detección de secuencias de DNA específicas por medio de hibridación DNA-DNA (Southern blotting) o DNA-RNA (Northern blotting); detección de proteínas con anticuerpos específicos (Western blotting y ELISA); despliegue de proteínas en fagos (Phage display), etc.

Los métodos y las herramientas como tal, generalmente están sujetos a una evolución y un mejoramiento permanentes, por lo que su refinamiento se vuelve un aspecto importante del quehacer científico y tecnológico. A su vez, los intentos de mejoramiento de las herramientas y métodos científicos revelan, muchas veces, nuevos fenómenos que demandan el planteamiento de hipótesis nuevas que a su vez enriquecen el campo del conocimiento particular en el que se aplican. Así, queda claro que la evolución conjunta del avance científico y el desarrollo de técnicas y herramientas utilizadas en la solución de problemas planteados por el conocimiento, además de que se potencian y retroalimentan entre sí, contribuyen de manera incuestionable en el progreso de la Ciencia y la Tecnología.



**CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE  
SISTEMAS DE RECOMBINACIÓN Y  
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA**

**III**

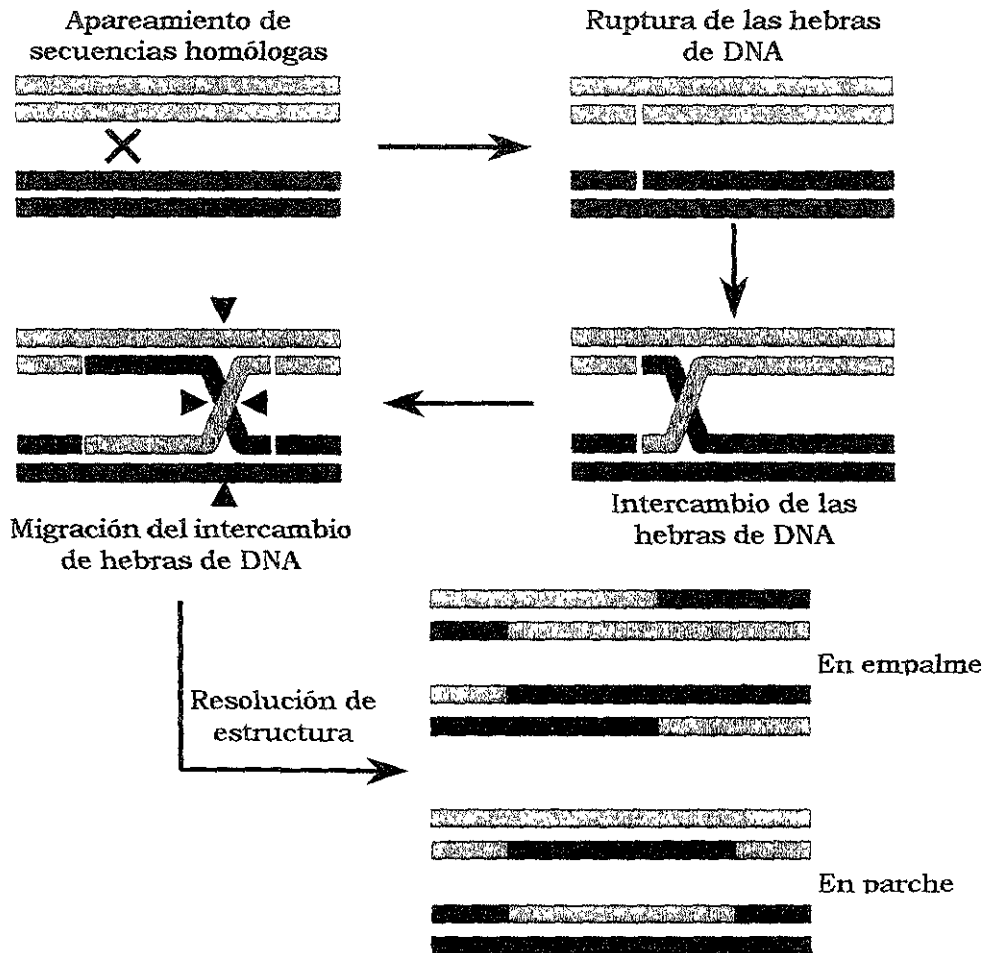
## RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA O GENERALIZADA.

La transferencia de información genética de un organismo a otro, ya sea por conjugación, transducción o transformación, es un fenómeno que ocurre en la naturaleza. Este fenómeno, aunado a la habilidad de recombinar dicha información dentro de una de las moléculas de DNA del organismo receptor, por lo general el cromosoma o algún plásmido, permite a los seres vivos mantener y expresar de forma estable la información genética recién adquirida. Estas características, intrínsecas a cualquier célula, se utilizan en el laboratorio con la finalidad de modificar genéticamente un microorganismo y lograr un propósito específico.

La recombinación entre dos moléculas de DNAs homólogas, como se mencionó antes, es un proceso presente en cualquier célula viva y su función ha sido asociada, principalmente y entre otros fenómenos, con la evolución de los cromosomas, ya que continuamente suceden rearrreglos de secuencias del genoma o genes o partes de genes tanto intra- como inter-cromosómicamente (Hawley, 1988). Además, la recombinación disminuye la divergencia de secuencias de DNA repetidas, guía la segregación adecuada de los cromosomas en la división celular y promueve la reparación del DNA dañado. En general, en organismos procariotes se encuentra íntimamente relacionada con los eventos de replicación y reparación del DNA (Mahajan, 1988; Radman, 1988), mientras que en eucariotes ocurre durante la meiosis, oogénesis o espermatogénesis (Giroux, 1988).

El evento de recombinación homóloga o general es el resultado de una serie de procesos enzimáticos específicos que ocurren entre moléculas de DNA del mismo o diferente origen, y depende fundamentalmente de la presencia de secuencias idénticas o con una homología extensa y de cierta longitud mínima, 100 pb o mayores en procariotes y más de 300 pb en eucariotes (Shen and Huang, 1986). Durante la realización de este proceso en *E. coli*, la proteína RecA es el protagonista principal. Aparte de esta enzima, se han definido tanto para *E. coli* como para levaduras y eucariotes superiores otras proteínas Rec que participan en recombinación homóloga y en otras vías de recombinación relacionadas, como son RecBCD, RecE, RecF, RecT, SbcA, SbcB entre otras. La recombinación generalizada no es un proceso al azar, sino que involucra el intercambio físico de segmentos homólogos entre los DNAs participantes. El mecanismo de este proceso se basa en la complementariedad de las hebras sencillas de los DNAs; cuando la complementariedad de bases es reconocida por ciertas proteínas involucradas en el proceso de la recombinación, el intercambio de los segmentos inicia con el

rompimiento de las hebras de DNA, continúa con el entrecruzamiento de las secuencias homólogas y finaliza con la formación de la unión entre ellas. Se han propuesto varios modelos para explicar el proceso por el cual se lleva a cabo la recombinación homóloga, uno de ellos es el modelo de Holliday mostrado en la Figura 1.



**Figura 1.** Modelo de Holliday que esquematiza los posibles mecanismos moleculares involucrados en la recombinación homóloga. Tomada de Lloyd and Low, 1996.

Las características importantes de la recombinación homóloga entre dos moléculas de DNA o en un solo DNA y que son relevantes para el trabajo experimental, están las siguientes: **1.** La recombinación ocurre en sitios específicos presentes en la(s) molécula(s) de DNA participante(s); **2.** La recombinación es recíproca; ambos productos resultantes son híbridos ya que una parte de su secuencia proviene de una secuencia parental y la otra parte de la segunda secuencia parental; **3.** La recombinación es conservativa; el

intercambio de las cadenas sencillas de DNA se logra por el rompimiento y unión precisa de las moléculas, sin quitar ni añadir un solo nucleótido en el punto de intercambio; **4.** Como las moléculas participantes comparten una región de homología, las hebras complementarias forman una región heteróloga doble (heteroduplex) en el sitio donde ocurre el intercambio de las hebras sencillas; **5.** La recombinación homóloga es más eficiente cuando ocurre entre trechos largos de DNA, que cuando ocurre entre DNAs cortos o que tienen poca homología entre ellos; y **6.** La frecuencia de recombinación no es constante en todo el genoma y está influenciada por efectos tanto locales como globales.

La recombinación homóloga doble se utiliza con éxito para modificar, integrar e intercambiar genes en el cromosoma de diferentes microorganismos, como *E. coli* (Balbás *et al.*, 1993; Balbás *et al.*, 1996; Hamilton *et al.*, 1989; Murphy, 1998; Murphy *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1998). Para esto, el segmento de DNA o construcción genética que se desea insertar en el genoma de la célula huésped se coloca entre fragmentos de DNA homólogos al sitio de integración seleccionado (secuencia blanco) y que tengan el tamaño adecuado para que se lleve a cabo el evento de recombinación de manera eficiente. La ventaja principal de utilizar este proceso como sistema de modificación génica, es que permite determinar el sitio donde se realiza la inserción de la modificación deseada.

## RECOMBINACIÓN SITIO-ESPECÍFICA.

La recombinación sitio-específica es un proceso de intercambio genético recíproco muy eficiente, y que a diferencia de la recombinación homóloga se lleva a cabo entre secuencias de DNA muy cortas, las cuales en algunas ocasiones muestran poca homología en sus secuencias. Este tipo de recombinación genética se lleva a cabo por medio de la participación de una o más proteínas específicas para cada sistema, y no requiere de la participación de la proteína RecA u otras proteínas involucradas en la recombinación generalizada. Este tipo de recombinación ocurre en sitios muy específicos y bien definidos presentes en los DNAs participantes (sitios de recombinación), los cuales tienen una región corta de secuencia idéntica. Como en la recombinación homóloga, el intercambio genético se realiza por una ruptura precisa en los sitios blancos de recombinación y la unión de las hebras de DNA sin pérdida ni ganancia de un solo nucleótido (Craig, 1988; Nash, 1996). El ejemplo clásico de recombinación sitio-específica



en procariotes, está dado por la integración y escisión del genoma circular de ciertos bacteriófagos, como lambda, dentro del cromosoma bacteriano. Sin embargo, la lista de funciones en las que están involucrados diferentes sistemas de recombinación sitio-específica incluyen: el mantenimiento y estabilización de plásmidos en alto número de copias (plásmido 2  $\mu$ m de *Saccharomyces cerevisiae*); la resolución de cointegrados generados durante el establecimiento de transposones como Tn3; el control del rango de huésped del fago Mu; la expresión de genes para la fijación de nitrógeno durante la diferenciación de cianobacterias (*Anabaena*); la expresión de los genes que codifican para los antígenos flagelares de *Salmonella typhimurium*; la resolución fiel de los dímeros replicativos del fago P1. En la Tabla 1 se mencionan algunos de los sistemas de recombinación sitio-específica conocidos.

**Tabla 1.** Sistemas de recombinación sitio-específica

Recombinasa:	Origen:	Función:	Sitio blanco:
Int	Fago lambda	Integrasa	<i>attP</i> , <i>attB</i>
Int	Fagos $\phi$ 80, P22, P4	Integrasa	<i>att</i>
RES	Transposón $\gamma\delta$ y Tn3	Resolvasa	<i>res</i>
RES	Tn21, Tn501, Tn1721	Resolvasa	<i>res</i>
ParA	Plásmido RP4 (sistema <i>mrs</i> )	Resolvasa	<i>res</i>
Cre	Fago P1	Recombinasa	<i>loxP</i>
Flp	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Recombinasa	<i>FRT</i>
R	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Recombinasa	RSs
Kw	<i>Kluyveromyces waltii</i>	Recombinasa	<i>kw</i>
Cer	Plásmido ColE1	Recombinasa	<i>cer</i>
Hin	<i>Salmonella typhimurium</i>	Invertasa	<i>inv</i>
Gin	Fago Mu	Invertasa	<i>inv</i>
Pin	<i>E. coli</i>	Invertasa	<i>inv</i>

Aunque la característica distintiva de la recombinación sitio-específica es realizar la recombinación recíproca entre dos secuencias de DNA de tamaño mínimo, los

rearrreglos promovidos entre los DNAs participantes por este mecanismo son diferentes. Debido a lo anterior, su uso no sólo ha permitido eliminar fragmentos muy grandes de DNA y mejorar la expresión genética (Backman, 1987), sino que también son muy útiles para obtener inserciones, deleciones e inversiones (Sauer, 1994b). Además, la utilización de diferentes sistemas de recombinación sitio-específica para manipular el genoma, de unos años a la fecha se ha incrementado considerablemente porque permiten manipular el DNA tanto *in vivo* como *in vitro*, y por que estos sistemas son funcionales en organismos tan diversos como bacterias, levaduras, plantas, insectos y células de mamíferos (Kilby *et al.*, 1993).

A pesar de que se han caracterizado y descrito varios sistemas de recombinación sitio-específica, sólo algunos de ellos se utilizan extensamente en la modificación del genoma de diversos organismos y entre ellos destacan: a). El sistema FRT/Flp de *S. cerevisiae* utilizado para activar genes en células de mamífero (O’Gorman *et al.*, 1991), para generar mutaciones múltiples y reciclar marcadores en levadura (Storici *et al.*, 1999), para generar deleciones y amplificaciones de fragmentos genómicos grandes (Pósfai *et al.*, 1994; Wild *et al.*, 1998), para insertar o eliminar fragmentos específicos de DNA del cromosoma de diferentes bacterias (Cherepanov and Wackernagel, 1995; Hoang *et al.*, 1998); b). El sistema *loxP*/Cre del fago P1 utilizado para escindir y rehusar marcadores de selección en levadura (Sauer, 1994a), para insertar y recuperar DNAs específicos del cromosoma bacteriano (Hasan *et al.*, 1994), para manipular animales transgénicos (Metzger and Feil, 1999; Schmidt *et al.*, 2000), para insertar modificaciones génicas en levadura (De Antoni and Gallwitz, 2000) y eucariontes superiores (Brecht *et al.*, 1999); c). El sistema *attP*/Int del bacteriófago  $\lambda$  que se ha utilizado para promover deleciones de fragmentos específicos de DNA (Zubko *et al.*, 2000), para generar inserciones cromosomales múltiples (Diedrich *et al.*, 1992; Peredelchuk and Bennett, 1997); d). El sistema *res*/RES del transposón  $\gamma\delta$  utilizado para obtener deleciones (Higgins *et al.*, 1996); e). El sistema *mrs* (multimer resolution system) del plásmido RP4 utilizado para escindir genes insertados en el cromosoma de *Pseudomonas putida* y otras especies Gram-negativas (Kristensen *et al.*, 1995), así como para remover el marcador de resistencia después de seleccionar la interrupción de diferentes genes en el cromosoma de *E. coli* (Denome *et al.*, 1999).

**EL SISTEMA CRE/LOXP DEL BACTERIOFAGO P1.** El sistema de recombinación sitio-específica Cre/*loxP* del bacteriófago P1 fue descrito en los 80's (Abremski *et al.*, 1983; Sternberg and Hamilton, 1981). Este sistema es funcional durante el ciclo de replicación de este fago, ya que la recombinasa Cre es la responsable de resolver los dímeros replicativos que se forman durante la duplicación de su material genético. Los dos elementos que componen este sistema son: una secuencia de DNA corta y asimétrica o sitio de recombinación designado *loxP* (locus of crossover in P1) y una proteína de 38 kDa, la recombinasa Cre (cyclization recombination). Cada sitio *loxP* consiste de una secuencia de 34 pb, compuesta de dos secuencias invertidas repetidas de 13 pb separadas por una región central asimétrica de 8 nucleótidos (Fig. 2).



**Figura 2.** Secuencia nucleotídica de un sitio *loxP*

La recombinación inter- o intramolecular entre dos sitios *loxP* localizados en DNA superenrollado, circular o lineal, únicamente requiere de la presencia de la proteína Cre, y a diferencia del sistema de lambda (*Int/attP*), no requiere factores adicionales ni del huésped ni del fago. La interacción de la recombinasa Cre con el DNA en su sitio blanco *loxP* se lleva a cabo en forma de dímeros, para lo cual una molécula de esta proteína se une en cada una de las secuencias repetidas invertidas más 4 pb de la región espaciadora. Después de que un dímero de Cre se une a un sitio *loxP*, otro dímero de Cre localiza y se une a un segundo sitio *loxP*, corta el DNA en la región espaciadora y después de llevar a cabo el intercambio de las hebras, vuelve a unir el DNA. El evento de recombinación es independiente de la orientación relativa de los sitios *loxP* sobre el DNA (Hoess *et al.*, 1982 y 1986). Así, la recombinación entre dos sitios *loxP* localizados en la misma molécula de DNA y dispuestos con la misma orientación, provoca que el fragmento de DNA localizado entre ellos se escinda como una molécula circular; los productos de este evento de recombinación llevan un sitio *loxP* completo cada uno (Fig. 3). En cambio, el evento de recombinación entre dos sitios *loxP* localizados en la misma molécula de DNA y dispuestos en orientación contraria provoca que el fragmento de DNA comprendido entre ellas se invierta (Fig. 4).

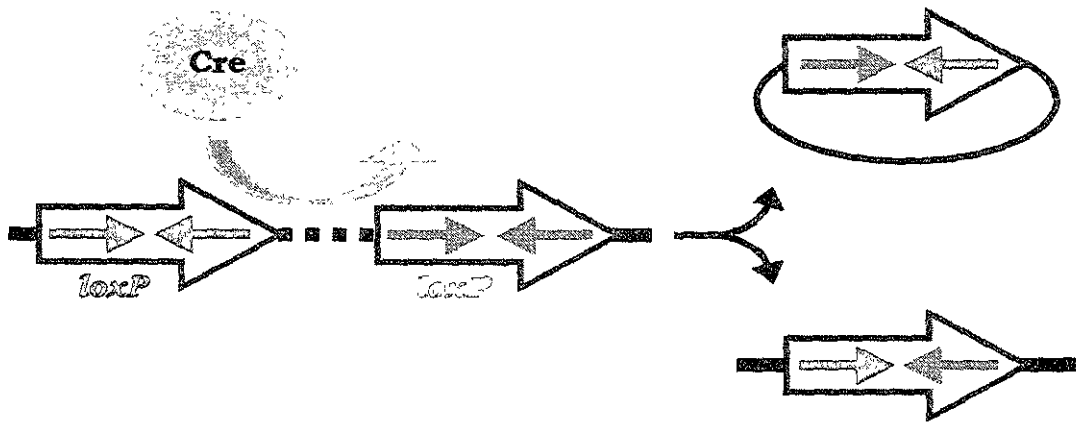


Figura 3. Recombinación entre dos sitios *loxP* con la misma dirección.

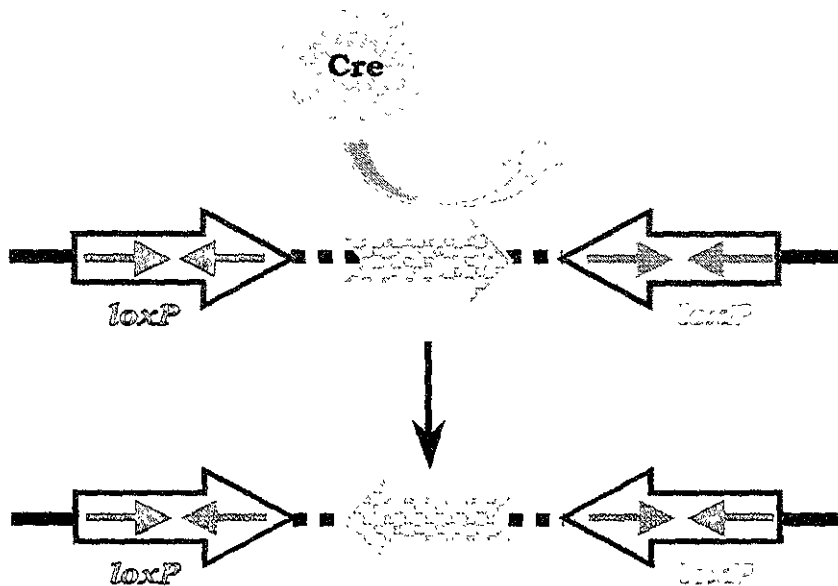


Figura 4. Recombinación entre dos sitios *loxP* con dirección contraria.

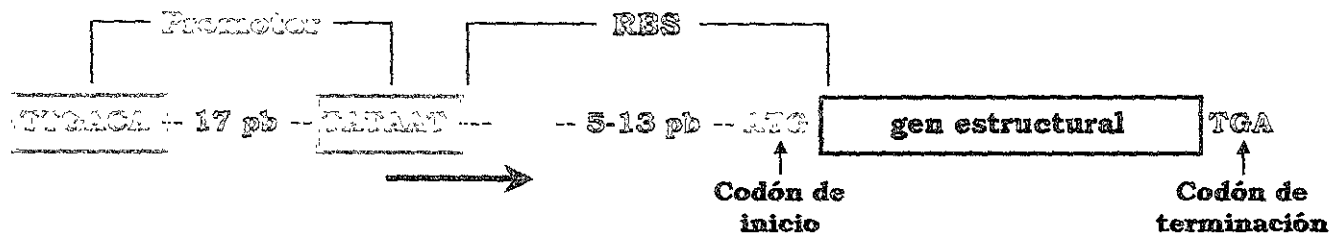
La recombinasa Cre, además de llevar a cabo la recombinación entre sitios *loxP* localizados en la misma molécula de DNA (recombinación intramolecular), puede llevar a cabo la recombinación entre sitios *loxP* localizados en moléculas de DNA diferentes; en éste último caso, una de las moléculas de DNA participantes queda insertada dentro de la otra molécula (recombinación intermolecular).

## REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA.

La regulación de la expresión genética, es un proceso que se lleva a cabo en todas las etapas de la cascada de eventos que conducen a la síntesis de una proteína en particular, durante el ciclo de vida de un organismo y en un momento determinado. Éste proceso involucra señales a nivel del DNA (v. gr. promotores, operadores, etc.), RNA (v.gr. sitios de procesamiento, sitio de unión a ribosoma, sitios de empalme en el RNA mensajero de eucariotas, etc.) y proteínas (v.gr. sitios de procesamiento postraduccion, como los de glicosilación y fosforilación), las cuales son reconocidas por las moléculas involucradas en cada uno de los pasos que inician con la transcripción de un gen y terminan con la síntesis y procesamiento de la proteína codificada por dicho gen. Hasta hace poco tiempo, la mayoría de los estudios realizados sobre regulación genética se habían hecho a nivel de las señales presentes en el DNA y a nivel transcripcional (Makrides, 1996). Con respecto a la última etapa de la expresión genética, conocida como traducción, los conocimientos eran limitados, pero últimamente se han incrementado considerablemente. Esto, quizá se debió al hecho de que los eventos que actúan en los niveles superiores de la cascada de la expresión genética (regulación transcripcional) usualmente tienen efectos más notorios, mientras que los eventos que ocurren en los últimos niveles de la expresión de genes (regulación traduccional) son más sutiles, pero no por eso menos importantes.

Para obtener la expresión eficiente de cualquier gen en *E. coli*, es necesario colocarlo bajo el control de las señales que reconoce la maquinaria de transcripción y traducción del huésped, además de que se requiere que las señales de inicio de la transcripción y de la traducción sean adecuadas para obtener el nivel de expresión requerido, y estén en la posición correcta con respecto al inicio de la secuencia codificadora (Yasueda and Matsui, 1994). La combinación adecuada de las señales necesarias para que se lleve a cabo la transcripción y la traducción de un gen, así como la presencia de las moléculas reguladoras, casi siempre permiten obtener su expresión a niveles altos. El diseño y construcción de un sistema genético para expresar un gen en *E. coli*, debe de incluir al menos las siguientes señales: **1.** Región codificadora o gen estructural de la proteína de interés; **2.** En el extremo 5' las regiones reguladoras para el inicio de la transcripción y la traducción: Promotor, Secuencia Shine-Dalgarno (SD) y un codón de inicio de la traducción, generalmente ATG aunque también puede ser GTG o TTG, a una distancia adecuada del SD; y **3.** En el extremo 3' las regiones reguladoras

para la terminación de la transcripción y al menos un codón para el término de la traducción (TAA, TGA o TAG). Los elementos necesarios para que se lleve a cabo la expresión de un gen se muestran en la Figura 5, donde se utiliza el promotor híbrido  $P_{tac}$  como ejemplo.



**Figura 5.** Representación esquemática de los elementos necesarios para la expresión óptima de un gen. Como ejemplo, se muestran las características del promotor híbrido *tac*. La flecha indica la dirección de transcripción.

El **promotor** es la secuencia que reconoce la RNA-polimerasa en el DNA, como señal para iniciar la síntesis del RNA mensajero (transcripción). En *E. coli* los promotores se encuentran ubicados entre 10-100 pb arriba del RBS. Cada promotor contiene dos secuencias de seis nucleótidos cada una, las cuales están ubicadas alrededor de 35 y 10 pb arriba del sitio de inicio de la transcripción, caja -35 ó  $5'TTGACA^3'$  y caja -10 ó  $5'TATAATg^3'$  (Pribnow box), las cuales están separadas por 16-18 pares de bases. La "fuerza" de un promotor es directamente proporcional a la semejanza que tiene con respecto a la secuencia consenso reportada. Sin embargo, la fuerza real del promotor *in vivo* es el resultado de interacciones más complejas que existen entre regiones del DNA hacia arriba y hacia abajo del promotor. De acuerdo con su regulación los promotores pueden ser: **1.** Constitutivos, los que siempre permiten la transcripción del(os) gen(es) bajo su control y **2.** Regulados, los que únicamente permiten la expresión genética en condiciones ambientales y metabólicas específicas. La regulación de la transcripción a partir de los promotores tipo **2**, se lleva a cabo por la unión de proteínas específicas en determinadas secuencias localizadas dentro o muy cerca del promotor, las cuales actúan como activadores (regulación positiva, +) o represores (regulación negativa, -).

Hacia abajo del promotor se localiza una región de 39-54 nucleótidos conocida como el **sitio de unión a ribosoma** (RBS), la cual comprende: un trecho de polipurinas o secuencia **Shine-Dalgarno** (SD), una secuencia rica en A+T que separa el SD del codón de inicio de la traducción, y el codón de inicio de la traducción, generalmente AUG o menos

frecuentemente GUG o UUG. La secuencia consenso del SD,  $5'AAGGACG3'$ , es complementaria a una secuencia altamente conservada en el extremo 3' del RNA ribosomal 16S,  $3'UCCUCC5'$ , y permite la formación de un complejo entre el RNA mensajero y la sub-unidad ribosomal 30S, con lo que se establece el primer paso en la síntesis de proteínas o traducción (Hüttenhofer and Noller, 1994). La distancia que hay del SD al codón de inicio de la traducción tiene una longitud que varía dentro de un rango de 5 a 13 nucleótidos, y se ha determinado que esta distancia afecta la eficiencia del inicio de la traducción (Chen *et al.*, 1994). Debido a que la formación de estructura secundaria en el transcrito del mRNA puede reducir la eficiencia del inicio de la traducción, las regiones alrededor del SD y del codón de inicio de la traducción deben de tener una secuencia de nucleótidos que evite o al menos disminuya la posibilidad de que se forma una estructura de horquilla que impida la interacción de la sub-unidad ribosomal 30S con el SD; un contenido alto en adeninas en las regiones 5' y 3' del RBS evitan la formación de estructura secundaria en el mRNA (Schauder *et al.*, 1989).

Como se mencionó anteriormente, además del promotor y el RBS localizados hacia arriba de la región codificadora, hacia abajo de esta región en su extremo 3', están ubicados uno o más **codones de término de la traducción** y en posición más distal, el **terminador de la transcripción** (TT). De los tres codones de término, TAA (UAA en el mRNA) seguido por T (U) es el más eficiente en *E. coli* (Poole *et al.*, 1995). En organismos procariotes, el término de la transcripción se lleva a cabo por dos mecanismos diferentes: **1.** La que depende de la proteína hexamérica Rho, la cual causa la liberación del transcrito de RNA; y **2.** La terminación Rho independiente que depende de señales codificadas en el templado, específicamente una región con simetría de díada que forma una estructura de tallo-anillo y una segunda región rica en A+T localizada de 4-9 pb de la secuencia de díada (Wilson and von Hippel, 1995). Adicionalmente, la estructura de horquilla que forma este tipo de terminador protege el mRNA de degradación exonucleolítica y por consiguiente, aumenta la vida media del transcrito (Ehretsmann *et al.*, 1992).

Como se revisó en párrafos anteriores, la regulación de la expresión de genes homólogos o heterólogos en un huésped como *E. coli*, depende de la combinación de diferentes señales y factores involucrados en este proceso; en consecuencia, la selección adecuada de cada uno de estos elementos, permitirá obtener los niveles de regulación genética requeridos para la expresión de genes de interés. Debido a que uno de los

elementos clave es el promotor, las características que en general se toman en cuenta para seleccionar el adecuado son las siguientes: que sea suficientemente fuerte para permitir que la proteína de interés represente entre el 10 y el 30% de la proteína total; que se encuentre bien controlado para que la actividad de transcripción basal sea mínima; y que se pueda inducir fácilmente y a un costo mínimo. Generalmente, se recomienda el uso de un promotor regulado e inducible (tipo 2, Pág. 21), el cual permite que la cepa huésped crezca a una densidad celular alta antes de inducir la expresión de los genes que codifican el producto deseado (Gold, 1990). Existen diferentes promotores que regulan de forma eficiente el inicio de la transcripción, por lo que se emplean para expresar genes de forma eficiente. Algunos de ellos se mencionan en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Algunos promotores homólogos y heterólogos utilizados para regular la expresión de genes en *E. coli*

Promotor:	Origen:	Regulador:	Inductor:
$P_{lac}$	<i>E. coli</i>	- producto del gen <i>lacI</i> + cAMP-CRP (CAP)	IPTG o lactosa
$P_{lacUV5}$	<i>E. coli</i>	- producto del gen <i>lacI</i> + cAMP-CRP (CAP)	IPTG o lactosa
$P_{trp}$	<i>E. coli</i>	- producto del gen <i>trpR</i> unido a L-triptofano	IAA o ausencia de triptofano
$P_{tac}$	Promotor sintético	- producto del gen <i>lacI</i>	IPTG o lactosa
$P_{tacII}$	Promotor sintético	- producto del gen <i>lacI</i>	IPTG o lactosa
$P_{trc}$	Promotor sintético	- producto del gen <i>lacI</i>	IPTG o lactosa
Promotor T7	Fago T7	- producto del gen <i>lacI</i> - $cI$ silvestre o $cI_{ts857}$	IPTG o lactosa Choque térmico
$P_R$	Fago lambda	- $cI$ silvestre o $cI_{ts857}$	Choque térmico
$P_L$	Fago lambda	- $cI$ silvestre o $cI_{ts857}$	Choque térmico

Algunos promotores inducibles como  $P_{lac}$  y  $P_{lacUV5}$ , están controlados negativamente por la proteína represora codificada por el gen *lacI* y positivamente por la proteína CRP o proteína receptora de AMP-cíclico (cAMP), también conocida como CAP (proteína activadora de catabolitos). La proteína CRP en presencia de AMP-cíclico forma el complejo CRP-cAMP y se une su secuencia blanco, con lo que estimula la interacción de la RNA-polimerasa con el promotor activando la transcripción. El represor impide la



transcripción a partir de estos promotores uniéndose a la región operadora, con lo que evita que la RNA-polimerasa lleve a cabo la transcripción. La inducción de la expresión genética a partir de estos promotores se lleva a cabo en presencia de lactosa, inductor natural de este promotor, o en presencia de compuestos químicos de bajo peso molecular como el IPTG, inductor gratuito, los cuales se unen al represor impidiendo que se una al operador. El promotor  $P_{lacUV5}$  se obtuvo por mutagénesis del promotor  $P_{lac}$ ; la mutación UV5 cambió la secuencia de la caja -10 del promotor silvestre a la secuencia consenso,  $5'TATAATg^3'$ , con lo cual se incrementó la fuerza de este promotor, debido a que los cambios favorecen la interacción de la RNA-polimerasa con el promotor nuevo (Reznikoff and Abelson, 1980).

Los promotores sintéticos híbridos  $P_{tacl}$  y  $P_{tacll}$  se construyeron con las secuencias de las cajas -35 del promotor  $P_{trp}$  y -10 del promotor  $P_{lacUV5}$  separadas por 16 pb, por lo que su regulación es similar a la que tienen los promotores que les dieron origen (Yasueda and Matsui, 1994). Ambos promotores son reprimidos por el represor del operón de lactosa, proteína codificada por el gen *lacI*, por lo que se inducen con lactosa o IPTG; como carecen del sitio de unión para CRP-cAMP son insensibles a represión catabólica. La transcripción a partir de los promotores  $P_{tacl}$  y  $P_{tacll}$  es dos y tres veces más eficiente que la mostrada por el promotor  $P_{trp}$  cuando se induce. Otro promotor híbrido,  $P_{trc}$ , es un derivado del promotor  $P_{tacl}$  que en lugar de tener las cajas -10 y -35 separadas por 16 pb, lleva la región espaciadora consenso de 17 pb; sin embargo, la actividad transcripcional de este promotor es similar a la del promotor  $P_{tacl}$ .

El promotor del operón de triptofano,  $P_{trp}$ , está regulado negativamente por el represor codificado por el gen *trpR*, el cual para ser activo debe estar unido a L-triptofano. El inductor químico para este promotor es el ácido indol-acrílico (IAA) que inactiva al represor impidiendo que se una con el triptofano. Otra forma de mantener activo a este promotor es eliminando el triptofano del medio de cultivo. En condiciones de inducción, la expresión a partir de este promotor es aproximadamente 70 veces mayor que la obtenida en condiciones sin inducción (Yansura and Henner, 1990).

Otras regiones promotoras utilizadas, son los promotores derecho e izquierdo del fago lambda ( $P_L$  y  $P_R$ ) que están controlados por la proteína represora  $\text{cl}$  silvestre o la mutante sensible a temperatura ( $\text{cl}_{ts857}$ ). El promotor  $P_L$  es un promotor muy fuerte e inducible, y a diferencia de otros promotores inducibles está completamente reprimido por el represor  $\text{cl}$ ; la inducción de este promotor se lleva a cabo eliminando la proteína

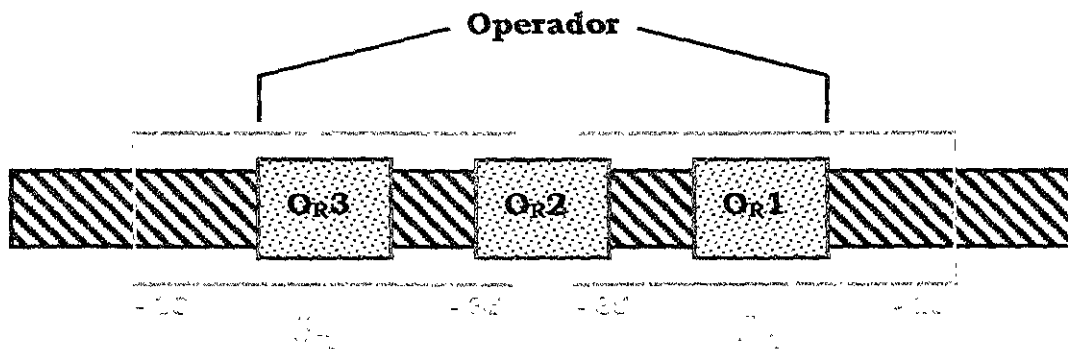
represora, ya sea por aumento en la temperatura cuando es termosensible o por proteólisis inducida con ácido nalidixico en cepas *RecA*<sup>+</sup>. La regulación más fina de la expresión genética a partir de promotores inducibles es la que se logra cuando el represor también está regulado, ya sea que esté codificado en el vector de expresión o insertado en el cromosoma, para evitar el efecto de titulación del represor. Mas adelante se comentará con más detalle el funcionamiento y uso de los promotores del bacteriófago lambda.

Un sistema de expresión genética útil, es el que emplea una combinación de uno de dos promotores del bacteriófago T7, los promotores de los genes 9 y 10, y la RNA-polimerasa que reconoce estos promotores. La RNA-polimerasa del fago T7 está codificada por el gen *I* y es un monómero de aproximadamente 98.8 kDa que además de reconocer de forma específica los promotores de este fago, una secuencia de 23 pb altamente conservada, es más activa que la RNA-polimerasa de *E. coli*. Como los promotores de T7 no son funcionales en los huéspedes utilizados para expresar genes, debido a que su secuencia no es reconocida por la RNA-polimerasa endógena, los sistemas de expresión basados en estos promotores incluyen un sistema genético para producir RNA-polimerasa de T7 activa. El sistema más utilizado, involucra la inducción de la expresión de una copia del gen *I* insertado en cromosoma y bajo la regulación del promotor *P<sub>lacUV5</sub>*; así, la expresión genética a partir de alguno de los promotores del fago T7 únicamente se lleva a cabo después de inducir la expresión de la RNA-polimerasa exógena que reconoce de forma específica a estos promotores e inicia de inmediato la transcripción (Studier *et al.*, 1990).

Actualmente, están disponibles varias regiones de inicio de la transcripción y de la traducción que pueden utilizarse en diferentes huéspedes para regular la expresión de uno o más genes. También, se encuentran disponibles diferentes regiones de terminación, las cuales pueden ser del mismo gen del que se tomaron las regiones de inicio de la transcripción o provenir de un gen diferente. Actualmente, no es posible predecir con certeza el grado en que se va a transcribir y traducir una región codificadora bajo la regulación dada por una combinación de determinado promotor, con cierto RBS y cierto terminador de la transcripción. Así, la construcción y funcionalidad de vectores quiméricos para la expresión controlada de genes, se desarrolla de manera específica para cada caso y su eficiencia se valora por ensayo y error. Para expresar un gen determinado, normalmente se coloca junto con algún gen cuyo producto está involucrado en la transcripción en un vector apropiado para introducirlos dentro del huésped de

expresión. Existe una gran cantidad de vectores, entre los que se puede seleccionar aquel que reúna las características necesarias para cubrir los requerimientos de cada caso. Dependiendo del vector utilizado, la construcción se puede mantener como elemento extracromosomal o integrarse dentro del cromosoma del huésped. Cuando se desea que haya integración en el cromosoma, es necesario que en la construcción exista una secuencia homóloga a una secuencia presente en el cromosoma del huésped; la selección de esta secuencia, se hace tomando siempre en cuenta que no codifique para alguna proteína indispensable para el crecimiento del huésped.

**LOS PROMOTORES  $P_L$  Y  $P_{RM}$  DEL BACTERIÓFAGO LAMBDA.** El bacteriófago lambda para replicarse necesita de manera obligada infectar a su célula huésped, *E. coli*. Inmediatamente después de infectar a la bacteria, puede seguir uno de dos modos de desarrollo: el lítico o el lisogénico. En el primero, las células infectadas producen muchas copias del fago y entonces se lisan liberando numerosas partículas virales infectivas. En el segundo, el cromosoma del fago se integra dentro del cromosoma de la célula huésped donde permanece en estado latente y se duplica pasivamente como parte del cromosoma bacteriano. El estado del fago dentro de la bacteria está controlado por una región promotora, la cual regula que continúe la expresión genética de las funciones de lisis o éstas se repriman y se inicie el establecimiento de lisogénia. La inhibición del modo de replicación lítico y el mantenimiento del estado lisogénico, se lleva a cabo en la región operadora tripartita  $O_R$  que es la región en el cromosoma del fago donde la proteína represora  $cI$  se une para controlar la transcripción divergente a partir de los promotores  $P_R$  y  $P_{RM}$  (Fig. 6).



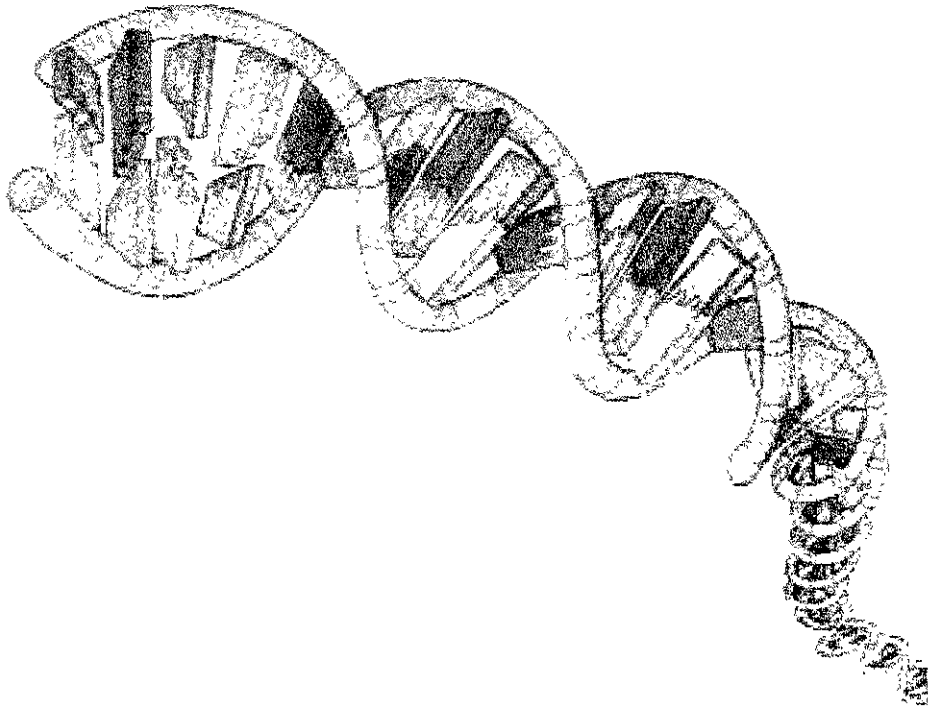
**Figura 6.** Región promotora  $P_{RM}/P_R$  y operador tripartida  $O_R$  del fago lambda.

Durante el estado lisogénico del fago el único gen que se expresa es el del represor  $cI$ , el cual en realidad es un regulador de la expresión genética tanto positivo como negativo. Este represor también controla otros promotores líticos ( $P_L$  y  $P_I$ ) y uno de ellos, el promotor  $P_L$ , está regulado de manera muy fuerte y efectiva por  $cI$  (Ptashne, 1992).

El represor  $cI$ , como ya se mencionó, es una proteína bi-funcional que actúa como regulador positivo y negativo de la expresión genética; este regulador además de interactuar con  $O_R$ , también interactúa con la región operadora  $O_L$ ; la estructura de éste segundo operador es igual a la de  $O_R$  (Fig. 6), solo que se encuentra ubicado en la región que contiene al promotor  $P_L$ , el cual tiene la misma dirección relativa que la que presenta el promotor  $P_R$  en su región promotora. La unión de la proteína  $cI$  en dos de las tres regiones del operador  $O_R$ ,  $O_{R1}$  y  $O_{R2}$ , mantiene inducida la expresión de su propio gen a partir del promotor  $P_{RM}$  y reprime la expresión del gen *cro* a partir del promotor  $P_R$ ; de la misma manera, la unión de  $cI$  en las regiones  $O_{L1}$  y  $O_{L2}$  del operador  $O_L$  mantiene apagados todos los genes de lambda que están bajo el control del promotor  $P_L$ . La unión del represor  $cI$  en forma de dímeros a los sitios de los operadores  $O_R$  y  $O_L$ , está determinada por la afinidad de esta proteína por la secuencia de nucleótidos de las tres regiones que forman estos operadores ( $O_{R1}$ ,  $O_{R2}$  y  $O_{R3}$ , y  $O_{L1}$ ,  $O_{L2}$  y  $O_{L3}$ ); la afinidad por el sitio  $O_1$  es mayor que por el sitio  $O_2$ , y la afinidad por este último es mayor que por  $O_3$ . Debido a la alta afinidad del represor  $cI$  por la secuencia presente en  $O_1$ , la unión de esta proteína en este sitio es 10 veces mas fuerte que la que se da en los otros dos, por lo que primero se une a este sitio y entonces por cooperatividad, facilita la unión de otro dímero de  $cI$  en  $O_2$  y finalmente en  $O_3$ .

El papel de la proteína  $cI$  como regulador positivo o negativo está determinado por la forma en que se da la interacción espacial y temporal de esta proteína con los operadores  $O_R$  y  $O_L$ : A). La unión del represor  $cI$  en  $O_{R1}$  reprime al promotor  $P_R$  y facilita la interacción con  $O_{R2}$ ; la unión de  $cI$  en el segundo operador aumenta la afinidad de la RNA-polimerasa por el promotor  $P_{RM}$  por lo que éste se activa. B). La unión de  $cI$  en  $O_{L1}$  impide la expresión a partir del promotor  $P_L$ . La forma en que  $cI$  puede actuar como regulador negativo y/o positivo de la expresión genética se esquematiza en la Figura 7.

Para iniciar la transcripción a partir de los promotores líticos,  $P_L$ ,  $P_I$  y  $P_R$ , para que lambda pase del estado lisogénico al estado de lisis, es necesario inducir la expresión genética a partir de estos promotores. Lo anterior se logra inactivando la proteína represora  $cI$ , con lo cual se transcribe el gen *cro* a partir del promotor  $P_R$ . El producto de



ANTECEDENTES  
Y  
JUSTIFICACIÓN

IV

En nuestro laboratorio estamos interesados en el desarrollo, caracterización y refinamiento de herramientas moleculares para ser utilizadas en el aislamiento y la manipulación del material genético. En este sentido, nuestro grupo ha construido un conjunto de plásmidos derivados muchos de ellos del vector pBR322, que fue el primer vehículo molecular de clonación multipropósito, que permiten introducir en la bacteria el DNA clonado y estabilizarlo de forma extracromosómica (Bolívar *et al.*, 1977). Entre estos derivados, destacan tres familias de plásmidos que permiten integrar material genético específico en el cromosoma de *E. coli* (Balbás *et al.*, 1993 y 1996; Le Borgne *et al.*, 1998 y 2001). La característica principal de estos vectores de integración es que permiten efectuar la inserción en el cromosoma de forma sitio-dirigida, ya que la integración del material genético por recombinación homóloga doble se lleva a cabo en el locus *lacZ*. La inserción cromosomal del DNA clonado y en varios casos modificado, permite contender con los problemas de regulación debidos al efecto multicopia y a la pérdida de los genes de interés como consecuencia de la segregación de los plásmidos, así como mejorar la viabilidad de las células modificadas, eliminando la carga metabólica extra impuesta por el mantenimiento de varias copias del plásmido (Minas and Bailey, 1995).

Por otro lado, otras líneas de investigación importantes del laboratorio están dirigidas hacia el aislamiento y caracterización de genes en *E. coli*, entre los que destacan genes del metabolismo de nitrógeno y carbono (Castaño *et al.*, 1992; Ponce *et al.*, 1995), o el gen que codifica la enzima penicilino-acilasa (Merino *et al.*, 1992); así como la producción de proteínas heterólogas como proinsulina (Balbás *et al.*, 1988; Olmos *et al.*, 1994), interferón  $\alpha$  (Oliver *et al.*, 1985), somatostatina (Itakura *et al.*, 1977) y penicilino-acilasa (Gómez *et al.*, 1994). Para fortalecer estas líneas de investigación, ha sido necesario establecer un área de investigación que cubre el diseño y construcción de métodos y herramientas que permitan optimizar el manejo y la expresión del material genético, tanto *in vitro* como *in vivo*.

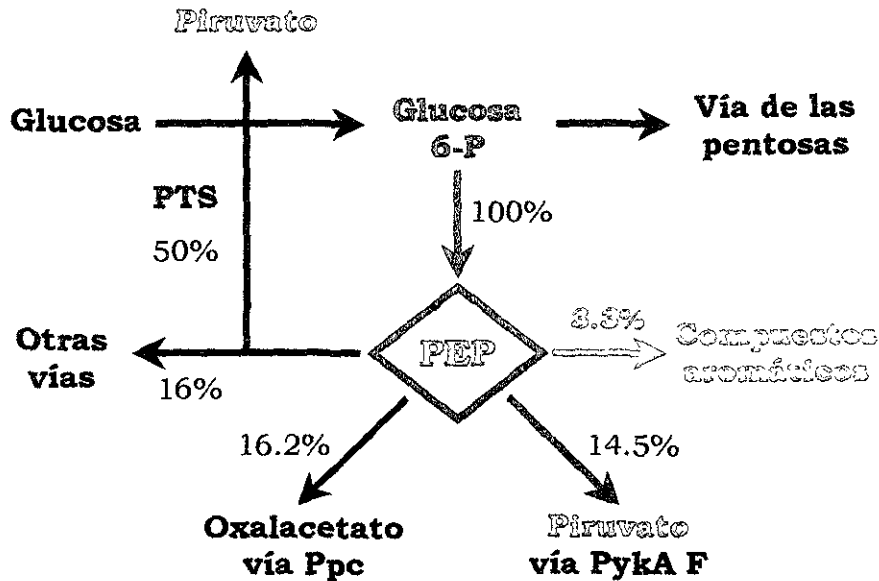
El mejoramiento de los sistemas genéticos utilizados hasta ahora, así como el diseño e implementación de mejores sistemas, ha permitido obtener avances en el desarrollo de otras de las áreas de interés del grupo: el estudio y modificación de la regulación de genes cromosomales de la enterobacteria *E. coli* y de *Bacillus subtilis*, con la finalidad de entender y a su vez modificar sus vías metabólicas. En consecuencia, el planteamiento de la manipulación genética de un microorganismo para los fines del grupo, no se limita a la modificación estructural de loci determinados, sino que también

implica la expresión controlada de genes específicos de *E. coli* y *B. subtilis*. De esta manera, los esfuerzos dirigidos hacia la modificación directa del metabolismo celular, principalmente de *E. coli*, se engloban dentro del área de investigación y desarrollo de la Ingeniería de Vías Metabólicas que constituye otra de las líneas de investigación del grupo.

La ingeniería o modificación de vías metabólicas consiste en la identificación, caracterización y modificación de aquellas etapas del metabolismo celular que regulan la síntesis de algún metabolito de interés comercial; en general, estas etapas son las que limitan la biosíntesis del compuesto. Esta disciplina inicialmente realiza un análisis cuantitativo de la distribución de los flujos de carbono en las vías metabólicas asociadas a las etapas críticas en la biosíntesis del compuesto de interés y, posteriormente, con la ayuda de la Ingeniería Genética, modifica algunas etapas estratégicas para redistribuir los flujos de carbono (Bailey, 1991; Stephanopoulos and Vallino, 1991). En consecuencia, el objetivo que se persigue durante el desarrollo o mejoramiento de una cepa de producción, es incrementar los flujos de carbono, energía y poder reductor hacia la síntesis del metabolito de interés.

Cuando *E. coli* crece aeróbicamente en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono, cubre sus requerimientos de energía y precursores a través de las siguientes vías: 1. La Vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) o glicólisis que convierte la glucosa-6-fosfato a piruvato; 2. El Ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) que oxida acetil-CoA a CO<sub>2</sub>; 3. La Vía de Entner-Doudoroff (ED) que produce piruvato y gliceraldehido-3-fosfato; y 4. la Vía de las pentosas fosfato (PP) que oxida la glucosa a CO<sub>2</sub> y gliceraldehido-3-fosfato con producción de dinucleótido-fosfato reducido de nicotín-adenina (NADPH). Uno de los pasos importantes en la distribución de los esqueletos de carbono dentro del metabolismo central de *E. coli*, es el nodo de fosfoenolpiruvato-piruvato (PEP-PYR). El consumo de PEP en este nodo se da por varias vías (ver Fig. 8): el sistema de la fosfotransferasa (PTS) consume el 50 % del PEP utilizándolo como donador de grupos fosfato durante el transporte y fosforilación de carbohidratos; las enzimas piruvato cinasas I y II (PykA, PykF) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (Ppc) consumen 30.7 %; otras vías consumen el 16 %, y sólo un 3.3 % se utiliza como precursor para la síntesis de compuestos aromáticos. El consumo de PEP para síntesis de aromáticos es mínimo, si se compara con el consumido por otras vías; este hecho se debe principalmente a que los

requerimientos celulares por estos compuestos son relativamente bajos, por lo que la célula mantiene un flujo de carbono limitado hacia esta vía biosintética.

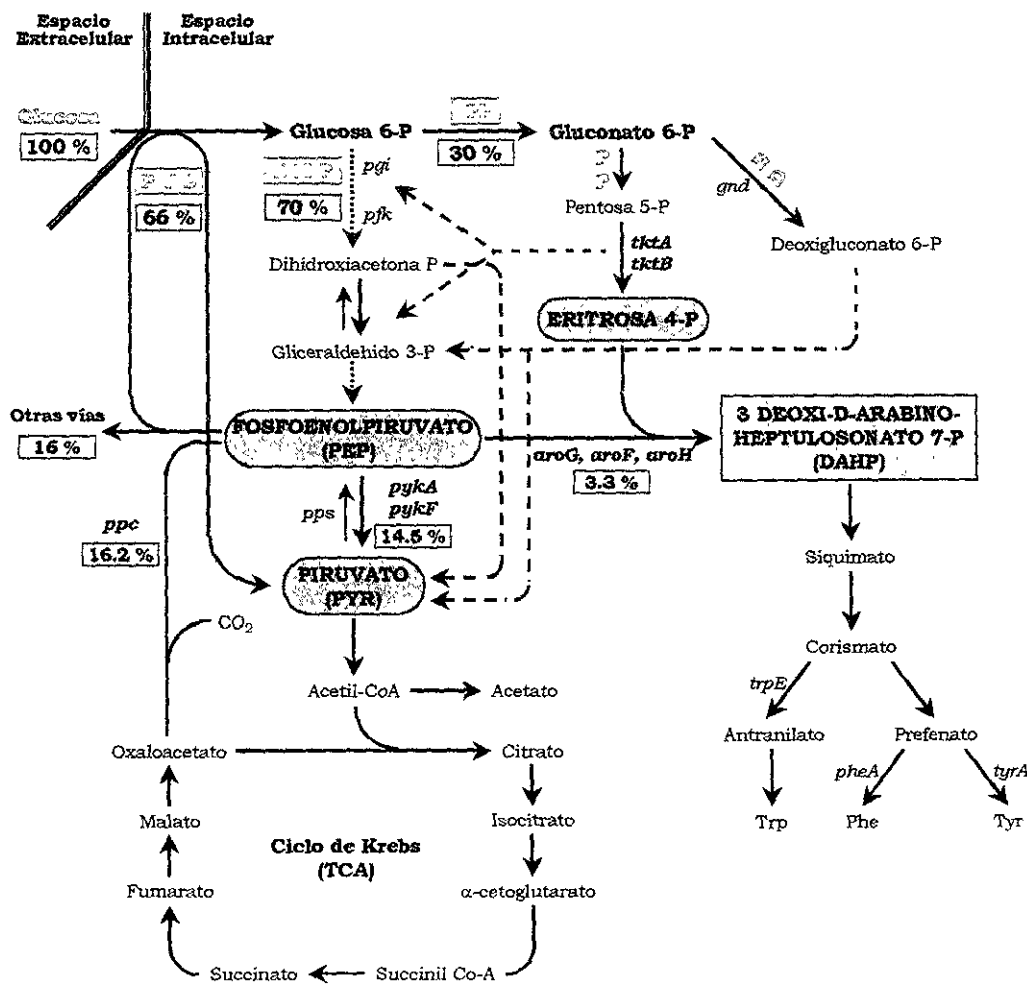


**Figura 8.** Distribución del fosfoenolpiruvato en *E. coli*. Los porcentajes fueron calculados de datos reportados por Holms (1986). Tomada de Valle *et al.*, 1996

En nuestro grupo, el estudio, modificación y redistribución del metabolismo de carbono en la vía glicolítica, tiene como uno de sus objetivos específicos modificar el nodo del fosfoenolpiruvato-piruvato (PEP-PYR), con la finalidad de incrementar la disponibilidad de PEP para utilizarlo en la vía de síntesis de compuestos aromáticos o proteínas recombinantes. Uno de los pasos críticos para la síntesis de compuestos aromáticos es la condensación de eritrosa-4-fosfato (E4F), que proviene de la vía de las pentosas, con el fosfoenolpiruvato (PEP), que proviene principalmente de la glicólisis, para formar 3-desoxi-D-arabino-heptulosoato 7-fosfato (DAHP), que es el primer intermediario de la vía de síntesis de estos compuestos (Fig. 9). Las estrategias utilizadas para aumentar la disponibilidad de PEP han requerido la modificación de algunas reacciones enzimáticas involucradas en el metabolismo de este compuesto. Para esto, se inactivó el sistema de fosfotransferasa (PTS) en *E. coli* JM101, y se seleccionó una cepa derivada de ella que fuera capaz de crecer utilizando glucosa como fuente de carbono (PTS-Glc<sup>+</sup>). Posteriormente, se inactivaron los genes que codifican para las isoenzimas piruvato cinasas PykA y PykF y se incrementó la expresión de la enzima PEP-sintasa que



reconvierte el PYR en PEP (Pps<sup>++</sup>). En estas condiciones de estudio, la cepa con las mutaciones PTS-Glc<sup>+</sup>, PykA<sup>-</sup> PykF<sup>-</sup>, produjo cinco veces más DAHP que la cepa sin ninguna modificación (Flores *et al.*, 1996; Gosset *et al.*, 1996; Ponce *et al.*, 1995).



**Figura 9.** Representación esquemática de las principales vías metabólicas de *E. coli*.

Desafortunadamente, la velocidad de crecimiento de estas cepas disminuye considerablemente con respecto a la presentada por la cepa parental (ver Tabla 3). Por lo tanto, si bien con las modificaciones realizadas se logró aumentar la concentración de DAHP, también es evidente que no es posible realizar varias modificaciones genéticas sin alterar las capacidades biosintéticas de las células, y sin que la reducción de los recursos metabólicos necesarios para el crecimiento balanceado de la bacteria afecten su velocidad de crecimiento, como lo señalan Bailey (1991) y Seo (1985).

**Tabla 3.** Tiempos de duplicación ( $t_D$ ) obtenidos para *E. coli* silvestre y las cepas mutantes en PTS y *pyk*. Tomada de Ponce, 1996.

Cepa	$t_D$ (min) <sup>a</sup>	% de incremento <sup>b</sup>
JM101 silvestre	58.8 ± 2.10	0
JM101 <i>pykA</i>	69.3 ± 3.95	17.9
JM101 <i>pykF</i>	69.4 ± 1.72	18.0
JM101 <i>pykA pykF</i>	82.2 ± 0.60	39.8
JM101 PTS Glc <sup>+</sup>	106.4 ± 2.79	80.9
JM101 PTS <i>pykA</i>	98.5 ± 1.62	67.6
JM101 PTS <i>pykF</i>	141.0 ± 0.06	139.8

<sup>a</sup> Los datos se presentan como el promedio de 2 a 4 mediciones independientes.

<sup>b</sup> Calculado de las diferencias entre el  $t_D$  de la cepa silvestre y las mutantes.

Como se desprende del ejemplo mencionado en el párrafo anterior, la Ingeniería de Vías Metabólicas requiere realizar numerosas modificaciones en el genoma de las cepas de producción para mejorar la biosíntesis de algún metabolito de interés industrial y, en condiciones ideales, se desearía que estas modificaciones no comprometieran el crecimiento de las cepas. Las modificaciones genéticas, normalmente, además de requerir el uso de plásmidos también involucran deleciones y/o integraciones específicas en el cromosoma, así como de modificaciones en la expresión de un gen o genes específicos de una vía metabólica. Con la finalidad de seleccionar modificaciones genéticas, así como eventos de integración en el cromosoma, en éste y en muchos otros enfoques de manipulación genética, se tienen que utilizar marcadores de selección que sean detectar fácilmente, los cuales por lo general son genes que codifican resistencia a antibióticos. Normalmente, al final del proceso de construcción de una cepa, estos marcadores permanecen en el huésped y si el evento de integración se repite varias veces, la cepa modificada adquiere varios genes de resistencia a antibióticos. Debido a que la disponibilidad de marcadores de selección es limitada, un microorganismo con estas características tiene la desventaja de dificultar su manipulación y, además, impide realizar modificaciones posteriores; por otro lado, los genes de resistencia representan una carga metabólica adicional. También es importante tomar en cuenta que una cepa portadora de múltiples genes de resistencia a antibióticos está sujeta a muchas restricciones cuando se pretende utilizar en procesos industriales para la producción de

proteínas o metabolitos (Colwell, 1991; De Lorenzo, 1992). Por lo tanto, es deseable contar con sistemas eficientes para integrar genes y/o fragmentos de DNA en sitios específicos del cromosoma y que simultáneamente permitan evitar la generación de cepas con resistencias a múltiples antibióticos. Lo anterior se puede lograr eliminando el marcador empleado para seleccionar las células que adquirieron la modificación deseada, a través de un evento de eliminación.

Como ya se ha señalado, una manera de eliminar regiones específicas del genoma se realiza por medio de eventos de recombinación promovidos por las recombinasas sitio-específicas de los sistemas utilizados en la actualidad (ver Tabla 4). Algunas de las recombinasas que se han utilizado con este fin son: la recombinasa Cre del bacteriófago P1 (Sauer, 1987; Sauer and Henderson, 1988 y 1989; Dale, 1990), la recombinasa FRT de levadura (Pósfai *et al.*, 1994; Cherepanov and Wackernagek, 1995) y, en menor grado, la recombinasa Int del fago lambda (Huse *et al.*, 1994). Sin embargo, el sistema más utilizado por diversos grupos es el sistema Cre/*loxP* del bacteriófago P1 (Medberry *et al.*, 1995).

**Tabla 4.** Sistemas de Recombinación sitio-específica.

Recombinasa:	Secuencia blanco:	Microorganismo:
Cre	<i>loxP</i>	Bacteriófago P1
Int	<i>attP</i>	Bacteriófago $\lambda$
Flp	FRT	Plásmido 2 $\mu$ m de levadura.

Con base en lo anterior, es posible pensar en construir casetes de selección que lleven genes que codifiquen para la resistencia a algún antibiótico y que también incluyan sitios *loxP* delimitando dichos genes. El diseño anterior permitiría eliminar el marcador de resistencia promoviendo la expresión de la recombinasa Cre en un momento dado, para que después de haber realizado y seleccionado la modificación deseada en el cromosoma de *E. coli*, se lleve a cabo un evento de recombinación sitio-específica entre las secuencias *loxP* con la consecuente delección del gen de resistencia.

Como se señaló, el planteamiento de la manipulación genética de un microorganismo, para los fines de nuestro grupo, no se limita a la modificación estructural de loci determinados, sino que también implica la expresión controlada de genes cromosomales de *E. coli*. En general, el desarrollo o/y mejoramiento de un proceso

de producción requiere de controlar o modificar la expresión de uno o varios genes. Para esto, se han realizado algunos intentos para controlar esta expresión por medio de promotores específicos, tales como el promotor híbrido  $P_{tac}$  (de Boer *et al.*, 1983). Este promotor y algunos otros derivados de él se caracterizan por ser promotores fuertes, pero tienen el inconveniente de que no se pueden controlar adecuadamente, y de hecho aún en condiciones de represión presentan transcripción de escape muy alta; esto se debe, entre otros factores, a que la cantidad de proteína represora no es suficiente y a que la interacción entre el represor y la secuencia de DNA que reconoce en la región del promotor es débil (de Boer *et al.*, 1985). Entre las estrategias realizadas para resolver este inconveniente, se encuentra la sobre-expresión de la proteína represora o disminuyendo el número de copias de la construcción promotor-gen, ya sea utilizando plásmidos de bajo número de copias o la integración en cromosoma; el inconveniente de utilizar estas estrategias, es que en algunos casos no se logra el nivel de expresión deseado.

Una alternativa viable para lograr una nivel de expresión alto y una regulación controlada de uno o más genes en el cromosoma de *E. coli*, sería utilizar los promotores que regulan la replicación del bacteriófago lambda. Este sistema de promotores, como se mencionó en la sección de generalidades, se encuentra regulado de manera muy eficiente a través de la interacción que se establece entre la proteína represora  $cI$  y secuencias operadoras presentes en estos promotores.  $P_{RM}$  y  $P_R$  son promotores divergentes localizados en una de las regiones reguladoras del ciclo de replicación del bacteriófago lambda y sus sitios de inicio de la transcripción están separados por tan solo 82 pb. Además de los hexámeros consensos de las regiones  $-10$  y  $-35$  de ambos promotores, la región entre los dos sitios de inicio de la transcripción contiene tres segmentos operadores  $O_{R1}$ ,  $O_{R2}$  y  $O_{R3}$ , que son los sitios de reconocimiento y unión del represor  $cI$ . La unión del represor a  $O_{R1}$  u  $O_{R2}$  bloquea el inicio de la transcripción desde  $P_R$  evitando la transcripción de los genes localizados hacia abajo de este promotor; sin embargo, y de manera simultánea, la unión a  $O_{R2}$  activa el promotor  $P_{RM}$  (Woody *et al.*, 1993). Este efecto diferencial sobre ambos promotores, se hace extensivo al promotor  $P_L$  sobre el cual  $cI$  actúa como lo hace con  $P_R$ ; en presencia de  $cI$  el promotor  $P_L$  es inactivo y en su ausencia es activo (ver Tabla 5).

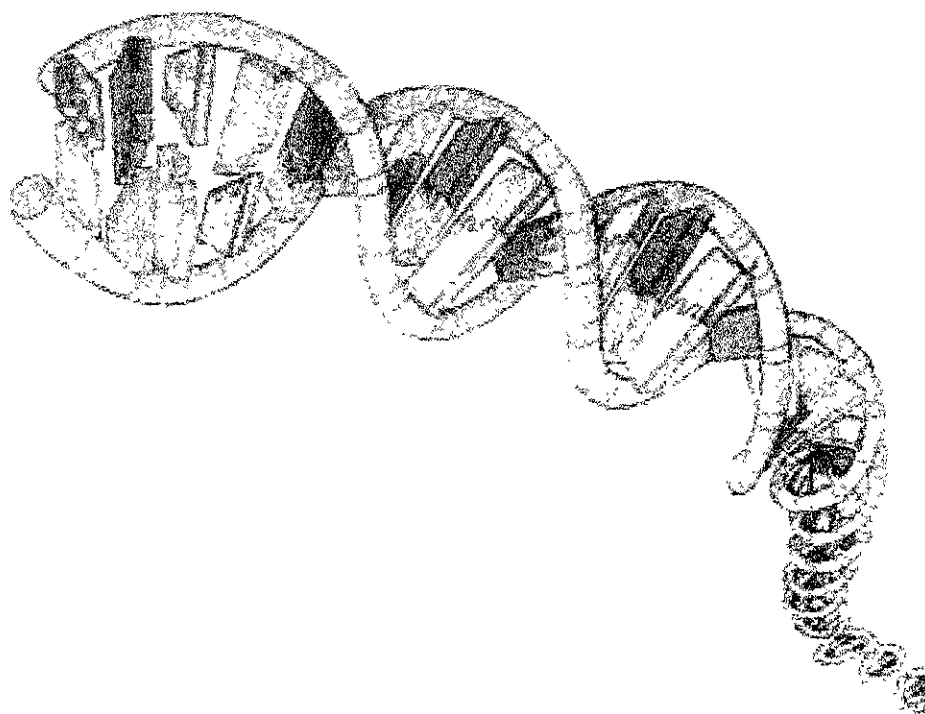
Bajo el esquema anterior, cualquier gen que esté bajo control del promotor  $P_L$  podrá ser inducido a niveles muy altos de expresión al inactivar  $cI$ . Por otro lado, como el

promotor  $P_{RM}$  funciona de manera inversa a  $P_L$ , únicamente estará activo en presencia de  $cI$  e inactivo en su ausencia. Así, si se desea activar simultáneamente la expresión de uno o varios genes bajo la misma señal reguladora, el sistema  $cI$ - $P_{RM}$  lo permite. Si por el contrario, lo que se desea es reprimir la expresión genética de uno o varios genes con la misma señal, el sistema  $cI$ - $P_L$  ofrece esa oportunidad. De hecho, es concebible utilizar ambos promotores simultáneamente y así disponer de un sistema que permita prender y apagar al mismo tiempo genes cromosomales en *E. coli* (La Vallie *et al.*, 1993 y 2000).

**Tabla 5.** Efecto del represor  $cI$  sobre los promotores  $P_L$  y  $P_{RM}$  de lambda.

$cI$ funcional	ausencia de $cI$
$P_L$ inactivo	$P_L$ activo
$P_{RM}$ activo	$P_{RM}$ inactivo

El presente proyecto se enmarca dentro de esta consideración, ya que pretende construir sistemas genéticos que permitan controlar la expresión, ya sea positiva o negativamente, de uno o varios genes presentes en el cromosoma; lo anterior, permitirá tener o no la expresión del o los genes específicos. Utilizando el diseño adecuado, éste podría permitir que utilizando una sola señal de regulación, se lleve a cabo la expresión o represión de manera concertada y controlada, de genes o familias de genes. Bajo esta estrategia, se abre la posibilidad de modificar cepas de producción sin comprometer su crecimiento. Así, primero se estarían expresando los genes necesarios para el crecimiento óptimo del microorganismo y cuando se obtenga una biomasa alta, la expresión genética se invertiría a través del sistema de regulación adecuado, para reprimir los genes cuya expresión es necesaria para el crecimiento y en su lugar expresar los genes necesarios para la biosíntesis de un compuesto específico. Además, y como se mencionó líneas arriba, en este proyecto también se pretende construir herramientas genéticas que permitan insertar y/o eliminar regiones delimitadas de DNA cromosomal de *E. coli*, evitando, en particular, la permanencia de marcadores de resistencia a antibióticos.



# OBJETIVOS

**V**

## GENERALES

La ingeniería de vías metabólicas requiere muchas veces modificar diferentes genes cromosomales, los cuales están involucrados en la producción de un metabolito particular. Los procesos anteriores implican en muchos casos la incorporación de genes de resistencia a antibióticos. Así mismo, la ingeniería de vías metabólicas también requiere modular la regulación de la expresión de genes involucrados en la misma vía metabólica o en otras vías que compiten por el consumo de ciertos metabolitos intermediarios. Con base en lo antes mencionado, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- I. Utilizando el sistema de recombinación sitio-específica del fago P1, diseñar y construir sistemas genéticos que permitan eliminar el marcador de resistencia a antibiótico utilizado en la construcción de cepas genéticamente modificadas.
- II. Utilización de las señales de regulación genética del bacteriófago lambda, promotores  $P_L$  y  $P_{RM}$ , así como el represor cI, para diseñar y construir sistemas genéticos que permitan regular de manera simultánea y concertada, genes cromosomales de *Escherichia coli*.
- III. Aplicación de los sistemas construidos en *E. coli*, usando como modelo algunos genes cromosomales y/o genes heterólogos insertados en su cromosoma

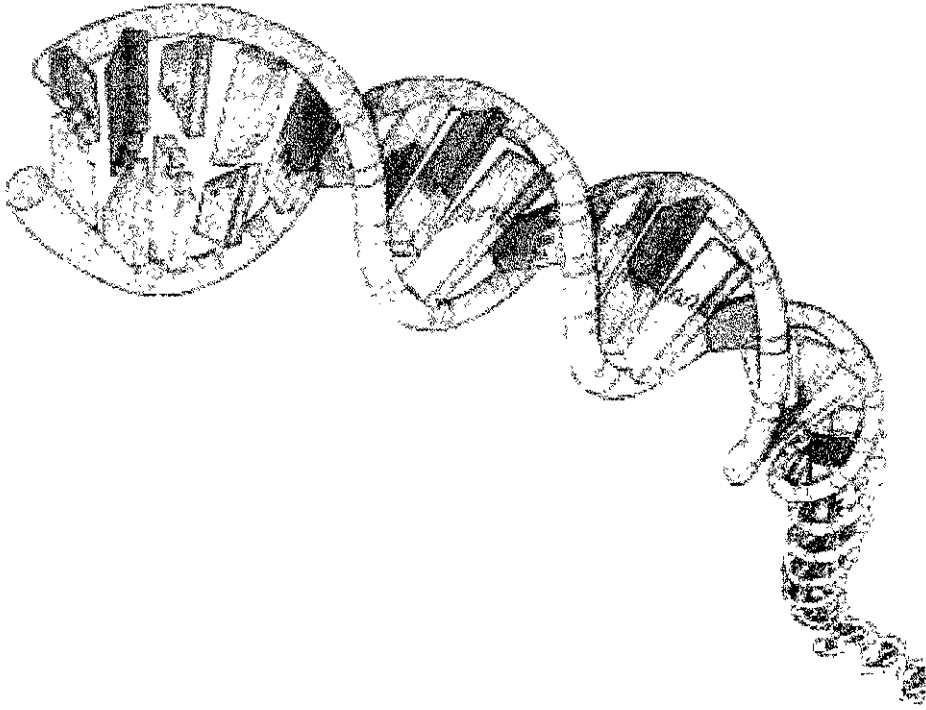
## PARTICULARES

Para la realización de los objetivos generales, se definieron los siguientes objetivos particulares:

- I. Construir sistemas genéticos que permitan insertar y/o eliminar regiones delimitadas de DNA cromosomal de *E. coli*.
  - a) Utilizando el sistema de recombinación Cre/loxP del bacteriófago P1, construir casetes mutagénicos que codifiquen para alguna resistencia a antibiótico y que se puedan escindir por medio de recombinación sitio-específica inducida.

- b)** Construir un sistema genético para expresar de manera controlada la recombinasa Cre del bacteriófago P1.
- II.** Diseñar y construir vectores de clonación / inserción que permitan colocar uno o varios genes cromosomales de *E. coli* bajo el control de una de las señales de regulación genética del bacteriófago lambda.
- a)** Construir casetes que permitan poner uno o varios genes cromosomales de *E. coli* bajo el control de los promotores  $P_L$  o  $P_{RM}$  del bacteriófago lambda.
  - b)** Construir un sistema que permita expresar de manera controlada al gen *cI*, el cual codifica para la proteína represora de lambda.
- III.** Utilizando los sistemas construidos, modificar la expresión genética de genes homólogos o heterólogos insertados en el cromosoma de *E. coli*.
- a)** Con los casetes construidos en los objetivos anteriores, colocar el gen reportero que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa bajo el control de los promotores  $P_L$  y  $P_{RM}$ .
  - b)** Para caracterizar los sistemas genéticos construidos, insertar las fusiones génicas en el cromosoma de *E. coli* para evaluar el nivel de control y de expresión del gen bajo la regulación de los promotores del fago lambda.





MATERIALES  
Y  
MÉTODOS

VI

## CEPAS BACTERIANAS Y VECTORES

Las cepas de *E. coli* y los plásmidos utilizados y construidos en este trabajo se describen en las Tablas A y B, respectivamente. La cepa XL1-Blue de *E. coli* se utilizó para la propagación y amplificación de vectores del tipo de pBR322 (origen de replicación ColE1) y derivados termo-sensibles del pSC101, así como en los experimentos de clonación y construcción de los plásmidos. Las cepas lisogénicas del fago lambda *pir*, S17-1  $\lambda_{pir}$  o SY327  $\lambda_{pir}$ , se utilizaron para el enriquecimiento de plásmidos que llevan el origen de replicación condicionada del plásmido R6K (*ori<sub>R6K</sub>*). La cepa 294-Cre que lleva el gen de la recombinasa Cre bajo regulación del represor termosensible *cl<sub>857</sub>* integrado en el locus cromosomal *lacZ*, se utilizó para comprobar el funcionamiento correcto de las secuencias *loxP* presentes en cada uno de los casetes de resistencia escindibles construidos en este trabajo. *E. coli* W3110T<sup>+</sup> se utilizó para obtener las modificaciones cromosomales sin marcador de resistencia (inserción/interrupción para *lacZ*, y delección-inserción/interrupción para *galE*). La cepa GI724 se utilizó para la expresión del gen reportero *lacZ* fusionado a los promotores *P<sub>L</sub>* y *P<sub>RM</sub>*, tanto silvestre como mutante, del bacteriófago lambda.

TABLA A. CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS Y CONSTRUIDAS DURANTE ESTE TRABAJO.

Cepas de <i>E. coli</i> :	GENOTIPO Y FENOTIPO RELEVANTES <sup>a</sup>	Fuente o Referencia:
XL1-Blue	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA46</i> (Nal <sup>R</sup> ), <i>thi</i> , <i>relA1</i> , <i>lac F</i> [ <i>traD36 proAB' lac<sup>R</sup> lacZΔM15</i> , Tn10 (Tet <sup>R</sup> )]. Cepa transformable a eficiencias altas y deficiente en los sistemas de recombinación homóloga. Modifica pero no restringe el DNA transformado, por lo que se utiliza para propagar plásmidos, fagos filamentosos y fagémidos a gran escala. El F' de esta cepa permite la selección de colonias blancas/azules en XGal y permite la superinfección con el bacteriófago M13.	Sambrook et al., 1989
MM294	F <sup>-</sup> , $\lambda$ , <i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> (r, m <sup>+</sup> ), <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> .	Sambrook et al., 1989
294-Cre	F <sup>-</sup> , $\lambda$ , <i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>lacZ::cl<sub>857</sub>-Cre</i> . Derivada de la cepa MM294, a la cual se le insertó en el locus cromosomal <i>lacZ</i> el gen <i>cre</i> bajo el control del represor sensible a temperaturas mayores a 37°C ( <i>cl<sub>857</sub></i> ).	Buchholz et al., 1996
S17-1 $\lambda_{pir}$	<i>hsdR M'</i> , <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , [RP4-2-Tc::Mu::Km::Tn7, Tp <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , integrado en cromosoma]. Cepa que lleva un fago $\lambda_{pir}$ en estado lisogénico, el cual codifica para la proteína Pi ( $\pi$ ) necesaria para la replicación de plásmidos con el origen de replicación gama del replicón R6K ( <i>ori<sub>R6K</sub></i> )	De Lorenzo, 1994

## CONTINUACIÓN DE LA TABLA A

Cepas de <i>E. coli</i> :	GENOTIPO Y FENOTIPO RELEVANTES <sup>a</sup>	Fuente o Referencia:
SY327 $\lambda$ <i>pir</i>	F <sup>-</sup> , <i>araD</i> , $\Delta$ ( <i>lac-pro</i> ), <i>argE</i> (Am), <i>recA56</i> , <i>nalA</i> , Rif <sup>R</sup> Derivada de la cepa SY327, la cual fue lisogenizada con el fago $\lambda$ <i>pir</i> . Cepa altamente transformable después de someterla a tratamiento con CaCl <sub>2</sub> , pero que no moviliza plásmidos.	Kaniga <i>et al.</i> , 1991
W3110	F <sup>-</sup> , $\lambda^-$ , INV ( <i>rnnD-rnnE</i> )1, <i>RecA</i> <sup>+</sup> , <i>Trp</i> <sup>-</sup> , <i>Lac</i> <sup>+</sup> .	Jensen, 1993
W3110T <sup>+</sup>	Como la cepa W3110, solo que el fenotipo <i>Trp</i> <sup>-</sup> se restauró a <i>Trp</i> <sup>+</sup> por medio de transducción generalizada con el bacteriófago P1.	Colección del laboratorio
W3110T <sup>+</sup> <i>lacZ</i> ::Cat2	Cm <sup>R</sup> Derivada de la cepa W3110T <sup>+</sup> que tiene interrumpido el gen cromosomal <i>lacZ</i> por la inserción del casete escindible de resistencia a cloranfenicol Cat2.	Este trabajo
W3110T <sup>+</sup> <i>lacZ</i> :: <i>loxP</i>	Cm <sup>S</sup> Derivada de la cepa W3110T <sup>+</sup> <i>lacZ</i> ::Cat2 que tiene interrumpido el gen cromosomal <i>lacZ</i> por la permanencia de una secuencia <i>loxP</i> después de la escisión del casete Cat2.	Este trabajo
W3110T <sup>+</sup> <i>galE</i> ::Cat2	Cm <sup>R</sup> Derivada de la cepa W3110T <sup>+</sup> que tiene interrumpido el gen cromosomal <i>galE</i> por la inserción del casete Cat2.	Este trabajo
W3110T <sup>+</sup> <i>galE</i> :: <i>loxP</i>	Cm <sup>S</sup> Derivada de la cepa W3110T <sup>+</sup> que tiene interrumpido el gen cromosomal <i>galE</i> por la permanencia de una secuencia <i>loxP</i> después de la escisión del casete Cat2.	Este trabajo
GI724	F <sup>-</sup> , $\lambda^-$ , <i>lacI<sup>h</sup></i> , <i>lacPL8</i> , <i>ampC</i> :: <i>P<sub>trp</sub>cl</i> , <i>mcrA</i> , <i>mcrB</i> , INV ( <i>rnnD-rnnE</i> ). Cepa utilizada para amplificar el vector de expresión pLEX y sus derivados, así como para la expresión óptima de los genes clonados bajo la regulación del promotor <i>P<sub>i</sub></i> del bacteriófago lambda presente en este plásmido. Además, esta cepa lleva integrado en el locus cromosomal <i>ampC</i> el gen que codifica el represor <i>cl</i> bajo regulación del promotor inducible <i>P<sub>trp</sub></i> .	Invitrogen
GI724/pINTP <sub>RMWT</sub> - <i>lacZ</i>	Igual que la cepa GI724 solo que lleva el gen <i>lacZ</i> bajo regulación del promotor silvestre <i>P<sub>RMWT</sub></i> del bacteriófago lambda en plásmido.	Este trabajo
GI724/pINTP <sub>RMUP</sub> - <i>lacZ</i>	Igual que la cepa GI724 solo que lleva el gen <i>lacZ</i> bajo regulación del promotor mutante <i>P<sub>RMUP</sub></i> del bacteriófago lambda en plásmido.	Este trabajo
GI724/pINTP <sub>L</sub> - <i>lacZ</i>	Igual que la cepa GI724 solo que lleva el gen <i>lacZ</i> bajo regulación del promotor <i>P<sub>i</sub></i> del bacteriófago lambda en plásmido.	Este trabajo

<sup>a</sup> para la descripción de algunas características mencionadas en esta tabla, consultar el anexo de abreviaturas.

TABLA B. PLÁSMIDOS CONSTRUIDOS Y UTILIZADOS DURANTE ESTE TRABAJO.

Plásmido:	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES <sup>a</sup>	Fuente o Referencia:
pMS102	Ap <sup>R</sup> Derivado del vector pSL1180 que lleva en el MCS dos secuencias <i>loxP</i> con la misma dirección relativa y con un sitio de restricción <i>XbaI</i> entre ellas. Además, como lleva la región intergénica del fago f1 permite preparar DNA de cadena sencilla para secuenciación o mutagénesis.	Snaith <i>et al.</i> , 1995
pLox1	Ap <sup>R</sup> Derivado del vector pMS102 que se obtuvo eliminando un fragmento de 26 pb del MCS, con lo que se removieron los sitios de restricción <i>HpaI</i> , <i>KpnI</i> , <i>XbaI</i> y <i>NheI</i> . Con esta modificación, el sitio <i>XbaI</i> presente entre las secuencias <i>loxP</i> es único.	Este trabajo
pCAT19	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> Derivado de pUC19 que lleva el gen que codifica resistencia a cloranfenicol del plásmido pBR325 ( <i>cat</i> ) delimitado en ambos lados por varios sitios de restricción, los que permiten liberar dicho gen por medio de digestiones sencillas o dobles.	Fuqua, 1992
pLoxCat2	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> Derivado del vector pLox1 que lleva clonado el gen <i>cat</i> (Cm <sup>R</sup> ) entre las secuencia <i>loxP</i> . La dirección de transcripción de este gen de resistencia es igual a la dirección relativa de las secuencias <i>loxP</i> .	Este trabajo
pBSL121	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> Derivado de pBR322 que lleva el gen de resistencia a cloranfenicol del pBR325 delimitado en ambos lados por un MCS del vector pBluescriptIIS+. El sitio de restricción <i>EcoRI</i> dentro del gen <i>cat</i> fue eliminado por mutagénesis.	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995
pLoxCat4	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> Derivado del vector pLox1 que lleva clonado el gen <i>cat</i> de pBR325 entre las secuencia <i>loxP</i> . Este gen ya no tiene el sitio interno <i>EcoRI</i> y la dirección de transcripción es igual a la dirección relativa de las secuencias <i>loxP</i> .	Este trabajo
pBSL141	Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> Derivado de pBR322 que lleva el gen de resistencia a gentamicina del transposón Tn1696 ( <i>aacC1</i> ) entre dos MCS del pBluescriptIIS+.	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995
pLoxGen4	Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> Derivado del vector pLox1 que lleva clonado entre las secuencia <i>loxP</i> el gen <i>aacC1</i> (Gm <sup>R</sup> ) del transposón Tn1696. La dirección de transcripción de este gen de resistencia es igual a la dirección relativa de las secuencias <i>loxP</i> .	Este trabajo
pBSL98	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> Derivado de pBR322 que lleva el casete de resistencia a kanamicina del transposón Tn5 ( <i>ntpII</i> ) delimitado en ambos lados por un MCS del pBluescriptIIS+.	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995
pLoxKan2	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> Derivado del vector pLox1 que lleva clonado entre las secuencia <i>loxP</i> el gen <i>ntpII</i> (Km <sup>R</sup> ) del transposón Tn5. La dirección de transcripción de este gen de resistencia es igual a la dirección relativa de las secuencias <i>loxP</i> .	Este trabajo

## CONTINUACIÓN DE LA TABLA B

Plásmido:	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES <sup>a</sup>	Fuente o Referencia
pINT-ts	Ap <sup>R</sup> Vector de expresión derivado de pBR322 que lleva las funciones de replicación termosensibles del plásmido pSC101 ( <i>par</i> , <i>ori</i> y <i>rep101<sup>ts</sup></i> ).	Hasan <i>et al.</i> , 1994
pJW168	Ap <sup>R</sup> Vector para la expresión del gen <i>cre</i> bajo regulación del promotor <i>P<sub>lacUV5</sub></i> y con las funciones de replicación termosensibles del plásmido pSC101. Las cepas transformadas con este plásmido se deben crecer a 30°C (temperatura en la cual se lleva a cabo la replicación de este plásmido).	Este trabajo
pJW168ΔEB	Ap <sup>R</sup> Plásmido control derivado del vector pJW168 que lleva el gen <i>cre</i> inactivo debido a que le falta la mitad 3'. Para construirlo, el vector pJW168 se digirió con <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i> y después de rasurar el fragmento del plásmido por tratamiento con DNA polimerasa del fago T4, éste se ligó sobre sí mismo.	Este trabajo
pMC1403	Ap <sup>R</sup> Vector que lleva clonado el operón de lactosa ( <i>lacZYA</i> ), al cual le falta el promotor/operador y los primeros 8 codones del gen <i>lacZ</i> . Se utiliza para la clonación e identificación de regiones promotoras que lleven las secuencias necesarias para el inicio de la traducción. El análisis de los niveles de expresión se realiza cuantificando la actividad enzimática de la proteína β-galactosidasa.	Casadaban <i>et al.</i> , 1980
pInt3	Ap <sup>R</sup> Derivado del vector pMC1403, del cual se eliminaron 33 codones del final del gen <i>lacZ</i> y la mayor parte del gen <i>lacY</i> por la deleción del fragmento interno <i>NdeI</i> de 1119 pb.	Colección del laboratorio
pInt3 <sub>ts</sub>	Ap <sup>R</sup> Derivado del plásmido pInt3, al cual se le cambio el origen de replicación de pBR322 por el origen y las funciones de replicación termosensibles del pSC101 ( <i>par</i> , <i>ori</i> y <i>rep101<sup>ts</sup></i> ).	Le Borgne <i>et al.</i> , 1998
pLZLC3	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> Derivado del vector pInt3 que lleva insertado en el gen <i>lacZ</i> el casete removible de resistencia a cloranfenicol (Cat2).	Este trabajo
pT7Blue	Ap <sup>R</sup> Vector para la clonación directa de productos de PCR, ya que está modificado en los extremos con timinas que complementan a las adeninas adicionadas por diferentes DNA-polimerasas a los productos de PCR.	Novagen
pGalET	Ap <sup>R</sup> Derivado del pT7Blue que lleva clonados los genes <i>galE</i> y <i>galT</i> de <i>E. coli</i> como producto de PCR.	Le Borgne, sin publicar
pELCT	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> Derivado del plásmido pGalET que lleva el gen <i>galE</i> interrumpido por la sustitución del fragmento interno <i>NruI</i> de 240 pb por el casete removible de resistencia a cloranfenicol (Cat2).	Este trabajo

## CONTINUACIÓN DE LA TABLA B

Plásmido:	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES <sup>a</sup>	Fuente o Referencia:
pKNG101	Sm <sup>R</sup> Plásmido mobilizable ( <i>mob</i> ) con el origen de replicación condicionada del R6K ( <i>ori</i> ), por lo que se comporta como vector suicida en cualquier cepa que no exprese el gen <i>pir</i> . Además, como lleva los genes <i>sacBR</i> de <i>B. stearothermophilus</i> que confieren sensibilidad a sacarosa a cualquier bacteria gram-negativa (Sac), facilita la selección positiva de eventos de recombinación homóloga doble en este grupo de microorganismos.	Kaniga <i>et al.</i> , 1991
pKNGlac	Sm <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> Derivado del vector pKNG101 que lleva clonado el gen <i>lacZ</i> interrumpido <i>in vitro</i> por la inserción del casete escindible Cat2.	Este trabajo
pKNGgal	Sm <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> Derivado del vector pKNG101 que lleva clonado el gen <i>galE</i> interrumpido con el casete escindible Cat2.	Este trabajo
pBPSO	Ap <sup>R</sup> Derivado del plásmido pBSL98 del cual se eliminó el gen de resistencia <i>ntpII</i> (Km <sup>R</sup> ) por digestión con <i>MluI</i> y ligación del fragmento del vector sobre sí mismo. Plásmido con dos secuencias de clonación múltiple del pBluescriptIIKS+ (MCS) y un sitio <i>MluI</i> entre ellos que permite adicionar sitios de restricción a cualquier gen o segmento de DNA que sea clonado en este sitio.	Este trabajo
pBPSCat2	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> pBPSO que lleva clonado entre los dos MCS el casete escindible Cat2 obtenido del plásmido pLoxCat2. La dirección de transcripción del casete de resistencia es igual a la del gen <i>bla</i> y la region intergénica del fago $\lambda$ 1.	Este trabajo
pBPSCat4	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> igual que el pBPSCat2 solo que el gen <i>cat</i> presente en este plásmido no tiene el sitio de restricción <i>EcoRI</i> interno.	Este trabajo
pBPSTen4	Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> pBPSO que lleva clonado entre los MCS el casete escindible Gen4 obtenido del plásmido pLoxGen4. La dirección de transcripción del casete de resistencia es igual a la del gen <i>bla</i> del vector.	Este trabajo
pBPSTen2	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> pBPSO que lleva clonado entre los dos MCS el casete escindible de resistencia a kanamicina (Kan2) obtenido del plásmido pLoxKan2. La dirección de transcripción del casete de resistencia es igual a la del gen <i>bla</i> del vector.	Este trabajo
pMCP <sub>RMUP</sub> 10	Ap <sup>R</sup> Derivado del vector pMC1403 que lleva el gen <i>lacZ</i> bajo regulación del promotor $P_{RM}$ mutante ( $P_{RMUP}$ ) del bacteriófago lambda.	Este trabajo
pBRP <sub>RMUP</sub> Cat2	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> Derivado del pMCP <sub>RMUP</sub> 10 al cual se le adicionó el casete escindible Cat2 precedido por un MCS hacia arriba del promotor $P_{RMUP}$ de lambda.	Este trabajo
pBRP <sub>RMUP</sub> Cat4	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> Derivado del pMCP <sub>RMUP</sub> 10 al cual se le adicionó hacia arriba del promotor $P_{RMUP}$ de lambda el casete escindible Cat4 precedido por un MCS.	Este trabajo

## CONTINUACIÓN DE LA TABLA B

Plásmido:	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES <sup>a</sup>	Fuente o Referencia
pBRP <sub>RMUP</sub> Gen4	Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> Derivado del pMCP <sub>RMUP</sub> 10 al cual se le adicionó el casete escindible Gen4 precedido por un MCS hacia arriba del promotor P <sub>RMUP</sub> de lambda.	Este trabajo
pBRP <sub>RMUP</sub> Kan2	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> Derivado del pMCP <sub>RMUP</sub> 10 al cual se le adicionó hacia arriba del promotor P <sub>RMUP</sub> de lambda el casete escindible Kan2 precedido por un MCS.	Este trabajo
pIntP <sub>RMWT</sub> 8	Ap <sup>R</sup> Derivado del pInt3 <sub>ts</sub> que lleva el gen <i>lacZ</i> bajo regulación del promotor P <sub>RM</sub> silvestre (P <sub>RMWT</sub> ) del bacteriófago lambda.	Este trabajo
pTSP <sub>RMWT</sub> Cat2	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> Derivado del pIntP <sub>RMWT</sub> 8 al cual se le adicionó el casete escindible Cat2 precedido por un MCS hacia arriba del promotor P <sub>RMWT</sub> de lambda.	Este trabajo
pTSP <sub>RMWT</sub> Cat4	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> Derivado del pIntP <sub>RMWT</sub> 8 al cual se le adicionó hacia arriba del promotor P <sub>RMWT</sub> de lambda el casete escindible Cat4 precedido por un MCS.	Este trabajo
pTSP <sub>RMWT</sub> Gen4	Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> Derivado del pIntP <sub>RMWT</sub> 8 al cual se le adicionó hacia arriba del promotor P <sub>RMWT</sub> de lambda el casete escindible Gen4 precedido por un MCS.	Este trabajo
pTSP <sub>RMWT</sub> Kan2	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> Derivado del pIntP <sub>RMWT</sub> 8 al cual se le adicionó el casete escindible Kan2 precedido por un MCS hacia arriba del promotor P <sub>RMWT</sub> de lambda.	Este trabajo
pIntP <sub>L</sub> 14	Ap <sup>R</sup> Derivado del pInt3 <sub>ts</sub> que lleva el gen <i>lacZ</i> bajo regulación del promotor P <sub>L</sub> del bacteriófago lambda.	Este trabajo
pTSP <sub>L</sub> Cat2	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> Derivado del pIntP <sub>L</sub> 14 al cual se le adicionó hacia arriba del promotor P <sub>L</sub> de lambda el casete escindible Cat2 precedido por un MCS.	Este trabajo
pTSP <sub>L</sub> Cat4	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> Derivado del pIntP <sub>L</sub> 14 al cual se le adicionó el casete escindible Cat4 precedido por un MCS hacia arriba del promotor P <sub>L</sub> de lambda.	Este trabajo
pTSP <sub>L</sub> Gen4	Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> Derivado del pIntP <sub>L</sub> 14 al cual se le adicionó hacia arriba del promotor P <sub>L</sub> de lambda el casete escindible Gen4 precedido por un MCS.	Este trabajo
pTSP <sub>L</sub> Kan2	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> Derivado del pIntP <sub>L</sub> 14 al cual se le adicionó el casete escindible Kan2 precedido por un MCS hacia arriba del promotor P <sub>L</sub> de lambda.	Este trabajo
pCR-BluntII-TOPO	Km <sup>R</sup> , Zeo <sup>R</sup> Vector modificado con Topoisomerasa I por lo que permite la clonación de productos de PCR sin utilizar la enzima ligasa. Este vector permite la selección directa de clonas recombinantes por la interrupción del gen letal <i>ccdB</i> .	Novagen
pCRuplacl	Km <sup>R</sup> , Zeo <sup>S</sup> Derivado del vector pCR-BluntII-TOPO que lleva clonado un fragmento de PCR de 1067 pb que contiene la región cromosomal localizada hacia arriba del gen <i>lacl</i> .	Este trabajo

## CONTINUACIÓN DE LA TABLA B

Plásmido:	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES <sup>a</sup>	Fuente o Referencia
pBPSCI	Km <sup>R</sup> , Zeo <sup>S</sup> Derivado del pCR-BluntII-TOPO que lleva clonado el gen <i>ampC</i> y sus secuencias aledañas. En medio de <i>ampC</i> esta insertado el gen que codifica el represor cI del fago lambda bajo la regulación del promotor de triptofano ( <i>ampC::P<sub>trp</sub>-cI</i> ).	Este trabajo
pLEX	Ap <sup>R</sup> Vector de expresión que lleva el promotor P <sub>L</sub> del bacteriófago lambda para dirigir la expresión del(os) gen(es) insertado(s) en el MCS presente hacia abajo de este promotor.	Invitrogen
pLEXLacZ	Ap <sup>R</sup> Derivado del pLEX que lleva clonado el gen <i>lacZ</i> frente al promotor P <sub>L</sub> .	Invitrogen
pQBI25	Ap <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup> Vector para fusionar regiones promotoras al gen estructural de la proteína verde fluorescente (GFP).	Quantum Biotechnologies
pLEX-GFP	Ap <sup>R</sup> Derivado del pLEX que lleva clonado el gen de la proteína verde fluorescente bajo regulación del promotor P <sub>L</sub> de lambda.	Este trabajo
pINTP <sub>RMWT</sub> lacZ	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> Derivado del pTSP <sub>RMWT</sub> Cat4 al que se le insertó en el MCS, la región cromosomal que está hacia arriba del gen <i>lacI</i> . Este vector se utilizó para sustituir el promotor silvestre P <sub>lac</sub> del operón <i>lac</i> por el promotor heterólogo P <sub>RM</sub> silvestre (P <sub>RMWT</sub> ) por medio de recombinación homóloga doble.	Este trabajo
pINTP <sub>RMUP</sub> lacZ	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> Derivado del pBRP <sub>RMUP</sub> Kan2 al que se le insertó en el MCS, la región cromosomal que está hacia arriba del gen <i>lacI</i> . Este vector se utilizó para sustituir el promotor silvestre P <sub>lac</sub> del operón <i>lac</i> por el promotor heterólogo P <sub>RM</sub> mutante (P <sub>RMUP</sub> ) por medio de recombinación homóloga doble.	Este trabajo
pINTP <sub>L</sub> lacZ	Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> Derivado del pTSP <sub>L</sub> Gen4 al cual se le insertó en el MCS la región cromosomal que esta hacia arriba del gen <i>lacI</i> . Este vector se utilizó para sustituir el promotor silvestre P <sub>lac</sub> del operón <i>lac</i> por el promotor heterólogo P <sub>L</sub> de lambda por medio de recombinación homóloga doble.	Este trabajo

<sup>a</sup> para la descripción de algunas características mencionadas en esta tabla, consultar el anexo de abreviaturas.

## CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Todas las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo fueron mantenidas y crecidas rutinariamente en medio Luria-Bertani líquido o solidificado con agar al 1.5 % (LB: 10 g/litro de triptona, 5 g/litro de extracto de levadura y 5 g/litro de NaCl; Sambrook *et al.*, 1989). Las cepas derivadas de *E. coli* GI724 y transformadas con los plásmidos que llevan



los promotores  $P_L$  y  $P_{RM}$  de lambda se mantuvieron en medio mínimo M9 con los suplementos adecuados para cada uno de ellos: **1.** Las clonas con el promotor  $P_L$  se crecieron en medio mínimo líquido o solidificado con agar al 1.5 % y en condiciones de represión (R/I-M: 1X de sales de medio mínimo M9, 20 g/litro de casaminoácidos, 10 ml/litro de glicerol y 1 mM de  $MgCl_2$ ); y **2.** Las clonas con el promotor  $P_{RM}$  se crecieron en medio mínimo líquido o solidificado con agar al 1.5 % y en condiciones de inducción (I/R-M: 1X de sales de medio mínimo M9, 2 g/litro de casaminoácidos, 5 g/litro de glucosa y 1 mM de  $MgCl_2$ ). Para los estudios de expresión de *lacZ* a partir de los promotores  $P_L$  y  $P_{RM}$  de lambda se utilizó medio mínimo líquido en condiciones de inducción (I/R-M). Cuando fue necesario utilizar antibióticos para seleccionar las construcciones buscadas o asegurar la presencia de un plásmido en *E. coli*, éstos se utilizaron a las siguientes concentraciones: ampicilina/carbenicilina, 200/100  $\mu\text{g/ml}$ ; cloranfenicol, 30  $\mu\text{g/ml}$ ; estreptomina, 75  $\mu\text{g/ml}$ ; gentamicina, 10  $\mu\text{g/ml}$ ; kanamicina, 30 ó 50  $\mu\text{g/ml}$  y tetraciclina, 15  $\mu\text{g/ml}$  para seleccionar las cepas con los genes de resistencia a antibióticos en multicopia; carbenicilina, 20  $\mu\text{g/ml}$ ; cloranfenicol, 20  $\mu\text{g/ml}$ ; estreptomina, 20  $\mu\text{g/ml}$ ; gentamicina, 5  $\mu\text{g/ml}$  y kanamicina, 20  $\mu\text{g/ml}$  para seleccionar clonas con los genes de resistencia en una sola copia. Todas las cepas de *E. coli* se crecieron a 37°C, excepto cuando se transformaron con plásmidos con funciones de replicación termo-sensibles y en los estudios de expresión, donde los crecimientos se hicieron a 30°C. Para seleccionar las clonas con los genes *lacZ* y *galE* interrumpidos en el cromosoma, además de verificar la adquisición de la resistencia a antibiótico dada por el casete escindible que se utilizó para generar las interrupciones *in vitro*, se determinaron los fenotipos  $\beta\text{-Gal}^-$  y  $\text{GalE}^-$  en placas de LB sólido con 33  $\mu\text{g/ml}$  de XGal + IPTG 100  $\mu\text{M}$  y medio MacConkey + galactosa al 2 %, respectivamente. Para la selección de las fusiones génicas de *lacZ* a los promotores  $P_L$  y  $P_{RM}$  de lambda se utilizaron placas de medio de inducción/represión con XGal a la concentración mencionada anteriormente. El medio YENB libre de sales (7.5 g/litro de extracto de levadura, 8.0 g/litro de triptona y 14.0 g/litro de agar bacteriológico; Sharma *et al.*, 1991) se utilizó para crecer y electroporar *E. coli* con plásmido super-enrollado, con lo que se evita la preparación previa de las células electrocompetentes.

## PROCEDIMIENTOS GENÉTICOS Y TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE

Todas las enzimas de restricción, DNA ligasa y DNA polimerasa del fago T4 y marcadores de tamaño de fragmentos de DNA fueron obtenidos de New England BioLabs (Beverly, MA, USA) o Gibco-BRL (Life Technologies, Rockville, MD, USA) y se utilizaron de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes. Todos los demás reactivos necesarios para el trabajo de microbiología y biología molecular se obtuvieron de Sigma-Aldrich Química (Toluca, MEX), Research Organics Inc (Cleveland, OH, USA), Merck-México (Naucalpan de Juárez, MEX) y Difco Laboratories (Detroit, MI, USA). Todas las manipulaciones de DNA, por lo general, se realizaron como se describió previamente (Sambrook *et al.*, 1989)

**Transformación de DNA.** En los experimentos de clonación, el DNA de plásmido se introdujo en *E. coli* por el método de transformación química estándar con  $\text{CaCl}_2$  o electroporación, pero en la mayoría de los casos se utilizó el método de electrotransformación modificado por Sharma *et al.* (1991).

**Purificación de DNA.** Para el análisis de las clonas recombinantes, el DNA de plásmido se preparó por medio del método de lisis alcalina (Rodríguez and Tait, 1983) o con QIAGEN Mini-isolation kit (Qiagen, Sta. Clarita, CA, USA) como lo describen los fabricantes. Para los experimentos de clonación, los fragmentos de DNA se extrajeron de geles preparativos de agarosa utilizando QIAquick Gel extraction kit (Qiagen) o por el método de maceración-congelación del fragmento de agarosa con la banda de DNA de interés, extracción posterior con fenol y cloroformo y recuperación del fragmento de DNA por precipitación alcohólica en presencia de sal. Los fragmentos de DNA pequeños (iguales o menores de 250 pb) se separaron en geles de poliacrilamida al 7.5 %, después de escindir los fragmentos del polímero con el DNA de interés, éste se recuperó por elusión a 37°C y concentración con n-butanol. El DNA cromosomal se extrajo de cultivos de toda la noche usando cetiltrimetilamonio y NaCl (Wilson, 1987).

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Las reacciones de la polimerasa en cadena se realizaron utilizando Taq DNA-polimerasa (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) o elongasa (Gibco-BRL, Life Technologies, Rockville, MD, USA). Las mezclas de reacción se prepararon mezclando los siguientes reactivos en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ : 50 ng de DNA templado, 50 pmol de cada oligonucleótido iniciador, 0.25 mM de mezcla de dNTPs, 1.6 mM de  $\text{CaCl}_2$  y 1-2 unidades de DNA-polimerasa. Para el proceso de amplificación las mezclas se incubaron en Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, USA) siguiendo un método de tres etapas: **1.** Un ciclo de pre-desnaturalización a 94°C durante 3-5 min; **2.**

De 25-30 ciclos de amplificación, cada uno con un paso de desnaturalización, alineamiento y polimerización, cuyos parámetros de temperatura y duración fueron determinados para cada caso; **3.** Un ciclo de extensión final de 10 minutos a la temperatura óptima de la polimerasa que se usó (68°C para elongasa o 72°C para Taq-polimerasa).

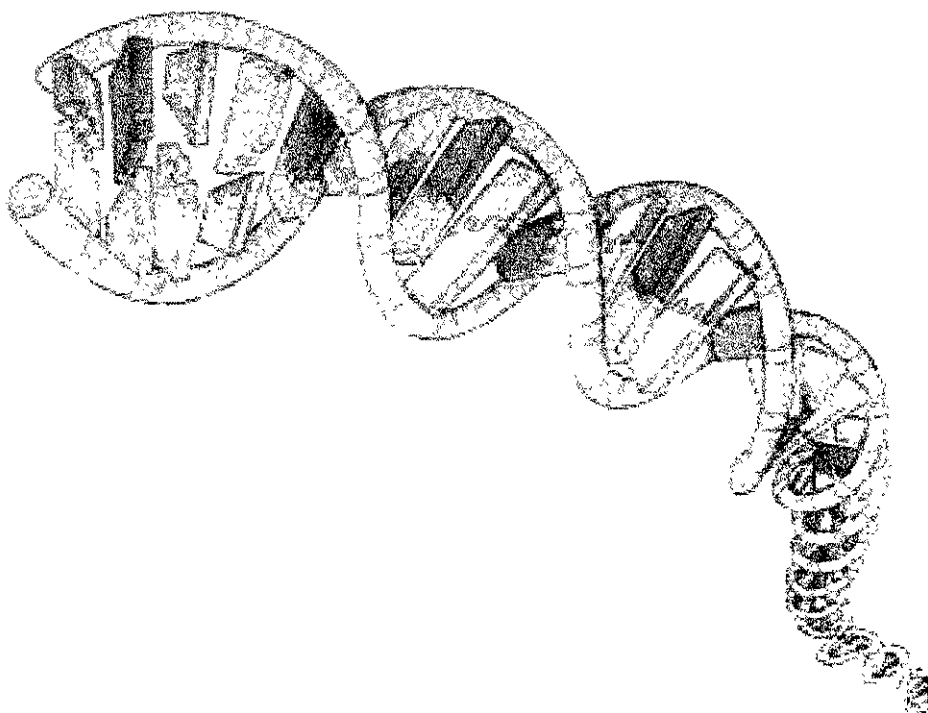
**Determinación de la secuencia de nucleótidos.** La determinación de la secuencia de nucleótidos se realizó por el método de Sanger modificado por Amersham Life Science. Con este método la elongación de las cadenas de DNA cuya secuencia se quiere determinar, se realiza por medio de PCR y adicionando dideoxinucleótidos a la reacción. Se utilizó Termosequenase Kit con Redivue <sup>33</sup>P-dNTPs. En algunos casos, se llevó a cabo secuenciación automatizada usando ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer).

## MÉTODOS ANALÍTICOS

**Determinación de la concentración de proteína.** La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (PROTEIN ASSAY, Bio-Rad), utilizando albúmina sérica de bovino como proteína de referencia (Sigma Co., St. Louis, MO)

**Determinación de crecimiento bacteriano.** El crecimiento de las cepas se determinó en función de la concentración celular (turbidez), midiendo la absorbancia de los cultivos a 600 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU-70, Fullerton, CA).

**Análisis de expresión genética.** Para los estudios de regulación de la expresión genética a partir de los promotores de lambda, las cepas de *E. coli* que llevan estas construcciones se crecieron como se describe a continuación: los pre-inóculos se prepararon por crecimiento durante toda la noche en medio de represión con antibiótico y a 30°C y 300 rpm. Los extractos celulares se prepararon inoculando el medio de inducción/represión (medio mínimo M9 suplementado con glucosa y casaminoácidos) con los cultivos saturados, diluyendo de 50 a 100 veces (D.O.<sub>600nm</sub> inicial de aproximadamente 0.1). Cuando el cultivo llegó a una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.5-0.6 (crecimiento exponencial) se le adicionó triptofano a una concentración final de 100 µg/ml. Antes, al momento y después de la adición del inductor/represor, se tomaron muestras del cultivo. El muestreo por duplicado de 1 ml del cultivo inducido se hizo cada hora y durante un total 6 hrs. Las células se recuperaron por centrifugación y los paquetes celulares fueron resuspendidos en 1.0 ml de NaCl 10 mM a 4°C para lavarlos. La suspensión celular se centrifugó y



# RESULTADOS

# VII

**A FAMILY OF REMOVABLE CASSETTES DESIGNED  
TO OBTAIN ANTIBIOTIC-RESISTANCE-FREE  
GENOMIC MODIFICATIONS OF ESCHERICHIA COLI  
AND OTHER BACTERIA  
(PUBLICADO EN GENE)**

En este artículo se reporta la construcción del grupo de herramientas moleculares que permiten modificar genes en el cromosoma bacteriano sin dejar marcadores de resistencia a antibióticos en el cromosoma de la bacteria. Los elementos que se describen son los siguientes:

1. La construcción y caracterización del vector pLox1, el cual se utiliza para modificar cualquier gen de selección mediante la adición en ambos lados de sitios *loxP* y MCS. Mediante este procedimiento, el marcador de selección además de ser más versátil por los sitios de restricción adicionales, es escindible por la presencia de los sitios *loxP* que lo delimitan y sobre los cuales actúa la recombinasa Cre.
2. La construcción y caracterización de los casetes de resistencia a antibiótico removibles Cat2, Gen4 y Kan2, así como del vector pJW168 en el cual la expresión del gen de la recombinasa sitio-específica Cre, está bajo el control del promotor *P<sub>lacUV5</sub>*
3. La validación del sistema genético construido, la cual se llevó a cabo utilizando uno de los casetes construidos (Cat2) para interrumpir los genes *lacZ* y *galE* en el cromosoma de *E. coli* y sin dejar ningún marcador de resistencia en esta bacteria, ya que después de inducir la expresión de Cre, el gen de resistencia fue escindido por recombinación sitio-específica.



## A family of removable cassettes designed to obtain antibiotic-resistance-free genomic modifications of *Escherichia coli* and other bacteria

Beatriz Palmeros<sup>a</sup>, Jadwiga Wild<sup>b</sup>, Waclaw Szybalski<sup>b</sup>, Sylvie Le Borgne<sup>a</sup>,  
Georgina Hernández-Chávez<sup>a</sup>, Guillermo Gosset<sup>a</sup>, Fernando Valle<sup>c</sup>, Francisco Bolívar<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, 62210 Morelos, Mexico

<sup>b</sup> McArdle Laboratory for Cancer Research, University of Wisconsin Medical School, Madison, WI 53706, USA

<sup>c</sup> Genencor International Inc., Palo Alto, CA 94304, USA

Received 15 October 1999, received in revised form 24 January 2000; accepted 4 February 2000

Received by D.L. Court

### Abstract

Modifications of microbial genomes often require the use of the antibiotic-resistance (Anb<sup>R</sup>)-encoding genes and other easily selectable markers. We have developed a set of such selectable markers (Cm<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup> and Gm<sup>R</sup>), which could easily be inserted into the genome and subsequently removed by using the Cre/*loxP* site-specific recombination system of bacteriophage P1. In this manner the same marker could be used more than once in the same background, while the resulting strain could or would remain Anb<sup>R</sup> marker-free.

Three plasmids were constructed, each containing a cassette consisting of the Cm<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup>, or Gm<sup>R</sup> gene flanked by two parallel *loxP* sites and two polylinkers (MCS). To test insertion and excision, cassettes were inserted into the *lacZ* or *galE* genes carried on an *oriT/par*-dependent suicide plasmid, which contained a dominant Sm<sup>R</sup> gene. The cassettes were crossed into the *E. coli* genome by homologous recombination (allelic exchange), in a manner analogous to that described by Pósfai et al. [Nucl. Acids Res. 22 (1994) 2392–2398], selecting for the Cm<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup>, or Gm<sup>R</sup>, for the LacZ<sup>-</sup> or GalE<sup>-</sup> and for the Sm<sup>S</sup> phenotypes (the latter to assure allelic exchange rather than insertion of the entire plasmid). When required, after selecting the strain with the desired modification, the Cm<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup>, or Gm<sup>R</sup> marker was excised by supplying the Cre function. Cre was provided by the thermosensitive plasmid pJW168, which was transformed into the Anb<sup>R</sup> host at 30 °C, and was subsequently eliminated at 42 °C. Thus the Anb<sup>R</sup> marker was removed, whereas the *lacZ* or *galE* gene remained interrupted by the retained *loxP* site. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Cre; *loxP*; Recombinant DNA tools; Site-specific recombination; Unmarked strains

Abbreviations: *aacCI*, gene encoding Gm acetyltransferase 3 (Gm<sup>R</sup>), Anb, antibiotic(s), βGal, β-galactosidase, *bla*, gene encoding β-lactamase (Ap<sup>R</sup>); bp, base pair(s); BSA, bovine serum albumin; *cat*, gene encoding Cm acetyltransferase (Cm<sup>R</sup>), Cb, carbenicillin; ccc, covalently closed circular; Cm, chloramphenicol; Cre, site-specific recombinase, *cre*, gene encoding Cre protein, CSSR, conservative site-specific recombination; dNTPs, deoxyribonucleoside triphosphates; *E. Escherichia*, EtdB, ethidium bromide, *galE*, gene encoding UDP-galactose 4-epimerase (GalE); Gm, gentamycin, IPTG, isopropyl β-D-thiogalactopyranoside, kb, kilobase(s) or 1000 bp, Km, kanamycin; *lacI<sup>q</sup>*, mutant gene encoding the *lac* repressor under the enhanced constitutive expression, *lacZ*, gene encoding βGal, LB, Luria-Bertani medium; *loxP*, DNA target site for Cre, MCS, multiple cloning site(s), nt, nucleotide(s); *aptIII*, gene encoding aminoglycoside 3'-phosphotransferase (Km<sup>R</sup>), *ori*, origin(s) of DNA replication, p, plasmid, P, promoter; PCR, polymerase chain reaction; *P<sub>lacUV5</sub>*, *lac* promoter with UV5 mutation; PolIk, Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase I, <sup>R</sup>, resistant resistance, Rep, replication protein; <sup>S</sup>, sensitive sensitivity; Sm, streptomycin; TBE, Tris-borate-EDTA; ts, temperature-sensitive, T4Pol, T4 DNA polymerase, UV, ultraviolet, wt, wild type, XGal, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside, [ ], denotes the plasmid-carrier state, †, novel junction (fusion or insertion); ‡, designates a truncated gene at the indicated side

\* Corresponding author. Tel.: +52-7329-1601; fax: +52-7317-2388.

E-mail address: bolivar@ibt.unam.mx (F. Bolívar).

## 1. Introduction

The advances in genetic engineering, both for prokaryotic and eukaryotic organisms, have led to desirable improvements in their traits, with a tremendous potential for health, industrial, environmental, and agricultural applications. Despite these advances, the fact remains that utilization of genetically modified organisms has been slowed by public concerns (Colwell, 1991). Although experimentally unsubstantiated, such concerns are related mainly to the use of heterologous genes that confer specific traits, like antibiotic-resistance markers ( $Anb^R$ ) that might present uncertainty regarding the environmental impact (De Lorenzo, 1992). These kinds of marker are widely utilized to select specific constructs and genetic transformants. A clear example of this preoccupation and deliberation is the case of recent difficulties for the approval of a transgenic corn, because it was claimed that the bacterial ampicillin resistance gene present in this strain represents an unacceptable risk (Mikkelsen et al., 1996).

Beside the above-mentioned societal problems, there are also good scientific reasons to remove and/or recycle the selective markers, especially when the improvement of strains requires several modifications. If every genetic modification in a given strain results in an antibiotic marker retained in the modified organism, and if the combination of two or more mutations needs to be analyzed, it becomes progressively more difficult to find new  $Anb^R$  genes to use. Therefore, gene modifications without retaining  $Anb^R$  genes in the host genome should overcome certain reservations expressed at various levels against modified organisms carrying such traits. Moreover, it would obviate the need for a plethora of selectable markers in subsequent rounds of gene modification into the same host.

In this paper we describe a genetic system designed to remove unwanted  $Anb^R$  genes from modified cells by conservative site-specific recombination (CSSR). Methods previously employed to excise certain sequences from the genome of mammalian, plants, insects or bacterial cells involve one of these CSSR systems (Pósfai et al., 1994; Sauer, 1994a; Cherepanov and Wackernagel, 1995; Peredelchuk and Bennett, 1997). These systems are very simple, as they require only an enzyme recombinase and very short DNA sequences as targets for recombination (reviewed by Craig, 1988). The CSSR systems are useful tools for genetic engineering due to the high specificity of their respective recombinases, which enables directed *in vivo* and *in vitro* operations on DNA molecules, and since they do not require additional factors, they function efficiently in a wide variety of species and heterologous environments (Sauer, 1994b). Among the best-characterized CSSR systems, the ones preferentially utilized are three systems containing recombinases that belong

to the integrase family: Cre/*loxP* from bacteriophage P1, Fli/*FRT* from *Saccharomyces cerevisiae* and R/RSSs from *Zygosaccharomyces rouxii* (Kilby et al., 1993). In addition to these systems, two members of the resolvase/invertase family have also been described: RES/*res* from the  $\gamma\delta$  transposon (Higgins et al., 1996) and the *mrs* system from plasmid RP4 (Kristensen et al., 1995). In this work, we used the bacteriophage P1 Cre/*loxP* recombination system, which consists of the Cre enzyme and two asymmetric 34 bp *loxP* recombination sites (Sternberg and Hamilton, 1981). A *loxP* site consists of two 13 bp sequences, inverted and imperfectly repeated, which surround an 8 bp core asymmetric sequence, where crossing-over occurs. The Cre-dependent intramolecular recombination between two parallel *loxP* sites results in excision of any intervening DNA sequence as a circular molecule, producing two recombination products each containing one *loxP* site (Kilby et al., 1993). Based on these properties, we decided to clone three  $Anb^R$  markers ( $Cm^R$ ,  $Km^R$  and  $Gm^R$ ), between two *loxP* sites in order to be subsequently removed from the bacterial genome by Cre action. Since recombinases are sufficiently active to promote excision when transiently expressed in the bacterium from a plasmid, we have constructed plasmid pJW168 as the Cre protein-producing element. In this replicon, the recombinase structural gene is under control of the *P<sub>lacUV5</sub>* promoter, which contains the *lacI<sup>q</sup>* gene. Moreover, this plasmid carries a temperature-sensitive replicon derived from pSC101, which can replicate at 30°C but not at temperatures above 37°C; therefore, it can be removed from its host by increasing the temperature (Armstrong et al., 1984).

## 2. Materials and methods

### 2.1 Bacterial strains, plasmids and media

The following *E. coli* strains, plasmids and media were used in this work: *E. coli* strains XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA) and SY327  $\lambda$ -*pir* (Miller and Mekalanos, 1988) as the hosts for construction and amplification of all plasmids with *ori<sub>ColE1</sub>* and of plasmids with *ori<sub>γ<sub>ROK</sub></sub>*, respectively. W3110 (Jensen, 1993) was used for chromosomal integration studies, and 294-Cre (Buchholz et al., 1996) was utilized to confirm the excision of  $Anb^R$  genes from all constructed cassettes. Plasmids pMS102 (Snaith et al., 1995), pKNG101 (Kaniga et al., 1991), pCAT19 (Fuqua, 1992), pBSL98 and pBSL141 (Alexeyev et al., 1995), pINTts (Hasan et al., 1994), pMH303 (van Haaren, unpublished results), pInt3 (Valle, unpublished results) and pGalET (Le Borgne, unpublished results) were utilized to construct the plasmids described here. Cells were grown in LB broth or on LB-agar plates prepared as described

(Sambrook et al., 1989). Antibiotics (Anb) were used in selection media at the following final concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) for cells carrying multicopy plasmids: 100 Cb, 30 Cm, 30 Km, 10 Gm and 75 Sm, respectively. For cells carrying the Anb<sup>R</sup> marker in a single copy or low-copy number plasmids, the final Anb concentrations were as follows: 20  $\mu\text{g/ml}$  for Cb, Cm, Km and Sm, and 5  $\mu\text{g/ml}$  for Gm; Cb was used instead of ampicillin. The  $\beta\text{Gal}$  and  $\text{GalE}$  phenotypes were screened on LB-agar plates containing 33  $\mu\text{g}$  XGal/ml + 0.1 mM IPTG and MacConkey + 2% galactose plates, respectively.

## 2.2. Genetic procedures and recombinant DNA techniques

Restriction enzymes, T4 DNA ligase,  $\text{PolIk}$  and T4Pol were purchased from either New England BioLabs (Beverly, MA) or Gibco-BRL (Life Technologies, Rockville, MD) and were used as suggested by the supplier; except for T4Pol which was utilized for blunting DNA fragments in the respective restriction enzymes incubation buffers supplemented with BSA and 100 mM dNTPs. All DNA manipulations were performed as described previously (Sambrook et al., 1989). Bacterial transformations were carried out using cells treated with  $\text{CaCl}_2$  or by electroporation using an Eppendorf electroporator, according to the manufacturer's recommendations (Eppendorf, Hamburg, Germany). Plasmid DNA was purified by alkaline lysis method. DNA restriction fragments and PCR products were separated by electrophoresis on a 1.2–1.5% agarose gel in  $1 \times$  TBE buffer and analyzed on UV transilluminator after staining with EtdBr. Nucleotide sequences of the PCR fragments were determined by the dideoxy method as modified by Amersham Life Science (ThermoSequenase Kit using Redivue <sup>32</sup>P-dideoxynucleotides).

## 2.3. Construction of plasmids

### 2.3.1. Construction of pLox1 vector with removable loxP-Anb<sup>R</sup>-loxP cassettes

Plasmid pMS102 that carries two parallel loxP sites within MCS was modified by digesting to completion with  $\text{HpaI} + \text{NheI}$ , blunt-ending with T4Pol and then self-ligation. The resulting plasmid, pLox1, has lost from its MCS the 26 bp DNA fragment, carrying the  $\text{XbaI}$  and  $\text{KpnI}$  sites. Three restriction fragments containing  $\text{Cm}^R$  (*cat*),  $\text{Km}^R$  (*nipII*) and  $\text{Gm}^R$  (*aacCI*) were singly inserted into the unique  $\text{XbaI}$  site of pLox1. The *cat* gene was obtained as a 982 bp  $\text{XbaI}$  DNA fragment from pCAT19 and cloned into  $\text{XbaI}$ -digested pLox1. The *nipII* and *aacCI* genes were obtained as 1178 bp and 790 bp  $\text{MluI}$  DNA fragments from pBSL98 and pBSL141, respectively. These fragments, together with  $\text{XbaI}$ -digested pLox1, were blunt-ended using T4Pol and

co-ligated afterwards. Depending on which Anb<sup>R</sup> marker they carried, the respective plasmids were designated pLoxCat2, pLoxKan2 and pLoxGen4 (Fig. 1), and they were the sources of removable loxP-Anb<sup>R</sup>-loxP markers, namely Cat2, Kan2 and Gen4 cassettes.

### 2.3.2. Construction of the Cre-supplying vector

To supply the Cre recombinase in a transient fashion, we used plasmid pJW168 (Wild et al., 1998) that carries *lacI<sup>q</sup>P<sub>lacUV5</sub>-cre* construct and the ts Rep functions. The ts-replicon was excised as a 3.0 kb fragment from plasmid pINT-ts (Hasan et al., 1994) by digestion with  $\text{ClaI}$ , blunting with  $\text{PolIk}$ , and then digesting with  $\text{HindIII}$ . The 3.0 kb *lacI<sup>q</sup>P<sub>lacUV5</sub>-cre* fusion was obtained from pJW159 (Wild, unpublished results) by digestion with  $\text{NheI}$ , blunting with  $\text{PolIk}$ , and then digesting with  $\text{HindIII}$ .

To verify that it was the Cre recombinase that performed the excision, we have constructed a control plasmid, pJW168 $\Delta\text{EB}$ , derived from pJW168, in which the *cre* gene was inactivated by digestion with  $\text{EcoRI} + \text{BamHI}$ , blunting with T4Pol, followed by self-ligation.

## 2.4. Construction of allelic exchange vectors

### 2.4.1. Vectors containing the removable Cat2 marker in their lacZ gene

To target the Cat2 cassette into the *lacZ* gene, we constructed the pKNGlac vector in the following steps. Plasmid pInt3 was obtained from plasmid pMC1403 (Casadaban et al., 1980) by digestion with  $\text{NdeI}$  and self-ligation of the 5.0 kb purified DNA fragment carrying *bla* gene, *ori<sub>pBR322</sub>* and the truncated *lacZ'* gene. The 1061 bp Cat2 cassette was excised as a  $\text{BamHI}-\text{NotI}$  fragment from pLoxCat2 (Fig. 1), blunted with T4Pol, and ligated to plasmid pInt3 cut with  $\text{EcoRV}$ , resulting in plasmid pLZLC3. In the last step, the 4.5 kb  $\text{BamHI}-\text{NdeI}$  fragment, containing *lacZ':::Cat2* gene interruption, was excised from pLZLC3, blunted with T4Pol, and ligated with the  $\text{SmaI}$ -digested pKNG101 to obtain pKNGlac. This 'suicidal' vector can be used for allelic exchange in most bacterial species since its *ori<sub>y</sub>* functions only in bacteria engineered to produce the P1 $\pi$  replication protein.

### 2.4.2. Vectors containing the removable Cat2 marker in their galE gene

To target the Cat2 cassette into the *galE* gene, we constructed the pKNGgal vector in the following steps. Plasmid pGalET was obtained by cloning a 2045 bp PCR fragment carrying the *E. coli galE* and *galT* genes into pT7Blue(R) vector (Novagen, Madison, WI). The internal 240 bp  $\text{NruI}$  fragment of *galE* gene on pGalET was replaced by the 1061 bp Cat2 cassette prepared as in Section 2.4.1, resulting in plasmid pL-LCT. In the last



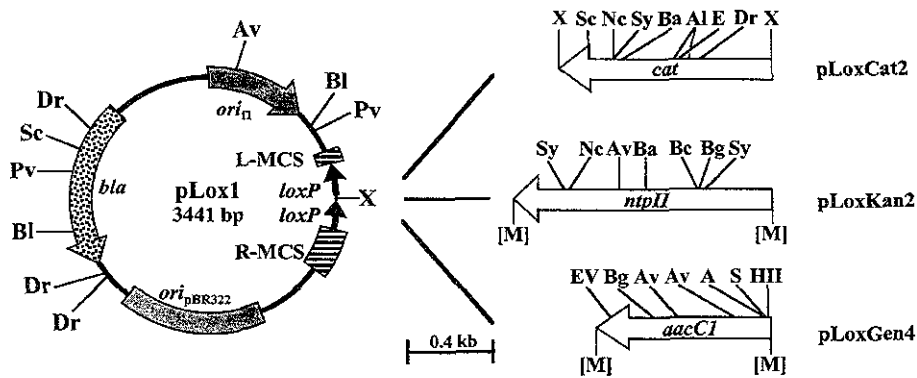


Fig. 1 Physical maps of the pLox1 plasmid and Anb<sup>R</sup> genes. The pLox1 vector carries *ori* and *bla* genes from pBR322 (Bolivar et al., 1977) and L-MCS and R-MCS flanking two parallel *loxP* sites (black upward arrows) with *Xba*I site (X) between them (see fig. 1b in Snaith et al., 1995). Depending on the Anb<sup>R</sup> gene added (*cat*, *ntpII* or *aacC1*), the pLox1-derived pLox1Anb<sup>R</sup> plasmids are designated pLoxCat2 (Cm<sup>R</sup>), pLoxKan2 (Km<sup>R</sup>), or pLoxGen4 (Gm<sup>R</sup>). Arrowheads indicate the gene or *loxP* orientations. The restriction sites (some only in MCS and specified in legends, but not in figure) are: *Acc*I (A), *Acl*I (Al), *Apal* (Ap), *Ava*I (Av), *Bal*I (Ba), *Bam*HI (B), *Bcl*I (Bc), *Bgl*I (Bl), *Bgl*II (Bg), *Cla*I (C), *Dra*I (Dr), *Eco*RI (E), *Eco*RV (EV), *Hinc*II (HI), *Hind*III (H), *Nco*I (Nc), *Nde*I (Nd), *Nhe*I (Nh), *Not*I (N), *Nru*I (Nr), *Nsi*I (Ns), *Pml*I (Pm), *Pvu*I (Pv), *Sal*I (S), *Scal* (Sc), *Sfi*I (Sf), *Sma*I (Sm), *Sna*BI (Sn), *Spe*I (Se), *Sph*I (Sp), *Stu*I (St), *Sty*I (Sy), *Xba*I (X) and *Xho*I (Xh). Only selected restriction sites are shown. Restriction sites in the L- and R-MCS are (L) H, Al, Pm, Sf, Bl, Ba\*, Se, Sc, Xh, Av\*, S\*, A\*, HII\*, C\*, and B\*; (R) N, Nd, Ns, Sy, St, A\*, Sn, Sp, Dr, EV, C\*, Pv, Bg, Bc, B\*, Av\*, Ap, Sm, S\*, A\*, HII\*, Sy, Nc, Ba\*, and E. Asterisks indicate restriction sites present in both L- and R-MCS. [M] represents the 'blunted' *Mlu*I sites. Plasmids and gene inserts are drawn approximately to scale. The term cassette refers to the Anb<sup>R</sup> gene flanked by two parallel *loxP* sites and variable segments of the L- and R-MCS as present in any of the three pLox1Anb<sup>R</sup> plasmids.

step, the 2.9 kb *Sma*I–*Spe*I fragment, containing *galE::Cat2* gene interruption, was excised from pELCT, and ligated with the *Sma*I + *Spe*I-digested pKNG101 to obtain pKNGgal. This 'suicidal' vector can be targeted to the *galE* gene to be used for allelic exchange in a wide variety of bacterial species that do not produce the Pir ( $\pi$ ) replication protein (see Section 2.4.1).

2.5. PCR analysis of chromosomal modifications

Genomic DNA was extracted from overnight cultures using cetyltrimethylammonium bromide, as described by Wilson (1987), and used as template for PCR amplification utilizing the Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, USA). The 50  $\mu$ l reaction mixture contained one unit of elongase, 50 ng genomic DNA, 50  $\mu$ mol of each primer, 0.25 mM dNTPs-mix and 1.6 mM MgCl<sub>2</sub>. Mixtures were heated at 94°C for 3 min, the amplification was carried during 30 cycles of extension (30 s at 95°C, 45 s at 60°C, 2.5 min at 68°C) followed by a final extension (10 min at 68°C)

3. Results and discussion

3.1. Construction of the basic components

The system described in this report is composed of two genetic instruments (Figs. 1 and 2). The first one consists of three removable Anb<sup>R</sup> cassettes, whose expression is high enough to permit selection for Anb<sup>R</sup>, even if present on only one copy integrated into the

genome. This is important to consider, because in our hands, not all the available Anb<sup>R</sup> genes allowed efficient selection when integrated into the genome only as a single copy; this is the case for the Tc<sup>R</sup> and Sm<sup>R</sup> genes (Valle, unpublished results). To test more than one Anb<sup>R</sup> marker, we decided to construct three different cassettes by cloning into pLox1 the *cat*, *ntpII* and *aacC1* genes, which encode for Cm<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup> and Gm<sup>R</sup>, respectively. In the constructed cassettes each Anb<sup>R</sup> gene is flanked by a complete *loxP* site, and since the deletion

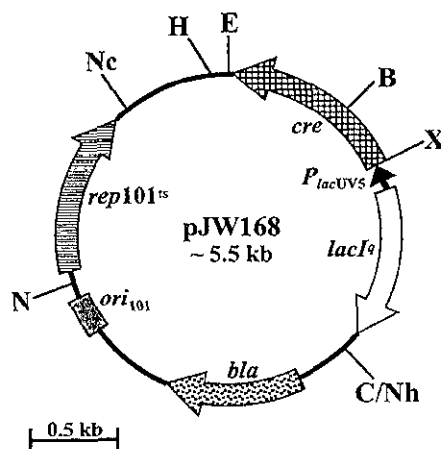


Fig. 2 General structure and physical map of the *cre*-expression plasmid pJW168. Transcription of *cre* is driven by the *lacUV5* promoter and is regulated by *lacI<sup>q</sup>*-encoded repressor. This vector carries a ts-replicon derived from pSC101 and the *bla* gene encoding Cb<sup>R</sup>. Only selected restriction sites are shown. The abbreviations used are as in the caption to Fig. 1. Plasmid is drawn approximately to scale.

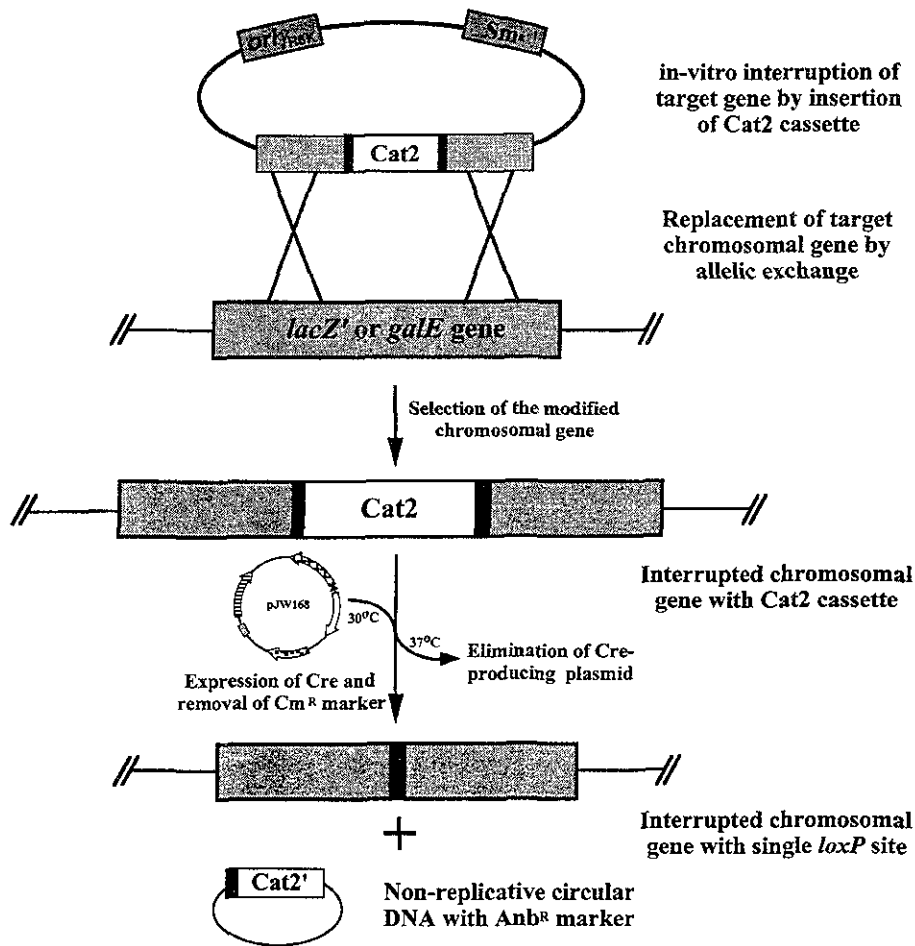


Fig. 3 Genetic manipulations employing *Anb<sup>R</sup>* markers and leading in the final step to the desired *Anb<sup>S</sup>* (resistance marker-free) mutant strains. The objective, as exemplified here, was to disrupt the *lacZ* or *galE* genes with the *Cat2* cassette. First, the cloned *lacZ* or *galE* genes were in vitro interrupted by insertion of the *Cat2* removable cassette. Second, gene replacement vectors carrying such interrupted *lacZ* or *galE* genes were transformed into *E. coli* W3110; the allelic exchange event was screened for the gain of the *Cm<sup>R</sup>* phenotype and the simultaneous loss of the plasmid, the latter was done by replica plating, since loss of the plasmid is associated with loss of the dominant *Sm<sup>R</sup>* phenotype. Third, the removal of *Anb<sup>R</sup>* marker from the chromosome, as a non-replicative circular DNA, was achieved by Cre-mediated recombination (excision) after transforming the mutant strains with pJW168. Fourth, increasing the growth temperature of the bacterial culture eliminated the Cre recombinase-producing ts-vector. Narrow filled-in boxes represent *loxP* sites.

of the small fragment with an *XbaI* site left nearly intact the original MCS, they can easily be excised from its vector in order to use in subsequent genetic modifications (Fig. 1). On the other hand, unique recognition sites for several restriction enzymes can be used to liberate the *loxP* cassette from the vector backbone, or can also be useful for cloning any DNA sequence. Moreover, the *XbaI* site located on plasmid pLox1 between the two *loxP* sites enables the construction of customized removable cassettes by insertion of selectable and/or screenable markers.

The second component is plasmid pJW168, which produces the Cre recombinase (Fig. 2). This vector carries the *cre* gene under the control of *P<sub>lac</sub>*, as well

as *lacI<sup>a</sup>* gene encoding the Lac repressor; all the elements required for efficient and regulated synthesis of the Cre recombinase. The plasmid also contains a ts-replicon derived from pSC101, and the *bla* gene (*Cb<sup>R</sup>* or *Ap<sup>R</sup>*), allowing selection for the presence of the vector in its host. As shown in Fig. 3, the Cre product of the pJW168 is used for the excision of the *Anb<sup>R</sup>* marker, once it is no longer required. In turn, growing the culture at 42°C can efficiently eliminate the Cre-supplying plasmid. After the *Cat2* cassette and the plasmid pJW168 have been removed from the modified cell, the only remaining piece of the system described here is a single and innocuous *loxP* site at the bacterial chromosome (see Figs. 3 and 4).

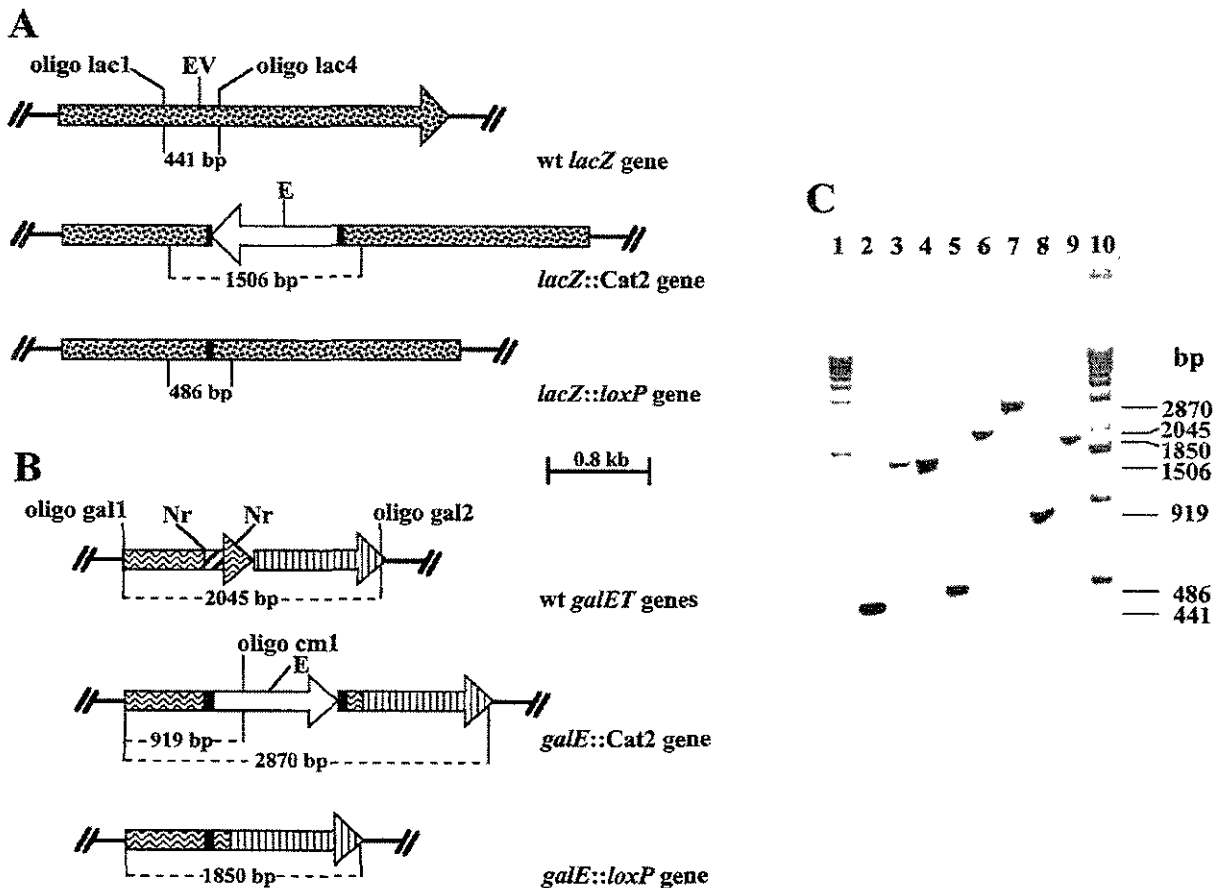


Fig. 4. Characterization of the Anb<sup>S</sup> (resistance marker-free) and Anb<sup>R</sup> strains by PCR analysis. (A, B) Top lines represent structures of the original *lacZ* and *galET* genes, respectively. Middle lines represent structures after allelic exchange when using pKNGlac and pKNGgal plasmids, respectively. Positions where each primer hybridizes are indicated above the top lines (and in the middle line of B) for oligo cm1. The sequences of the PCR primers are as follows: **lac1**, 5'-gaaattatcagatgagcgtggtggttatgcc-3'; **lac4**, 5'-cattggcaaccatgccgtgggtttcaatatt-3'; **gal1**, 5'-gagagtctggtaccgggtgtagcgg-3'; **gal2**, 5'-ggatgtcgtcgaactgcgcgcaaacgct-3'; **cm1**, 5'-gggtgatataccagtgattttttccat-3'. Stippled, wavy-line and striped boxes represent *lacZ*, *galE* and *galT* genes, respectively. Hatched box (top line of B) represents *galE* internal *NruI* fragment, which was replaced with Cat2 cassette. Narrow filled-in boxes represent *loxP* sites. Open arrows represent Cm<sup>R</sup> marker. Heavy horizontal lines (interrupted at their outer ends) represent the *E. coli* genome, which adjoins the *lacZ* and *galET* genes. The abbreviations used are as in the caption to Fig. 1. Maps are drawn approximately to scale. (C) Electrophoretic analysis of PCR products. The amplified DNA fragments using specific primers for each gene were resolved by electrophoresis on a 1.2% agarose gel. Primers used for amplification are in bold, between parentheses (see below). Lanes 1 and 10, molecular weight standards (1 kb ladder). 2, W3110 wt *lacZ* (**lac1**, **lac4**); 3 and 4, W3110 *lacZ*::Cat2 (**lac1**, **lac4**); 5, W3110 *lacZ*::*loxP* (**lac1**, **lac4**); 6, W3110 wt *galET* (**gal1**, **gal2**); 7, W3110 *galE*::Cat2 (**gal1**, **gal2**); 8, W3110 *galE*::Cat2 (**gal1**, **cm1**); 9, W3110 *galE*::*loxP* (**gal1**, **gal2**)

### 3.2. Two examples of gene interruptions in *E. coli*

To validate the use of the genetic system described in this paper, we decided to isolate unmarked mutant strains by interruption of the *lacZ* and *galE* genes in *E. coli* W3110. We chose these genes because both display unmistakable phenotypes, which permit a straightforward selection for the Anb<sup>R</sup> integration into the chromosome. The *lacZ*<sup>-</sup> genotype can easily be selected by 'white' phenotype on plates containing XGal+IPTG, and the *galE*<sup>-</sup> genotype also displays the 'white' phenotype on MacConkey-galactose plates. As described in Section 2.4, both genes were interrupted by insertion of the Cat2 cassette and then they were subcloned in an

R6K replicon-derived plasmid, pKNG101. The replication of this plasmid strictly depends of the  $\pi$  initiator protein encoded by the *pir* gene from R6K replicon (see Kornberg and Baker, 1992). Since *pir* gene is not a normal component of the *E. coli* genome, such plasmids are suicidal (non-replicating) vectors, that are very useful for introduction of gene modifications to chromosome by homologous recombination (Kaniga et al., 1991). Therefore, ccc DNA from pKNGlac and pKNGgal were introduced into *E. coli* W3110 by electroporation and transformed cells were selected for Cm<sup>R</sup> and 'white' phenotype on the above mentioned selection media. White colonies were then tested for the Sm phenotype, since a single recombination event (incorporation of the

entire  $Sm^R$  vector) will result in the dominant  $Sm^R$  phenotype, whereas an allelic exchange event (with the loss of the  $Sm^R$  gene) will produce  $Sm^S$  colonies with the  $Cm^R$ -carrying gene interruption. As expected, a significant portion of the tested colonies was  $Cm^R Sm^S$  (20%). Chromosomal  $Cm^R$ -carrying insertions were further confirmed by PCR amplification of the DNA regions with gene interruptions present in chromosomal DNA isolated from colonies with the proper phenotype. PCR analysis of DNA from those colonies, where an allelic exchange event occurred, resulted as expected in the 1.5 kb and 2.8 kb DNA fragments corresponding to  $lacZ::Cat2$  and  $galE::Cat2$  interruptions (Fig. 4C, lanes 4 and 7, respectively). *E. coli* W3110 derivative colonies containing the correct insertions were retained for the excision experiments.

### 3.3. Deletion of resistance markers

The removal of chromosomally integrated *Cat2* cassette was achieved upon transformation with Cre-producing plasmid pJW168. Transformed cells were selected for the  $Cb^R Cm^R$  phenotype and then 100 isolated colonies of the  $lacZ::Cat2$  and  $galE::Cat2$  strains were grown on Anb-free LB-agar plates with or without IPTG. As shown in Table 1, after overnight growth in the presence of IPTG to induce the Cre production, approximately 90% of the colonies have lost the  $Cm^R$  trait but still remained  $lacZ^-$  or  $galE^-$ . These results demonstrate that, in both cases, the genes remained interrupted by the *loxP* site, but the  $Cm^R$  marker was removed at high frequencies by the Cre function provided by pJW168. It is important to mention that, even in the absence of IPTG, the basal level of Cre was enough to cause substantial loss of the  $Cm^R$  marker (see Table 1). To confirm that the excision of the *Cat2* cassette was dependent on Cre-mediated recombination, plasmid pJW168 $\Delta EB$  was constructed (see Section 2.3.2); in this

plasmid the *cre* structural gene was inactivated by deletion of its 3'-end portion. As can be seen in Table 1, no  $Cm^S$  colonies were detected in the absence of functional Cre recombinase.

The elimination of the  $Cm^R$  marker was monitored by PCR analysis utilizing specific primers for each gene, as depicted in Fig. 4A and B. From the results presented in Fig. 4C, it is evident that both  $Cm^R$  deletion events were successful. The 441 bp DNA fragment from the wt *lacZ* was increased to 1506 bp in the  $lacZ::Cat2$  insertion and then reduced to 486 bp in the  $lacZ::loxP$   $Cm^S$  strain (Fig. 4A and C, lanes 2, 3–4 and 5, respectively). Also, the 2045 bp fragment corresponding to the wt *galET* DNA segment was increased to 2870 bp in the  $galE::Cat2$  insertion and then reduced to 1850 bp in the  $galE::loxP$  after *Cat2* excision (Fig. 4B and C, lanes 6, 7 and 9, respectively); the latter two segments have lost the *NruI-NruI* fragment (see Section 2.4.2). The 919 bp DNA fragment, corresponding to the  $galE::Cat2$  insertion, was also obtained with a *cat* gene specific primer (Fig. 4C, lane 8).

A final corroboration of the type of chromosomal modifications that were produced was obtained by determining the nucleotide sequence of the PCR products obtained from the chromosomal DNA regions that should contain the remaining *loxP* site. The nucleotide sequence of these fragments demonstrated that, as expected, Cre catalyzed the perfect removal of the marker, leaving only a 45 bp fragment without loss or alteration of the *loxP* sequence or its flanking regions in both gene interruptions (data not shown).

### 3.4. Elimination of plasmid pJW168

As previously mentioned, plasmid pJW168 carries a ts-replicon from pSC101, which allows the replication of this vector at 30°C but not at temperatures above 37°C (Hashimoto-Gotoh and Sekiguchi, 1977).

Table 1

Excision frequencies of the *Cat2* cassette from the gene interruptions by the Cre/*loxP* site-specific recombination<sup>a</sup>

Strain <sup>b</sup>	Media	Colonies $Cm^S$	Colonies $Cm^R$	Frequency of $Cm^R$ excision (%) <sup>c</sup>
W3110 <i>lacZ::Cat2</i> [pJW168]	LB	78	22	78
	LB+IPTG	84	16	84
W3110 <i>lacZ::Cat2</i> [pJW168 $\Delta EB$ ]	LB	0	100	0
	LB+IPTG	0	100	0
W3110 <i>galE::Cat2</i> [pJW168]	LB	78	22	78
	LB+IPTG	91	9	91
W3110 <i>galE::Cat2</i> [pJW168 $\Delta EB$ ]	LB	0	100	0
	LB+IPTG	0	100	0

<sup>a</sup> Similar results were obtained when the *Gen4* ( $Gm^R$ ) and *Kan2* ( $Km^R$ ) cassettes (see Fig. 1) were excised from the chromosome (data not shown).

<sup>b</sup> *E. coli* is carrying chromosomal gene interruptions by the *Cat2* cassette. Single colonies were screened for  $Cm^R$ ,  $Cm^S$  and 'white' (see Table 2) phenotypes on selection media (see Section 2.1) after the cells were transformed with allelic exchange vectors. Selected strains were transformed with Cre-producing [pJW168] plasmid or non-producing [pJW168 $\Delta EB$ ] control plasmid, to score the excision of the Anb<sup>R</sup> marker.

<sup>c</sup> Percentage of cells losing the  $Cm^R$  marker as a result of the Cre activity. Colonies were replica plated on the  $Cm$ -containing and on the  $Cm$ -free plates. Results are the averages of two experiments.

Table 2  
Loss of the Cre-supplying plasmid pJW168 at the non-permissive temperature of 42°C

Strains <sup>a</sup>	Growth temperature (°C)	Initial phenotype	Expected phenotype	Observed (%) <sup>b</sup>
W3110 <i>lacZ::loxP</i> [pJW168]	42	White, Cb <sup>R</sup>	White, Cb <sup>S</sup>	100
	30	White, Cb <sup>R</sup>	White, Cb <sup>R</sup>	100
W3110 <i>galE::loxP</i> [pJW168]	42	White, Cb <sup>R</sup>	White, Cb <sup>S</sup>	100
	30	White, Cb <sup>R</sup>	White, Cb <sup>R</sup>	100

<sup>a</sup> *E. coli* as used in Table 1, but after *cre* expression and resulting excision of the Anb<sup>R</sup> cassette. The *lacZ* or the *galE* gene is now disrupted only with the *loxP* site, still resulting in the 'white' phenotype.

<sup>b</sup> Cell percentages with expected phenotypes, after growth at permissive (30°C) and non-permissive (42°C) temperatures for the replication of pJW168. The data show that the loss of the pJW168 plasmid was nearly 100% (the loss was resulting in the Cb<sup>S</sup> phenotype). Similar results were obtained independently of which Anb<sup>R</sup> cassette was previously inserted (see Table 1, footnote a)

Therefore, when the growth temperature is increased to 42°C, plasmid pJW168 is eliminated by the method previously described (Le Borgne et al., 1998). As shown in Table 2, 100% of the recovered single colonies lost the plasmid when grown at non-permissive temperature. The loss of plasmid pJW168 was phenotypically confirmed by the inability of the clones to grow on LB plates containing Cb. The absence of vectors in Cb<sup>S</sup> cells was also confirmed by failure to isolate plasmid DNA from some of these colonies by the alkaline-lysis method. When subjected to electrophoresis in agarose gels stained with EtBr, no plasmid DNA was detected in extracts of all the analyzed colonies (data not shown).

### 3.5. Functionality of the *Kan2* and *Gen4* cassettes

The adequate functioning of the *Kan2* and *Gen4* removable cassettes was verified by excision of the corresponding Anb<sup>R</sup> marker from the pLoxKan2 and pLoxGen4 plasmids. For that purpose, these two plasmids were transformed into the *E. coli* 294-Cre strain, which produced the Cre recombinase under the control of the *p<sub>R</sub>* promoter of  $\lambda$  (Buchholz et al., 1996). In plasmids with two *loxP* sites, the inserts between these sites were deleted by Cre-mediated recombination, as assessed by analysis of all colonies at 42°C. The consequent loss of the Km<sup>R</sup> and Gm<sup>R</sup> markers from their vectors by Cre action was confirmed by the inability of the recombinant clones to grow on LB plates containing Km or Gm, and by growing on LB plates containing Cb. Similar values to those obtained for the excision (and recombination) frequencies for the *Cat2* (*cat*) cassette (Table 1) were also obtained for the *Kan2* (*ntpII*) and *Gen4* (*aacC1*) cassettes (data not shown). Subsequent isolation of plasmid DNA, followed by restriction analysis, confirmed the loss of the Anb<sup>R</sup> markers (data not shown).

## 4. Conclusions

In this paper we describe a set of Anb<sup>R</sup>-encoding cassettes and a *cre* expression vector. This system allows

and simplifies recycling of markers and greatly expands the repertoire of available Anb<sup>R</sup> determinants for re-use in *E. coli* and other bacteria. The system is useful to obtain genetic modifications at chromosomal level without retaining Anb<sup>R</sup> markers, because the Cre recombinase removes the undesirable Anb<sup>R</sup> genes from the cassettes inserted in the genome. This technique has the advantage that no Anb<sup>R</sup> marker stays behind on the *E. coli* chromosome and therefore the cell does not carry an Anb<sup>R</sup> gene that subsequently would prevent the selection for plasmids or other chromosomal modifications that would depend on such markers. Also, it can reduce the restrictions imposed on experimental designs by the limited availability of selectable markers. Furthermore, the elimination of Anb<sup>R</sup> markers from the bacterial chromosome could increase the acceptance of manipulated organisms for their use in biotechnological applications. Finally, the use of appropriate derivatives of in vitro transposition kits for mutagenesis of the cloned gene fragments could enrich the capacity of this system for the interruptions of genes at the chromosomal level.

Since the constructed cassettes are available with Cm<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup> and Gm<sup>R</sup> selectable markers, they are applicable in a wide range of bacteria. In addition, the *ntpII* gene utilized in this system is functional in *Bacillus* and the *aacC1* gene is functional in *Pseudomonas* species.

The MCS present in the backbone vector permits the use of various restriction enzymes for the excision of these Anb<sup>R</sup> cassettes, and provides an opportunity for the insertion of additional DNA sequences (e.g. promoters, heterologous genes, etc.) next to the cassette. Also, the basic *loxP* cassette used in this study possesses a unique *XbaI* site, which can be utilized for the insertion of desired markers.

One possible drawback to the present strategy may be the eventual site-specific recombination between *loxP* sites accumulating in the same chromosome that could lead to the deletion or inversion of a large chromosomal segment, depending on the orientation of the *loxP* sites and the distance between them. However, the survival of such large rearrangements will be highly unlikely.

because they will be lethal to the resulting strain, especially when the selection of the mutants is performed on minimal medium. It is also important to realize that after each round of allelic exchange and subsequent elimination of Anb<sup>R</sup> markers, a small region of the MCS remains in the chromosome. It is unlikely that these additional sequences could play a significant role in homologous recombination, because they are very small and not completely homologous. When the construction scheme makes it necessary to integrate another removable cassette into a second gene in the same host, it would be advisable to place the second cassette in the same orientation as the first gene, since this would lead to a very lethal deletion rather than possibly less lethal inversions. Another possibility would be to utilize for each next insertion the suitable *loxP* variants that are known not to recombine with the wild-type *loxP* (Hoess et al., 1986). The described approaches allowed us to obtain four different genetic modifications in the same strain (Valle, unpublished results).

Finally, since similar insertion–removal systems have even been reported which utilize the Fip recombinase and the FRT sites (Cherepanov and Wackernagel, 1995; Hoang et al., 1998) or other approaches, like the use of the *mrs* system and the RES resolvase and the *res* sites (Kristensen et al., 1995; Higgins et al., 1996), we believe that the Cre/*loxP* system described here has some advantages because *E. coli* is a natural host for the Cre/*loxP*-bearing phage P1, it does not leave behind any eukaryotic DNA fragments in the bacterial chromosome (Cherepanov and Wackernagel, 1995; Ueki et al., 1996; Hoang et al., 1998) and has a smaller target (34 bp) compared with the resolvase and *res* sites (120–140 bp).

## Acknowledgements

Plasmids pMS102 and pKNG101 were kindly provided by Dr. James A. Murray (Cambridge University, UK) and Dr. José L. Puente (University of México), respectively. *E. coli* W3110 was obtained from Charles Yanofsky (Stanford University, USA) and Dr. Frank Buchholz kindly provided *E. coli* strain 294-Cre. We wish to thank Mercedes Enzaldo, Paul Gaytán, and Eugenio Bustos for their technical assistance. This work was supported in part by a grant from Genencor International, Inc. and B.P. was supported by a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.

## References

Meveyev, M.I., Shokolenko, I.N., Croughan, T.P., 1995. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escher-*

- ichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160, 63–67.
- Armstrong, K.A., Acosta, R., Ledner, E., Machida, Y., Pancotto, M., McCormick, M., Ohtsubo, H., Ohtsubo, E., 1984. A  $37 \times 10^3$  molecular weight plasmid-encoded protein is required for replication and copy number control in the plasmid pSC101 and its temperature-sensitive derivative pHS1. *J. Mol. Biol.* 175, 331–347.
- Bolívar, F., Rodríguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., Falkow, S., 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95–113.
- Buchholz, F., Angrand, P.O., Stewart, A.F., 1996. A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucl. Acids Res.* 24, 3118–3119.
- Casadaban, M.J., Chou, J., Cohen, S.N., 1980. In vitro gene fusions that join an enzymatically active  $\beta$ -galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: *Escherichia coli* plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. *J. Bacteriol.* 143, 971–980.
- Cherepanov, P.P., Wackernagel, W., 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc<sup>R</sup> and Km<sup>R</sup> cassettes with the option of Fip-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158, 9–14.
- Colwell, R.R., 1991. Risk assessment in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2, 470–475.
- Craig, N.L., 1988. The mechanism of conservative site-specific recombination. *Annu. Rev. Genet.* 22, 77–105.
- De Lorenzo, V., 1992. Genetic engineering strategies for environmental applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3, 227–231.
- Fuqua, W.C., 1992. An improved chloramphenicol resistance gene cassette for site-directed marker replacement mutagenesis. *BioTechniques* 12, 223–225.
- Hasan, N., Koob, M., Szybalski, W., 1994. *Escherichia coli* genome targeting. I. Cre-*lox*-mediated in vitro generation of *ori*<sup>-</sup> plasmids and their in vivo chromosomal integration and retrieval. *Gene* 150, 51–56.
- Hashimoto-Gotoh, T., Sekiguchi, M., 1977. Mutations to temperature sensitivity in R plasmid pSC101. *J. Bacteriol.* 131, 405–412.
- Higgins, N.P., Yang, X., Fu, Q., Roth, J.R., 1996. Surveying a supercoil domain by using the  $\gamma\delta$  resolution system in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 178, 2825–2835.
- Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J., Schweizer, H.P., 1998. A broad-host-range Fip–FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212, 77–86.
- Hoess, R.H., Wierzbicki, A., Abremski, K., 1986. The role of the *loxP* spacer region in P1 site-specific recombination. *Nucl. Acids Res.* 14, 2287–2300.
- Jensen, K.F., 1993. The *Escherichia coli* K12 ‘wild types’ W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels. *J. Bacteriol.* 175, 3401–3407.
- Kaniga, K., Delor, I., Cornelis, G.R., 1991. A wide host range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *bla<sub>A</sub>* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 109, 137–141.
- Kilby, N.J., Snath, M.R., Murray, J.A.H., 1993. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet.* 9, 413–421.
- Kornberg, A., Baker, T.A., 1992. Plasmids and organelles. R6K. In: *DNA Replication*. W.H. Freeman and Company, New York, pp. 655–658.
- Kristensen, C.S., Eberl, L., Sanchez-Romero, J.M., Givskov, M., Mohl, S., De Lorenzo, V., 1995. Site-specific deletions of chromosomally located DNA segments with the multimer resolution system of broad-host-range plasmid RP4. *J. Bacteriol.* 177, 52–58.
- Le Bouc, S., Palmeros, B., Valle, F., Bolívar, F., Gosset, G., 1998.

- pBRINT-T<sub>5</sub>: a plasmid family with a temperature-sensitive replicon, designed for chromosomal integration into the *lacZ* gene of *Escherichia coli*. *Gene* 223, 213–219.
- Mikkelsen, T.R., Andersen, B., Jorgensen, R.B., 1996. The risk of crop transgene spread. *Nature* 380, 31.
- Miller, V.L., Mekalanos, J.J., 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations. osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* 170, 2575–2583.
- Peredelchuk, M.Y., Bennett, G.N., 1997. A method for construction of *E. coli* strains with multiple DNA insertions in the chromosome. *Gene* 187, 231–238.
- Pósfai, G., Koob, M., Hradecná, Z., Hasan, N., Filutowicz, M., Szybalski, W., 1994. In vivo excision and amplification of large segments of the *Escherichia coli* genome. *Nucl. Acids Res.* 22, 2392–2398.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sauer, B., 1994a. Recycling selectable markers in yeast. *BioTechniques* 16, 1086–1088.
- Sauer, B., 1994b. Site-specific recombination: developments and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5, 521–527.
- Snath, M.R., Murray, J.A.H., Boulter, C.A., 1995. Multiple cloning sites carrying *loxP* and *FRT* recognition sites for the Cre and Flp site-specific recombinases. *Gene* 166, 173–174.
- Sternberg, N., Hamilton, D., 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between *loxP* sites. *J. Mol. Biol.* 150, 467–486.
- Ueki, T., Inouye, S., Inouye, M., 1996. Positive-negative KG cassettes for construction of multi-gene deletions using a single drug marker. *Gene* 183, 153–157.
- Wild, J., Sektas, M., Hradecná, Z., Szybalski, W., 1998. Targeting and retrofitting pre-existing libraries of transposon insertions with *FRT* and *oriV* elements for in vivo generation of large quantities of any genomic fragment. *Gene* 223, 55–66.
- Wilson, K., 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Seidman, J.G., Struhl, K. (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publications/Wiley Interscience, New York, pp. 2.4.1–2.4.5.

**pBRINT-Ts: A PLASMID FAMILY WITH A TEMPERATURE-  
SENSITIVE REPLICON, DESIGNED FOR CHROMOSOMAL  
INTEGRATION INTO THE LACZ GENE OF E. COLI  
(PUBLICADO EN GENE)**

En este artículo se describe la construcción de un grupo nuevo de plásmidos, los cuales están relacionados con los vectores pBRINT previamente reportados por nuestro grupo (Balbás *et al.*, 1993, 1996). Se describe lo siguiente:

1. La construcción y caracterización de tres vectores que permiten la integración de DNA en el gen *lacZ* del cromosoma de *E. coli*. La característica relevante de estos vectores es que no dependen de cepas especiales para llevar a cabo la integración en el cromosoma tal y como sucede con los plásmidos pBRINTs. Como sus funciones de replicación son sensibles a temperaturas mayores de 30°C, con un aumento en la temperatura de cultivo y, en presencia del marcador de selección, se promueve su integración en cromosoma.
2. La validación de los tres plásmidos como vectores de clonación y/o modificación de genes. Así mismo, se reportan sus eficiencias de integración por recombinación homóloga doble, con genes clonados o sin ellos, y la comprobación de la integración cromosomal de éstos usando el sistema de PCR descrito por Balbás *et al.*, 1993
3. Un método simple y rápido para llevar a cabo la integración cromosomal de los genes clonados o de una construcción génica, así como la eliminación subsecuente del vector, a través del aumento de la temperatura del cultivo en el cual se crece la bacteria transformada con alguno de estos vectores.
4. La validación del sistema, a través de clonar inicialmente el gen heterólogo *amy* de *Bacillus stearothermophilus*, en uno de los vectores construidos e integrándolo posteriormente en el locus cromosomal *lacZ* de *E. coli*.





## pBRINT-T<sub>s</sub>: a plasmid family with a temperature-sensitive replicon, designed for chromosomal integration into the *lacZ* gene of *Escherichia coli*<sup>1</sup>

Sylvie Le Borgne, Beatriz Palmeros, Fernando Valle, Francisco Bolivar, Guillermo Gosset \*

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

Received 4 November 1997, accepted 6 March 1998; Received by J. Wild

### Abstract

A pBRINT-T<sub>s</sub> family of integrative vectors for *Escherichia coli* was constructed by using a temperature-sensitive replicon derived from pSC101, a region of homology to the *lacZ* gene, and various antibiotic resistance markers (kanamycin, chloramphenicol and gentamycin) for selection of the integrants. The gene or group of genes to be integrated can be inserted into a multiple cloning site, flanked by an antibiotic resistance marker and *lacZ* sequences. A simple and rapid procedure was developed for the selection of cells where allelic exchange had occurred. With this procedure, the efficiency of integration of around 10<sup>-3</sup> was observed, using several *E. coli* strains. From colonies with an integrated pBRINT-T<sub>s</sub> plasmid, we detected an average allelic exchange event frequency of 7.5%. As a test for this system, we integrated the *amy* gene that codes for the  $\alpha$ -amylase from *B. stearothermophilus*, into the *lacZ* gene of *E. coli* W3110. Production of  $\alpha$ -amylase was found to be proportional to copy number; at up to 10 copies per chromosome. © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Genetic engineering; Homologous recombination; Heterologous gene expression; Gene dosage;  $\alpha$ -Amylase; *Bacillus stearothermophilus*

### 1. Introduction

Extrachromosomal autonomously replicating plasmid vectors have become a fundamental tool for gene charac-

terization or regulation studies, as well as in commercial applications to produce heterologous proteins or valuable metabolites in microbial cultures. Even though their usefulness has been well established in many cases, some serious problems are associated with the use of multicopy plasmid vectors, the most common being segregational instability and undesired copy-number effects.

In order to circumvent these difficulties, several methods have been developed to allow the stable integration of genes into the *Escherichia coli* chromosome: random integration using transposons (Herrero et al., 1990); integration at phage attachment sites (Koob and Szybalski, 1990; Diederich et al., 1992); homologous recombination techniques using linear or circular DNA fragments that are unable to replicate in *E. coli* (Saarilahti and Palva, 1985; Shevell et al., 1988; Oden et al., 1990); or special plasmids, such as suicide vectors or conditional replicative systems (Kaniga et al., 1991; Pósfar et al., 1994; Wild et al., 1996).

Recently, a pBRINT family of pBR322-derived plasmids, allowing the chromosomal integration of cloned

\* Corresponding author. Tel: +52 73 291601; Fax: +52 73 172388; e-mail: gossel@ibi.unam.mx

<sup>1</sup> Published in conjunction with A Wisconsin Gathering Honoring Wacław Szybalski on the occasion of his 75th year and 20 years of Editorship-in-Chief of *Gene*, 10–11 August 1997, University of Wisconsin, Madison, WI, USA

Abbreviations: *aacC1*, Gm<sup>R</sup>-encoding gene; Ab, antibiotic(s); *amy*, *B. stearothermophilus* amylase-encoding gene; *B.*, *Bacillus*; *bla*, ampicillin resistance-encoding gene; bp, base pair(s);  $\beta$ Gal,  $\beta$ -galactosidase; *cat*, Cm<sup>R</sup>-encoding gene; Cb, carbenicillin; Cm, chloramphenicol; dNTPs, deoxyribonucleoside triphosphates;  $\Delta$ , deletion; EtdBr, ethidium bromide; Gm, gentamycin; IPTG, isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside; kb, kilobase(s) or 1000 bp; Km, kanamycin; *lacA*, lactose permease-encoding gene; *lacY*, lactose transacetylase-encoding gene; *lacZ*,  $\beta$ Gal-encoding gene; L.B. Luria Bertani medium; MCS, multiple cloning site (s); nt, nucleotide (s); *nptII*, Km<sup>R</sup>-encoding gene; PCR, polymerase chain reaction; <sup>R</sup>, resistant resistance; <sup>S</sup>, sensitive sensitivity; Tc, tetracycline; *tet*, Tc<sup>R</sup>-encoding gene; ts, temperature sensitive; u, unit(s); wt, wild type; XGal, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl galactopyranoside; ||, plasmid-carryer state

DNA sequences into the *lacZ* gene of *E. coli*, has been developed in our laboratory (Balbás et al., 1993, 1996). A potential drawback of these vectors is the need for an intermediate special strain to achieve the desired chromosomal insertion, and the subsequent transfer of the chromosomal inserts to the strain of interest by P1 transduction. To overcome these special requirements, we have constructed a set of pBRINT-*T<sub>s</sub>* integration plasmids containing a temperature-sensitive (*ts*) replicon that makes them applicable to virtually any *E. coli* strain. We also describe a simple and rapid method allowing both plasmid integration and curing, which was successfully tested with several *E. coli* strains and using the *B. stearothermophilus*  $\alpha$ -amylase gene, as an example of specific DNA that can be integrated and stably maintained.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains, plasmids and media

*E. coli* strain XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA) was utilized as the host for all plasmid constructions. *E. coli* strains W3110, C600, RR1 and JM101 were used for chromosomal integration studies. Plasmids pMAK705 (Hamilton et al., 1989), pMC1403 (Casadaban et al., 1980), pBSL98, pBSL121, pBSL141 (Alexeyev et al., 1995) and p18 $\alpha$ H3 (Spratt et al., 1986; del-Rio, 1997) were utilized to construct the plasmids described here.

Cells were grown in Luria–Bertani (LB) medium. Antibiotics (Ab) were used at the following concentrations (per ml) for the growth of cells carrying multicopy plasmids: carbenicillin (Cb), 50  $\mu$ g; kanamycin (Km), 30  $\mu$ g; chloramphenicol (Cm), 30  $\mu$ g; and gentamycin (Gm), 10  $\mu$ g (except for plasmid pBRINT-*T<sub>s</sub>*Gm, 5  $\mu$ g); for the selection of cells carrying the Ab markers integrated in the chromosome, the following concentrations were utilized: Cb 15  $\mu$ g, Km 15  $\mu$ g, Cm 15  $\mu$ g and Gm 5  $\mu$ g. Cb was used instead of ampicillin. Detection of  $\beta$ Gal activity was performed on plates containing 33  $\mu$ g of XGal per ml and 0.1 mM IPTG.

### 2.2. Genetic procedures and recombinant DNA techniques

Recombinant DNA techniques were performed as described previously (Sambrook et al., 1989). Transformation of *E. coli* was carried out by electroporation using an Eppendorf electroporator, according to the manufacturer's recommendations (Eppendorf, Hamburg, Germany).

### 2.3. Construction of the pBRINT-*T<sub>s</sub>* plasmids

These plasmids were constructed as follows. Plasmid pInt<sub>3</sub> was obtained from pMC1403 by deleting a 4.8-kb *Nde*I fragment, containing a small region of the *lacZ* gene, followed by the *lacY*, *lacA* and *tet* genes. Plasmid pInt<sub>3</sub> was digested to completion with *Nde*I, and partially digested with *Dra*I to give a 4.1-kb DNA fragment missing the pBR322 origin of replication. Protruding ends were filled in with the T4 DNA polymerase, and a 2.9-kb *Sma*I–*Pvu*II fragment from plasmid pMAK705, containing the temperature-sensitive replication functions, was ligated to the above segment, giving plasmid pInt<sub>3</sub>-*T<sub>s</sub>*. pInt<sub>3</sub>-*T<sub>s</sub>* was then double-digested with *Eco*RI + *Bam*HI, filled in with the T4 DNA polymerase and self-ligated in order to remove the *Eco*RI, *Bam*HI and *Sma*I sites, and the resulting vector was named pInt-*T<sub>s</sub>*. The Km, Cm and Gm resistance genes were obtained as *Sac*I fragments from plasmids pBSL98, pBSL121 and pBSL141, respectively. These DNA fragments were blunt-ended with T4 DNA polymerase and inserted into the unique *Eco*RV site of pInt-*T<sub>s</sub>* to produce pBRINT-*T<sub>s</sub>*Km, pBRINT-*T<sub>s</sub>*Cm and pBRINT-*T<sub>s</sub>*Gm, respectively.

### 2.4. Chromosomal integration of the pBRINT-*T<sub>s</sub>* derivatives

The pBRINT-*T<sub>s</sub>* plasmids were introduced into *E. coli* strains by electroporation, and transformants were selected after 60 h of incubation at 30°C on solid media containing: Cb and Km for pBRINT-*T<sub>s</sub>*Km; Cb and Cm for pBRINT-*T<sub>s</sub>*Cm; or Cb and Gm for pBRINT-*T<sub>s</sub>*Gm. A single transformant colony was grown in 0.5 ml of LB medium for 4 h at 30°C. The resulting culture was then inoculated into 10 ml of LB medium and incubated for 6 h at 30°C. This culture was then incubated at 37°C for overnight growth. Several dilutions (10<sup>-3</sup>–10<sup>-6</sup>) of this overnight culture were plated on solid media supplemented with XGal, IPTG and the appropriate Ab (Km for pBRINT-*T<sub>s</sub>*Km, Cm for pBRINT-*T<sub>s</sub>*Cm or Gm for pBRINT-*T<sub>s</sub>*Gm), and incubated for 24 h at 44°C. Single white colonies from these plates were screened for resistance to Km (Km<sup>R</sup>), Cm (Cm<sup>R</sup>) or Gm (Gm<sup>R</sup>), depending on the plasmid initially utilized to transform the cells, and also sensitivity to Cb (Cb<sup>S</sup>), at 44°C. White Cb<sup>S</sup> colonies were replicated again at 44°C and, finally, picked at 30°C on solid media containing Cb in order to confirm the absence of the plasmid.

### 2.5. PCR analysis of allelic exchange in the *lacZ* gene

*E. coli* genomic DNA was isolated from overnight cultures, as described by Wilson (1987). An elongase enzyme mix (Gibco BRL, Life Technology, Gaithersburg,

MD) was utilized with an optimized reaction buffer provided by the manufacturer. The 50- $\mu$ l reaction mixture contained 20 ng of genomic DNA, 50 pmol of each primer (see Fig. 2), 0.25 mM dNTPs and 1.6 mM MgCl<sub>2</sub>. Amplifications were performed using a Gene Amp PCR System (Perkin Elmer, Norwalk, CN). The PCR conditions involved an initial melt of 30 s at 94°C, followed by 30 cycles of 30 s at 94°C, primer annealing at 55°C for 30 s and extension at 68°C for 3.5 min. Samples from PCR reactions were separated by electrophoresis in 1% agarose at 80 V for 1 h and visualized on a UV transilluminator.

### 2.6. $\alpha$ -amylase activity measurements

Cells were grown at 30°C and 300 rpm in LB medium supplemented with the required Ab. IPTG (1 mM) was utilized to induce *P<sub>lac</sub>* in all cultures; 4 h after induction, cells were harvested by centrifugation. Cells were resuspended in 50 mM Tris·HCl buffer (pH 7) containing 1 mM CaCl<sub>2</sub> and disrupted by sonication. Enzymatic activities were determined with soluble starch at 70°C, at pH 6, in the presence of 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Reducing sugars were measured according to the 3,5-dinitrosalicylic acid method. Total protein was determined by the Bradford assay (Bradford, 1976), using bovine serum albumin as the standard. The  $\alpha$ -amylase specific activity unit was defined as micromoles of reducing equivalents liberated per minute, and was measured at least twice for each culture.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Construction of a family of pBRINT-*T<sub>s</sub>* integration plasmids

A set of three pBRINT-*T<sub>s</sub>* plasmids was constructed, to allow the site-directed insertion of cloned DNA into the chromosome of virtually any *E. coli* strain, provided that it contained the *lacZ* gene and it was capable of homologous recombination (Fig. 1). These vectors share some common features with the pBRINT plasmids previously developed in our laboratory (Balbás et al., 1996): (1) the integration locus is the *lacZ* gene that provides a simple blue–white screening scheme when the cells are plated on solid media containing XGal and IPTG; (2) they possess a convenient MCS, flanked by an Ab<sup>R</sup> gene cassette (either Km, Cm or Gm) inserted into *lacZ* to easily monitor the integration of the cloned fragment; (3) the vector marker is Cb<sup>R</sup>. As a new feature, the pBR322 *ori* (Bolivar et al., 1977) was replaced by the temperature-sensitive (*ts*) replication system from pMAK705 (Hamilton et al., 1989), a *ts* mutant derivative of pSC101 that can replicate at 30°C but not at temperatures above 37°C (Armstrong et al.,

1984). It has been previously shown that plasmids that are unable to replicate extrachromosomally in a recipient strain can recombine efficiently with the host chromosome when they carry homologous sequences (Hamilton et al., 1989). The truncated *lacZ* sequences and the *ts* replicon of these pBRINT-*T<sub>s</sub>* derivatives permit a straightforward selection of the integration events into the *lacZ* gene located in the chromosome, and allow subsequent plasmid loss when the temperature of the culture is increased to 44°C.

### 3.2. Integration of the pBRINT-*T<sub>s</sub>* derivatives into the *E. coli* chromosome

We first verified whether the above-constructed vectors could integrate efficiently into the *E. coli* chromosome. For these experiments, the nearly wt *E. coli* strain W3110 was used as a host. Covalently closed circular DNA of each of the pBRINT-*T<sub>s</sub>* derivatives was introduced into W3110 by electroporation, and transformants were selected for both the vector-encoded resistance (Cb) and the resistance inserted into *lacZ* (Km, Cm or Gm). As described in Section 2.4, a technically simple and rapid temperature-based procedure, was employed to select for allelic exchange and to cause plasmid-curing. The appearance of large Ab<sup>R</sup> white colonies, at a frequency ranging from 10<sup>-3</sup> to 10<sup>-4</sup> with respect to total viable cells, after incubation at 44°C on plates containing XGal, IPTG and the appropriate Ab, indicated that the plasmids had integrated into the *lacZ* gene of the chromosome (Table 1). Some small blue colonies, corresponding to cells that had stopped growing because the plasmid had not integrated, were also visible (especially in the case of pBRINT-*T<sub>s</sub>*Cm). White colonies were then tested for Cb<sup>S</sup> since a single recombination event will produce clones exhibiting the vector-encoded resistance as well as the resistance marker inserted in *lacZ*, whereas an allelic exchange event will produce colonies only presenting the resistance marker inserted in *lacZ*. A significant portion of the tested colonies (from 0.5 to 16%) were Cb<sup>S</sup>, indicating that the allelic exchange event occurred efficiently in these cells (Table 1). For unknown reasons, better results were obtained with pBRINT-*T<sub>s</sub>*Km and pBRINT-*T<sub>s</sub>*Cm than with pBRINT-*T<sub>s</sub>*Gm (Table 1).

The above-selected colonies were also Cb<sup>S</sup> at the permissive temperature for replication (30°C), indicating loss of the plasmids. The absence of vectors in these cells was confirmed by trying to isolate plasmid DNA from these colonies, no plasmid DNA was detected in agarose gels stained with ethidium bromide (EtdBr) (data not shown). Integration of the pBRINT-*T<sub>s</sub>* plasmids was found to occur reliably and efficiently in a variety of *recA*<sup>-1</sup> *E. coli* strains, such as C600, RR1 and JM101 (Table 1). It is important to point out that even though strain JM101 does not have a chromosomal

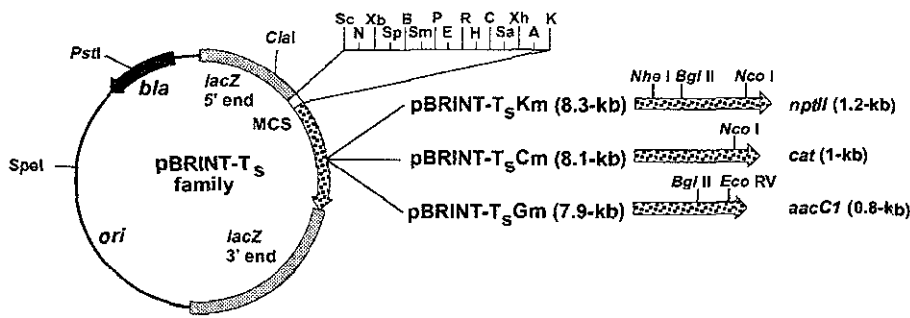


Fig. 1 General structure of the pBRINT-T<sub>s</sub> plasmids. Plasmids were named pBRINT-T<sub>s</sub>Km, pBRINT-T<sub>s</sub>Cm and pBRINT-T<sub>s</sub>Gm depending on the Ab<sup>R</sup>. The dotted arrows indicate the Ab<sup>R</sup> markers that can be used to select for chromosomal integrations. The cloning sites present in the MCS of these vectors are: SacII (Sc), NotI (N), XbaI (Xb), SpeI (Sp), BamHI (B), SmaI (Sm), PstI (P), EcoRI (E), EcoRV (R), HindIII (H), ClaI (C), SalI (Sa), XhoI (Xh), ApaI (A) and KpnI (K). The SpeI, ClaI and PstI restriction sites are not unique on these vectors. Plasmid pBRINT-T<sub>s</sub>Gm contains an additional EcoRV site in the Gm<sup>R</sup> gene.

*lacZ* gene, integration can occur at the *lacZ*ΔM15 allele present in the F' episome, since it contains an incomplete *lacZ* gene encoding an inactive βGal. In this case, the white-blue selection scheme could not be applied, and the integrates, forming larger colonies, were only screened for Cm<sup>R</sup> and for Cb<sup>S</sup> at 44°C.

It should be noted that high transformation efficiencies were not necessary with the present method of integration, unlike with other described gene transfer systems involving suicide vectors that are totally unable to replicate in the target cells (Kaniga et al., 1991). Indeed, we were able to obtain integrates from a single plasmid bearing colony, which was first grown at 30°C before selecting for the integration event by raising the temperature of the culture to 44°C.

3.3. Confirmation of the chromosomal integrations by PCR analysis

Chromosomal integrations were further confirmed by PCR amplification of the *lacZ* region present in genomic DNA isolated from the above constructed strains. Primers were designed to hybridize to a sequence found in the Ab<sup>R</sup> genes inserted in *lacZ* (Km<sub>1</sub>, Cm<sub>1</sub> and

Gm<sub>1</sub>), and to a DNA sequence located at the 5' end of *lacZ* that is not present in the pBRINT-T<sub>s</sub> plasmids (*lacext*<sub>1</sub>) (Fig. 2A). The use of these primers ensured that DNA was amplified from chromosomal sequences and not from residual plasmid DNA eventually present in the cells. PCR analysis of chromosomal DNA from strains initially transformed with pBRINT-T<sub>s</sub>Km, pBRINT-T<sub>s</sub>Cm and pBRINT-T<sub>s</sub>Gm, where an allelic exchange event had occurred, resulted in the expected 1.6-, 1.5- and 1.7-kb fragments (Fig. 2B, lanes 3, 4 and 5); whereas no amplification products were obtained with the wt strain (Fig. 2B, lane 2). Although Southern blot analysis could also be used, the PCR analysis described appears to be simpler and faster.

3.4. Chromosomal integration into E. coli of the B. stearothermophilus amy gene coding for a thermostable α-amylase

The ability of the pBRINT-T<sub>s</sub> derivatives to insert cloned DNA sequences into the E. coli chromosome, was demonstrated using the *amy* gene, which codes for the thermostable α-amylase from B. stearothermophilus. A 2.4-kb NdeI-HindIII fragment from plasmid p18αH3,

Table 1 Integration and allelic exchange frequencies for pBRINT-T<sub>s</sub> plasmids in different E. coli strains

Host	Plasmid	Ab <sup>R</sup> marker for chromosomal integration	Frequency of appearance of Ab <sup>R</sup> white colonies <sup>a</sup>	Allelic exchange frequency (%) <sup>b</sup>
W3110	pBRINT-T <sub>s</sub> Km	Km <sup>R</sup>	10 <sup>-3</sup>	8.5
W3110	pBRINT-T <sub>s</sub> Cm	Cm <sup>R</sup>	10 <sup>-3</sup>	7
W3110	pBRINT-T <sub>s</sub> Gm	Gm <sup>R</sup>	10 <sup>-3</sup>	0.5
W3110	pINT <sub>amy</sub>	Cm <sup>R</sup>	10 <sup>-3</sup>	1
C600	pBRINT-T <sub>s</sub> Cm	Cm <sup>R</sup>	10 <sup>-3</sup>	10
RR1	pBRINT-T <sub>s</sub> Cm	Cm <sup>R</sup>	10 <sup>-3</sup>	16
JM101	pBRINT-T <sub>s</sub> Cm	Cm <sup>R</sup>	10 <sup>-3</sup>	3

<sup>a</sup>Frequency of appearance of Km<sup>R</sup>, Cm<sup>R</sup> or Gm<sup>R</sup> white colonies after temperature-based selection from cells initially transformed with pBRINT-T<sub>s</sub> derivatives, with respect to total viable cells

<sup>b</sup>Percentage of cells losing the Cb<sup>S</sup> marker and retaining Km<sup>R</sup>, Cm<sup>R</sup> or Gm<sup>R</sup>, after replica plating at 44°C

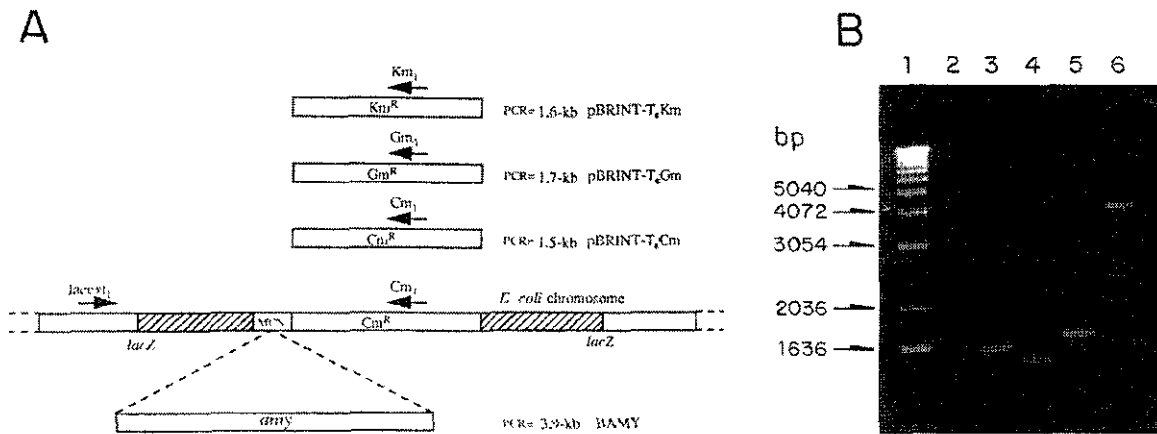


Fig. 2. Strategy for PCR genomic analysis of integration into the *lacZ* gene. (A) Structure of the *lacZ* locus after allelic exchange with DNA from pBRINT- $T_s$  and the pINT $amy$  derivative. Arrows indicate the positions where each primer hybridizes. The shaded area represents the *lacZ* sequences present on the pBRINT- $T_s$  plasmids. The maps are not drawn to scale. The primers used for amplification of chromosomal DNA were: *lacext*<sub>1</sub>: 5'-GCTATGACCATGATTACGGATCACTGG (nt positions -3 to +25 relative to the first nt of *lacZ*), *Km*<sub>1</sub>: 5'-GATCCCCTGCGCCATCAG-ATCCTTGGCGG (nt positions -37 to -66 relative to the first nt of the *Km*<sup>R</sup> gene), *Cm*<sub>1</sub>: 5'-GGTGGTATATCCAGTGATT-TTTTCTCCAT (nt positions +1 to +30 relative to the first nt of the *Cm*<sup>R</sup> gene); *Gm*<sub>1</sub>: 5'-GAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCT (nt position +334 to +363 relative to the first nt of the *Gm*<sup>R</sup> gene). (B) Electrophoretic analysis of PCR amplification products. Primers used for amplification are indicated below, between parentheses. Lanes: 1, molecular weight standards, 2, W3110 (*lacext*<sub>1</sub>, *Cm*<sub>1</sub>); 3, W3110 *lacZ::npt II* (*lacext*<sub>1</sub>, *Km*<sub>1</sub>); 4, W3110 *lacZ::cat* (*lacext*<sub>1</sub>, *Cm*<sub>1</sub>); 5, W3110 *lacZ::aacCI* (*lacext*<sub>1</sub>, *Gm*<sub>1</sub>); 6, BAMY (*lacext*<sub>1</sub>, *Cm*<sub>1</sub>)

containing this gene under the *lac* promoter transcriptional control, was blunt-ended with T4 DNA polymerase and ligated to pBRINT- $T_s$ Cm previously digested with *Sma*I. The resulting plasmid, pINT $amy$ , was used to transform strain W3110. Following the procedure described in Section 2.4, the *amy* gene was integrated into the chromosome of strain W3110. We detected a frequency of integration of  $10^{-3}$ , similar to that observed for any of the pBRINT- $T_s$  plasmids without an insert (Table 1). The frequency of allelic exchange was 1%, slightly lower than that observed for intact pBRINT- $T_s$  plasmids (Table 1), but still a manageable number for screening by replica-plating. This new strain with the integrated *amy* gene was named BAMY.

Proper integration of the *amy* gene into the *lacZ* locus was confirmed by PCR (see Section 2.5). By using primers *lacext*<sub>1</sub> and *Cm*<sub>1</sub>, a 3.9-kb band was amplified (we also detected the presence of a lower molecular weight band, presumably an artifact from the PCR) (Fig. 2B, lane 6). This band had the expected molecular weight, corresponding to the addition of 2.4 kb from the *amy* gene to the 1.5-kb band generated from the gene encoding *Cm*<sup>R</sup> inserted in *lacZ* (Fig. 2B, lane 4). We then determined the  $\alpha$ -amylase level for this new strain and compared it to strains with plasmids carrying the *amy* gene (Table 2). The  $\alpha$ -amylase specific activity was similar in strains W3110[p18 $\alpha$ H3] and W3110[pINT $amy$ ] (13.1 and 12.4 u/mg protein, respectively), whereas specific activity from strain BAMY was 0.76 u/mg protein. Table 2 also shows the expected copy number for the *amy* gene on these strains. From these data, it is evident that  $\alpha$ -amylase activity is roughly

proportional to copy number up to about 10 copies per cell. Specific activity did not increase proportionally in the strain carrying the high-copy-number plasmid p18 $\alpha$ H3. The relatively low  $\alpha$ -amylase specific activity detected in strain BAMY is probably the consequence of having a single copy of the *amy* gene transcribed from the relatively weak *P*<sub>lac</sub> promoter. If desired, a higher expression level might be achieved by changing *P*<sub>lac</sub> to a stronger promoter such as *P*<sub>L</sub> or *P*<sub>lac</sub> (Deuschle et al., 1986).

#### 4. Conclusions

- (1) We have constructed a family of cloning-integration pBRINT- $T_s$  plasmids that allow the efficient insertion of cloned DNA into the *lacZ* locus on the *E*

Table 2  
The  $\alpha$ -amylase-specific activities and estimated *amy* gene copy number of strains W3110, W3110[p18 $\alpha$ H3], W3110[pINT $amy$ ] and BAMY

Strain	$\alpha$ -amylase (u/mg protein) <sup>a</sup>	<i>amy</i> copy number/ chromosome <sup>b</sup>
W3110	0	0
BAMY	0.76	1
W3110[pINT $amy$ ]	12.4	5–10
W3110[p18 $\alpha$ H3]	13.1	500–700

<sup>a</sup>Enzyme activity measurements are described in Section 2.6

<sup>b</sup>Plasmid copy number is assumed to be similar to that reported in the literature: pUC8 (Chambers et al., 1988), pSC101 (Hasunuma and Sekiwuchi, 1977)

*coli* chromosome. Selection of the integration event is accomplished by a rapid and simple temperature-based selection procedure. A PCR-based analysis strategy was developed for the accurate and rapid confirmation of the correct integration by double recombination into the *lacZ* gene.

(2) The pBRINT- $T_s$  plasmids should have several potential applications, when properly modified as required, as in the following cases:

when it would be advantageous to produce a heterologous protein from a stable, single or multiple-copy gene, integrated in the chromosome;

when a single-copy gene is desired for gene regulation studies, in this case, the gene under study must be transcriptionally isolated from the *lacZ* promoter present in the vectors; or

when genes or their products are toxic in multicopy numbers, and stable single-copy integrates overcome this problem.

The fact that the pBRINT- $T_s$  derivatives enable insertion at only one specific site of the chromosome could be seen as a limitation of this system. However, the integration of several copies of a gene or several different genes can be accomplished, by multiple tandem insertions using the numerous cloning sites of the pBRINT- $T_s$ . Previous results have shown that large DNA fragments (7.5 kb), were efficiently cloned and integrated into *lacZ* using the pBRINT plasmids (Balbás et al., 1996); thus, the size of the DNA fragment to be inserted should not be a limiting factor. Techniques allowing multiple chromosomal insertions that rely mainly on the use of transposons integrating randomly into the chromosome have been previously reported (Peredelchuk and Bennet, 1997). A potential drawback of these systems, however, is that certain insertions might be located in loci important for basic cell functions. In contrast, the pBRINT- $T_s$  derivatives described here direct the integration to a non-essential and well-characterized locus on the chromosome. This characteristic should make this plasmid family a useful tool for the construction of strains for use in a variety of studies and applications.

## 5. Dedication

This paper is dedicated to Waclaw Szybalski, on the occasion of his 75/76 birthday. Waclaw Szybalski is and has always been a visionary. His research has not only generated important knowledge of the particular biological systems on which he has worked, but has also contributed to the construction of lines of universal thought.

I was fortunate to collaborate with him for several years as one of the Editors of *Gene*. During that time,

I became aware of his commitment to science and to the training of the new generation of scientists. I also saw his untiring interest in promoting the development of science in other countries and in seeking new ways of fostering collaboration between different institutions.

I am grateful to Waclaw for his generosity and guidance, that has always been so valuable to me, but above all I am grateful for his deep, sincere friendship that will always be with me in my spirit.

Francisco (Paco) Bolivar

## Acknowledgements

We wish to thank Gloria Soberón, José Luis Puente and Edmundo Calva for critically reading the manuscript. We thank Gabriel del-Río for providing plasmid p18 $\alpha$ H3. We thank Paul Gaytán, Eugenio Bustos and Mercedes Enzaldo for their technical assistance. This work was supported in part by a grant from Genencor International, Inc. (CA, USA).

## References

- Alexeyev, M.F., Shokolenko, I.N., 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.
- Armstrong, K.A., Acosta, R., Ledner, E., Machida, Y., Pancotto, M., McCormick, M., Ohtsubo, H., Ohtsubo, E., 1984. A  $37 \times 10^3$  molecular weight plasmid-encoded protein is required for replication and copy number control in the plasmid pSC101 and its temperature-sensitive derivative pHS1. *J. Mol. Biol.* 175, 331–347.
- Balbás, P., Alvarado, X., Bolivar, F., Valle, F., 1993. Plasmid pBRINT, a vector for chromosomal integration of cloned DNA. *Gene* 136, 211–213.
- Balbás, P., Alexeyev, M., Shokolenko, I., Bolivar, F., Valle, F., 1996. A pBRINT family of plasmids for integration of cloned DNA into the *Escherichia coli* chromosome. *Gene* 172, 65–69.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., Falkow, S., 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95–113.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248–254.
- Casadaban, M.J., Chou, J., Cohen, S.N., In vitro gene fusions that join an enzymatically active  $\beta$ -galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins. *Escherichia coli* plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. 1980 *J. Bacteriol.* 143, 971–980.
- Chambers, S.P., Prior, S.E., Barstow, D.A., Minton, N.P., 1988. The pMTL *mtc* cloning vectors. I. Improved pUC polylinker regions to facilitate the use of sonicated DNA for nucleotide sequencing. *Gene* 68, 139–149.
- del-Río, G., 1997. Estudio del Sitio Catalítico de una alfa-Amilasa por Medio de Ingeniería de Proteínas. PhD thesis (Biotechnology). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Deuschle, U., Kammerer, W., Gentz, R., Bujard, H., 1986. Promoters

- of *Escherichia coli*: a hierarchy of in vivo strength indicates alternate structures. *EMBO J.* 5, 2987–2994.
- Diederich, L., Rasmussen, L.J., Messer, W., 1992. New cloning vectors for integration into the lambda attachment site *attB* on the *Escherichia coli* chromosome. *Plasmid* 28, 14–24.
- Hamilton, C.M., Aldea, M., Washburn, B.K., Babitzke, P., Kushner, S.R., 1989. New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171, 4617–4622.
- Hasunuma, K., Sekiguchi, M., 1977. Replication of pSC101 in *E. coli* K-12: requirement for *dnaA* function. *Mol. Gen. Genet.* 154, 225–230.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., Timmis, K.N., 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 172, 6557–6567.
- Kaniga, K., Delor, I., Cornelis, G.R., 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria. Inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 109, 137–141.
- Koob, M., Szybalski, W., 1990. Cleaving yeast and *Escherichia coli* genomes at a single site. *Science* 250, 271–273.
- Oden, K.L., DeVeaux, L.C., Vibat, C.R.T., Cronan, Jr., J.E., Gennis, R.B., 1990. Genomic replacement in *Escherichia coli* K-12 using covalently closed circular plasmid DNA. *Gene* 96, 29–36.
- Peredelchuk, M.Y., Bennet, G.N., 1997. A method for construction of *E. coli* strains with multiple DNA insertions in the chromosome. *Gene* 187, 231–238.
- Pósfai, G., Koob, M., Hradečná, Z., Hasan, N., Filutowicz, M., Szybalski, W., 1994. In vivo excision and amplification of large segments of the *Escherichia coli* genome. *Nucleic Acids Res.* 12, 2392–2398.
- Saarihahti, H.T., Palva, E.T., 1985. In vivo transfer of chromosomal mutations onto multicopy plasmids utilizing *polA* strains. cloning of an *ompR2* mutation in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.* 26, 27–33.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Shevfil, D.E., Abou-Zamzam, A.M., Demple, B., Walker, G.C., 1988. Construction of an *Escherichia coli* K-12 *ada* deletion by gene replacement in a *recD* strain reveals a second methyltransferase that repairs alkylated DNA. *J. Bacteriol.* 170, 3294–3296.
- Spratt, B.G., Hedge, P.J., Heesen, S.T., Edelman, A., Broome-Smith, J.K., 1986. Kanamycin-resistant vectors that are analogues of plasmids pUC8, pUC9, pEMBL8 and pEMBL9. *Gene* 41, 337–342.
- Wild, J., Hradečná, Z., Pósfai, G., Szybalski, W., 1996. A broad-host-range in vivo pop-out and amplification system for generating large quantities of 50- to 100-kb genomic fragments for direct DNA sequencing. *Gene* 179, 181–188.
- Wilson, K., 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Seidman, J.G., Struhl, K. (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, New York, pp. 2.4.1–2.4.5.

IMPROVEMENT OF THE pBRINT-Ts PLASMID  
FAMILY TO OBTAIN MARKER-FREE CHROMOSOMAL  
INSERTION OF CLONED DNA IN E. COLI  
(PUBLICADO EN BIOTECHNIQUES)

En esta publicación se describen los cambios que se realizaron a la familia de plásmidos pBRINT-Ts para mejorar sus características como vectores de integración cromosomal. En particular se señala lo siguiente:

1. La sustitución de los genes de resistencia a cloranfenicol (Cm), gentamicina (Gm) y kanamicina (Km), presentes en estos vectores como marcadores de selección, por los casetes de resistencia removibles Cat2, Gen 4 y Kan2, descritos en el primer artículo de esta sección.
2. La validación de los tres plásmidos como vectores de integración en cromosoma por medio de recombinación homóloga doble y a través de la determinación de sus eficiencias de integración sin genes clonados
3. La comprobación de la integración cromosomal de éstos plásmidos, a través del fenotipo blanco en presencia de XGal + IPTG que presentan las cepas modificadas y utilizando el sistema de PCR descrito por Balbás *et al.*, 1993



# Benchmarks

when synthesized with *Vent* DNA polymerase. Our decreased substitution rate presumably reflects the use of the high-fidelity *Pfu* DNA polymerase (4).

Less satisfying was the finding of small point deletions in all clones sequenced. Different clones had different deletions, but most (60%) had only a single base missing. These deletions are presumably the result of incorporation of a non-full-length oligonucleotide, amongst the 84, during LCR. No deletions were detected in the clones produced by Au et al. (1) with gel-purified oligonucleotides, suggesting that oligonucleotide purification is an important consideration.

Several options are therefore open to the investigator working to scale up the LCR-based approach to gene synthesis at minimum expense. Costs will rise steeply if gel purified oligonucleotides are purchased, as not only does purification incur additional charges but the synthesis must also be on a larger scale. In house gel purification of oligonucleotides is possible but increases the time spent on gene synthesis. A higher annealing temperature could be tested for LCR to minimize incorporation of non-full-length oligonucleotides, and/or more clones could be sequenced, at additional expense, to identify those without deletions. Considering all these factors, and our experience, the most cost- and time-effective strategy is to simply assemble the gene from non-purified oligonucleotides and perform site-directed mutagenesis to correct a single base pair deletion.

As anticipated by Au et al. (1), the LCR-based method for gene synthesis can be applied to larger genes by increasing the number of segments. In addition, this study shows that scaling up the LCR method with non-purified oligonucleotides is a cost- and time-effective approach to *in vitro* gene synthesis.

## REFERENCES

1. Au, L.C., F.Y. Yang, W.J. Yang, S.H. Lo, and C.F. Kao. 1998. Gene synthesis by a LCR-based approach: high-level production of leptin-L54 using synthetic gene in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 248:200-203.
2. Casimiro, D.R., A. Toy-Palmer, R.C. Blake, and H.J. Dyson. 1995. Gene synthesis, high-level expression, and mutagenesis of *Therobacillus ferrooxidans* rusticyanin. His 85 is a ligand to the blue copper center. *Biochemistry* 34:6640-6648.
3. Casimiro, D.R., P.E. Wright, and H.J. Dyson. 1997. PCR-based gene synthesis and protein NMR spectroscopy. *Structure* 5:1407-1412.
4. Cline, J., J.C. Braman, and H.H. Hogrefe. 1996. PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 24:3546-3551.
5. Hills, D. and C. Crane-Robinson. 1995. Baculovirus expression of human basic fibroblast growth factor from a synthetic gene: role of the Kozak consensus and comparison with bacterial expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1260:14-20.
6. Pikaart, M.J. and G. Felsenfeld. 1996. Expression and codon usage optimization of the erythroid-specific transcription factor cGATA-1 in baculoviral and bacterial systems. *Protein Expr Purif.* 8:469-475.
7. Prodromou, C. and L.H. Pearl. 1992. Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis. *Protein Eng.* 5:827-829.
8. Stemmer, W.P. 1994. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* 370:389-391.

We would like to thank Professor J.W. Funder and Dr. W.G. Thomas for their helpful comments. F.M.C. is the recipient of a scholarship from the National Heart Foundation of Australia, and K.M.C. is the recipient of a fellowship from the Australian Foundation for High Blood Pressure Research. Address correspondence to Felicity Chalmers, Baker Medical Research Institute, PO Box 6492 St Kilda Road Central, Melbourne, Victoria, Australia 8008. e-mail: felicity.chalmers@baker.edu.au

Received 16 May 2000; accepted 23 October 2000.

**Felicity Meredith Chalmers and Kathleen Margaret Curnow**  
Baker Medical Research  
Institute and Monash  
University  
Melbourne, Australia

## Improvement of the pBRINT-T<sub>5</sub> Plasmid Family to Obtain Marker-Free Chromosomal Insertion of Cloned DNA in *E. coli*

*BioTechniques* 30:252-256 (February 2001)

The expression of heterologous genes by recombinant microorganisms usually depends on the use of extrachromosomal replicating plasmid vectors that carry the gene(s) of interest. Although the usefulness of this type of vehicle has been well established in many cases, several problems related with their use have been identified, the most important being inefficient segregation and/or structural instability, as well as undesired copy number effects. An alternative approach for increasing the stabilization and controlling the copy number of heterologous genes is the chromosomal insertion of the gene(s) of interest.

**Low Cost!**

**Taq**

Excellent Yields  
Highly Purified  
Superb Value

As Low As  
**17¢**  
Per Unit

**Doc Frugal**  
SCIENTIFIC  
CORPORATION

**800.789.5550**  
**www.docfrugal.com**

The PCR process is covered by patents issued and applicable in certain countries. No statement by the vendor of these products constitutes an authorization or implicit license to practice PCR.

# Benchmarks

We have recently described the construction and use of a plasmid vector family with a temperature-sensitive replicon, the pBRINT-T<sub>5</sub> plasmids, which enable the insertion of cloned genes into the *lacZ* locus of the *E. coli* chromosome (4). No special intermediate strain is needed, and virtually any RecA<sup>+</sup> β-galactosidase<sup>-</sup> (β-gal<sup>-</sup>) *E. coli* strain is a suitable recipient to obtain chromosomal insertions using the pBRINT-T<sub>5</sub> plasmids. Simultaneously, we have developed a simple and rapid procedure for the insertion and curing of these plasmids (4).

With pBRINT-T<sub>5</sub> plasmids, an antibiotic resistance (Anb<sup>R</sup>) marker for the positive selection of integrates is introduced together with the gene(s) of interest. The presence of Anb<sup>R</sup> genes in genetically engineered bacteria might retard their use in some applications due to the increased possibility of horizontal gene transfer, which leads to the uncontrolled spread of these resistance genes to other microorganisms. Moreover, when the genetic improvement of any strain requires several successive modifications, each one requiring the introduction of a different Anb<sup>R</sup> marker, it becomes more and more difficult to find new antibiotic genes. Therefore, it would be useful to engineer stable recombinant strains that do not contain any residual Anb<sup>R</sup> markers.

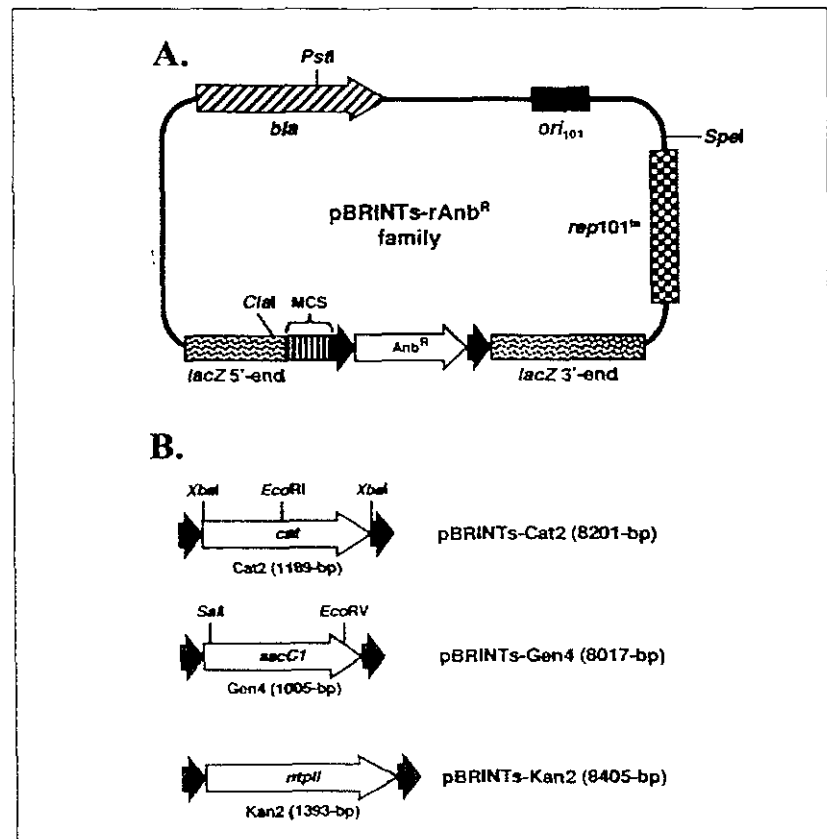
The aim of this study was to modify the pBRINT-T<sub>5</sub> plasmids to remove the Anb<sup>R</sup> marker used for selection of modified cells after obtaining chromosomal insertion of the gene(s) of interest. In these new plasmids, pBRINT<sub>5</sub>-rAnb<sup>R</sup> family, the Anb<sup>R</sup> selection markers are flanked by two parallel *loxP* sites, allowing their subsequent removal by Cre recombinase action from bacteriophage P1 (6,8).

The first step in the development of this new vector family was the construction of plasmids in which the removable Anb<sup>R</sup> marker (i.e., Anb<sup>R</sup> genes placed between two *loxP* sites, rAnb<sup>R</sup>) was flanked by multiple cloning sites (MCS) derived from pBluescript<sup>®</sup> II SK(+) plasmid (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The pBSL98 plasmid (1), from which the kanamycin resistance gene was removed by *MluI* digestion, followed by blunt-ending with T4 DNA polymerase, was used as backbone to

construct this new set of plasmids. The rAnb<sup>R</sup> cassettes chosen to construct this plasmid family encode resistance to chloramphenicol (Cat2), gentamycin (Gen4), and kanamycin (Kan2). The Cat2, Gen4, and Kan2 cassettes were obtained as 1065-, 881-, and 1269-bp *Bam*HI-*NotI* DNA fragments from plasmids pLoxCat2, pLoxGen4, and pLoxKan2, respectively (6). These restriction fragments were blunt-ended with T4 DNA polymerase and then ligated to the 3089-bp *MluI* blunt-ended fragment of pBSL98 to obtain pBPSCat2, pBPSPGen4, and pBPSPKan2 plasmids. Since in these plasmids the rAnb<sup>R</sup> cassettes are flanked by directly repeat-

ed MCS from plasmid pBluescript II SK(+), digestion with a restriction enzyme whose cleavage site is present in both MCS should release the rAnb<sup>R</sup> cassettes preceded by a single MCS.

The new plasmids containing MCS-Cat2, MCS-Gen4, or MCS-Kan2 cassettes were constructed using the pInt-T<sub>5</sub> plasmid as backbone (4). For this purpose, the MCS-Cat2, MCS-Gen4, and MCS-Kan2 cassettes were obtained as *SacI* fragments from plasmids pBPSCat2, pBPSPGen4, and pBPSPKan2, respectively. These DNA fragments were blunt-ended with T4 DNA polymerase and then inserted into the unique *EcoRV* site of plasmid pInt-T<sub>5</sub>



**Figure 1. General structure and physical maps of the pBRINT<sub>5</sub>-rAnb<sup>R</sup> plasmids and rAnb<sup>R</sup> genes.** (A) The basic vector carries a temperature-sensitive replicon derived from pSC101, the *bla* gene encoding Cb<sup>R</sup> derived from plasmid pBR322 (2) and the 5' and 3' regions of homology to the *lacZ* gene, flanking the removable Anb<sup>R</sup> cassettes. (B) Depending on the Anb<sup>R</sup> gene utilized (*cat*, *nptII*, or *sacG1*), the new plasmids were named pBRINT<sub>5</sub>-Cat2 (Cm<sup>R</sup>), pBRINT<sub>5</sub>-Gen4 (Gm<sup>R</sup>), or pBRINT<sub>5</sub>-Kan2 (Km<sup>R</sup>). The empty arrows indicate the Anb<sup>R</sup> genes, and the narrow black arrows indicate *loxP* sites. The restriction sites present in the MCS [where the gene(s) to be integrated can be inserted] are *SacII*, *BstXI*, *NotI/EagI*, *XbaI*, *SpeI*, *BamHI*, *SmaI*, *PstI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *ClaI*, *SalI*, *XhoI*, *ApaI*, and *KpnI*. The *SpeI*, *ClaI*, and *PstI* restriction sites are not unique on these vectors. The *EcoRI/XbaI* and *EcoRV/SalI* sites are present in *cat* and *lacZ* genes, respectively.

# Benchmarks

to obtain pBRINT<sub>5</sub>-Cat2, pBRINT<sub>5</sub>-Gen4, and pBRINT<sub>5</sub>-Kan2 plasmids, respectively (Figure 1).

We performed the chromosomal insertion of the pBRINT<sub>5</sub>-rAnb<sup>R</sup> plasmids following our previously described temperature-based insertion/selection procedure (4). Therefore, the nearly wild-type strain *E. coli* W3110, used as model host in this study, was electroporated with covalently closed circular DNA of each of the pBRINT<sub>5</sub>-rAnb<sup>R</sup> plasmids. Afterwards, one single colony transformed with each plasmid was grown in 0.5 mL LB medium without Anb for 4 h at 30°C, reinoculated into 10 mL fresh medium, and incubated additionally for 6 h at 30°C to obtain more biomass. The cultures were finally incubated overnight at 37°C, and several dilutions (10<sup>-3</sup>–10<sup>-6</sup>) were plated on solid media supplemented with X-gal, isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG), and the appropriate Anb (15 μg/mL Cm for pBRINT<sub>5</sub>-Cat2; 5 μg/mL Gm for pBRINT<sub>5</sub>-Gen4, and 15 μg/mL Km for pBRINT<sub>5</sub>-Kan2). After 24 h of incubation at 44°C, large Anb<sup>R</sup> white colonies grew at a frequency of at least 10<sup>-3</sup> with respect to total viable cells as for the previously described pBRINT-T<sub>5</sub> plasmids. The white phenotype indicates that the plasmids have been integrated into the *lacZ* chromosomal gene. Then, the white colonies were screened at 44°C for sensitivity to carbenicillin (Cb<sup>S</sup>) (3) and at the same time for resistance to Cm (Cm<sup>R</sup>), Gm (Gm<sup>R</sup>), or Km (Km<sup>R</sup>) depending on the plasmid initially utilized to transform the cells. A significant portion of the tested colonies, from 2% to 20%, were Cb<sup>S</sup> at 44°C, indicating that the chromosomal insertion event by double homologous recombination occurred efficiently in these cells. These colonies were also Cb<sup>S</sup> at 30°C, which confirmed plasmid loss. The insertions were confirmed by PCR analysis as previously described (4) (data not shown). The allelic exchange frequencies obtained with the pBRINT<sub>5</sub>-rAnb<sup>R</sup> plasmids were 20%, 6%, and 2% for vectors pBRINT<sub>5</sub>-Cat2, pBRINT<sub>5</sub>-Gen4, and pBRINT<sub>5</sub>-Kan2, respectively. These efficiencies were similar to those obtained with the previously described pBRINT-T<sub>5</sub> plasmids (4).

The remaining Anb<sup>R</sup> markers used

to select chromosomal insertions were removed by site-specific recombination mediated by the Cre recombinase as already described (6). Briefly, W3110 *lacZ*::Cat2, *lacZ*::Gen4, and *lacZ*::Kan2 cells were transformed with the temperature-sensitive pJW168 plasmid, which carries the *cre* gene under the control of the *Plac*<sub>T<sub>5</sub></sub> promoter. Transformed cells were replica-plated on LB solid medium containing X-gal without or with IPTG to induce Cre production at 30°C. One hundred percent of the colonies tested lost the Anb<sup>R</sup> marker but still remained β-gal<sup>-</sup>. This result indicates that the *loxP* site, which remains after Cre recombinase action, interrupts the *lacZ* gene. Elimination of the Anb<sup>R</sup> marker was also confirmed by PCR analysis (data not shown). Plasmid pJW168 was subsequently removed from the β-gal<sup>-</sup> cells by increasing the culture temperature to 37°C or higher, and its loss was confirmed by the loss of the Cb<sup>R</sup> phenotype.

The pBRINT<sub>5</sub>-rAnb<sup>R</sup> plasmids are useful tools designed for site-specific integration of cloned DNA into the *lacZ* gene, without leaving in the chromosome any Anb<sup>R</sup> markers. This is feasible due to the presence of tandem *loxP* sites flanking the Anb<sup>R</sup> genes in each plasmid, which allows subsequent removal of these genes by the action of the Cre recombinase. Therefore, the resulting cells do not contain any Anb<sup>R</sup> marker and can be transformed or further modified with plasmids containing the same Anb<sup>R</sup> marker previously used for the selection of integrants. The pBRINT<sub>5</sub>-rAnb<sup>R</sup> plasmids are an addition to a growing group of molecular tools designed for achieving chromosomal gene insertion and antibiotic resistance-encoding gene removal (5,7).

The accession numbers for the sequences of pBRINT<sub>5</sub>-Cat2, pBRINT<sub>5</sub>-Gen4, pBRINT<sub>5</sub>-Kan2, pBPSCat2, pBPSPGen4, and pBPSPKan2 in the EMBL Nucleotide Sequence Database are AJ278278, AJ278279, AJ278280, AJ403982, AJ403983, and AJ403984, respectively.

## REFERENCES

1. Alexeyev, M.F., I.N. Shokolenko, and I.P. Croughan. 1995. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for

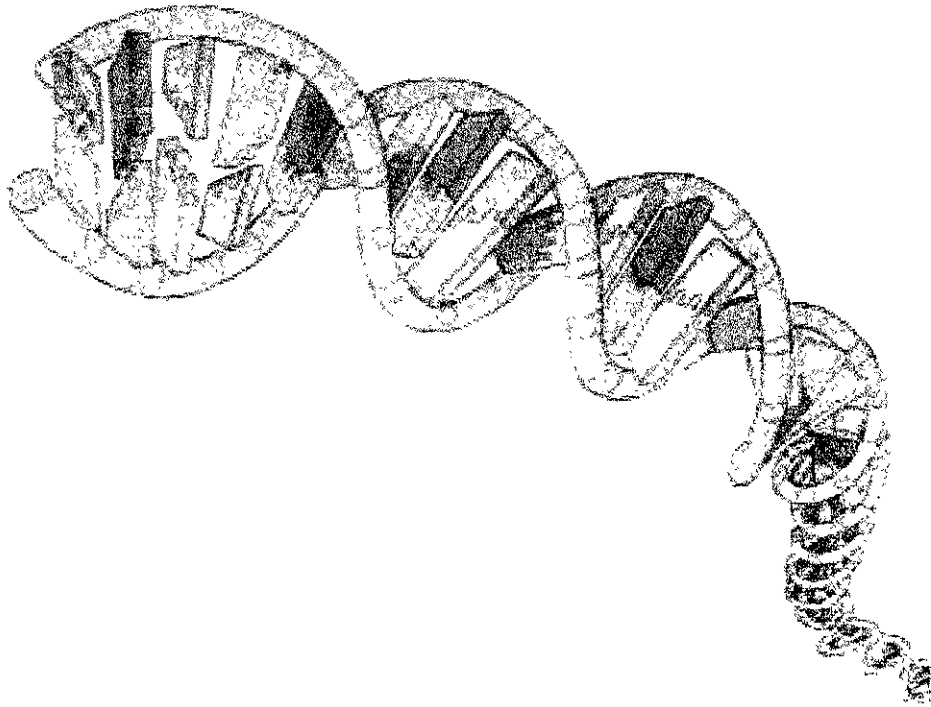
*Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160:63-67.

2. Bolivar, F., R.L. Rodriguez, J.C. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heyman, H.W. Boyer, J.H. Crosa, and S. Falikow. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2:95-113.
3. Kemp, G.W. and M.L. Britz. 1987. Removal of beta-lactam antibiotics during growth of *Escherichia coli* strains hosting pUR and pEX vectors. *Biotechnol. Tech.* 1:157-162.
4. Le Borgne, S., B. Palmeros, F. Valle, F. Bolívar, and G. Gosset. 1998. pBRINT-T<sub>5</sub>: a plasmid family with a temperature-sensitive replicon, designed for chromosomal integration into the *lacZ* gene of *Escherichia coli*. *Gene* 223:213-219.
5. Martínez-Morales F., A.C. Borges, A. Martínez, K.T. Shanmugam, and L.O. Ingram. 1999. Chromosomal integration of heterologous DNA in *Escherichia coli* with precise removal of markers and replicons used during construction. *J. Bacteriol.* 181:7143-7148.
6. Palmeros, B., J. Wild, W. Szybalski, S. Le Borgne, G. Hernández-Chávez, G. Gosset, F. Valle, and F. Bolívar. 2000. A family of removable cassettes designed to obtain antibiotic-resistance-free genomic modifications of *Escherichia coli* and other bacteria. *Gene* 247:255-264.
7. Peredelchuk, M.Y. and G.M. Bennet. 1997. A method for construction of *E. coli* strains with multiple DNA insertions in the chromosome. *Gene* 187:231-238.
8. Sauer, B. 1994. Site-specific recombination: developments and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5:521-527.

This work was supported by grant no. 25375N from CONACYT, México and in part by a grant from Genencor International, Inc. (Rochester, NY, USA). We thank Mercedes Enzaldo for her technical assistance. Address correspondence to Dr. Guillermo Gosset, Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos CP 62271, México e-mail: gosset@ibt.unam.mx

Received 17 July 2000; accepted 18 October 2000.

Sylvie Le Borgne<sup>1</sup>, Beatriz Palmeros, Francisco Bolívar, and Guillermo Gosset  
 Universidad Nacional  
 Autónoma de México  
 Cuernavaca, Mor.  
<sup>1</sup>Instituto Mexicano  
 del Petróleo  
 México D.F., México



RESULTADOS  
ADICIONALES

VII-B

Este proyecto de doctorado, se desarrolló básicamente en dos partes: En la primera, se diseñó, construyó y validó un grupo de casetes de resistencia a antibióticos que permiten obtener modificaciones genéticas a nivel cromosomal, los cuales pueden ser eliminados después de que se utilizan para seleccionar el organismo modificado. Para esto, los genes *cat*, *aacC1* y *ntpII* que confieren resistencia a cloranfenicol, gentamicina y kanamicina, respectivamente, fueron clonados entre dos secuencias *loxP* con la misma dirección relativa, para así poder escindirlos por recombinación sitio-específica mediada por la recombinasa Cre del bacteriófago P1.

En la segunda parte de este proyecto se diseñaron y construyeron sistemas genéticos que permiten prender y apagar genes simultáneamente por medio de una señal única. Este grupo de herramientas moleculares se diseñó y construyó utilizando los promotores  $P_L$  y  $P_{RM}$  (tanto silvestre como mutante), y la proteína represora *ci* del bacteriófago lambda. Estos promotores heterólogos pueden utilizarse para regular la expresión de un gen determinado, en lugar de hacerlo a partir del promotor silvestre.

A continuación se presentan y se discuten resultados adicionales obtenidos en diferentes etapas del proyecto, algunos de los cuales no fueron incluidos en los tres artículos publicados en revistas internacionales y mencionados en la sección previa, por lo que se consideran relevantes y por ello se presentan como parte de esta tesis. El resto de estos resultados, cubren los objetivos particulares contemplados en los incisos II y III.

#### a) CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN SISTEMA GENÉTICO PARA ELIMINAR GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS INSERTADOS EN EL CROMOSOMA BACTERIANO Y CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE E. COLI CON MODIFICACIONES CROMOSOMALES SIN MARCADOR DE SELECCIÓN

La metodología y los detalles de la construcción del conjunto de herramientas moleculares diseñadas para modificar el cromosoma bacteriano y eliminar los marcadores de resistencia utilizados para seleccionar las células con las modificaciones deseadas, están descritos en el artículo incluido en la sección previa de "presentación de

resultados en artículos publicados (páginas 58-67)", el cual se publicó en la revista GENE.

➤ **“ A family of removable cassettes designed to obtain antibiotic-resistance-free genomic modifications of *Escherichia coli* and other bacteria ”**

La construcción de las cepas mutantes sin marcadores de resistencia, también se describe en el artículo antes mencionado. Los genes seleccionados para validar nuestro sistema fueron *lacZ* y *galE*, debido a que las enzimas codificadas por ambos genes confieren un fenotipo característico y fácilmente reconocible a las cepas que expresan estos genes. Las células con *lacZ* silvestre son azules en presencia de XGal e IPTG, mientras que las clonas con *galE* silvestre utilizan galactosa como fuente de carbono y son rojas en medio de MacConkey con este carbohidrato; mientras que para ambos casos, las clonas con los genes interrumpidos presentan fenotipo blanco en los medios antes mencionados. Los dos genes clonados en plásmidos del tipo de pBR322, se interrumpieron *in vitro* insertándoles en su parte media el casete Cat2 (ver Figs. 3 y 4, Págs. 62-63). Después de verificar por patrón de restricción que las construcciones eran las correctas, los genes interrumpidos fueron subclonados en el vector pKNG101. Debido a que este plásmido lleva el origen de replicación  $\gamma$  del replicón R6K, su replicación depende de la presencia de la proteína Pi ( $\pi$ ), por lo que se comporta como vector suicida en cualquier fondo genético que no exprese el gen que codifica esta proteína (Kaniga *et al.*, 1991). Los plásmidos obtenidos se denominaron pKNGlac y pKNGgal, y se utilizaron para insertar en el cromosoma de *E. coli* W3110T<sup>+</sup> los genes modificados; para esto, la cepa se transformó con aproximadamente 100 ng de cada plásmido y las células transformantes se recuperaron en LB+cloranfenicol. Las colonias Cm<sup>R</sup> obtenidas, se crecieron por el método “copia” en presencia del marcador de selección del plásmido (estreptomycin) y en presencia del marcador de la construcción (cloranfenicol). De las colonias analizadas se determinó cuántas eran resistentes a estreptomycin, y cuántas eran sensibles; con esto, se cuantificó la eficiencia de recombinación homóloga doble entre los genes silvestres presentes en cromosoma y los genes interrumpidos presentes en plásmido, colonias con fenotipo Cm<sup>R</sup> Sm<sup>S</sup>. En ambos casos el gen cromosomal silvestre fue reemplazado por el gen mutado, a una frecuencia del 12 % para *lacZ* y del 20 % para *galE* (ver Tabla 6, Pág. siguiente).

Para eliminar el marcador de resistencia por recombinación sitio-específica mediada por Cre, una colonia de cada una de las modificaciones deseadas (*lacZ::Cat2* y

*galE::Cat2*) se transformó con el vector pJW168. Después de inducir la expresión del gen *cre* y comprobar la pérdida del marcador de selección ( $Cm^S$ ), el plásmido pJW168 se eliminó siguiendo el método reportado por Le Borgne *et al.* (1998). Los resultados se presentan en las Tablas 1 y 2, Págs. 64-65.

**Tabla 6.** Cuantificación de las transformantes de la cepa W3110T<sup>+</sup> obtenidas con los plásmidos derivados del vector suicida pKNG101.

Clonas:	Tot. cols.	No. cols.	Fenotipo:	E.R. <sup>1</sup>
W3110T <sup>+</sup> /pKNGlac	75	12	$Cm^S$ $Sm^S$ , azul	- - -
	⇒	9	$Cm^R$ $Sm^S$ , blanco	12.0
		8	$Cm^R$ $Sm^R$ , blanco	10.7
		46	$Cm^R$ $Sm^R$ , azul	61.4
W3110T <sup>+</sup> /pKNGgal	50	29	$Cm^S$ $Sm^S$ , rojo	- - -
	⇒	10	$Cm^R$ $Sm^S$ , blanco	20.0
		11	$Cm^R$ $Sm^R$ , rojo	22.0

<sup>1</sup> Eficiencia de recombinación = porcentaje de células en las que hubo integración o sustitución en el cromosoma de la construcción genética, por medio de recombinación homóloga sencilla o doble.

⇒ Número de colonias en las que ocurrió la sustitución del gen cromosomal silvestre por el gen interrumpido *in vitro* por recombinación homóloga doble con la subsiguiente pérdida del vector.

El funcionamiento adecuado de los otros dos casetes de resistencia escindibles, Gen4 y Kan2, mencionados en Palmeros *et al.* (2000), así como del casete Cat4, que carece del sitio de restricción *EcoRI* presente en el gen *cat* del casete Cat2, se verificó en la cepa 294-Cre de *E. coli*. Esta cepa expresa el gen *cre* que codifica la recombinasa Cre bajo regulación del promotor  $P_R$  y el represor cI termosensible (Buchholz *et al.*, 1996). Como controles se utilizaron el plásmido pLoxCat2 y la cepa isogénica MM294 que no lleva el gen de la recombinasa. Para esto, ambas cepas se transformaron con cada uno de los plásmidos pLoxGen4, pLoxKan2 y pLoxCat4. Se seleccionó una transformante de cada cepa con cada uno de los plásmidos mencionados y las clonas obtenidas se crecieron a 29-30°C y a 37°C, esta última temperatura para inducir la expresión del gen *cre*. La eficiencia de escisión (E.E.) de los genes de resistencia de los distintos plásmidos transformados en la cepa 294-Cre, fue del 100 % cuando ésta se creció a la temperatura de inducción para la expresión de la recombinasa Cre (37°C), y del 90±5 % cuando se creció a la temperatura de represión (29-30°C). En cambio, en la cepa MM294 que no

expresa la recombinasa los genes de resistencia se mantuvieron estables en todos los vectores, independientemente de la temperatura de crecimiento (ver Tabla 7).

**Tabla 7.** Cuantificación del evento de escisión de los genes que codifican la resistencia a antibiótico en los casetes removibles.

Plásmido:	Cepa:	Temp. <sup>1</sup>	Cb <sup>R</sup> (Ap <sup>R</sup> )	Cm <sup>R</sup>	% <sup>2</sup>	E.E. <sup>3</sup>
<b>pLoxCat2</b>	MM294	29-30°C	25	25	100 %	0 %
		37°C	25	25	100 %	0 %
	294-Cre	29-30°C	50	0	0 %	100 %
		37°C	50	0	0 %	100 %
<b>pLoxGen4</b>	MM294	29-30°C	25	25	100 %	0 %
		37°C	25	25	100 %	0 %
	294-Cre	29-30°C	50	6	12 %	88 %
		37°C	50	0	0 %	100 %
<b>pLoxKan2</b>	MM294	29-30°C	25	25	100 %	0 %
		37°C	25	25	100 %	0 %
	294-Cre	29-30°C	50	10	15 %	85 %
		37°C	50	0	0 %	100 %
<b>pLoxCat4</b>	MM294	29-30°C	25	25	100 %	0 %
		37°C	25	25	100 %	0 %
	294-Cre	29-30°C	50	0	5 %	95 %
		37°C	50	0	0 %	100 %

<sup>1</sup> Temperatura a la cual se crecieron las dos cepas de *E. coli* transformadas con los cuatro plásmidos que llevan los casetes de resistencia a antibiótico removibles.

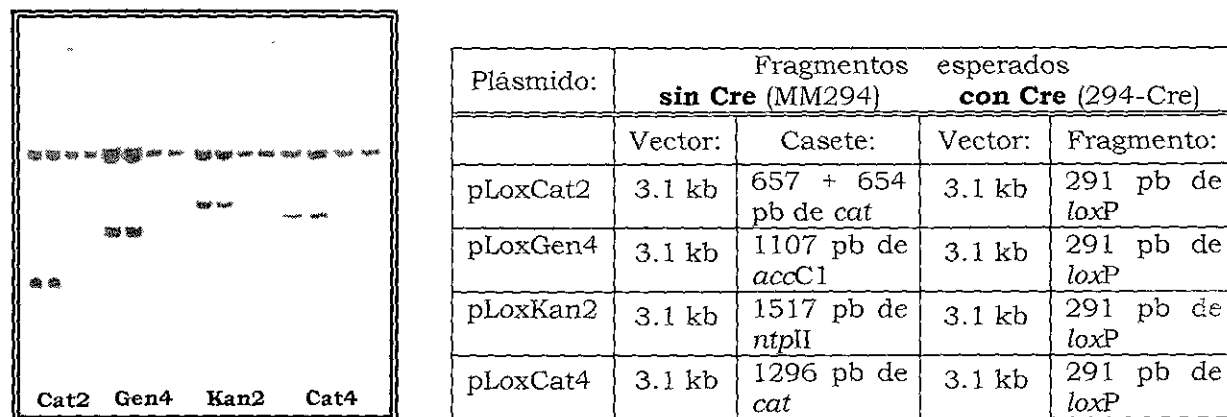
<sup>2</sup> Porcentaje de células en las que se mantuvo el marcador de resistencia.

<sup>3</sup> Eficiencia de escisión = porcentaje de células que perdieron el marcador de resistencia por recombinación sitio-específica mediada por Cre.

De los datos presentados en la Tabla 7, podemos afirmar que todos los casetes construidos funcionan correctamente. Además, en la cepa 294-Cre la cantidad de recombinasa producto de la transcripción de escape, es suficiente para que ocurra el evento de escisión de los genes de resistencia flanqueados por sitios *loxP* presentes en los plásmidos pLoxGcn4, pLoxKan2 y pLoxCat4. La pérdida o permanencia de los genes de resistencia en los plásmidos transformados en ambas cepas, se comprobó purificando los plásmidos de dos clones de cada cepa y de cada resistencia, y analizando su patrón de



restricción con *EcoRI-HindIII*. Como estos sitios de restricción están localizados en los extremos de los MCS de los casetes de resistencia removibles (ver Fig. 1, Pág. 61), la digestión con estas enzimas libera los casetes completos o los MCSs más un sitio *loxP* después de que ocurrió la escisión; en todos los casos se observó lo esperado (ver Fig. 10).



**Figura 10.** Caracterización de los plásmidos pLoxGen4, pLoxKan2 y pLoxCat4 e presencia y ausencia de la recombinasa Cre. En la tabla se presentan las bandas esperadas por la digestión con *EcoRI* y *HindIII*.

Como se mencionó con anterioridad, adicionalmente a los tres casetes escindibles descritos en el artículo Palmeros *et al.* (2000) y en esta sección, se construyó el casete de resistencia a cloranfenicol Cat4. Este casete resulta útil para hacer modificaciones genéticas, en las cuales la presencia del sitio de restricción *EcoRI* presente en el gen *cat* silvestre del casete Cat2, puede interferir con la obtención de la construcción deseada.

## b) CONSTRUCCIÓN Y MEJORAMIENTO DE UNA FAMILIA DE VECTORES TERMOSENSIBLES PARA OBTENER INSERCIÓNES CROMOSOMALES SITIO-DIRIGIDAS EN *E. COLI*

La metodología y los detalles de la construcción de la primera y segunda generación de esta familia de plásmidos, están descritos en los artículos incluidos en la sección previa de "presentación de resultados en artículos publicados (páginas 69-75 y 77-79)", el primero publicado en la revista GENE y el segundo en BioTechniques.

- “ **pBRINT-Ts: a plasmid family with a temperature-sensitive replicon, designed for chromosomal integration into the *lacZ* gene of *Escherichia coli* ”**
- “ **Improvement of the pBRINT-Ts Plasmid Family to Obtain Marker-Free Chromosomal Insertion of cloned DNA in *E. coli* ”**

La primera generación de esta familia de vectores se construyó utilizando las funciones de replicación termosensibles del plásmido pSC101, la mayor parte del gen estructural *lacZ* y tres marcadores de resistencia a antibióticos (cloranfenicol, gentamicina y kanamicina), para seleccionar las integraciones en cromosoma. El gen, grupo de genes o construcción genética que se quieren integrar al cromosoma, se pueden insertar en el MCS que se localiza entre el marcador de resistencia y la región de homología con el extremo 3' del gen *lacZ*. Debido a que estos plásmidos solo se replican a la temperatura permisible de 30°C, las integraciones en cromosoma por doble recombinación homóloga se obtienen de forma simple y rápida, ya que únicamente se requiere aumentar la temperatura de crecimiento para promover la integración y eliminación de estos plásmidos. Debido a esta nueva característica, con estos plásmidos no se requiere la utilización de una cepa especial para obtener las integraciones en el locus cromosomal *lacZ*.

Finalmente, para mejorar a esta familia de plásmidos, se diseñó y construyó una segunda generación de los vectores pBRINT-Ts. Para esto, se utilizaron los casetes escindibles de resistencia a antibióticos que se diseñaron y construyeron en la primera parte de este trabajo (Palmeros *et al.*, 2000). Con este cambio, el marcador de resistencia utilizado para seleccionar la modificación genética en el cromosoma de *E. coli*, se puede eliminar sin mayores complicaciones. De esta forma, el mismo marcador de selección utilizado para obtener la primera modificación genética, se puede reutilizar para hacer cambios posteriores en la misma cepa. Las demás características de estos vectores son iguales a las que tienen los plásmidos de la primera generación.

## C) CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN SISTEMA GENÉTICO PARA REGULAR DE MANERA SIMULTANEA Y CONCERTADA DIFERENTES GENES EN EL CROMOSOMA DE E. COLI:

### C.1. CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PROMOTORES P<sub>RM</sub> MUTANTE (P<sub>RMUP</sub>) Y P<sub>RM</sub> SILVESTRE (P<sub>RMWT</sub>)

Como se señaló al inicio de esta sección de resultados adicionales, en la segunda parte del proyecto se diseñaron y construyeron los sistemas genéticos que permiten expresar y/o reprimir la expresión de genes de forma simultánea, y por medio de una señal de regulación única, la proteína bifuncional  $\text{cI}$ . Este grupo de herramientas moleculares se diseñó y construyó utilizando los promotores  $P_L$  y  $P_{RM}$  (tanto silvestre como mutante) del bacteriófago lambda. Estos promotores heterólogos se pueden utilizar para regular la expresión genética de un gen determinado en lugar de utilizar su propio promotor.

La estrategia que se siguió para la construcción de los promotores silvestre y mutante,  $P_{RMWT}$  y  $P_{RMUP}$ , fue por medio de PCR y utilizando a los oligonucleótidos iniciadores como el DNA templado uno del otro. Tomando en cuenta la secuencia de estos promotores y todas las señales necesarias para la transcripción y la traducción (cajas -10 y -35, región operadora, RBS (SD), ATG, etc.) se diseñaron dos juegos de oligonucleótidos, formado cada uno por un 84amero y un 94amero; el primer oligo corresponde al extremo 5' y el segundo al extremo 3' de los promotores  $P_{RM}$ . En ambos juegos, los últimos 26 nucleótidos de ambos iniciadores son complementarios uno del otro, de tal manera que forman un híbrido estable de 26 pb con una  $T_m$  de 76°C y con extremos 5' salientes de 58 y 68 nucleótidos de longitud. Para facilitar la manipulación de los fragmentos de PCR y la clonación de los promotores, se introdujeron sitios de restricción en los extremos 5' de ambos oligonucleótidos de cada juego; el oligo que corresponde al extremo 5' lleva un sitio *EcoRI* y el oligo del extremo 3' lleva un sitio *BamHI*, tal y como se puede ver en las Figuras 11 y 12.

Para el diseño de los oligonucleótidos utilizados para obtener ambos promotores  $P_{RM}$ , además de tomar en cuenta las características mencionadas líneas más arriba, también se incluyeron en su secuencia de nucleótidos los siguientes cambios importantes:

- 1- Mutación puntual **prmup-1** que aumenta la fuerza del promotor  $P_{RM}$ . Esta mutación involucra el cambio de  $T_2$  por  $C_2$  en la caja -35 de este promotor (Gussin *et al.*, 1983).
- 2- Mutación puntual **x3** que inactiva al promotor  $P_R$  localizado en la misma secuencia del promotor  $P_{RM}$ , pero que transcribe en dirección opuesta. Esta mutación involucra el cambio de  $A_3$  por  $G_3$  en la caja -35 de este promotor (Gussin *et al.*, 1983).

- 3- Además de los sitios de restricción *EcoRI* y *BamHI* en los extremos 5' y 3', respectivamente, alrededor del codón de inicio de la traducción (ATG) se adicionaron otros sitios de restricción que además de facilitar la manipulación *in vitro*, permiten obtener fusiones transcripcionales o traduccionales de estos promotores a un gen de interés, en este caso al gen reportero *lacZ*.

Oligonucleótido **PRMUP5** (84amero)

5' TGATAGCGGAATTCCGTGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTA-  
EcoRI

-AAATAGCCAACACGCACGGTGTAGACATTTATCCCTTGCGG 3'

Oligonucleótido **PRMUP3** (94amero)

3' GCCACAATCTGTAATAGGGAACGCCACTATCTAAATTGCATAAGTG-

-TGTAGCTACAGCTGGTTCCTCCAGATCTACCATGGGCCCTAGGCGC 5'  
BamHI

**Figura 11.** Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para construir el promotor *P<sub>RMUP</sub>*. Las mutaciones introducidas están resaltadas en color: rojo para la mutación x3 y azul para *prmup-1*. Los extremos complementarios están subrayados en verde y los sitios de restricción en violeta.

Oligonucleótido **PRMWT5** (84amero)

5' TGATAGCGGAATTCCGTGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTA-  
EcoRI

-AAATAGCCAACACGCACGGTGTAGATATTTATCCCTTGCGG 3'

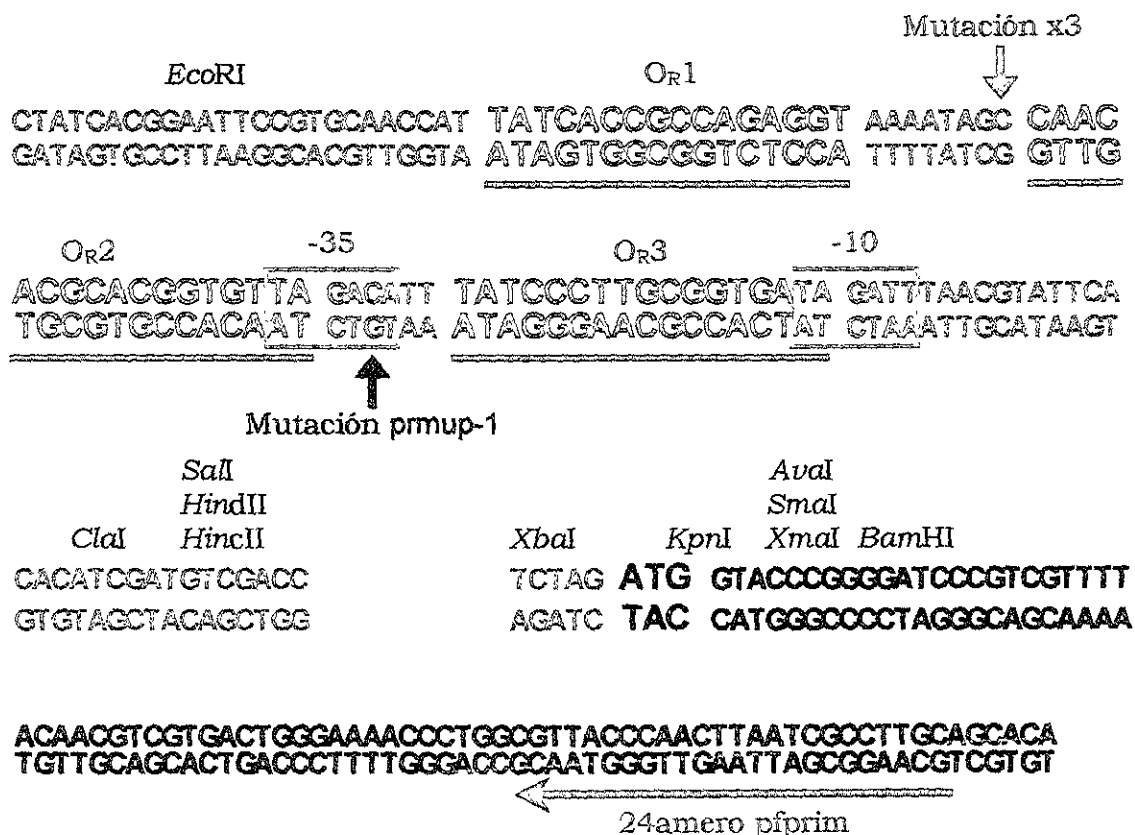
Oligonucleótido **PRMWT3** (94amero)

3' GCCACAATCTATAAATAGGGAACGCCACTATCTAAATTGCATAAGTG-

-TGTAGCTACAGCTGGTTCCTCCAGATCTACCATGGGCCCTAGGCGC 5'  
BamHI

**Figura 12.** Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para construir el promotor *P<sub>RMWT</sub>*. La mutación x3 está remarcada en rojo. Los sitios de restricción están subrayados en violeta y los extremos complementarios en verde.

Así, se llevaron a cabo las reacciones de PCR con ambos juegos de oligonucleótidos y utilizando una concentración de aproximadamente 125 pmolas de cada uno de ellos, para obtener suficiente producto de PCR para llevar a cabo la clonación de los promotores. Después de que los oligos de ambos juegos se alinearon y los extremos 5' salientes se polimerizaron sobre si mismos, se obtuvieron dos fragmentos de DNA de doble cadena de 152 pb de longitud cada uno, los cuales contienen los promotores  $P_{RMUP}$  y  $P_{RMWT}$ . Los promotores construidos se esquematizan en la Figura 13. El promotor  $P_{RMUP}$  lleva las dos mutaciones tomadas en cuenta, mientras que el promotor  $P_{RMWT}$  únicamente lleva la mutación x3.



**Figura 13.** Promotor  $P_{RM}$  mutante ( $P_{RMUP}$ ) obtenido por medio de PCR. Los sitios donde están ubicadas las mutaciones x3 y prmup-1 se indican con flechas. La única diferencia de este promotor con el promotor  $P_{RMWT}$ , es que este último no lleva la mutación prmup-1.

Para comprobar que los promotores construidos por medio de PCR son funcionales y pueden controlar la expresión de un gen determinado, ambos se fusionaron en fase al gen reportero *lacZ* presente en los plásmidos, pMC1403 y pInt3<sub>tr</sub>. Se utilizaron

estos plásmidos debido a que el gen *lacZ* presente en estos vectores carece de la región promotora, del codón de inicio de la traducción y de los primeros siete codones estructurales, por lo que no se produce proteína  $\beta$ -Gal activa y en consecuencia las clonas con estos plásmidos presentan fenotipo blanco en presencia del sustrato cromogénico XGal. Bajo este esquema, la clonación de los promotores construidos  $P_{RMUP}$  y  $P_{RMWT}$  frente al gen *lacZ* inactivo permitió comprobar que éstos son funcionales debido a que permiten la transcripción y traducción de este gen, y por lo tanto se obtiene enzima  $\beta$ -Gal activa (fenotipo azul en presencia de XGal). Para obtener las fusiones génicas, los productos de PCR de 152 pb se digirieron con *EcoRI-BamHI* y los fragmentos de restricción de 135 pb que contenían los promotores, se separaron por electroforesis en gel de acrilamida y se purificaron como se describe en materiales y métodos. Los promotores se ligaron con los plásmidos pMC1403 y pInt3<sub>ts</sub> digeridos con las mismas enzimas de restricción y después el DNA se utilizó para transformar la cepa XL1-Blue (*LacZ*<sup>-</sup>). Las clonas se seleccionaron por la resistencia del plásmido (Ap<sup>R</sup>) y por presentar fenotipo azul en presencia de XGal.

Del análisis cualitativo de la actividad de  $\beta$ -Gal en las transformantes Ap<sup>R</sup>, se obtuvieron varias clonas positivas (fenotipo azul) de las cuales se seleccionaron algunas para terminar de caracterizarlas. Para esto, se purificaron los plásmidos de 10 de las colonias seleccionadas, y se analizaron por patrón de restricción con *EcoRI* y *BamHI*. Después de comprobar que los plásmidos obtenidos presentaban el fragmento de 135 pb correspondiente a los promotores  $P_{RMUP}$  o  $P_{RMWT}$  (datos no mostrados), se verificó que la secuencia de nucleótidos fuera correcta. La secuenciación se hizo por medio de PCR, utilizando termosequencia y el oligonucleótido pfprim como iniciador. Las secuencias determinadas fueron las esperadas e iguales a la mostrada en la Figura 13. A pesar de que en todos los plásmidos analizados la secuencia de nucleótidos fue la esperada para los dos promotores construidos, en algunas clonas la fusión con el gen *lacZ* quedó fuera de fase. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8 en la página siguiente.

De entre los plásmidos analizados con la fusión del gen *lacZ* a cada uno de los promotores construidos, se seleccionaron uno con cada uno de los promotores. Los plásmidos se denominaron pBRP<sub>RMUP</sub>10, al que lleva el promotor con ambas mutaciones, y pTSP<sub>RMWT</sub>8, al que sólo lleva la mutación que inactiva al promotor  $P_R$ . Para terminar la construcción de los casetes de expresión, a los dos plásmidos seleccionados se les adicionaron los casetes removibles de resistencia a antibióticos construidos en este

trabajo y obtenidos de los plásmidos pBPSCat2, pBP SKan2, pBP SGen4 y pBP SCat4, descritos en el artículo Le Borgne *et al.*, 2001 (ver páginas 78-79).

**Tabla 8.** Resultados de la determinación de la secuencia de algunas clonas con los promotores  $P_{RMUP}$  y  $P_{RMWT}$

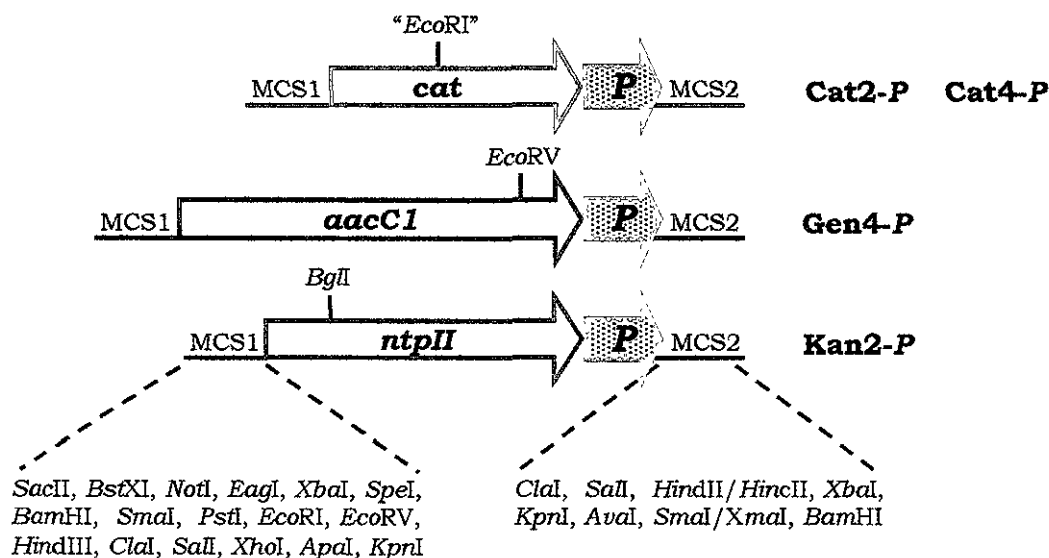
Plásmido:	Clona:	Fenotipo inicial:	Datos obtenidos de la secuenciación		
			Mutación x3	Mutación prmup-1 <sup>a</sup>	Fusión al gen <i>lacZ</i>
pMC1403+ $P_{RMUP}$	10	Azul intenso	O.K.	O.K.	O.K.
	14	Azul pálido	O.K.	O.K.	Fuera de fase
	18	Blanco	O.K.	O.K.	Fuera de fase
pInt3 <sub>ts</sub> + $P_{RMWT}$	7	Azul intenso	O.K.	- - -	O.K.
	8	Azul intenso	O.K.	- - -	O.K.
	14	Blanco	O.K.	- - -	Fuera de fase

<sup>a</sup> La mutación prmup-1 solo se introdujo en el promotor mutante  $P_{RMUP}$

## C.2. CONSTRUCCIÓN DE LOS CASETES PARA REGULAR LA EXPRESIÓN GENÉTICA UTILIZANDO LOS PROMOTORES $P_{RM}$ DEL BACTERIOFAGO LAMBDA

La construcción de los casetes para regular la expresión genética, se concluyó adicionando marcadores de resistencia a antibióticos a los promotores construidos. Los marcadores adicionados permiten seleccionar la sustitución del promotor silvestre de un gen determinado por uno de los promotores construidos,  $P_{RMUP}$  o  $P_{RMWT}$ . Para esto, se utilizaron los casetes de resistencia escindibles precedidos por un MCS del vector pBluescriptIIKS+ (MCS-rAnb<sup>R</sup>) presentes en los plásmidos mencionados anteriormente. Los MCS-rAnb<sup>R</sup> se obtuvieron de estos vectores como fragmentos *SacI* y después de rasurarlos con DNA-polimerasa del fago T4, fueron clonados en el sitio *EcoRI*/*DNApol* T4 de los plásmidos pBRP<sub>RMUP</sub>10 y pTSP<sub>RMWT</sub>8; este sitio se creó con los oligonucleótidos empleados en la construcción de los promotores y está localizado justo arriba de ellos. Las clonas con los plásmidos modificados fueron seleccionadas por la resistencia codificada por los casetes adicionados (Cm<sup>R</sup> o Gm<sup>R</sup> o Km<sup>R</sup>) y por la resistencia de los vectores (Ap<sup>R</sup>). De los plásmidos obtenidos, algunos fueron analizados por patrón de restricción con diferentes enzimas, para verificar que la dirección en que quedaron

clonados los MCS-rAnb<sup>R</sup> fuera la correcta, esto es que el MCS haya quedado en el extremo 5' (datos no mostrados). De los plásmidos que se analizaron y presentaron el patrón de restricción correcto, se seleccionó uno con cada uno de los casetes de resistencia. Los plásmidos seleccionados se nombraron: pBRP<sub>RMUP</sub>Cat2, pBRP<sub>RMUP</sub>Gen4, pBRP<sub>RMUP</sub>Kan2 y pBRP<sub>RMUP</sub>Cat4 a los que llevan el promotor mutante; y pTSP<sub>RMWT</sub>Cat2, pTSP<sub>RMWT</sub>Gen4, pTSP<sub>RMWT</sub>Kan2 y pTSP<sub>RMWT</sub>Cat4 a los que llevan el promotor silvestre. La estructura general de los casetes de regulación de la expresión genética se muestra en la Figura 14.



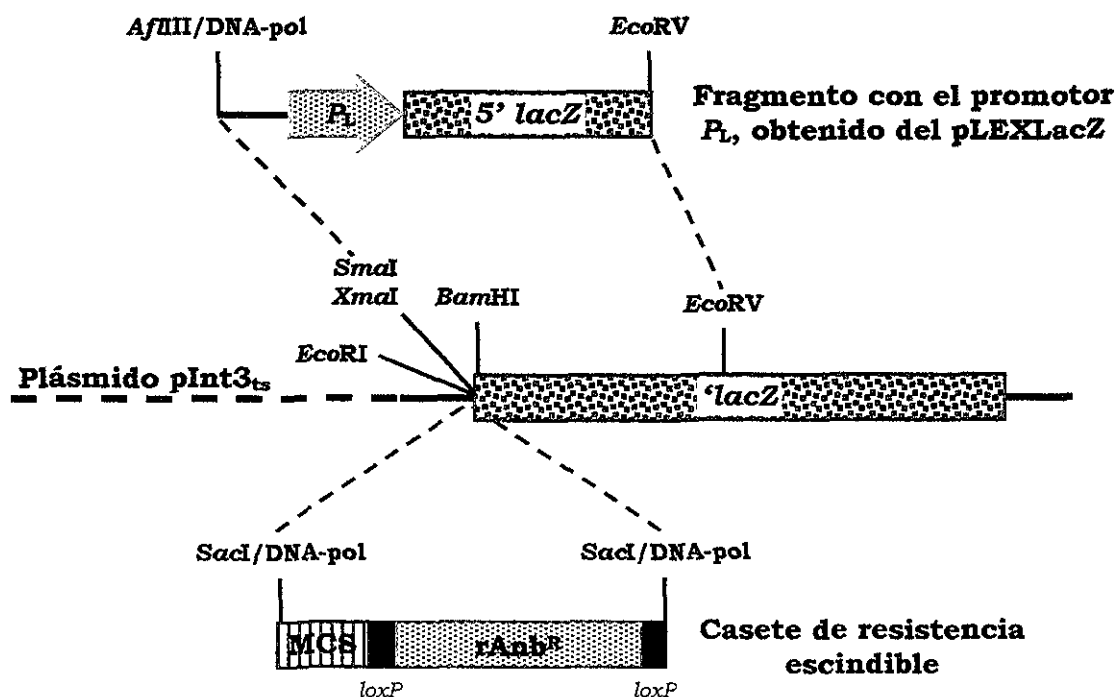
**Figura 14.** Estructura general de los casetes de regulación genética. Se especifican los sitios de restricción presentes en ambos lados; **P** representa a cualquiera de los promotores  $P_{RMUP}$  o  $P_{RMWT}$  o  $P_L$ .

Con la adición de los casetes de resistencia a antibióticos removibles junto con el MCS, los casetes de regulación de la expresión genética quedaron delimitados en ambos lados por varios sitios de restricción. Esta disposición permite obtener los promotores junto con el marcador de selección por medio de digestiones sencillas o dobles, para fusionarlos transcripcional o traduccionalmente a un gen determinado.

### C.3. CONSTRUCCIÓN DEL CASETE DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA CON EL PROMOTOR $P_L$ DEL BACTERIOFAGO LAMBDA



La construcción del casete de expresión con el promotor  $P_L$ , se realizó de manera diferente a la utilizada para construir los casetes con los promotores  $P_{RM}$  silvestre y mutante; la estrategia que se siguió se esquematiza en la Figura 15. El promotor  $P_L$  de lambda fusionado al gen *lacZ* se obtuvo del vector pLEXLacZ. Este plásmido se digirió totalmente con *AfIII-EcoRV* y los extremos cohesivos generados se rellenaron con DNA-polimerasa del fago T4; los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis en gel de agarosa. Finalmente, el fragmento de 1563 pb que lleva casi la mitad 5' del gen reportero *lacZ* bajo la regulación del promotor  $P_L$ , se recuperó del gel como se describe en materiales y métodos.



**Figura 15.** Estrategia seguida en el diseño y construcción del casete de regulación de la expresión genética con el promotor  $P_L$  de lambda.

El fragmento con la fusión  $P_L$ -*lacZ'* fue clonado en el plásmido  $pInt3_{ts}$  digerido con *SmaI-EcoRV*; con esta digestión, se eliminó un fragmento de 1110 pb que contenía la mitad 5' del gen *lacZ* sin promotor. De esta forma, no sólo se obtuvo la fusión del promotor  $P_L$  al gen reportero *lacZ*, sino que, además, esta fusión génica se tiene en un vector termosensible, con lo cual se facilita la obtención de inserciones/sustituciones cromosomales. Después de seleccionar varias clonas por mostrar fenotipo azul en XGal, se purificaron los plásmidos de algunas de ellas y se verificó que presentaran el patrón de

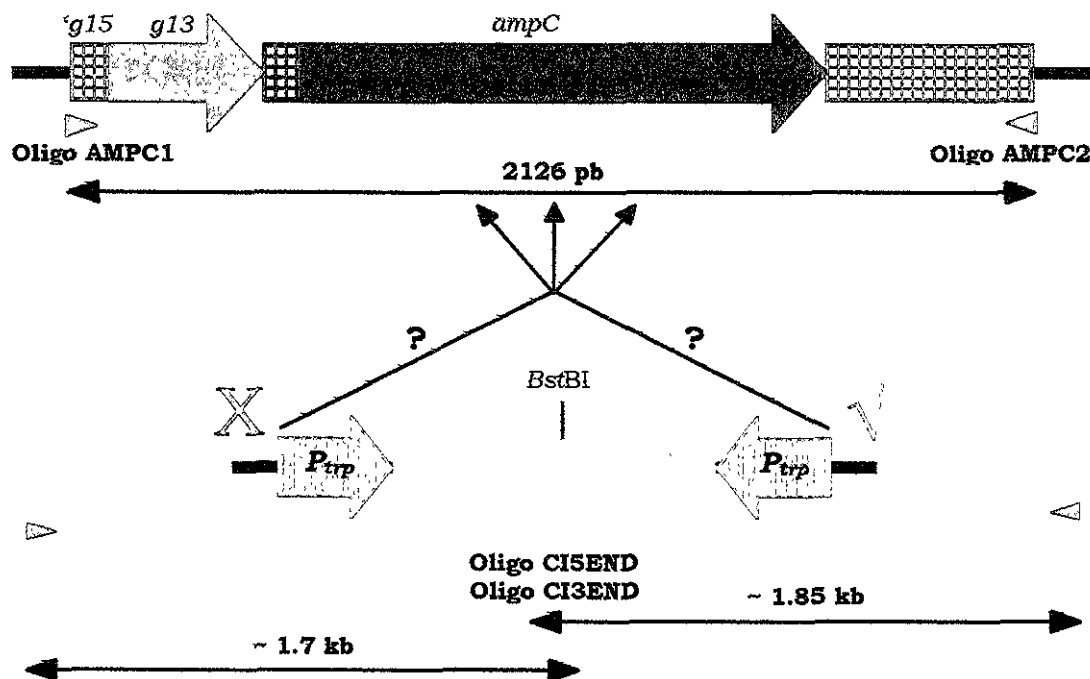
restricción esperado con la enzima *Hind*III (datos no mostrados). Todos los plásmidos analizados fueron correctos y se seleccionó uno de ellos, denominado pIntP<sub>L</sub>14, para adicionarle los casetes de resistencia a antibióticos removibles (MCS-rAnb<sup>R</sup>) y terminar de construir los casetes de regulación de la expresión genética con el promotor *P<sub>L</sub>*. La adición de los marcadores de selección al plásmido pIntP<sub>L</sub>14, se realizó utilizando la misma estrategia de construcción llevada a cabo con los plásmidos que portan los promotores *P<sub>RMUP</sub>* y *P<sub>RMWT</sub>* (ver Pág. 91). La estructura final de los casetes obtenidos se muestra en la Figura 14. Los plásmidos que llevan los casetes de expresión se nombraron pTSP<sub>L</sub>Cat2, pTSP<sub>L</sub>Gen4, pTSP<sub>L</sub>Kan2 y pTSP<sub>L</sub>Cat4.

Con la construcción de este grupo de plásmidos, se obtuvo un conjunto de casetes de regulación de la expresión genética que sirven para la sustitución *in vitro* del promotor silvestre de un gen en particular por uno de los promotores de lambda, y cuya expresión se desea inducir o reprimir debido a la presencia o ausencia de la proteína *ci* (ver Tabla 5). El otro componente del sistema para regular la expresión genética de forma simultánea y concertada, es la construcción genética que permite expresar al gen *ci* de forma regulada; ésta, se obtuvo a partir de la cepa GI724 como se describe en la siguiente sección.

#### C.4. OBTENCIÓN DEL SISTEMA GENÉTICO PARA EXPRESAR EL GEN QUE CODIFICA LA PROTEÍNA REGULADORA *CI* DEL BACTERIOFAGO LAMBDA

Para expresar el gen *ci* de forma regulada, se decidió utilizar la fusión génica *P<sub>trp</sub>-ci* donde la expresión del gen que codifica la proteína *ci* está regulada por triptofano; en ausencia de triptofano, el promotor se induce con lo que se transcribe el gen *ci* que codifica el represor de lambda, mientras que en presencia de este aminoácido el promotor se reprime y no se sintetiza *ci*. Esta fusión génica se encuentra insertada en el *locus* cromosomal *ampC* de *E. coli* GI724, *ampC::P<sub>trp</sub>-ci*, (LaVallie *et al.*, 1993 y 2000). Para obtener esta construcción y poder utilizarla en otros fondos genéticos, se intentó amplificarla por medio de PCR utilizando los oligos AMPC1 y AMPC2, los cuales son específicos para la región cromosomal hacia arriba y hacia abajo del gen *ampC* (ver Fig. 16). Después de realizar varios intentos para amplificar este fragmento haciendo varias modificaciones en las condiciones de PCR, no se obtuvieron resultados positivos. Como se desconocían los detalles de cómo se realizó esta construcción y no se encontró información al respecto, se decidió amplificarla en dos partes utilizando oligonucleótidos





**Figura 16.** Esquema de la estrategia utilizada para obtener la fusión génica *ampC::P<sub>trp</sub>-cl* por medio de PCR. Se indican los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar los dos fragmentos del gen *cl*.

De esta forma, la construcción *ampC::P<sub>trp</sub>-cl* presente en el plásmido pBPSCI se puede utilizar para regular la expresión del represor *cl* de lambda en cualquier cepa de *E. coli*, después de hacerle las modificaciones adecuadas para cada caso. Por ejemplo, para integrar la fusión génica *P<sub>trp</sub>-cl* en algún *locus* cromosomal diferente a *ampC*, es necesario agregarle las secuencias homólogas al nuevo *locus* cromosomal seleccionado en ambos lados, en lugar de las secuencias de *ampC*.

### C.5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *LACZ* A PARTIR DE LOS PROMOTORES *P<sub>L</sub>* Y *P<sub>RM</sub>* SILVESTRE Y MUTANTE DEL BACTERIOFAGO LAMBDA

La validación de los sistemas para la regulación de la expresión genética que se construyeron en esta parte del proyecto, se realizó utilizando las fusiones de los promotores de lambda al gen reportero *lacZ*, que se hicieron durante la construcción de los casetes de expresión génica. De tal manera que las mediciones de actividad de la enzima β-galactosidasa expresada a partir de las fusiones del gen que la codifica con los

promotores  $P_{RM}$  y  $P_L$ , deberán reflejar el nivel de regulación obtenido con los casetes de expresión génica y la proteína cI.

En los objetivos particulares de este proyecto, se planteó obtener fusiones génicas con los casetes de expresión construidos a nivel cromosomal. Para esto, el promotor  $P_{lac}$  del gen  $lacZ$  presente en el cromosoma de *E. coli* se intercambiaría por medio de un evento de recombinación homóloga doble por cada uno de los promotores de lambda. Para obtener el intercambio de una región específica de DNA por otra, es necesario que los fragmentos de DNA que se van a intercambiar tengan en ambos lados secuencias homólogas. En este caso, para tener las construcciones adecuadas para sustituir el promotor  $P_{lac}$  por uno de los promotores heterólogos utilizados, se seleccionó la región cromosomal localizada hacia arriba del gen  $lacI$  (región  $uplacI$ ), para adicionarla en el MCS1 de los casetes de regulación de la expresión genética presentes en los plásmidos pBRP<sub>RMUP</sub>Kan2, pTSP<sub>RMWT</sub>Cat4 y pTSP<sub>L</sub>Gen4 (ver Fig. 14). De esta forma, se tienen las dos regiones necesarias para que se lleve a cabo el evento de recombinación homóloga doble entre las secuencias del cromosoma y las secuencias correspondientes presentes en los plásmidos antes mencionados, región  $uplacI$  y  $lacZ$ .

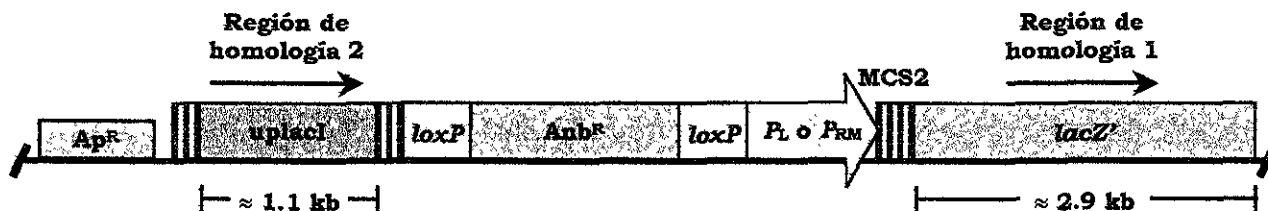
La región  $uplacI$  se obtuvo por medio de PCR, utilizando DNA cromosomal de *E. coli* W31 10T<sup>+</sup> como templado y los oligonucleótidos  $uplac3$  y  $uplac2$  como iniciadores:

**Oligo  $uplac3$  = 5'CAG CAG GCT GGA TGT CAG GGT GTT G3'**

**Oligo  $uplac2$  = 5'CGA TGG TGT CAA GCG CCA ACG TAA ATG C3'**

El producto de PCR de 1067 pb que contenía la región cromosomal  $uplacI$ , se clonó directamente en el vector pCR-BluntII-TOPO. Para determinar la dirección de clonación de este fragmento en los plásmidos obtenidos, se analizaron por patrón de restricción con *Pst*I y de ellos, se seleccionó un plásmido con el fragmento  $uplacI$  clonado en el sentido de las manecillas del reloj, al que se denominó pCR $uplacI$ . La adición del fragmento  $uplacI$  a los plásmidos pBRP<sub>RMUP</sub>Kan2, pTSP<sub>RMWT</sub>Cat4 y pTSP<sub>L</sub>Gen4, se realizó obteniendo esta región como fragmento *Hind*III-*Xho*I del vector pCR $uplacI$  y clonándola en el MCS1 ubicado hacia arriba de los promotores presentes en estos tres vectores. De los plásmidos obtenidos, algunos fueron seleccionados para caracterizarlos por patrón de restricción con *Hin*clI, con lo que se confirmó la clonación de la región  $uplacI$  (datos no mostrados). Así, para llevar a cabo la sustitución del promotor  $P_{lac}$  por los promotores  $P_{RMUP}$  o  $P_{RMWT}$  o  $P_L$ , se seleccionó un plásmido con cada uno de ellos; los plásmidos obtenidos se

nombraron  $pINTP_{RMU}lacZ$ ,  $pINTP_{RMWT}lacZ$  y  $pINTP_LlacZ$ . La estructura general de estos plásmidos se muestra en la Figura 17.



**Figura 17.** Esquema que muestra los principales componentes de los plásmidos construidos para sustituir el promotor silvestre de *lacZ*, por alguno de los promotores de lambda presentes en los casetes de regulación de la expresión genética. El origen de replicación no se muestra, y las cajas ralladas a los lados de la región *uplacI* corresponden al MCS1.

Finalmente, estos plásmidos se utilizaron para intercambiar el promotor  $P_{lac}$  del cromosoma de *E. coli* GI724, por los promotores de lambda. Para esto, la cepa se transformó con cada uno de los vectores y las células transformantes se recuperaron en LB+Ap + la resistencia codificada en el casete de expresión (Ap+Cm o Ap+Gm o Ap+Km); y de las transformantes obtenidas se seleccionó una clona con cada uno de los plásmidos. Las colonias seleccionadas se crecieron siguiendo el método reportado por Le Borgne *et al.* (1998), para promover el evento de recombinación homóloga doble y obtener la sustitución del promotor silvestre del operón de lactosa por los promotores  $P_{RMUP}$  o  $P_{RMWT}$  o  $P_L$ . Lamentablemente, a pesar de que se hicieron varios intentos por obtener las clonas derivadas de *E. coli* GI724, en las que se debió de llevar a cabo el intercambio de los promotores, no se obtuvieron resultados positivos. Si tomamos en cuenta que, en nuestras condiciones experimentales, diferentes cepas de *E. coli* RecA<sup>+</sup> utilizadas para obtener integraciones y/o sustituciones cromosomales muestran diferencias significativas en la eficiencia con la cual llevan a cabo este proceso y que, además, cuando utilizamos construcciones diferentes en una misma cepa también se presentan diferencias (ver Tabla 1, Pág. 72), no consideramos extraño los resultados obtenidos con esta cepa.

Debido a que los resultados obtenidos con la primera estrategia planteada para caracterizar los casetes de expresión genética no fueron los esperados, decidimos utilizar las fusiones del gen *lacZ* con los promotores de lambda presentes en los plásmidos  $pINTP_{RMU}lacZ$ ,  $pINTP_{RMWT}lacZ$  y  $pINTP_LlacZ$ , para hacer las determinaciones de  $\beta$ -galactosidasa. Las condiciones de crecimiento, preparación de las muestras y medición

de la actividad enzimática se detallan en materiales y métodos. Los resultados de la medición de la actividad enzimática de  $\beta$ -Gal expresada a partir de los casetes de expresión contruidos, se muestran en la Tabla 9; las unidades específicas se calcularon de acuerdo al método reportado por Miller (1992).

**Tabla 9.** Determinaciones de la actividad enzimática de  $\beta$ -galactosidasa expresada a partir de los casetes de expresión genética contruidos.

Cepa:	No. de Copias del plásmido	Actividad de $\beta$ -Gal <sup>a</sup> (U/min/mg de proteína)	
		+ cI <sup>b</sup>	- cI <sup>c</sup>
GI724	0	615 $\pm$ 130	721 $\pm$ 162
GI724/pLEX*	$\approx$ 200	650 $\pm$ 75	698 $\pm$ 126
GI724/pMC1403*	20-30	734 $\pm$ 150	711 $\pm$ 136
GI724/pInt3 <sub>ts</sub> *	6-10	685 $\pm$ 135	624 $\pm$ 189
GI724/pLEXLacZ	$\approx$ 200	733 $\pm$ 111	183,775 $\pm$ 10,914
GI724/pINTP <sub>RMU</sub> lacZ	20-30	4,505 $\pm$ 175	5,211 $\pm$ 232
GI724/pINTP <sub>RMWT</sub> lacZ	6-10	609 $\pm$ 100	686 $\pm$ 109
GI724/pINTP <sub>I</sub> lacZ	6-10	719 $\pm$ 165	654 $\pm$ 131

<sup>a</sup> Los resultados corresponden al promedio de cuatro mediciones hechas en muestras obtenidas a partir de dos experimentos independientes.

<sup>b</sup> Actividades de  $\beta$ -Gal de las muestras tomadas antes de adicionar triptofano, para inhibir la síntesis de la proteína cI.

<sup>c</sup> Actividades de  $\beta$ -Gal en las muestras tomadas 4 hrs. después de adicionar triptofano.

\* Plásmidos control: el pLEX solo lleva el promotor  $P_L$  y los otros dos vectores llevan el gen *lacZ* sin promotor.

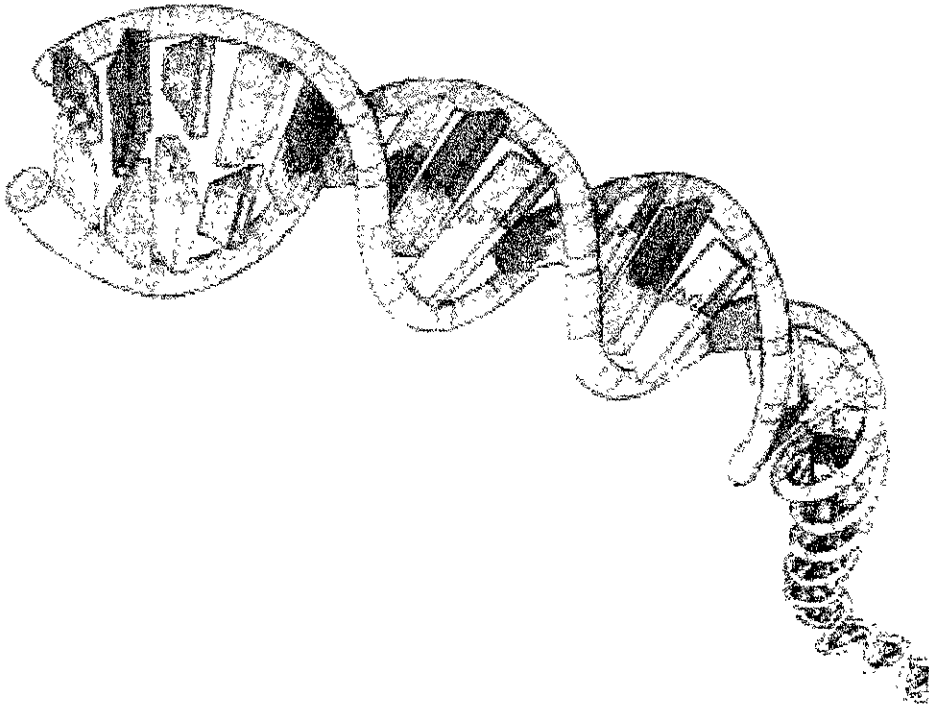
Como se mencionó líneas arriba, los experimentos realizados para determinar la regulación de la expresión del gen *lacZ* a partir de los promotores de lambda  $P_L$  y  $P_{RM}$ , tanto mutante como silvestre, y a través de la proteína cI, se llevaron a cabo con las construcciones presentes en plásmido. En los resultados presentados en la Tabla 9, se observa que cuando la cepa GI724 se crece en condiciones de inducción (I/R-M), presenta actividades específicas de  $\beta$ -Gal muy similares e independientemente de que lleve los plásmidos utilizados como control (pLEX, pMC1403 y pInt3<sub>ts</sub>) o los vectores que llevan el gen *lacZ* fusionado a los promotores  $P_{RMWT}$  y  $P_I$  en plásmidos de bajo número de copias (pINTP<sub>RMWT</sub>lacZ y pINTP<sub>I</sub>lacZ). Además, no se observaron diferencias significativas en

presencia o ausencia de la proteína reguladora cI. En cambio, cuando esta cepa lleva fusionado este gen reportero a los promotores  $P_{RMUP}$  y  $P_L$  en plásmidos de mediano y alto número de copias, si se observaron diferencias en las actividades específicas de  $\beta$ -galactosidasa.

La expresión de *lacZ* a partir del promotor  $P_L$  en el plásmido control pLEXLacZ multicopia, ~200 copias/célula, fue reprimida en presencia de cI; mientras que la expresión de este gen en condiciones de inducción, debidas a la ausencia de cI después de 4 hrs. de haber adicionado triptofano, se vio reflejada en un incremento de tres ordenes de magnitud en la actividad específica de esta enzima (Tabla 9). La expresión genética a partir del promotor  $P_{RMUP}$  presente en el plásmido pINTP $_{RMUP}$ lacZ de mediano número de copias, 20-50 copias/célula, no mostró diferencias en presencia o ausencia de cI; estos datos, además de lo reportado por Gussin *et al.* (1983) de que la mutación *prmup-1* aumenta la fuerza de este promotor debido a que el cambio de TA a CG acerca la secuencia de este promotor al consenso, de -gtTACATatt- a -gtTACACAtt-, nos sugieren, y salvo la confirmación experimental posterior, que el aumento en la expresión genética a partir de este promotor se debe a que el cambio favorece la formación del complejo cerrado con la RNA-polimerasa. Lo anterior, también se ve apoyado por el hecho de que la cepa de *E. coli* XL1-Blue transformada con este plásmido, a pesar de no expresar la proteína cI, presenta actividad de  $\beta$ -Gal similar a la presentada por la cepa GI724 transformada con este plásmido (datos no mostrados).

La expresión genética a partir de los promotores  $P_{RMWT}$  y  $P_L$  en los plásmidos de bajo número de copias, pINTP $_{RMWT}$ lacZ y pINTP $_L$ lacZ con 6-10 copias/célula, se mantuvo reprimida tanto en presencia de cI como cuando se inhibió la síntesis del represor por la adición de triptofano. Resultados similares fueron obtenidos por Mieschendahl *et al.* (1986) al tratar de expresar el gen de la citrato-cintasa (*gltA*) a partir del promotor  $P_L$ ; para regular la expresión genética a partir de este promotor, ellos también utilizaron la fusión del gen *cl* al promotor de triptofano clonado en el mismo vector de expresión del gen *gltA*. Células de *E. coli* transformadas con esta construcción, no produjeron citrato-sintasa ni en presencia ni ausencia de triptofano, y concluyen que la concentración de cI es elevada por lo que el promotor  $P_L$  se mantuvo reprimido; en cambio, cuando expresaron cI a partir de una copia de la fusión  $P_{trp}$ -*cl* integrada en cromosoma, lograron inducir la producción de la enzima después de adicionar triptofano. En nuestro caso, parece ser que la concentración de la proteína reguladora cI también es elevada, por lo





DISCUSIÓN  
Y  
CONCLUSIONES

VIII

## DISCUSIÓN

La modificación a nivel cromosomal de microorganismos para ser utilizados como maquinarias biosintéticas de compuestos con aplicaciones industriales, médicas, medioambientales, etc. es una alternativa muy importante utilizada para la construcción y optimización de este tipo de cepas. Con esta estrategia, la modificación y transferencia de genes de manera dirigida, de y hacia un *locus* cromosomal específico, no sólo permite la modificación fina de una cepa, sino que evita problemas asociados al uso de plásmidos. Entre estos inconvenientes, destacan la permanencia de los marcadores utilizados para verificar la obtención de la modificación deseada, en particular los que confieren resistencia a antibióticos, la pérdida de los plásmidos y la carga metabólica adicional impuesta por la presencia de estos elementos extracromosomales. Además, el estudio de la regulación de la expresión de un gen determinado en monocopia e integrado de manera estable en el cromosoma bacteriano, permite obtener resultados más claros y confiables, ya que evita problemas ocasionados por la dosis génica, tales como titulación de moléculas efectoras o represoras, etc.

Uno de los sistemas genéticos construido y descrito en este trabajo, permite eliminar eficientemente los genes de resistencia a antibióticos utilizados para seleccionar la inserción en el cromosoma bacteriano de modificaciones genéticas específicas. Este sistema comprende dos herramientas: La primera consiste de cuatro vectores que portan los casetes escindibles de resistencia a antibióticos, los cuales se construyeron colocando un sitio *loxP* y sitios de restricción múltiple (MCS) en ambos lados de los genes *cat* (Cm<sup>R</sup>), *ntpII* (Km<sup>R</sup>) y *aacC1* (Gm<sup>R</sup>). Los MCS colocados a ambos lados del gen que codifica la resistencia a antibiótico, sirven para manipular *in vitro* los casetes escindibles y los sitios *loxP*, permiten remover el gen de resistencia por medio de un evento de recombinación sitio-específica (Fig. 1, Pág. 61). La segunda herramienta es el plásmido pJW168, en el cual la expresión regulada del gen *cre*, está bajo control del promotor *P<sub>lacUV5</sub>* (Fig. 2, Pág. 61). Como este vector no puede replicarse a temperaturas superiores a 37°C, una vez que el gen de resistencia se ha escindido de la cepa modificada, el vector se elimina fácilmente por crecimiento del cultivo a temperaturas mayores de 37°C.

Para validar el funcionamiento de nuestro sistema, se construyeron cepas LacZ<sup>-</sup> y GalE<sup>-</sup> por medio de inserciones y sin dejar marcadores de resistencia en el cromosoma. La estrategia utilizada para interrumpir estos genes en *E. coli* W3110T<sup>+</sup> utilizando el

casete de resistencia Cat2 o un sitio *loxP*, se esquematiza en la Fig. 3, Pág. 62. Después de intercambiar los genes silvestres cromosomales por los interrumpidos en plásmido por recombinación homóloga, se eliminaron el marcador de resistencia y el vector pJW168. Así, después de que el casete Cat2 y el plásmido pJW168 han sido eliminados de la cepa modificada, la única pieza del sistema que permanece en los loci *galE* y *lacZ* del genoma bacteriano, es un sitio *loxP* híbrido de 34 pb, el cual es suficiente para interrumpir estos genes (ver Fig. 4, Pág. 63).

El sistema reportado aquí, además de utilizarse con éxito en diferentes cepas de *E. coli*, también se ha empleado para modificar cepas de *Klebsiella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Erwinia*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* y otros microorganismos (datos no mostrados). Si se toma en cuenta lo anterior, además de que las eficiencias de escisión del marcador de resistencia obtenidas fueron cercanas al 90+5% (Tabla 1, Pág. 64) y la eliminación del vector de expresión de Cre fue del 100% (Tabla 2, Pág. 65), el sistema descrito constituye una buena alternativa para modificar el genoma de microorganismos.

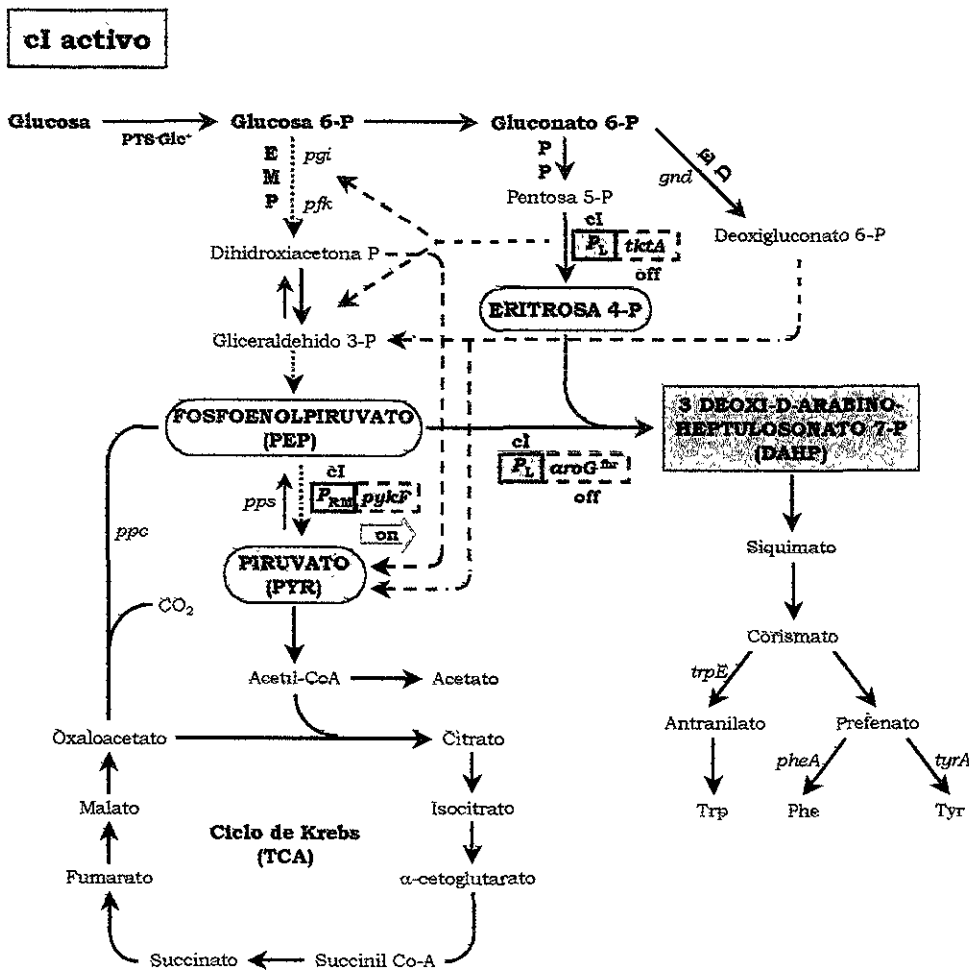
Una posible limitación a la utilización repetida del sistema Cre/*loxP* en la misma cepa, podría ser la acumulación de los sitios *loxP* que permanecen en el genoma modificado después de eliminar el marcador de resistencia, cuando se ha seleccionado la clona que lleva la modificación genética deseada. Esto podría permitir la recombinación entre estos sitios, provocando la delección o inversión de diferentes segmentos del cromosoma, en función de la orientación relativa y la distancia entre los sitios *loxP*. Este inconveniente puede evitarse utilizando medio mínimo para seleccionar las mutantes, ya que en este medio es muy poco probable que una clona pueda sobrevivir después de sufrir un rearrreglo de este tipo.

Otra alternativa para circunscribir la posible limitación en el número de modificaciones que se podrían realizar en una cepa, es la utilización de sitios *loxP* mutantes reportados en la bibliografía, *loxP511*, los cuales no recombinan con los sitios *loxP* silvestres aún en presencia de Cre (Albert *et al.*, 1995; Hoess *et al.*, 1986). Además, y dada la especificidad de cada recombinasa por sus secuencias blanco, una opción interesante sería utilizar dos o más de los sistemas de recombinación sitio-específica conocidos, para obtener varias modificaciones genéticas en la misma cepa (Tabla 1).

En la segunda etapa de este proyecto de doctorado, se construyeron los vectores con los casetes de regulación de la expresión genética, así como el vector de expresión de

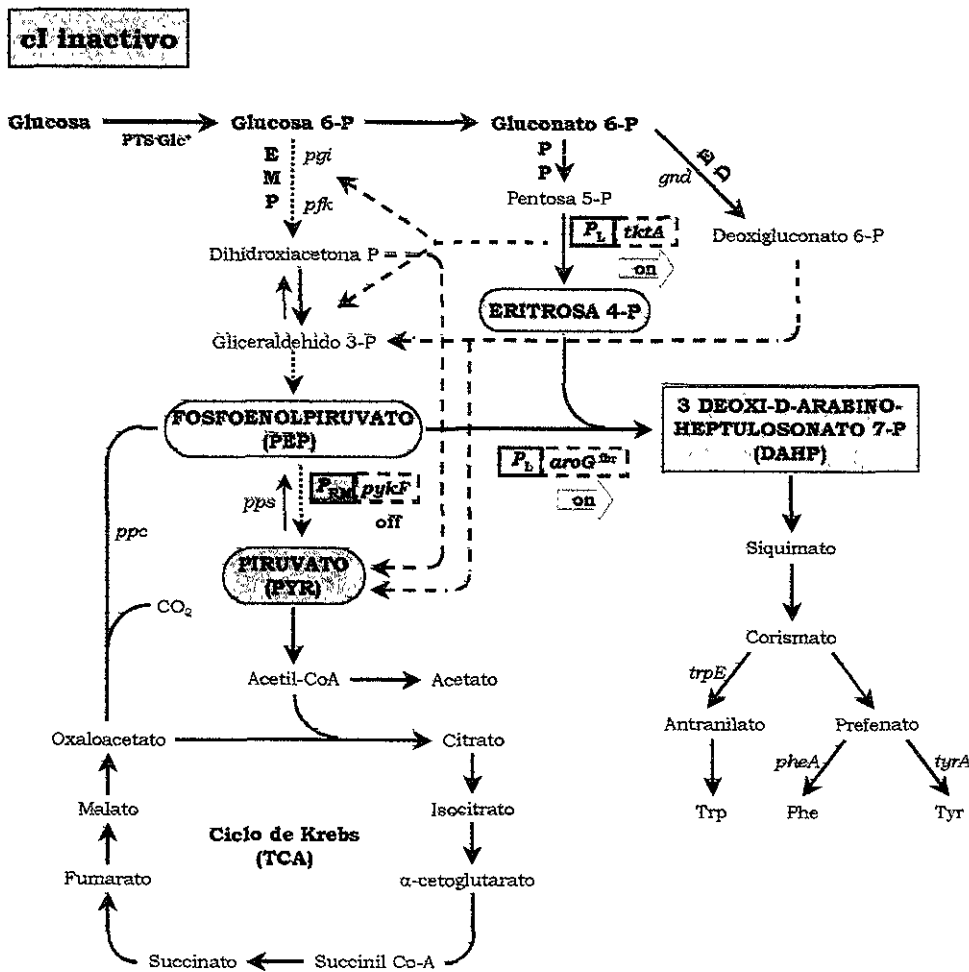
la proteína reguladora *cl*, plásmido pBPSCI (Figs. 14 y 16). El diseño y construcción de estas herramientas moleculares se llevó a cabo con la finalidad de regular de manera simultánea y concertada diferentes genes en el cromosoma bacteriano; básicamente, genes del metabolismo central de *E. coli*, con la finalidad de modificar sus vías metabólicas y redirigirlas hacia la producción de algún compuesto o metabolito de interés. Entre las modificaciones que se requieren realizar para alcanzar el objetivo particular mencionado, está la de obtener la modificación del nodo del fosfoenolpiruvato-piruvato (PEP-PYR) para dirigir los esqueletos de carbono hacia la síntesis de compuestos aromáticos, pero sin comprometer el crecimiento de la bacteria. La utilización de los promotores de lambda,  $P_{RM}$  y  $P_L$ , regulados por la proteína *cl* puede permitir esto. A pesar de que los datos obtenidos de la caracterización preliminar de los casetes de regulación de la expresión genética construidos no fueron los esperados (Tabla 9), no se elimina la posibilidad de utilizarlos para lograr los fines planteados en los objetivos. Como se mencionó en la sección de resultados adicionales, los datos obtenidos además de ser similares a los reportados por Mieschendahl *et al.* (1986), los podemos cambiar modificando la construcción utilizada para expresar a la proteína reguladora *cl*. Para esto y como continuación de este proyecto, se plantea la obtención de un sistema genético que permita regular la expresión del gen *cl* de manera diferente a la utilizada en este trabajo, de tal forma que se tengan concentraciones bajas de este regulador; lo anterior, se puede lograr modificando la fusión génica presente en el plásmido pBPSCI ( $amp^C::P_{trp-cl}$ ). Una opción viable sería disminuir la fuerza del promotor  $P_{trp}$  a través de la modificación de la secuencia de los hexámeros -35 y/o -10 por medio de mutagénesis dirigida y de acuerdo a lo reportado por Moyle *et al.* (1991). Esta estrategia ya ha sido utilizada con éxito en nuestro grupo para obtener promotores derivados del  $P_{trc}$  con diferentes fuerzas (Hernández, 2001). Otra opción, sería modificar el tamaño de la secuencia que separa las secuencias -35 y -10, partiendo de los datos reportados por Dombroski *et al.* (1996), con lo cual también se puede modificar la fuerza del promotor.

Después de realizar las modificaciones necesarias para tener la expresión adecuada de la proteína reguladora *cl*, la estrategia que en un principio puede plantearse es la siguiente: colocar el gen *pykF* o/y *pykA* bajo regulación del promotor  $P_{RM}$  y, los genes *tktA* y *aroG<sup>DB</sup>* que codifican las enzimas involucradas en la síntesis del primer intermediario de la vía de aromáticos (DAHP) bajo regulación del promotor  $P_L$  (ver Figs. 18 y 19).



**Figura 18.** Efecto de la regulación de la proteína *cI* sobre las vías metabólicas de una cepa de *E. coli*, cuando ciertos genes de la vía glicolítica y para síntesis de compuestos aromáticos son puestos bajo la regulación de los promotores  $P_L$  y  $P_{RM}$ .

Bajo este esquema, en presencia de *cI*, la vía glicolítica (EMP) debería estar funcionando para permitir el crecimiento adecuado de *E. coli*, mientras que en ausencia de *cI* esta vía debería estar funcionando al mínimo. Paralelamente, en presencia de *cI* la vía de síntesis de compuestos aromáticos estaría inactiva, mientras que en ausencia de *cI* se activaría fuertemente a través del promotor  $P_L$ , dirigiendo el carbono hacia la síntesis de estos compuestos.



**Figura 19.** Vías metabólicas de una cepa de *E. coli* en ausencia de *cl* y con algunos genes de la vía glicolítica y de la vía de síntesis de aromáticos puestos bajo la regulación de los promotores  $P_L$  y  $P_{RM}$ .

La modificación de genes en cromosoma, así como la inserción cromosomal de genes homólogos y/o heterólogos tanto silvestres como modificados, se ha transformado en una de las estrategias más utilizadas, tanto para realizar estudios genéticos básicos como para el desarrollo de estrategias con fines aplicados. Las estrategias que se han desarrollado son muy diversas, y así, encontramos aquellas que utilizan los sistemas de transposición de algunos transposones como Tn1545 (Peredelchuk and Bennett, 1997); las que utilizan los sistemas de integración del bacteriófago lambda (Peredelchuk and Bennett, 1997; Yu and Court, 1998); y las más recientes y novedosas que en lugar de utilizar plásmidos para introducir a la célula huésped el DNA que se quiere integrar en cromosoma, utilizan PCR para obtener la construcción genética que se quiere integrar en

el cromosoma como DNA lineal, y con el electrotransforman la cepa que se va a modificar (Datsenko and Wanner, 2000; El Karoui *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2000). La utilización de la técnica de PCR en estos sistemas los hace muy interesantes, ya que evita el proceso, a veces largo, de clonación y/o modificación y facilita la obtención de las construcciones genéticas deseadas en un tiempo muy corto. El inconveniente de estos sistemas es que debido a que el DNA lineal es muy susceptible a degradación por la actividad exonucleolítica intracelular presente en cualquier cepa, por lo que esta vía debe ser inactivada para modificar el microorganismo con el producto de PCR que lleva la construcción genética deseada (Yu *et al.*, 2000). Otra alternativa, es incluir sitios Chi en el DNA lineal, ya que éstos bloquean la degradación del DNA y estimulan la recombinación (El Karoui *et al.*, 1999).

Los sistemas disponibles para obtener modificaciones y/o integraciones en el cromosoma bacteriano son numerosos y diversos, por lo que es necesario hacer una evaluación de ellos para seleccionar el más adecuado para obtener la(s) modificación(es) requerida(s), y en algunos casos se pueden utilizar varios sistemas a la vez.

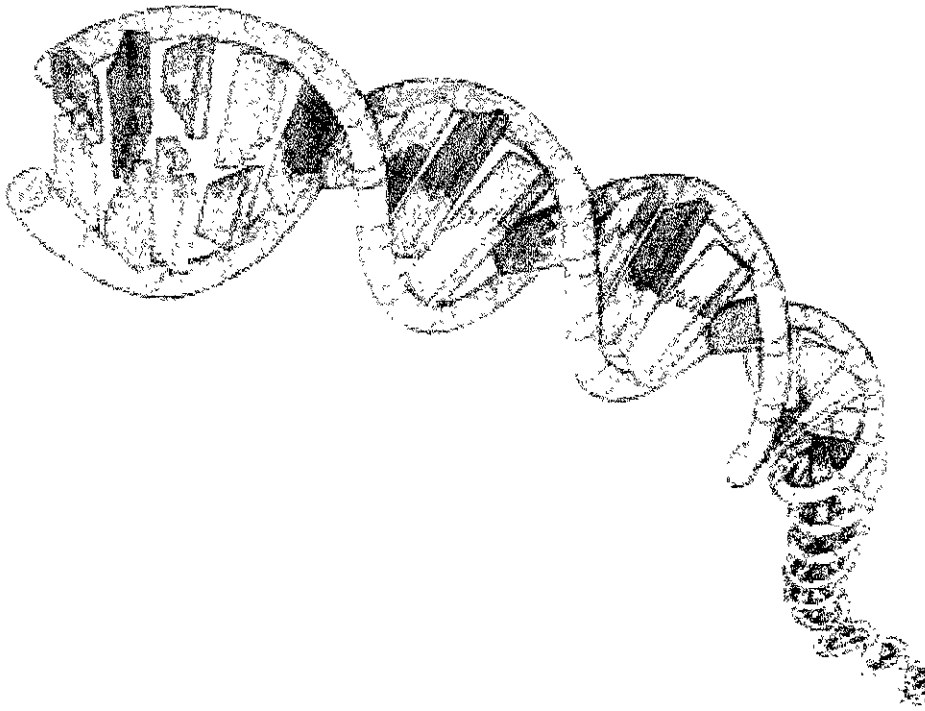
## CONCLUSIONES

La integración de marcadores a nivel del cromosoma de la bacteria y en sitios específicos, es un tipo de evento altamente demandado en las estrategias de modificación de cepas por medio de genética microbiana. De igual forma, también resulta deseable la ausencia de cualquier tipo de plásmidos en los microorganismos utilizados en los procesos de producción. En nuestro laboratorio, hemos diseñado sistemas genéticos orientados a optimizar ciertos procesos fisiológicos microbianos y para ello se han desarrollado herramientas y sistemas genéticos orientados a resolver los problemas señalados como parte de este tema en particular. Como resultado del presente trabajo experimental, podríamos señalar las siguientes conclusiones:

⌘ Las herramientas y el sistema genético que se diseñaron y construyeron en este trabajo, permiten obtener cepas de *E. coli* y otros microorganismos con modificaciones específicas en el cromosoma y sin dejar marcadores de selección, en particular los de resistencia a antibióticos.

- & Debido a que la recombinasa Cre escinde eficientemente el gen de resistencia delimitado por sitios *loxP*, el mismo marcador de resistencia a antibióticos puede ser reutilizado más de una vez en la misma cepa.
- & La reutilización de un mismo marcador para seleccionar varias modificaciones en la misma cepa, expande el uso de genes de resistencia a antibióticos que permiten seleccionar adecuadamente las células modificadas, sobre todo porque los genes que codifican resistencia a antibiótico y que permiten seleccionar adecuadamente las células que los expresan a partir de una copia integrada en cromosoma, no son muchos.
- & Algunos de los sistemas genéticos desarrollados en este trabajo, llevan el origen de replicación del plásmido pSC101, y debido a que la replicación a partir de este origen depende de la proteína RepA funcional, la cual en este caso es termosensible, estos sistemas permiten la obtención de cepas libres de plásmidos después de concluir el proceso de obtención y selección de la modificación genética deseada.
- & Por otro lado, el hecho de poder modificar un microorganismo sin dejar en su genoma marcadores de resistencia a antibióticos utilizados durante el proceso de modificación genética, facilita la aprobación para que dicho microorganismo sea empleado en procesos de producción a escala industrial.
- & La construcción de las nuevas familias de plásmidos para obtener modificaciones genéticas mediante la integración cromosomal *locus* específico, aumentó las ventajas obtenidas con el primer grupo de plásmidos (Balbás *et al.*, 1996). Las nuevas características relevantes en estos vectores son: la presencia del origen de replicación del plásmido pSC101, que debido a que depende de la presencia de la proteína RepA termosensible para replicarse, permite obtener integraciones cromosomales por recombinación homóloga doble sin requerir el uso de cepas especiales; los casetes de resistencia a antibióticos escindibles, eliminan la necesidad de contar con otros marcadores de selección para obtener modificaciones múltiples en una sola cepa, y la eliminación de los genes de resistencia permite





# BIBLIOGRAFÍA

**IX**

- Abremski, K., Hoess, R., Sternberg, N. (1983). Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* 32: 1301-1311
- Albert, H., Dale, E.C., Lee, E., Ow, D.W. (1995). Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant *lox* sites placed in the plant genome. *Plant J.* 7: 649-659
- Alexeyev, M.F., Shokolenko, I.N., 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
- Armstrong, K.A., Acosta, R., Ledner, E., Machida, Y., Pancotto, M., McCormick, M., Ohtsubo, H., Ohtsubo, E. (1984). A 37 x 10<sup>3</sup> molecular weight plasmid-encoded protein is required for replication and copy number control in the plasmid pSC101 and its temperature-sensitive derivative pHS1. *J. Mol. Biol.* 175: 331-347
- Backman, K. (1987). Regulated protein production using site-specific recombination. U.S.A. Patent No. 4,673,640
- Bailey, J.E. (1991). Toward a science of metabolic engineering. *Science* 252: 1668-1675
- Balbás, P., Alvarado, X., Bolívar, F., Valle, F. (1993). Plasmid pBRINT: a vector for chromosomal insertion of cloned DNA. *Gene* 136: 211-213
- Balbás, P., Alexeyev, M., Shokolenko, I., Bolívar, F., Valle, F. (1996). A pBRINT family of plasmids for integration of cloned DNA into the *Escherichia coli* chromosome. *Gene* 172: 65-69
- Balbás, P., de Anda, R., Flores, N., Alvarado, X., Cruz, N., Valle, F., Bolívar, F. (1988). Overproduction of protein by recombinant DNA: Human insulin. In: *Cell function and disease*. Cañedo, L.E., Todd, L.E., Packer, L., and Jaz, J. (eds.). Plenum Press, New York and London, pp. 59-74
- Bogosian, G., Kane, J.F., Obukowicz, M.G., Olins, P.O. (1990). Optimizing protein production in recombinant strains of *Escherichia coli*. In: *Recombinant DNA technology and applications*. Prokop, A., Bajpai, R., and Ho, C.S. (eds.). McGraw-Hill, Inc. New York and London, pp. 285-315
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles, II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-113
- Buchholz, F., Angrand, P.O., Stewart, A.F. (1996). A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucl. Acids Res.* 24: 3118-3119
- Brecht, S., Erdhart, H., Soete, M., Soldati, D. (1999). Genome engineering of *Toxoplasma gondii* using the site-specific recombinase Cre. *Gene* 234: 239-247

- Casadaban, M.J., Chou, J., Cohen, S.N. (1980). *In vitro* gene fusions that join an enzymatically active  $\beta$ -galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: *Escherichia coli* plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. *J. Bacteriol.* 143: 971-980
- Castaño, I., Flores, N., Valle, F., Covarrubias, A., Bolívar, F. (1992). *gltF* a member of the *gltBDF* operon of *Escherichia coli* is involved in nitrogen regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* 6: 2733-2741
- Cohen, S.N., Chang, A.C., Boyer, H.W., Helling, R.B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3240-3244
- Colwell, R.R. (1991). Risk assessment in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2: 470-475
- Craig, N.L. (1988). The mechanism of conservative site-specific recombination. *Annu. Rev. Genet.* 22: 77-105
- Chang, C.N., Rey, M., Bochner, B., Heyneker, H., Gray, G. (1987). High-level secretion of human growth hormone by *Escherichia coli*. *Gene* 55: 189-196
- Chen, H.Y., Bjercknes, M., Kumar, R., Jay, E. (1994) Determination of the optimal aligned spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the translation initiation codón of *Escherichia coli* mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 22: 4953-4957
- Cherepanov, P.P., Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc<sup>R</sup> and Km<sup>R</sup> cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158: 9-14
- Dale, E.C., Ow, D.W. (1990). Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene* 91: 79-85
- Datsenko, K.A., Wanner B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 6640-6645
- De Antoni, A., Gallwitz, D. (2000). A novel multi-purpose cassette for repeated integrative epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 246: 179-185
- de Boer, H.A., Comstock, L.J., Vasser, M. (1983). The *tac* promoter: A functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 21-25
- de Boer, H.A., Comstock, L.J., Yansura, D.G., Heynecker, H.L. (1985). Construction of a tandem *trp-lac* promoter and a hybrid *trp-lac* promoter for efficient and controlled expression of the human growth hormone gene in *Escherichia coli*. In: Promoter structure and function. Rodriguez, R.L., and Chamberlain, M.J. (eds.). Praeger Publishers, New York, pp. 462-481
- De Lorenzo, V. (1992). Genetic engineering strategies for environmental applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3: 227-231

- De Lorenzo, V., Timmis, K.N. (1994). Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* 235: 386-405
- Denome, S.A., Elf, P.K., Henderson, T.A., Nelson, D.E., Young, K.D. (1999). *Escherichia coli* mutants lacking all possible combinations of eight penicillin binding proteins: viability, characteristics, and implications for peptidoglycan synthesis. *J. Bacteriol.* 181: 3981-3993
- Diedrich, L., Ramunssen, L.J., Messer, W. (1992). New cloning vectors for integration into the  $\lambda$  attachment site *attB* of the *Escherichia coli* chromosome. *Plasmid* 28: 14-24
- Dombroski, A., Johnson, B.D., Lonetto, M., Gross, C.A. (1996). The sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase senses promoter spacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8858-8862
- Draths, J.M., Pompilano, D.L., Conley, D.L., Frost, J.W., Berry, A., Disbrow, G.L., Staversky, R.J., Lievense, J.C. (1992). Biocatalyst synthesis of aromatic from D-glucose: The role of transketolase. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 3956-3962
- Ehretsmann C.P., Carpousis, A.J., Krisch, H.M. (1992). mRNA degradation in procaryotes *FASEB J.* 6: 3186-3192
- El Raroui, M., Amundsen, S.K., Dabert, P., Gruss, A. (1999). Gene replacement with linear DNA in electroporated wild-type *Echerichia coli*. *Nucl. Acids Res.* 27: 1296-1299
- Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolívar, F., Valle, F. (1996). Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnol.* 14: 620-623
- Fuqua, W.C. (1992). An improved chloramphenicol resistance gene cassette for site-directed marker replacement mutagenesis. *BioTechniques* 12: 223-225
- Giroux, C.N. (1988). Chromosome synapsis and meiotic recombination. In: *Genetic Recombination*. Kucherlapati, R., and Smith, G.R. (eds.). American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 465-496
- Gold, L. (1990). Expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 185: 11-14
- Gómez, A., Rodríguez, M., Ospina, S., Merino, E., Bolívar, F., Ramírez, O.T., Quintero, R., López-Munguía, A. (1994). Strategies in the design of a penicillin acylase production process. In: *Advances in bioprocess engineering*. Galindo, E., and Ramírez, O.T. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Holland, pp. 29-40
- Gosset, G., Yong-Xiao, J., Berry, A. (1996). A Direct Comparison of Approaches for Increasing Carbon Flow to Aromatic Biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.* 17: 47-52

- Gussin, G.N., Johnson, A.D., Pabo, C.O., Sauer, R.T. (1983). Repressor and Cro protein: structure, function and role in lysogenization. In: Lambda II. Hendrix, R.W., Roberts, J.W., Stahal, F.W., and Weisberg, R.A. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp. 93-121
- Hamilton, C.M., Aldea, M., Washburn, D.K., Babitzke, P., Kushner, S.R. (1989). New method for generation deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 171: 4617-4622
- Hasan, N., Koob, M., Szybalski, W. (1994). *Escherichia coli* genome targeting, I. Cre-lox-mediated *in vitro* generation of *ori* plasmids and their *in vivo* chromosomal integration and retrieval. Gene 150: 51-56
- Hashimoto-Gotoh, T., Sekiguchi, M. (1977). Mutations to temperature sensitivity in R plasmid pSC101. J. Bacteriol. 131: 405-412
- Hawley, R.S. (1988). Exchange and chromosomal segregation in eucaryotes. In: Genetic Recombination. Kucherlapati R., and Smith, G.R. (eds.). American Society for Microbiology. Washington, D.C., U.S.A., pp. 497-528
- Hernández-Montalvo, V. Caracterización y manipulación del transporte de azúcares en cepas de *Escherichia coli* deficientes del sistema de la fosfotransferasa (PTS). (2001). Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M. Cuernavaca, Mor. México.
- Herrero, M., De Lorenzo, V., Timmis, K.N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 172: 6568-6567
- Higgins, N.P., Yang, X., Fu, Q., Roth, J.R. (1996). Surveying a supercoil domain by using the  $\gamma\delta$  resolution system in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 178: 2825-2835
- Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J., Schweizer, H.P. (1998). A broad-host-range FLP-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. Gene 212: 77-86
- Hoess, R.H., Ziese, M., Sternberg, N. (1982). P1 site-specific recombination: Nucleotide sequence of the recombining sites. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 3398-3402
- Hoess, R.H., Wierzbicki, A., Abremski, K. (1986). The role of the *loxP* spacer region in P1 site-specific recombination. Nucl. Acids Res. 14: 2287-2300
- Holms, W. (1986). The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationships between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass and excretion of acetate. In: Current Topics in Cellular Regulation. Horecker, B.L., and Stadman, E.R. (eds.). Academic Press, New York, U.S.A., pp 69-105
- Hüttenhofer, A., Noller, H.F. (1994). Footprinting mRNA-ribosome complexes with chemical probes. EMBO J. 13: 3892- 3901

- Huse, W., Sorge, J.A., Short, J.M. (1994). DNA cloning vector with *in vivo* excisable plasmids. U.S.A. Patent No. 5,286,636
- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, D., Heyneker, H.L., Bolivar, F., Boyer, H.W. (1977). Expression in *Escherichia coli* of the chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* 198: 1056-1063
- Jensen, K.F. (1993). The *Escherichia coli* K12 "wild types" W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels. *J. Bacteriol.* 175: 3401-3407
- Kaniga, K., Delor, I., Cornelis, G.R. (1991). A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 109: 137-141
- Kilby, N.J., Snaith, M.R., Murray, J.A.H. (1993). Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet.* 9: 413-421
- Kornberg, A., Baker, T.A. (1992). Plasmids and organelles: R6K. In: DNA Replication. W.H. Freeman and Company, New York, U.S.A., pp. 655-658
- Kristensen, C.S., Eberl, L., Sanchez-Romero, J.M., Givskov, M., Molin, S., De Lorenzo, V. (1995). Site-specific deletions of chromosomally located DNA segments with the multimer resolution system of broad-host-range plasmid RP4. *J. Bacteriol.* 177: 52-58
- Lander, E.S. *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921
- LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F., McCoy, J.M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology* 11: 187-93
- LaVallie, E.R., Lu, Z., Diblasio-Smith, E.A., Collins-Racie, L.A., McCoy, J.M. (2000). Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 326: 322-340
- Le Borgne, S., Palmeros, B., Valle, F., Bolívar, F., Gosset, G. (1998). pBRINT-Ts: a plasmid family with a temperature-sensitive replicon, designed for chromosomal integration into the *lacZ* gene of *Escherichia coli*. *Gene* 223: 213-219
- Le Borgne, S., Palmeros, B., Bolivar, F., Gosset, G. (2001). Improvement of the pBRINT-Ts plasmid family to obtain marker-free chromosomal insertion of cloned DNA in *E. coli*. *BioTechniques* 30: 252-256
- Lloyd R., Low, K.B. (1996). Homologous recombination. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology. 2d. Edition. Neidhardt, F.C., Curtis III, R., Ingram, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., and Umberger, H.E. (eds.). American Society of Microbiology Press, Washington D.C., U.S.A., pp. 2236-2255

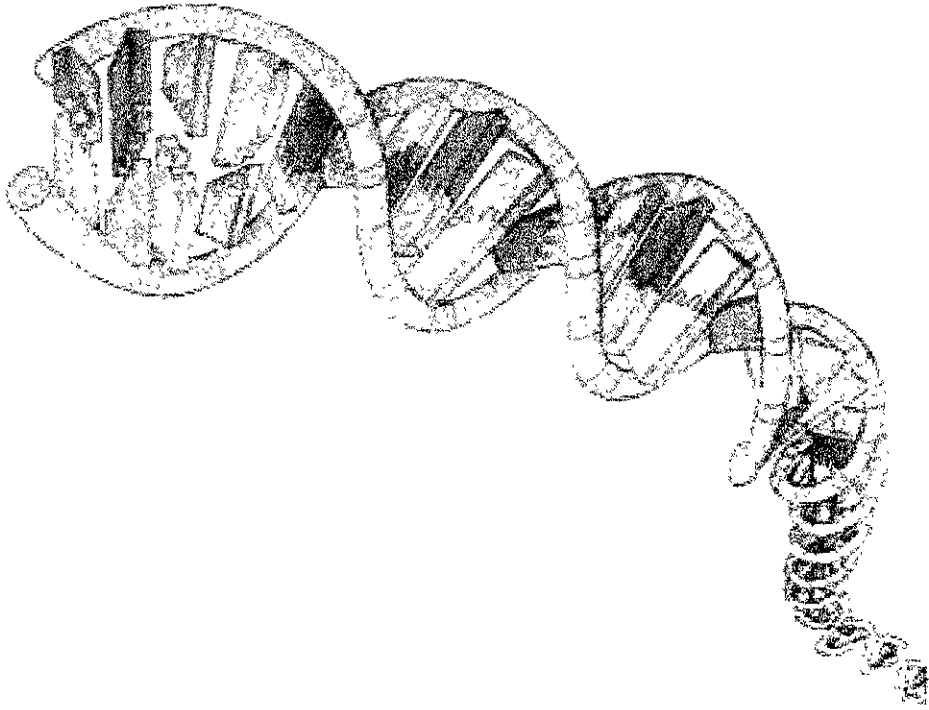
- Mahajan, S.K. (1988). Pathways of homologous recombination in *Escherichia coli*. In: Genetic Recombination. Kucherlapati R., and Smith, G.R. (eds.). American Society for Microbiology. Washington, D.C., U.S.A., pp. 87-140
- Makrides, S.C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 60: 512-538
- Medberry, S.L., Dale, E., Qin, M., Ow, D.W. (1995). Intra-chromosomal rearrangements generated by Cre-lox site-specific recombination. *Nuc. Acids Res.* 23: 485-490
- Merino, E., Balbás, P., Recillas, F., Becerril, B., Valle, F., Bolívar, F. (1992). Carbon regulation and the role in nature of the *E. coli* penicillin acylase (*pac*) gene. *Mol. Microbiol.* 6: 2175-2182
- Metzger, D., Feil, R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 470-476
- Mieschendahl, M., Petri, T., Hänggi, U. (1986). A novel prophage independent trp regulated lambda  $P_L$  expression system. *BioTechnology* 4: 802-807
- Mikkelsen, T.R., Andersen, B., Jorgensen, R.B. (1996). The risk of crop transgene spread. *Nature* 380: 31
- Miller, V.L., Mekalanos, J.J. (1988). A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: Osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* 170: 2575-2583
- Miller, J.H. (1992). A short course in bacterial genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Plainview, New York, U.S.A., pp.72-74
- Minas, W., Bailey, J.E. (1995). Co-overexpression of *prfF* increases cell viability and enzyme yields in recombinant *Escherichia coli* expressing *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -amylase. *Biotechnol. Prog.* 11: 403-411
- Miyake, T., Oka, T., Nishizawa, T., Misoka, F., Fuwa, T., Yoda, K., Yamasaki, M., Tamura, M. (1985). Secretion of human interferon  $\alpha$  induced by using secretion vectors containing a promoter and signal sequence of alkaline phosphatase gene of *E. coli*. *J. Biochem.* 97: 1424-1436
- Moyle, H., Waldburger, C., Susskind, M.M. (1991). Hierarchies of base pair preferences in the P22 *ant* promoter. *J. Bacteriol.* 173: 1944-1950
- Murphy, K.C. (1998). Use of bacteriophage  $\lambda$  recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180: 2063-2071
- Murphy, K.C., Campellone, K.G., Poteete, A.R. (2000). PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli*. *Gene* 246: 321-330

- Nash, H.A. (1996). Site-specific recombination: integration, excision, resolution and inversion of defined DNA segments. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology. 2d. Edition. Neidhardt, F.C., Curtis III, R., Ingram, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magazine, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., and Umbarger, H.E. (eds.). American Society of Microbiology Press, Washington D.C., U.S.A., pp. 2363-2376
- Neidhardt, F.C. (1987). Multigene systems and regulons. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Neidhardt, F.C., Ingram, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M., and Umbarger, H.E. (eds.). American Society of Microbiology Press, Washington D.C., U.S.A., pp. 1313-1327
- O'Gorman, S., Fox, D.T., Wahl, G.M. (1991). Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* 251: 1351-1355
- Oliver G., Balbás, P., Valle, F., Soberón, X., Bolívar, F. (1985). Clonación de un cDNA de interferón leucocitario humano y su estrategia de producción en *Escherichia coli*. *Rev. Lat. Microbiol.* 27: 141-150
- Olmos, J., Zamudio, M., Gosset, G., Balbás, P., Valle, F., Bolívar, F. (1994). Production in *Escherichia coli* of a rat chimeric proinsulin polypeptide carrying human A and B chains and its preparative chromatography. *J. Biotechnol.* 38: 89-96
- Palmeros, B., Wild, J., Szybalski, W., Le Borgne, S., Hernández-Chávez, G., Gosset, G., Valle, F., Bolívar, F. (2000). A family of removable cassettes designed to obtain antibiotic-resistance-free genomic modifications of *Escherichia coli* and other bacteria. *Gene* 247: 255-264
- Peredelchuk, M.Y., Bennett, G.N. (1997). A method for construction of *E. coli* strains with multiple DNA insertions in the chromosome. *Gene* 187: 231-238
- Ponce, E., Flores, N., Martínez, A., Valle, F., Bolívar, F. (1995). Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis. *J. Bacteriol.* 177: 5719-5722
- Ponce, E. Papel fisiológico de las isoenzimas piruvato cinasa de *Escherichia coli* en el metabolismo celular. 1996. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M. Cuernavaca, Mor. México. 62 pp.
- Poole, E.S., Brown, C.M., Tate, W.P. (1995). The identity of the base following the stop codón determines the efficiency of in vivo translational termination in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 14: 151-158
- Pósfai, G., Koob, M., Hradecná, Z., Hasan, N., Filutowicz, M., Szybalski, W. (1994). *In vivo* excision and amplification of large segments of the *Escherichia coli* genome. *Nucl. Acids Res.* 22: 2392-2398
- Ptashne, M. (1992). A genetic switch: Phage  $\lambda$  and higher organisms. Cell Press and Blackwell Scientific Publications, New York, U.S.A. Second edition, 192 pp



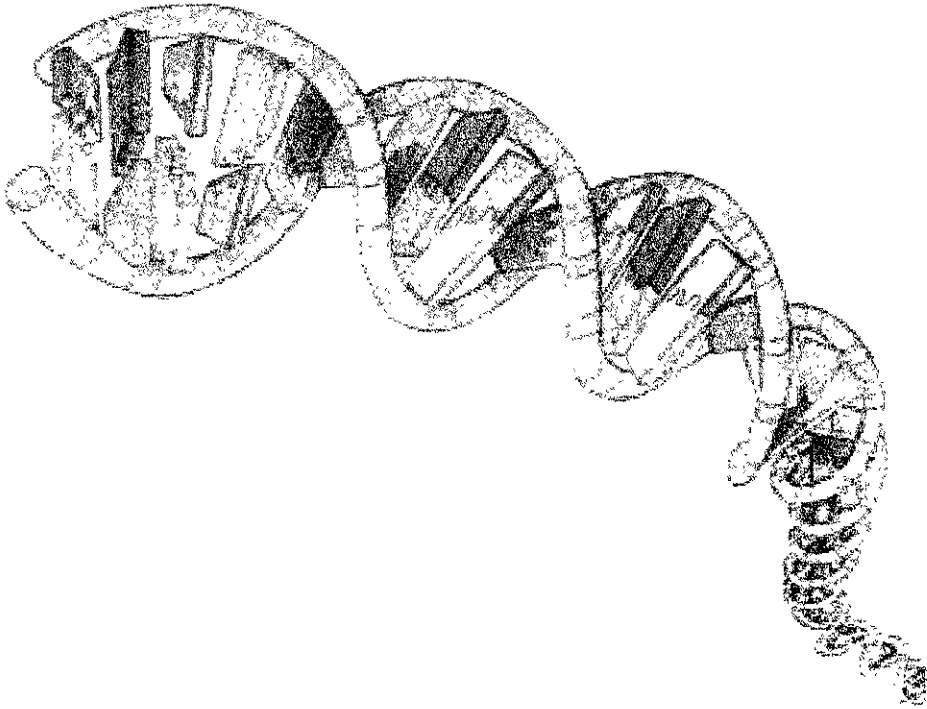
- Radman, M. (1988). Mismatch repair and genetic recombination. In: Genetic Recombination. Kucherlapati R., and Smith, G.R. (eds.). American Society for Microbiology. Washington, D.C., U.S.A., pp. 169-192
- Resnik, E., LaPorte, D.C. (1991). Introduction of single copy sequences into the chromosome of *Escherichia coli*: application to gene and operon fusions. *Gene* 107: 19-25
- Reznikoff, W.S., Abelson J.N. (1980). The *lac* promoter. In: The operon. Miller, J.H., and Reznikoff, W.S. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A., pp. 221-243
- Roberts, J., Devoret, R. (1983). Lysogenic induction. In: Lambda II. Hendrix, R.W., Roberts, J.W., Stahal, F.W., and Weisberg, R.A. (eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A., pp. 123-144
- Roberts, L., Davenport, R.J., Pennisi, E., Marshall, E. (2001). A History of the Human Genome Project. *Science* 291: 1195-1199
- Rodríguez, R.L., Tait, R.C. (1983). Recombinant DNA Techniques: An introduction. Addison-Wesley Publishing Company. Advanced Book Program Reading, Massachusetts, U.S.A., 236 pp
- Rodríguez, R.L., Denhardt, D.T. (eds.). (1988) Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses. Butterworths, Boston, U.S.A., 578 pp.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., U.S.A.
- Sauer, B. (1987). Functional expression of the *cre-lox* site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 7: 2087-2096
- Sauer, B., Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 5166-5170
- Sauer, B., Henderson, N. (1989). Cre-stimulated recombination at *loxP*-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. *Nucl. Acids Res.* 17: 147-161
- Sauer, B. (1994a). Recycling selectable markers in yeast. *BioTechniques* 16: 1086-1088
- Sauer, B. (1994b). Site-specific recombination: developments and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5: 521-527
- Schauder, B., McCarthy, J.E.G. (1989). The role of bases upstream of the Shine-Dalgarno region and in the coding sequence in the control of gene expression in *Escherichia coli*: translation and stability of mRNAs in vivo. *Gene* 78: 59-72
- Schmidt, E.E., Taylor, D.S., Prigge, J.R., Barnett, S., Capecchi, M.R. (2000). Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 13702-13707

- Seo, J., Bailey, J.E. (1985). Effect of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 1668-1674
- Sharma, R.C., Schimke, R.T. (1996). Preparation of electro-competent *E. coli* using salt-free growth medium. *BioTechniques* 20: 42-44
- Shen, P., Huang, H.V. (1986). Homologous recombination in *E. coli*: dependence on substrate length and homology. *Genetics* 112: 441-457
- Snaith, M.R., Murray, J.A.H., Boulter, C.A. (1995). Multiple cloning sites carrying *loxP* and *FRT* recognition sites for the Cre and Flp site-specific recombinases. *Gene* 166: 173-174
- Stephanopoulos, G., Vallino, J.J. (1991). Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science* 252: 1675-81
- Sternberg, N., Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination, I. Recombination between *loxP* sites. *J. Mol. Biol.* 150: 467-486
- Storici, F., Coglievina, M., Bruschi, C.V. (1999). A 2- $\mu$ m DNA-based marker recycling system for multiple gene disruption in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 271-283
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185: 60-89
- Ueki, T., Inouye, S., Inouye, M. (1996). Positive-negative KG cassettes for construction of multi-gene deletions using a single drug marker. *Gene* 183: 153-157
- Valle, F., Muñoz, E., Ponce, E., Flores, N., Bolívar, F. (1996). Basic and applied aspects of metabolic diversity: the phosphoenolpyruvate node. *J. Ind. Microbiol.* 17: 458-462
- Venter J.C. *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351
- Watson, J.D., Crick, F.H.C. (1953). Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737-738
- Wild, J., Sektas, M., Hradecná, Z., Szybalski, W. (1998). Targeting and retrofitting pre-existing libraries of transposon insertions with *FRT* and *oriV* elements for in-vivo generation of large quantities of any genomic fragment. *Gene* 223: 55-66
- Wilson, K. (1987). Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Seidman, J.G., and Struhl, K. (eds.). *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publ. and Wiley-Interscience, New York, U.S.A. pp. 2.4.1-2.4.5
- Wilson, K.S., von Hippel, P.H. (1995). Transcription termination at intrinsic terminators: the role of the RNA hairpin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 8793-8797



# ANEXOS

**X**



# ABREVIATURAS

X-A

# ABREVIATURAS

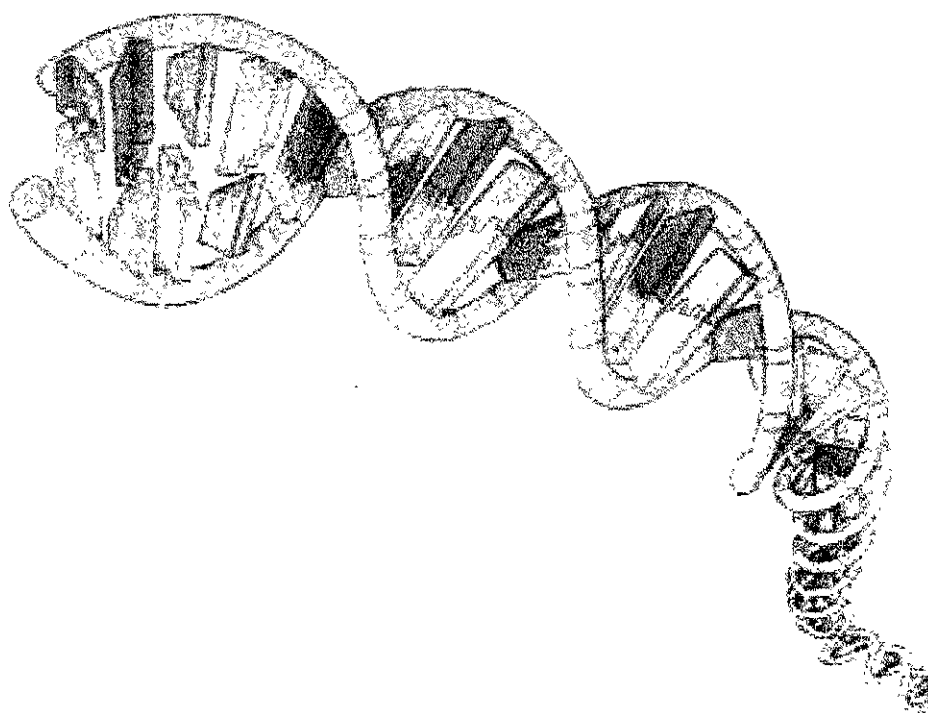
<i>aacC1</i>	gen que codifica para la enzima gentamicina acetil-transferasa (Gm <sup>R</sup> )
Anb	antibiótico(s)
Ap	ampicilina
β-Gal	enzima β-galactosidasa
<i>bla</i>	gen que codifica la enzima β-lactamasa (Ap <sup>R</sup> )
cAMP	AMP-cíclico
CRP (CAP)	proteína receptora de cAMP (proteína activadora de catabolitos), actúa como regulador positivo cuando se activa por AMP cíclico.
<i>cat</i>	gen que codifica la enzima cloranfenicol acetil-transferasa (Cm <sup>R</sup> )
Cm	cloranfenicol
<i>cre</i>	gen que codifica la proteína Cre
Cre	recombinasa sitio específica del bacteriófago P1
DAHP	3-desoxi-D-arabino-heptuloseonato 7-fosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNA-pol	enzima DNA-polimerasa
dNTPs	desoxi-nucleótidos trifosfato
D.O. <sub>xnm</sub>	densidad óptica determinada a una longitud de onda específica (x)
Δ	eliminación de un fragmento del cromosoma bacteriano o de algún gen determinado
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
E4F	eritrosa-4-fosfato
ED	vía metabólica de Entner-Doudoroff
EMP	vía metabólica de Embden-Meyerhof-Parnas
F	replicones de bajo número de copias que son auto-transmisibles por medio de conjugación. Entre ellos, los más importantes son los que llevan porciones del cromosoma de <i>E. coli</i> , como el F' que porta el operón <i>lac</i> y los genes <i>proAB</i>
g	gramos

<i>galE</i>	gen que codifica la enzima UDP-galactosa epimerasa o GalE, la cual participa en el metabolismo de galactosa
Gm	gentamicina
IAA	ácido indol-3-acrílico
I/R-M	medio mínimo formulado para condiciones de inducción, y utilizado para los estudios de la expresión genética a partir de los promotores $P_L/P_{RM}$ del bacteriófago lambda
INV	inversión del fragmento del cromosoma comprendido entre los genes especificados para cada caso v.gr. INV( <i>rnnD-rnnE</i> )
IPTG	isopropil $\beta$ -D-tiogalactopiranosido, inductor gratuito de la expresión del operón de lactosa
kb	kilo-base o 1,000 pares de bases
Km	kanamicina
$\lambda$	bacteriófago lambda
<i>lacI<sup>q</sup></i>	gen que codifica la proteína represora del operón de lactosa. El promotor de este gen lleva una mutación puntual en la caja -35 que cambia en la posición 5 una C por una T; este cambio provoca un incremento en la expresión a partir de este promotor y que se traduce en aproximadamente 10 veces más concentración del represor.
<i>lacZ</i>	gen que codifica la enzima $\beta$ -Gal, la cual está involucrada en el metabolismo de lactosa
LB	medio de cultivo Luria-Bertani
<i>loxP</i>	secuencia de 34 pb donde se lleva a cabo la recombinación sitio específica mediada por la recombinasa Cre del fago P1
MCS	sitio de clonación múltiple
mRNA	RNA mensajero
MM	medio mínimo
<i>mob</i>	fragmento de aprox. 1700 pb que contiene la región <i>oriT</i> del plásmido RP4. Esta región permite movilizar por conjugación cualquier plásmido que contenga este fragmento
NADPH	dinucleótido-fosfato reducido de nicotin-adenina
Nal	ácido nalidixico
Neo	neomicina

NTP	nucleótidos trifosfato
<i>ntpII</i>	gen que codifica la enzima aminoglicósido 3-fosfotransferasa ( $Km^R$ )
ONPG	ortonitrofenil-b-D-galactósido, sustrato cromogénico para la enzima $\beta$ -galactosidasa (
<i>ori</i>	origen(es) de replicación del DNA
<i>ori<sub>γR6K</sub></i>	origen gama de replicación condicionada del plásmido R6K
<i>oriT</i>	origen de transferencia del replicón RP4
p	plásmido
P	promotor
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEP	fosfoenolpiruvato
<i>pir</i>	gen que codifica la proteína pi ( $\pi$ ), la cual es necesaria para la replicación de los plásmidos con el origen de replicación gama del replicón R6K
<i>P<sub>lacUV5</sub></i>	promotor <i>lac</i> con la mutación <i>UV5</i> , que consiste en el cambio de TAs por ATs en la caja -10; estos cambios incrementan la fuerza de este promotor, debido a que favorecen la interacción independiente de CRP-cAMP de la RNA-polimerasa con este promotor.
PP	vía metabólica de las pentosas fosfato
Ppc	enzima fosfoenol-piruvato carboxilasa
Pps	enzima fosfoenol-piruvato sintasa
PTS	sistema de la fosfotransferasa
PykA	isoenzima piruvato cinasa A (tipo II)
PykF	isoenzima piruvato cinasa F (tipo I)
PYR	piruvato
R	resistencia
R6K	replicón silvestre de <i>E. coli</i> que confiere resistencia a estreptomicina y ampicilina
RBS	sitio de unión a ribosoma
Rif	rifampicina

R/I-M	medio mínimo formulado para condiciones de Represión, y utilizado en los estudios de la expresión genética a partir de los promotores $P_L/P_{RM}$ del bacteriófago lambda
RP4	replicón silvestre de <i>E. coli</i>
s	sensibilidad
sacBR	genes de <i>Bacillus stearothermophilus</i> que le confieren sensibilidad a sacarosa a cualquier cepa Gram-negativa que los porte
SD	secuencia Shine-Dalgarno, es parte o toda la secuencia de polipurinas 5'AGGAGG3' localizada en el RNA-mensajero hacia arriba del codón de inicio y es complementaria a la secuencia en el extremo 3' del RNA-ribosomal 16S
Sm	estreptomicina
T4Pol	DNA-polimerasa del fago T4
TCA	ciclo de los ácidos tricarbóxicos
Tet	tetraciclina
Tm	temperatura media de alineamiento o temperatura a la cual al menos la mitad de las moléculas de DNA complementarias, se encuentran apareadas.
Tn	transposón
Tp	trimetropín
w.t.	forma silvestre
XGal	5-bromo-4-cloro-3-indolil $\beta$ -D-galactopiranosido, sustrato cromogénico para la enzima $\beta$ -galactosidasa
Zeo	Zeocina
::	inserción o fusión de una construcción genética en un locus determinado
'	símbolo para denotar la interrupción de un gen en el lado especificado





**REGISTROS DE LA SECUENCIA  
NUCLEOTÍDICA DE LOS  
PLÁSMIDOS EN EMBL-NSDB**

**X-B**

# FAMILIA DE PLÁSMIDOS PLOX1-RANB<sup>R</sup>

DS43178

# EMBL

## European Bioinformatics Institute

Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire • European Molecular Biology Laboratory • Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie

Ref:DS43178/111309

06-JUN-00

BEATRIZ PALMEROS  
Instituto de Biotecnología, U.N.A.M.  
Microbiología Molecular  
Av. Universidad 2001, Colonia Chamilpa

Cuernavaca, 62210. Morelos  
MEXICO

Dear Colleague,

Thank you for your direct submission to the Nucleotide Sequence Database. Please find attached, a copy of the database entry made from the data which you submitted.

We ask that you check the entry carefully and report any errors using our WWW update form, URL: <http://www3.ebi.ac.uk/Services/webin/update/update.html>

If you do not have access to the WWW please e-mail our database staff to request an update form, [update@ebi.ac.uk](mailto:update@ebi.ac.uk). We do not accept updates sent by disk or surface mail.

If this data is to be published, it is important that you contact us with complete citation information at the time of publication, as this is the only way that we can guarantee timely reflection of the publication status in your entry.

Yours sincerely

EMBL Nucleotide Sequence Database

### Accession No(s):

AJ401047 AVE401047 is not confidential  
AJ401048 AVE401048 is not confidential  
AJ401049 AVE401049 is not confidential  
AJ401050 AVE401050 is not confidential

EMBL, Outstation EBI  
Hinxton Hall, Hinxton  
Cambridge CB10 1SD, UK  
Telephone +44 (0) 1223 494499  
Telefax +44 (0) 1223 494472

Network addresses  
data submissions:  
general enquiries:

[datasubs@ebi.ac.uk](mailto:datasubs@ebi.ac.uk)  
[datadb@ebi.ac.uk](mailto:datadb@ebi.ac.uk)

# FAMILIA DE PLÁSMIDOS pBPS-RANB<sup>R</sup>

DS43065

## EMBL European Bioinformatics Institute

Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire • European Molecular Biology Laboratory • Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie

Ref:DS43065/111594

14-JUN-00

BEATRIZ PALMEROS  
Instituto de Biotecnología, U.N.A.M.  
Microbiología Molecular  
Av. Universidad 2001  
Colonia Chamilpa  
Cuernavaca, 62210. Morelos  
MEXICO

Dear Colleague,

Thank you for your submission to the Nucleotide Sequence Database. Enclosed is a copy of each of your entries as listed below.

Please check the entry(ies) carefully and report any errors using our WWW update form, URL: <http://www3.ebi.ac.uk/Services/webin/update/update.html>

If you do not have access to the WWW please e-mail our database staff to request an update form, [update@ebi.ac.uk](mailto:update@ebi.ac.uk). We do not accept updates sent by disk or surface mail.

Please note that the status of the entry(ies) is confidential. If it is now appropriate to release the data to the research community, please contact us and we will make it available immediately. It is your responsibility to provide the database with the complete citation details as soon as they become available.

Yours sincerely

EMBL Nucleotide Sequence Database

### Accession No(s):

AJ403982 CVE403982 is confidential until 25-OCT-2000

AJ403983 CVE403983 is confidential until 25-OCT-2000

AJ403984 CVE403984 is confidential until 25-OCT-2000

EMBL, Outstation EBI  
Hinxton Hall, Hinxton  
Cambridge CB10 1SD, UK  
Telephone +44 (0) 1223 494489  
Telefax +44 (0) 1223 494472

Network addresses  
data submissions:  
general enquiries:

[datasubs@ebi.ac.uk](mailto:datasubs@ebi.ac.uk)  
[datalib@ebi.ac.uk](mailto:datalib@ebi.ac.uk)

# FAMILIA DE PLÁSMIDOS pBRINTs-RANB<sup>R</sup>

DS43084

## EMBL European Bioinformatics Institute

Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire • European Molecular Biology Laboratory • Europa-Mechanisches Laboratorium für Molekularbiologie

Ref:DS43084/111186

05-JUN-00

BEATRIZ PALMEROS  
Instituto de Biotecnología, U.N.A.M.  
Microbiología Molecular  
Av. Universidad 2001, Colonia Chamilpa  
Cuernavaca  
62210 Morelos  
MEXICO

Dear Colleague,

Thank you for your submission to the Nucleotide Sequence Database. Enclosed is a copy of each of your entries as listed below.

Please check the entry(ies) carefully and report any errors using our WWW update form, URL: <http://www3.ebi.ac.uk/Services/webin/update/update.html>

If you do not have access to the WWW please e-mail our database staff to request an update form, [updates@ebi.ac.uk](mailto:updates@ebi.ac.uk). We do not accept updates sent by disk or surface mail.

Please note that the status of the entry(ies) is confidential. If it is now appropriate to release the data to the research community, please contact us and we will make it available immediately. It is your responsibility to provide the database with the complete citation details as soon as they become available.

Yours sincerely

EMBL Nucleotide Sequence Database

### Accession No(s):

AJ278278 CVE278278 is confidential until 25-OCT-2000

AJ278279 CVE278279 is confidential until 25-OCT-2000

AJ278280 CVE278280 is confidential until 25-OCT-2000

EMBL, Outstation EBI  
Hinxton Hall, Hinxton  
Cambridge CB10 1SD, UK  
Telephone +44 (0) 1223 494409  
Telefax +44 (0) 1223 494472

Network addresses  
data submissions:  
general enquiries:

[datasubs@ebi.ac.uk](mailto:datasubs@ebi.ac.uk)  
[details@ebi.ac.uk](mailto:details@ebi.ac.uk)

# FAMILIA DE PLÁSMIDOS pBRINT-TsANB<sup>R</sup>

DS43085

# EMBL

## European Bioinformatics Institute

Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire - European Molecular Biology Laboratory - Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie

Ref:DS43085/111187

05-JUN-00

BEATRIZ PALMEROS  
Instituto de Biotecnología, U.N.A.M.  
Microbiología Molecular  
Av. Universidad 2001, Colonia Chamilpa  
Cuernavaca  
62210 Morelos  
MEXICO

Dear Colleague,

Thank you for your direct submission to the Nucleotide Sequence Database. Please find attached, a copy of the database entry made from the data which you submitted.

We ask that you check the entry carefully and report any errors using our WWW update form, URL: <http://www3.ebi.ac.uk/Services/webin/update/update.html>

If you do not have access to the WWW please e-mail our database staff to request an update form, [update@ebi.ac.uk](mailto:update@ebi.ac.uk). We do not accept updates sent by disk or surface mail.

If this data is to be published, it is important that you contact us with complete citation information at the time of publication, as this is the only way that we can guarantee timely reflection of the publication status in your entry.

Yours sincerely

EMBL Nucleotide Sequence Database

Accession No(s):

AJ278281 ACL278281 is not confidential

AJ278282 ACL278282 is not confidential

AJ278283 ACL278283 is not confidential

EMBL Outstation EBI  
Hinxton Hall, Hinxton  
Cambridge CB10 1SD, UK  
Telephone +44 (0) 1223 494499  
Telefax +44 (0) 1223 494472

Network addresses:  
data submissions: [dataaubs@ebi.ac.uk](mailto:dataaubs@ebi.ac.uk)  
general enquiries: [datalib@ebi.ac.uk](mailto:datalib@ebi.ac.uk)

**Subject: Re: request of plasmids**

**Date:** Mon, 01 May 2000 19:43:51 -0600

**From:** Sui-Lam Wong <slwong@ucalgary.ca>

**To:** bolivar@ibt.unam.mx

Dear Dr. Bolivar:

I have read your recent article in *Gene* 247:255-264, 2000 Entitled "A family of removable cassettes designed to obtain antibiotic-resistance-free genomic modifications of *E. coli* and other bacteria". I am interested to apply this system to study gene disruption in *B subtilis* and would greatly appreciate your kind assistance if you can send me the following three plasmids (or strains carrying these plasmids).

1. pLox1
- 2 pJW168
3. pLoxGen4

My mailing address is as follows:

Dr. Sui-Lam Wong  
Department of Biological Sciences  
University of Calgary  
2500 University Drive, N.W.  
Calgary, Alberta T2N 1N4  
Canada

Thank you very much for your attention

Sincerely yours,  
Sui-Lam Wong  
Associate Professor  
Department of Biological Sciences  
University of Calgary  
Calgary, Canada

**Subject: plasmids described in Palmeros et al**

**Date:** Tue, 16 May 2000 13:27:43 -0700

**From:** "Radany, Eric" <eradany@msx.ndc.mc.uci.edu>

**To:** "bolivar@ibt.unam.mx" <bolivar@ibt.unam.mx>

Dear Professor Bolivar:

Your elegant system for excision and re-use of antibiotic markers described in Palmeros et al, Gene 247 (2000) will be of great use to us in some current studies. I would be pleased to obtain from you the three antibiotic resistance cassette-donating plasmids as well as the pJW168 excision plasmid. I will not give these materials to others.

Sincerely,

Eric Radany, PhD, Assistant Professor  
UC Irvine College of Medicine  
Med Sci I Room B135  
Irvine, CA 92697-2695 USA

**Subject:**

**Date:** Thu, 18 May 2000 19:51:20 -0500

**From:** "Ferrandez, Abel" <FerrandezA@mail.medicine.uiowa.edu>

**To:** "'bolivar@ibt.unam.mx"' [bolivar@ibt.unam.mx](mailto:bolivar@ibt.unam.mx)

Dear Prof Bolivar,

I found really interesting your work recently published on Gene (2000) 247:255-264. As far the research I'm currently developing involves serial mutations of gene clusters, it would be really interesting for me to use a system providing me the possibility of removing antibiotic resistance markers from former mutants. Therefore, I would really appreciate if you could send me the following plasmids described in the above-mentioned paper: pLoxCat2, pLoxKan2, pLoxGen4, and pJW168. I thank you in advance for your interest. I'm looking forward to hearing from you soon.

Sincerely yours.

Abel Ferrández

---

Abel Ferrández, Ph.D.  
The University of Iowa  
Department of Microbiology  
51 Newton Rd. 3-401 BSB  
Iowa City, IA 52242  
PH. 319-335-7856  
FAX. 319-335-7679  
e-mail: [abel-ferrandez@uiowa.edu](mailto:abel-ferrandez@uiowa.edu)  
[ferrandez@mail.medicine.uiowa.edu](mailto:ferrandez@mail.medicine.uiowa.edu)



**Subject: vectors**

**Date:** Wed, 24 May 2000 16:33:39 -0700

**From:** "Miro Pastrnak" <pastrnak@scripps.edu>

**To:** <bolivar@ibt.unam.mx>

Dear Dr. Bolivar,

We are extremely interested in obtaining your set of plasmids published in Gene 247(2000): 255 (pJW168, pLoxCat2, pLoxKan2, pLoxGen4). We are searching for a very efficient way to knock-out several genes in *E. coli*. Our goal is to develop in vivo methods for site-specific incorporation of unnatural amino acids, and we are interested in modifying the genomic copies of the amino acid transport genes in a common cloning strain. We will gratefully acknowledge your contribution and we will not distribute the vectors to others without your written approval.

Thank you in advance, and we look forward to hearing from you.

Sincerely,

Miro Pastrnak

Peter G. Schultz Laboratories  
The Scripps Research Institute, SR202  
10550 North Torrey Pines Road  
La Jolla, CA 92037  
Phone: 858-784-9318  
Fax: 858-784-9339  
pastrnak@scripps.edu

**Subject: constructs**

**Date:** Mon, 19 Jun 2000 15:46:12 +0800 (WST)

**From:** Wayne Reeve <reeve@possum.murdoch.edu.au>

**To:** bolivar@ibt.unam.mx

Dear Francisco Bolivar,

I have recently read your extremely interesting article in the journal Gene 247:255-264 (2000). Our laboratory would be interested in using some of the plasmids detailed in your paper for our work with the root nodule bacteria. Would you please be able to send the constructs:

pLox1  
pLox1Cat2  
pLox1Kan2  
pLox1Gen4  
pJW168  
pKNG101  
pKNGlac  
pKNGgal

Hoping that you can help. Thanking you

Cheers

Wayne.

Dr. Wayne Reeve  
Centre for Rhizobium Studies  
Division of Science & Engineering  
Murdoch University  
Perth, WA 6150  
Australia

Phone 61-8-93602631      Fax 61-8-93606486

**Subject: pLox Vectors**

**Date:** Thu, 29 Jun 2000 16:11:01 +0100

**From:** Amrita Kumar <akumar@microbio.emory.edu>

**To:** Bolivar@ibt.unam.mx

Hello Dr. Bolivar,

I am a post doc here at Emory University in the laboratory of Prof. Charles Moran. We use *Bacillus Subtilis* as our model organism to study sporulation in bacteria. Recently, i read your paper on using the Lox/Cre system to insert tags in the genomes. I am very interested in this work and would like to try your vectors in *Bacillus*. As such, I would very much appreciate if you could send us the pLOXCat4/pLOX1 vector(s). At the same time, I would also appreciate the plasmid pJW168 for expressing the Cre gene.

Please let me know if you would like any further information. I look forward to hearing from you.

Thank you for your cooperation.

Sincerely,

Amrita Kumar

3010 Rollins Research Center

1510 Clifton Road

Atlanta, GA 300322

USA

**Subject: Materials request**

**Date:** Wed, 5 Jul 2000 19:51:29 -0400 (EDT)

**From:** Chaitanya Jain <jain@mcbi-34.med.nyu.edu>

**To:** bolivar@ibt.unam.mx

Dear Dr. Bolivar,

I recently read a paper from your laboratory describing the construction of a family of removable cassettes to obtain antibiotic-resistance-free genomic modifications of *E. coli* and other bacteria. The tools that you have described in this Gene paper could be useful to many people who study prokaryotic organisms, including myself. I wonder if I may request you for some of the materials described in this paper, specifically: pJW168, pLoxCat2, pLoxKan2, pLoxGen4, and as a control for chromosomal integration, the R6K plasmid, pKNGlac.

My mailing address is:

Dr. Chaitanya Jain  
Skirball Institute, lab #3, 3rd Flr.  
NYU Medical Center  
540 First Avenue  
New York, NY 10016.

Thank you in advance for considering my request. If possible, I will be grateful if you could e-mail me sequence files for these plasmids, if these have been generated.

Sincerely yours,

Chaitanya Jain

**Subject: Lox cassettes**

**Date:** Fri, 28 Jul 2000 11:26:36 -0500

**From:** Susan Egan <sme@ukans.edu> (Susan Egan)

**To:** bolivar@ibt.unam.mx

Dr. Francisco Bolivar,

I recently read your paper describing the construction of several antibiotic resistance cassettes that can be used to construct gene replacements and subsequently excised using Cre acting on the lox sites. I'm sure you have read the recent reports by Kenan Murphy and Donald Court (J. Bacteriol. 180:2063, Gene 246:321, and PNAS 97:5978) describing a very efficient method for constructing gene replacements using *E. coli* strains that express the lambda red recombination genes. I have used the Murphy system to construct several gene replacements, and have been very happy with the technique. I am interested in combining this recombination system with your Cre-lox system to make unmarked deletions. I was wondering whether you would be willing to send me the three different (CmR, KmR, and GmR) cassettes you describe in Gene 247:255. Also, the simplest method for making the replacements with the lambda red system is to synthesize 60 nt oligos with 40 nt of homology with the gene to be replaced, and 20 nt of homology to the cassette you wish to integrate into the chromosome, and then using the oligos to PCR amplify the cassette. The product then has a small amount of homology to the ends of the gene of interest, enough to construct replacements. To use your cassettes for this, I would need to know the DNA sequence of the 20 bp at either end of your cassettes.

Thank you in advance for your consideration of my request.

Sincerely,

Dr. Susan Egan

~~~~~  
Dr. Susan M. Egan  
8031 Haworth Hall  
Dept of Molecular Biosciences  
University of Kansas  
Lawrence, KS 66045-2106  
Phone: 785-864-4294  
fax: 785-864-5294

**Subject: loxP AnbR plasmids**

**Date:** Tue, 1 Aug 2000 12:28:59 -0700

**From:** de crecy-lagard <vcrecy@scripps.edu>

**To:** bolivar@ibt.unam.mx

Dear Professor Bolivar

My name is Valerie de Crecy-Lagard. I am Assistant Professor at The Scripps Research Institute in the Lab of Prof. Schimmel.

I am by heart an *E. coli* geneticist and I think I am the only one at Scripps who knows how to do a P1 transduction. I was working around the line you published to construct tool but not at a very efficient pace. I am happy that you constructed your tools I would be interested in getting your three plasmids described in the Gene paper (pLoxCat2 , ploxKan2 and ploxGen4)

Also I would like to know in more details then described in your paper your experience in doing multiple deletions

Thank you in advance for your help

Sincerely yours

valerie de crecy

The Scripps Research Institute, BCC-379

10550 N. Torrey Pines Road

La Jolla, CA 92037

Tel: (858) 784-8974,

Fax: (858) 784-8990,

**Subject: Plasmids request**

**Date:** Tue, 08 Aug 2000 15:02:24 -0700

**From:** "Francois Baneyx" <baneyx@cheme.washington.edu>

**To:** Francisco Bolivar <bolivar@ibt.unam.mx>

Dear Dr. Bolivar:

I read with great interest your recent paper (Gene 247:255-64 [2000]) on the use of the lox-cre system for introducing antibiotic-free deletions in *E. coli*. Since we routinely need to accumulate multiple mutations in the *E. coli* genome, the plasmids that you describe in the above-referenced paper would be very helpful for our work. I would therefore be very grateful if you could send me pLoxCat2, pLoxKan2, pLoxGen4, pJW168 and pKNG101, and their maps or sequences (as electronic txt files), if available.

Thank you in advance for this courtesy. I look forward to hearing from you.

Best wishes,

François Baneyx

University of Washington

Department of Chemical Engineering, Box 351750

Seattle, WA 98195-1750

USA

Ph: (206) 685-7659

Fax: (206) 685-3451

E-mail: [baneyx@cheme.washington.edu](mailto:baneyx@cheme.washington.edu)

**Subject: Cre/loxp system**

**Date:** Fri, 11 Aug 2000 15:29:41 -0700

**From:** JianGen Gong <jgong@diversa.com>

**To:** "F.bolivar" <bolivar@ibt.unam.mx>

Dear Dr. Bolivar:

This is Dr. JianGen Gong, a Research Scientist, at Diversa Corporation USA. We are trying to develop a streptomyces host for expression of small molecule. I have read your recent paper published in Gene 247 (2000)255-264, with a great interest. I am wondering if you could provide us with the following strains and plasmids described in your recent paper. Strains: SY327 l-pir, W3110 and 294-cre. Plasmids: pMS2, pLOX1, pJW168, pJW168DEB and pInt3. It would greatly facilitate our research if you could kindly provide us with those strains and plasmids. I'd like to ensure you that those plasmids will be used for research purpose only and will not be distributed to other researchers without your permission.

I look forward to hearing from you.

JianGen Gong, Ph.D  
Molecular Diversity  
Diversa Corporation  
10665 Sorrento Valley Road  
San Diego, CA 92122  
USA



**Subject: Plasmid request**

**Date:** Sun, 27 Aug 2000 15:33:22 -0500

**From:** "Barry L. Wanner" <blwanner@bilbo.bio.purdue.edu>

**To:** bolivar@ibt.unam.mx

**CC:** wild@oncology.wisc.edu

Dear Dr. Bolivar,

I am writing for samples of the plasmids pJW168 (lacIq Puv5-Cre ori-ts bla), pLox1, pLoxCat2, pLoxKan2, and pLoxGen4 which you described in Gene 247 (2000) 255-264.

We would like to use them to construct unmarked gene disruptions in *E. coli* for basic research purposes.

Thank you

Sincerely,

Barry L. Wanner  
Professor  
Purdue University  
Dept. Biol. Sci.  
West Lafayette, IN 47907-1392

Ph: (765) 494-8034

Fax: (765) 494-0876

Email: BLWanner@bilbo.bio.purdue.edu

<http://www.bio.purdue.edu/Bioweb/people/faculty/wanner.html>

<http://www.biochem.purdue.edu/~bmb/faculty/wann.html>

**Subject: cre/lox system**

**Date:** Thu, 2 Nov 2000 10:32:17 -0700

**From:** kofoid@biology.utah.edu (Eric Kofoid)

**To:** bolivar@ibt.unam.mx

Dear Dr. Bolivar

I read your recent paper in Gene with considerable interest. John Roth and I have been using a similar FRT/FLP based system in Salmonella with reasonable success. I would like to compare your system with ours and also use it to minimize the accumulation of FRT sites, as the latter would encourage rearrangements. Could you please send me the following plasmids, either as DNA or as strains carrying them?

pLox1, pLoxCat2, pLoxKan2, pLoxGen4, and pJW168.

Also, what promoters are used to drive the antibiotic resistance genes? Are they constitutive or regulated?

Many thanks,

Eric Kofoid.

|                                                                             |   |                                          |
|-----------------------------------------------------------------------------|---|------------------------------------------|
| Eric Kofoid                                                                 | / | "Being certain of the conclusion assists |
| Dept. Biology, U.of Utah                                                    | / | in finding the proof"                    |
| SLC, UT 84112 USA                                                           | / | Galileo                                  |
| <u><a href="mailto:kofoid@biology.utah.edu">kofoid@biology.utah.edu</a></u> | / |                                          |

801/581-3340 (lab)

801/585-6207 (fax)

**Subject: request**

**Date:** Mon, 13 Nov 2000 15:49:06 -0500

**From:** Elizabeth <Elizabeth.Pradel@medecine.univ-mrs.fr>

**To:** bolivar@ibt.unam.mx

Dear Dr. Bolivar,

Almost 2 months ago I wrote an email to you requesting for some strains. As I didn't get any answer, I resend you the message:

I'm a senior researcher and I've joined Jean-Marie Pages' lab in Marseille, France, last February to study multidrug efflux pumps in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes* (Ea). I'm a bacterial geneticist and molecular biologist and I used to work on *E. coli* during my thesis (periplasmic acid phosphatases) and 1st postdoc (LPS). Then, for 6 years I've been working on iron uptake and iron regulation in *Bordetella pertussis* at the Pasteur Institute in Lille, Northern France.

In my present project, I've already cloned and sequenced some Ea genes involved in active efflux (*acrAB* operon and *tolC*) and I need to inactivate them to characterize the corresponding Ea mutants. Thus I'd be very grateful if you could send me the following plasmids or strains bearing them, that you described in your very interesting Gene 247:255-264 (2000) article:

pKNG101  
pLoxCat2, pLoxKan2, pLoxGen4  
pJW168

In advance, I thank you very much for your help in my new project.

Best regards  
Elizabeth Dr Elizabeth Pradel  
INSERM CJF 9606  
Faculté de Médecine  
27 Bd Jean Moulin  
13385 Marseille cedex 05  
France  
Tel: 33 (0)4 91 32 46 07  
Fax: 33 (0)4 91 32 46 06

**Subject: plasmid requests**

**Date:** Wed, 15 Nov 2000 13:31:24 +0100

**From:** Klas.Flardh@icm.uu.se (Klas Flardh)

**To:** bolivar@ibt.unam.mx

Dear Dr. Bolivar,

I am working in the microbiology-programme of Dept. of Cell and Molecular Biology, Uppsala University (headed by Kurt Nordstrom, and since a few weeks Gerhart Wagner).

For my work on developmental biology and cell division in *Streptomyces coelicolor*, I'd be extremely grateful if you kindly could send us the plasmids pLoxCat2, pLoxKan2, pLoxGen4, and pLox1 (from the recent Gene paper 247:255). This would be extremely helpful both for my work and for the *E. coli* groups in the department.

Many thanks in advance,

Sincerely,

Klas Flardh

---

Klas Flårdh, PhD

Department of Cell and Molecular Biology  
Uppsala University  
Biomedical Center  
Box 596  
SE-751 24 Uppsala  
Sweden

tel +46 18 4714058

fax +46 18 530396

e-mail: klas.flardh@icm.uu.se

<http://www.icm.uu.se/mikrobio/research/streptomyces/klas.html>

**Subject:** ENEP Iztacala  
**Date:** Mon, 27 Nov 2000 17:32:12 -0600  
**From:** <octavio.garcia@correo.unam.mx>  
**To:** <beatriz@ibt.unam.mx>

Mi nombre es Octavio García, pertenezco al laboratorio de genética de la ENEP Iztacala, y asistí al congreso de bioquímica en Acapulco donde pude ver el trabajo que están realizando Uds. en materia de mutagénesis bacteriana y realmente me encuentro muy interesado en el sistema desarrollado por ustedes, en específico el mostrado en su cartel "Obtención de modificaciones cromosomales en *E. coli* con la eliminación posterior del marcador de selección". El motivo de mi interés es debido a que nosotros estamos interesados en la expresión del gen de Aerolisina de *Aeromonas hydrophila* y la obtención de una cepa mutante mediante el sistema desarrollado por uds. nos sería de gran utilidad. Espero podamos tener comunicación pronta, ya que como le decía me es muy interesante ese sistema y me parece factible aplicarlo en nuestro proyecto.

Agradezco de antemano su atención.

Atte. Octavio García

**Subject:**

**Date:** Tue, 6 Mar 2001 01:05:09 +0100

**From:** "lau pierre" <laupoui@immgen.cnrs.fr>

**To:** <bolivar@ibt.unam.mx>

Dear Dr.Bolivar,

After reading the very nice article you published last year in Gene about removable cassettes to obtain genomic modifications of *E.coli*, I am writing to ask you if the pLOX1 is available from your lab. We are working on MHC class I expression and would like to clone our rat cDNA between LoxP sites. We would then be very grateful if you could provide us with the the pLOX1 vector.

Looking forward to your reply.

Best regards.

Pierre Lau  
UPCM-CNRS UPR 2163  
Hopital Purpan  
Place du Dr Baylac  
31300 Toulouse  
France