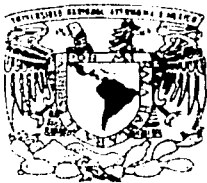


00322

189



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Construcción de un nuevo vehículo molecular para la clonación de productos de PCR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

B I O L O G O

P R E S E N T A :

GABRIEL SANDOVAL LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA BEATRIZ ALMEROS SÁNCHEZ



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**TESIS CON
FALLA DE
ORIGEN**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Construcción de un nuevo vehículo molecular para la clonación de productos de PCR

realizado por Gabriel Sandoval López

con número de cuenta 8420888-8, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Beatriz Palmeros Sánchez

Beatriz Palmeros Sánchez

Propietario

Dr. Victor Manuel Valdés López

Victor Manuel Valdés López

Propietario

Dra. María Alicia González Manjarréz

María Alicia González Manjarréz

Suplente

M en IBB. Saúl Cano Colín

Saúl Cano Colín

Suplente

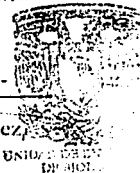
Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez

René de Jesús Cárdenas Vázquez

Consejo Departamental de Biología

Juan Manuel Rodríguez Chávez
M en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ESTUDIOS
DE BIOL.

B

DEDICATORIA

Dedico esta tesis y agradezco muy profundamente a las personas que han llenado mi vida con amor y que se han esforzado para que logremos realizar nuestros sueños, juntos por siempre.

A mi madre Deifilia

A mi padre Gabriel (†)

A mis hermanas y hermanos

A mis sobrinas y sobrinos

A ti Paulinita

A mis tías

A mis primas

A mi abuela y al abuelo

A ti Rocío, a las pitufas, a Sofia, y a Gabriel.

Gracias a la vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los honorables miembros del jurado: Dra. Beatríz Palmeros Sánchez, Dra. Alicia González Manjarréz, Dr. Víctor Manuel Valdés López, M en IBB. Saúl Cano Colín, y Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez, quienes revisaron esta tesis, por sus valiosos comentarios y sugerencias.

Agradezco a la Dra Alicia González Manjarréz, y al Dr. Fernando Valle Baheza, quienes me dieron la oportunidad de iniciar en la investigación, y a la Dra. Beatríz Palmeros Sánchez por sus consejos y por enseñarme a usar las herramientas para ello.

Agradezco a todos mis profesores por su valiosa labor en mi preparación.

Agradezco a mi país México y a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco al personal técnico y administrativo del Laboratorio Bolívar-Valle; un gran agradecimiento a Mercedes Enzaldo, por que con su trabajo facilita la realización de los proyectos de todos los miembros de éste laboratorio.

Agradezco a mis grandes amigos y colegas: Aristides III, Martín, Juan y Takuya.

Agradezco a Rocío Thompson Bonilla porque es una mujer muy valiosa, por irradiar tantas cosas lindas para mí, por sus consejos y cuidados, por revisar y hacerme comentarios valiosos sobre mi tesis.

INDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	3
1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	3
1.2 Enzimas utilizadas en el método de PCR	7
1.3 Estrategias de clonación de productos de PCR	8
1.3.1 extremos rasurados	8
1.3.2 sitios de restricción en oligonucleótidos iniciadores	9
1.3.3 vectores T	10
2. ANTECEDENTES	13
3. OBJETIVOS	16
4. MATERIAL Y METODOS	17
4.1 Creación del casete ECLHKI	17
4.2 Ligación	17
4.3 Transformación	18
4.4 Purificación de DNA plasmídico (lisis alcalina)	20
4.5 Reacciones de restricción de DNA	21
4.6 Electroforesis	21
4.7 Mutagénesis sitio dirigida	22
4.8 Transformación mediante electroporación	25
4.9 Validación del vector construido	26
5. RESULTADOS	29

6. DISCUSION Y CONCLUSION	35
7. FIGURAS (3 a 14)	38
8. APENDICE 1 (preparación de soluciones y medios)	49
9. APENDICE 2 (glosario)	52
10. REFERENCIAS	57

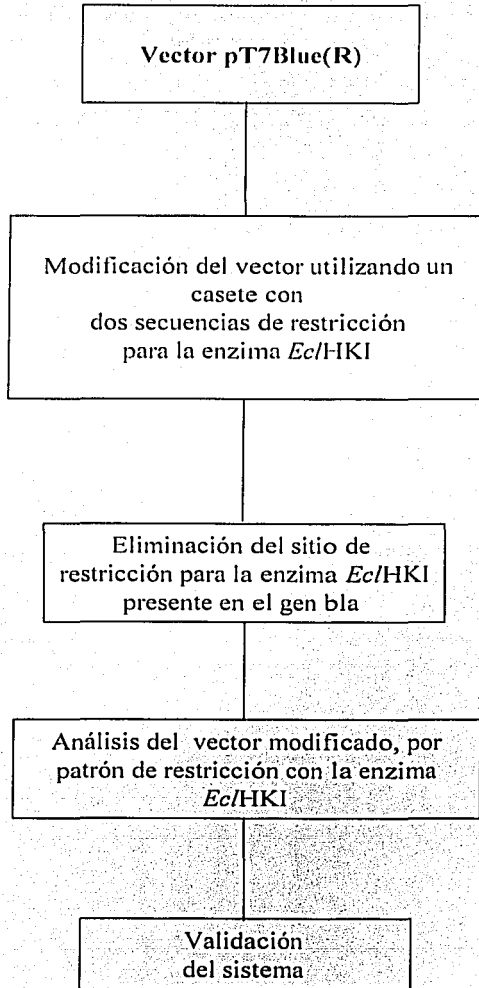


Diagrama de flujo: obtención del vector T (pTA57) para clonación directa de productos de PCR

RESUMEN

Con este proyecto se desarrollo una herramienta molecular (vector T) que permite la clonación directa de productos amplificados por PCR, de una manera sencilla; se realizó por la necesidad de tener un vector que fuese preparado por simple digestión con una enzima de restricción (*Ec/HKI*), la cual deja moléculas de DNA con nucleótidos de timidinas (dT) 3' terminales. Este sistema de clonación se diseño para aprovechar el hecho de que los fragmentos de DNA amplificados con la enzima DNA *Taq* polimerasa contienen un nucleótido adicional en sus extremos 3' terminales, agregado por esta enzima a través de su actividad transferasa terminal independiente de templado, y que preferentemente es una adenina (A), la cual es justamente complementaria a la T terminal del vector restringido con la *Ec/HKI*

El vector desarrollado en este trabajo se denomina pTA57, el cual después de ser digerido con la enzima *Ec/HKI* asegura que todas las moléculas del mismo lleven en sus extremos precisamente las T 3' terminales mencionadas, lo cual es una ventaja al compararlo con otros sistemas de clonación comerciales, en los que se preparan este tipo de vectores T por medio restricción con enzimas que les dejan extremos rasurados y que luego se incuban con la enzima DNA *Taq* polimerasa y desoxitimidin trifosfato (dTTP) en exceso y en ausencia del nucleótido de adenina, en los cuales muchas de sus moléculas pierden las T 3' terminales que se pretende aprovechar para la clonación de los fragmentos deseados de PCR.

Para lograr la generación del vector pTA57 se tomó como base el plásmido comercial pT7Blue(R) de Novagen (restringido con la enzima *EcoRV*, y con una T 3' terminal en sus extremos), y que fue ligado a un casete de secuencia conocida (región del gen de tetraciclina) denominado ECLHKI obtenido mediante la fosforilación y el alineamiento de dos oligonucleótidos complementarios (cade1TA y cade2TA) de 59 pb, diseñados para tener un sitio de restricción para la enzima *Ec/HKI* en cada extremo, y que incluyeran

además una A extra en los extremos 3' terminales, que fuera complementaria a las T 3' terminales del pT7Blue(R) para poder insertarlo por ligación en éste vector, y que además al ser clonado permitiera restituir el marco de lectura abierto (ORF) de la subunidad α de *lacZ*, necesaria para la selección de colonias bacterianas recombinantes por fenotipo de color azul

Con el casete ya incluido en el vector llamado hasta aquí pTA5, lo siguiente fue eliminar un sitio de reconocimiento extra para la enzima *Ec*HKI, localizado en la región del gen que codifica para la β -lactamasa (resistencia a carbenicilina y ampicilina) de este último plásmido, esto se logró mediante mutagénesis sitio dirigida con el uso de un iniciador que tiene solo una base cambiada, y que eliminó el sitio de restricción mencionado, sin sustituir el aminoácido codificado por el codón que incluyó dicho cambio. Así, el nuevo vector T (denominado pTA57), quedó listo para su preparación de manera sencilla por digestión con la enzima *Ec*HKI y para la clonación de productos amplificados por PCR

1. INTRODUCCION

1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es utilizada para amplificar *in vitro* un segmento de **DNA**, el cual está situado entre dos regiones de secuencia conocida. Este método, también puede ser usado para alterar la secuencia a amplificar o para introducir información nueva en ella. Para llevar a cabo la reacción no es necesario que la secuencia a sintetizar este inicialmente en forma pura, puede ser la fracción menor de una mezcla, es decir, se necesita una pequeña cantidad de la secuencia para iniciar la reacción. En ella, se usan dos **oligonucleótidos** como **iniciadores** para una serie de reacciones de síntesis catalizadas por una DNA polimerasa termoestable. Estos oligonucleótidos generalmente tienen secuencias distintas entre ellos, son complementarios a las secuencias que están en las cadenas opuestas del DNA templado y delimitan el segmento de DNA que será amplificado.

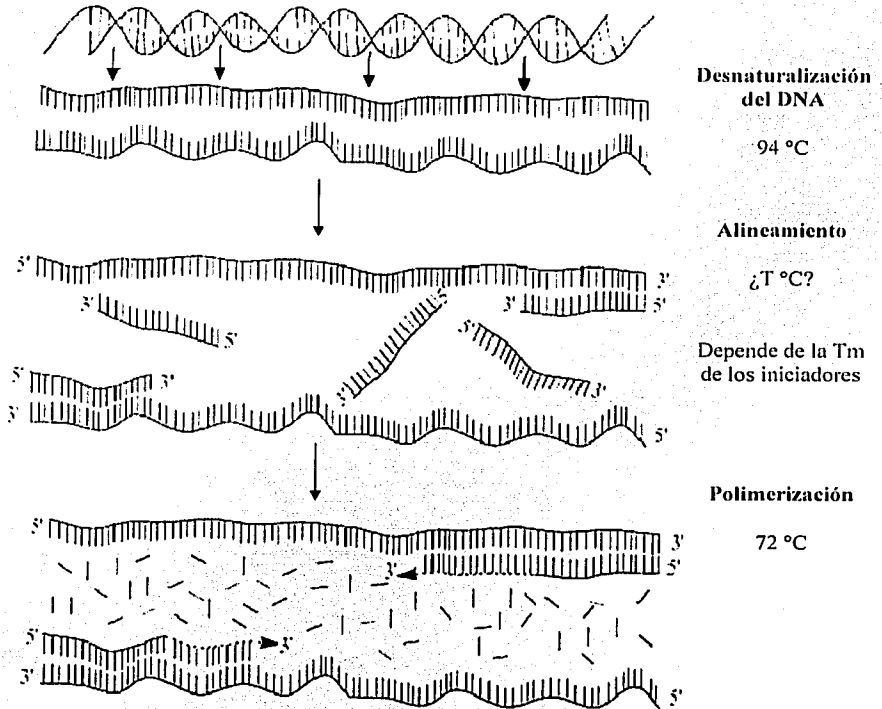
En la PCR se realizan varios ciclos divididos en tres fases, las cuales son: **Desnaturalización, Alineamiento, y Polimerización o Extensión** (figura 1). Cada ciclo inicia cuando el DNA templado es desnaturalizado por calor en presencia de los dos iniciadores, 5' y 3', en exceso molar cada uno, y los cuatro **desoxinucleótidos fosfatados** de adenina, guanina, citosina, y timina (*i.e.*, dNTPs: dATP, dGTP, dCTP y dTTP respectivamente) Entonces, la mezcla de reacción es enfriada a una temperatura que permita que los oligonucleótidos iniciadores hibriden en las cadenas opuestas de la secuencia blanco (alineamiento) y queden orientados de tal forma que la polimerasa inicie la síntesis de DNA de la región que está entre los oligonucleótidos 5' y 3' (polimerización). A causa del incremento en la especificidad de la síntesis, hay una disminución de productos no específicos de la polimerización, por lo que los rendimientos de los fragmentos deseados son más altos. En el segundo ciclo de la amplificación y en los subsecuentes, las moléculas recién amplificadas, también sirven como templados para el siguiente ciclo de desnaturalización, alineamiento y síntesis de DNA, el cual se repite muchas veces de manera sucesiva, generando moléculas de DNA de longitud definida.

Estas moléculas, se acumulan de manera exponencial con cada ciclo de amplificación posterior y forman los productos dominantes de la reacción (figuras 1 y 2)

El producto principal de esta reacción exponencial es un segmento de DNA de doble cadena cuyos extremos 5' y 3' están definidos por la terminación 5' de los oligonucleótidos iniciadores y cuya longitud esta dada por la distancia entre los mismos. La reacción en cadena de la polimerasa es capaz de producir un enriquecimiento selectivo de una secuencia específica de DNA en un factor de 10^6 , facilitando enormemente una gran variedad de manipulaciones analíticas subsecuentes, *e. g.*, **clonación** altamente eficiente de secuencias genómicas (Saiki *et al.*, 1988).

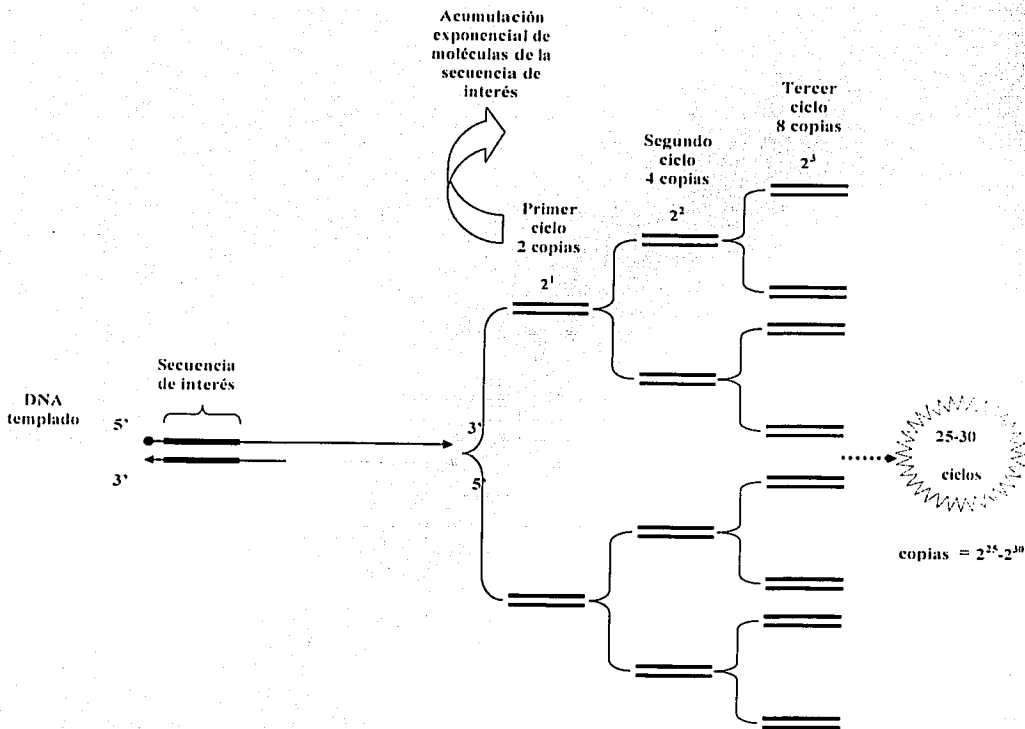
Los productos de un ciclo de amplificación exitoso, son moléculas de DNA de tamaño heterogéneo cuyas longitudes pueden exceder la distancia entre los sitios de enlace de los dos iniciadores. Pero aun cuando en cada ciclo de la reacción de amplificación se producen moléculas de DNA más grandes del tamaño esperado, éstas se acumulan en una proporción lineal, de tal forma que no contribuyen significativamente a la masa final de las secuencias específicas.

PCR



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 1. Reacción en cadena de la polimerasa (ciclos de desnaturalización, alineamiento, y polimerización)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sandoval-López G, 2003

Figura 2. Aumento en la cantidad de moléculas de DNA con respecto al número de ciclos de amplificación en la PCR.

1.2 Distintas enzimas utilizadas en el método de PCR

Los protocolos originales para PCR usaban el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *Escherichia coli* para catalizar la extensión de los oligonucleótidos iniciadores alineados (Mullis and Fallona, 1985). Debido a que esta enzima se inactiva a las temperaturas que son requeridas para desnaturalizar el DNA, cada ciclo de síntesis requería la adición de una nueva alícuota de ella. Aunque estas reacciones funcionan bien para la amplificación de segmentos pequeños de DNA, < 200 pares de bases (**pb**), sin embargo los resultados con templados más grandes son malos. Frecuentemente, el rendimiento obtenido es pobre y en general los productos son de tamaño heterogéneo, presumiblemente porque se presenta un apareamiento incorrecto de los iniciadores con el DNA templado a las temperaturas usadas para la extensión catalítica de los oligonucleótidos.

Estos inconvenientes fueron resueltos con la introducción de una DNA polimerasa termoestable y termoactiva, purificada de la eubacteria termofílica *Thermus aquaticus* (Saiki *et al.*, 1988), denominada **DNA Taq polimerasa**. Esta enzima puede resistir una incubación prolongada a 95°C, por lo cual no se inactiva a la temperatura necesaria en el proceso de desnaturalización y no se requiere su reemplazo en cada ronda de amplificación. Además, debido a que el alineamiento y la extensión de los oligonucleótidos pueden llevarse a cabo a temperaturas elevadas, el apareamiento erróneo se reduce enormemente. Esto resulta en mejoras sustanciales en la especificidad y rendimiento de la reacción de amplificación y en el tamaño del producto amplificado. Sin embargo, este método tiene dos limitaciones que recaen en la fidelidad del producto final y en el tamaño del fragmento de DNA que puede ser amplificado (hasta 10 Kb) El problema de la fidelidad puede ser solucionado, aunque de manera parcial, reemplazando a la DNA polimerasa de *T. aquaticus* por la de *Pyrococcus furiosus* (Lundberg *et al.*, 1991), la cual muestra una **actividad** adicional de **exonucleasa** que le permite llevar a cabo un proceso de edición en sentido 3'- 5'; esta enzima, permite amplificar secuencias de DNA de 5 a 7 Kb. Actualmente se tiene la opción de utilizar una combinación de DNA polimerasas con y sin capacidad de edición, un ejemplo de esto es el producto de alta fidelidad y eficiencia para PCR llamado

“Expand” que consiste de una mezcla de la DNA *Taq* polimerasa y de dos DNA polimerasas llamadas *Pwo*. Esta mezcla de enzimas permite amplificar de manera eficiente secuencias de DNA genómico de 5 Kb como tamaño óptimo, además permite amplificar productos hasta de 12 Kb con un rendimiento menor, este último guarda una relación indirecta con la longitud de la secuencia. Con una variante de dicho producto (llamada sistema para PCR de templado grande), se puede lograr la amplificación de moléculas de DNA desde 3 hasta 27 Kb con fidelidad y eficiencia aceptables, aunque esta variante es óptima para amplificar fragmentos tan pequeños como de 0.5 Kb.

Además se ha reportado la amplificación de secuencias por PCR de hasta 42 Kb utilizando para ello las propiedades de las enzimas en combinación, en la que predomina la enzima sin capacidad de edición, con una pequeña cantidad de actividad exonucleasa conferida por el otro tipo de enzimas (Barnes, 1994; Cheng *et al.*, 1994; Cheng, 1995)

Con relación a las polimerasas sin actividad exonucleasa o de edición, cabe agregar que tienen una tasa de error de incorporación de nucleótidos tal que existe una gran probabilidad de adicionar un nucleótido erróneo que evite la polimerización sobre todo en reacciones en las que se pretenda amplificar un fragmento de DNA de más de 10 Kb. En cuanto a las polimerasas que sí presentan actividad de edición, poseen tasas muy bajas de incorporación errónea de nucleótidos, pero están limitadas en cuanto a capacidad para realizar polimerizaciones extensas, debido a que requieren tiempos más largos para ello.

1.3 Estrategias para la clonación de productos de PCR

1.3.1 Clonación de productos con extremos rasurados

Los intentos por clonar productos de PCR como fragmentos con extremos rasurados, han sido ineficientes debido a la **actividad transferasa terminal (TDT)** independiente de templado de la enzima DNA *Taq* polimerasa. Cuando se generan fragmentos de DNA por PCR, la enzima adiciona uno o dos desoxinucleótidos en el extremo 3' del DNA rasurado de doble cadena.

Cualquiera de los cuatro nucleótidos puede ser adicionado cuando está presente una mezcla de ellos en la reacción, pero por razones desconocidas la enzima tiene preferencia por incorporar dATP (Clark *et al.*, 1988). Más de la mitad de los productos de PCR de una reacción contienen dicho nucleótido extra, el cual interfiere en la **reacción de ligación** entre el vector y el fragmento. La presencia de esas terminaciones desiguales en el fragmento de DNA amplificado disminuye la eficiencia. Así, para clonar de manera eficiente productos de PCR como fragmentos con extremos rasurados se requiere un procesamiento enzimático adicional.

Hay distintos métodos para realizar lo anterior, en uno de ellos se utiliza una enzima (*PolIK*) con actividad de exonucleasa 3' - 5' para quitar el nucleótido 3' saliente (Hemsley *et al.*, 1989). Otro método es usar el fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa I de *Escherichia coli* para llenar el extremo 3' saliente (Tabor *et al.*, 1988). Ambos métodos pueden solucionar el problema en cierto grado, pero las eficiencias de clonación son comúnmente bajas.

1.3.2 Incorporación de sitios de restricción en los oligonucleótidos iniciadores.

La incorporación de **sitios de restricción** específicos en los iniciadores usados en la amplificación, permite que los productos resultantes puedan ser clonados fácilmente en algún vector que contenga los mismos sitios de restricción. Esta tal vez es la más común de las estrategias para solucionar el problema de la adición de un residuo de adenina en los extremos del fragmento amplificado (Erlich, 1989., Sharf *et al.*, 1986). Aun cuando dichas secuencias adicionadas no aparean con el DNA templado, en la mayoría de los casos tienen poco efecto en la especificidad o en la eficiencia de la amplificación, después de la cual se lleva a cabo la digestión con las endonucleasas de restricción apropiadas para generar las terminaciones cohesivas deseadas en el producto de PCR. Así, el DNA amplificado y posteriormente digerido queda listo para su subsiguiente ligación en la región de los **sitios múltiples de clonación (MCS)** del vector lineal con la (s) misma (s) enzima (s)

Sin embargo, algunas endonucleasas no pueden cortar el DNA cuando su secuencia blanco está localizada cerca de los extremos de las moléculas de DNA (Kaufman *et al.*, 1990. Jung *et al.*, 1990); entre estas se encuentran varias enzimas de uso común incluyendo *Sall*, *HindIII*, y *XbaI*. Esta limitación puede ser superada usando un procedimiento de ligación de los productos sobre sí mismos, previa a la digestión y a la clonación. De manera alternativa, las terminaciones de los fragmentos pueden ser rasurados a través de la actividad de la enzima *PollK* (Hemsley *et al.*, 1989).

1.3.3 Vectores T

La actividad independiente de templado de la DNA *Taq* polimerasa, puede ser explotada para crear un esquema de clonación que tenga la eficiencia de un sistema de clonación con extremos cohesivos, sin requerir de ninguna modificación enzimática adicional del producto amplificado. Dicho sistema emplea un plásmido que contiene sólo un nucleótido saliente de timidina. Esencialmente, se han utilizado tres estrategias distintas para adicionar dicho nucleótido saliente al vector:

I. Incubación del vector lineal con extremos rasurados con un exceso de dTTP y la enzima DNA *Taq* polimerasa; en ausencia de dATP. En estas condiciones la enzima adiciona únicamente un residuo de timidina saliente. Esta reacción es catalizada por la actividad TDT independiente de templado de la polimerasa mencionada (Marchuk *et al.*, 1991).

II. Adición de sólo un residuo saliente de timidina 3' usando: 2', 3'-didesoxi-timidin trifosfato (ddTTP) y la enzima desoxinucleótido transferasa terminal (TDT) (Holton *et al.*, 1991). La utilización del ddTTP asegura la adición de un sólo residuo T, al cual le falta el grupo hidróxilo-3' por lo que los extremos del vector generados así no pueden formar un **enlace fosfodiéster**. Por otro lado, el producto de PCR puede ligarse a otros DNAs ya que contiene un fosfato 5'. De tal modo que se puede ligar directamente un vector con colas ddT a un producto de PCR que contenga una dA 3' saliente por la formación de un enlace fosfodiéster.

Los vectores resultantes, mencionados en los puntos I y II, pueden ser ligados a los productos de PCR que llevan las dAs salientes complementarias en sus extremos 3'. Sin embargo, la preparación de vectores dT o ddT no esta libre de problemas. La adición de dTTP o de ddTTP catalizada por la DNA *Taq* polimerasa o la enzima TDT respectivamente, es ineficiente y no todas las moléculas del vector llevan los extremos modificados (Marchuk *et al.*, 1991).

III. Digestión con las endonucleasas de restricción *XcmI* o *HphI* para producir residuos de desoxitimidinas 3' no apareados, en ambos extremos (Kovalic *et al.*, 1991; Mead *et al.*, 1991). No obstante, existe un problema en cuanto a que las preparaciones de las enzimas de restricción pueden estar contaminadas con exonucleasas las cuales quitan los residuos T terminales produciendo clonas sin inserto por su ligación como extremos rasurados (colonias azules, en el caso de complementación de cepas con la subunidad α del gen *lacZ*). Por tanto para reducir el número de tales clonas sin inserto se recomienda la desfosforilación de los vectores. Por todo esto, los vectores T o sus derivados ddT salientes representan una alternativa práctica con respecto a los otros métodos de clonación de productos de PCR en vectores con extremos rasurados.

Actualmente existen varios vectores dT comercialmente disponibles, que se preparan mediante alguna de las estrategias antes mencionadas. Entre los vectores T esta el plásmido pGEM-T derivado del vector pGEM-5Zf (+). Este vector se prepara por medio de digestión con la enzima de restricción *EcoRV* que produce extremos rasurados, seguida de la adición de una timidina 3' terminal en ambos extremos; esto mejora la eficiencia de ligación del producto de PCR en el plásmido. En la ligación se aprovecha la adición de adenosina, independiente de templado en los extremos 3' de los productos de PCR, por ciertas DNA polimerasas termoestables como la mencionada *Taq*.

Además, se pueden generar fragmentos con terminaciones rasuradas utilizando algunas DNA polimerasas termoestables que tienen actividad de exonucleasa 3' - 5', tal como las DNA polimerasas *Pfu* o *Tli*. Una gran proporción de los productos de PCR generados por estas enzimas posee extre-

mos rasurados (por tanto también pueden ser clonados como fragmentos rasurados). Los productos de PCR resultantes pueden ser modificados por una segunda incubación con la DNA *Taq* polimerasa en presencia de dATP y después ser clonados en alguno de los vectores T existentes pGEM-T.

Otros vectores como el PCR TM II que contienen timidinas 3' salientes, se construyen ligando moléculas del vector con extremos rasurados con fragmentos de oligonucleótidos adaptadores conteniendo dichas timidinas 3' salientes.

El vector pT7Blue(R) fue también diseñado para la clonación de productos de PCR. Este es preparado por digestión con *EcoRV*, seguida por la adición de sólo un residuo de dT en cada uno de los extremos 3' del plásmido.

2. ANTECEDENTES

Se han construido vectores T comerciales para ser utilizados en la clonación directa de productos de PCR, *e.g.*, el pBlueScript derivado del pCR-Script™ SK (+), el pCR™ II, el pGEM^R-T, y el pT7Blue(R) (usado en este trabajo). El uso de estos vectores presenta ciertas desventajas, ya que se tienen problemas en la selección de colonias recombinantes (Hengen, 1995).

Los problemas que se han encontrado, al utilizar el vector pCR-Script™, son cuando este plásmido se transforma. Después de la reacción de ligación con el producto de PCR se presenta una proporción elevada de colonias blancas sin inserto con respecto a las colonias azules sin inserto, es decir, se obtienen colonias que son falsas positivas. Lo mencionado anteriormente también ocurre cuando se usa el plásmido pGEM^R-T, y esto puede presentarse con cualquier otro vector comercial. En el caso del pGEM^R-T se ha reportado que sólo el lote original funciona bien y no así los siguientes, y que incluso estos lotes dan un fondo elevado de colonias blancas cuando se usa solamente el plásmido para transformar *E. coli* (control sin inserto) y se extiende sobre medio con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (**X-Gal**) e isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (**IPITG**).

Otro punto en contra de los vectores-T comerciales es la inestabilidad de las terminaciones de timidina 3' salientes presentes en estos plásmidos. Los vectores del tipo del pT7Blue tienen una probabilidad elevada de perderlas cuando se congelan a -20°C y descongelan repetidamente, aunque el pT7Blue parece ser el que tiene menor probabilidad de perder las timinas 3' terminales entre los de su tipo. Otros lotes del vector pGEM^R-T al igual que el pT7Blue pierden las timidinas 3' terminales, de modo que en el proceso de ligación ni siquiera el inserto control es ligado. Con el uso del pGEM^R-T se han presentado otros inconvenientes, como lo es el hecho de que se han aislado clonas con distintos insertos, sin la terminación T7 del vector, es decir, ninguna de las enzimas que deberían de reconocer secuencias de restricción dentro del MCS, en la terminación T7 del vector, digiere el DNA.

Por otra parte se han construido, mediante otras estrategias, más vectores para la clonación directa de productos de PCR como lo son los vectores-T (BSII TKS y BSII TS) que son preparados por digestión con la enzima de restricción *AspEI* (Ichihara and Kurosawa, 1993). En su construcción se les insertaron dos sitios de restricción sintéticos para dicha enzima uno detrás del otro (*i.e.*, en tandem), de tal manera que ambos extremos del vector llevan una T 3' saliente, cuando este se digiere con la enzima mencionada. Para construir estos vectores se utilizó el pBlueScript II, por lo tanto al clonar productos generados por PCR la selección de recombinantes se hace mediante fenotipo blanco en medio con X-Gal e IPTG.

Así mismo se construyeron vectores T a partir de los fagos M13mp18 y M13mp19 utilizando dos oligonucleótidos sintéticos parcialmente complementarios entre si. Estos fueron fosforilados y alineados para obtener un fragmento de DNA de cadena doble con extremos cohesivos *BamHI* y *Asp718* para insertarlo en los sitios de clonación múltiple de los vectores citados. Además hay entre los sitios mencionados dos secuencias de reconocimiento adyacentes para la enzima *XcmI*. Al digerir las construcciones derivadas del M13 con esta última enzima se produce un vector linearizado con residuos T 3' desapareados en sus extremos (Cha *et al.*, 1993). Este inserto fue diseñado para estar en marco de lectura abierto dentro de la forma trunca del gen *lacZ* de *E. coli*. Como en el caso anterior, cuando se clonan productos de PCR en estos vectores los derivados recombinantes del fago presentan fenotipo blanco en presencia de X-Gal e IPTG como placas blancas.

Se ha descrito otro vector para la clonación directa de fragmentos generados por PCR construido a partir del plásmido pGEM5-fZ(+), para esto se utilizaron dos oligonucleótidos sintéticos parcialmente complementarios que incluyen la secuencia de reconocimiento 5' saliente para la enzima *NcoI* y dos sitios para *XcmI*. Estos, se alinearon y se ligaron al vector digerido con *NcoI*. Como en el caso anterior la restricción de esta construcción con la enzima *XcmI* produce un vector con residuos T 3' desapareados en sus extremos. Este vector está listo para la clonación de productos de PCR. Mead *et al.*, diseñaron vectores T similares a éste último, los cuales son preparados por digestión con las enzimas *XcmI* o *HphI*.

Debido a los problemas y desventajas que presentan los vectores comerciales mencionados, y al hecho de que los vectores que se preparan por digestión con enzimas de restricción no están disponibles comercialmente, se propuso la obtención de un vector T para la clonación directa de productos de PCR a partir del vector pT7Blue(R), y que mediante algunas modificaciones pudiera ser preparado (*i. e.*, que lleve residuos de timidina 3' salientes en sus extremos) de forma sencilla por restricción con la enzima *Ec/HKI*.

Vector pT7Blue(R)

El vector pT7Blue(R) tiene 2887 pb, el origen de replicación fl esta orientado de tal forma que la infección con un **fago ayudador (helper phage)** produce viriones que contienen DNA de cadena sencilla. Además tiene otro origen de replicación llamado ori ColE1 para la síntesis de DNA de cadena doble.

Este vector permite el análisis de recombinantes por fenotipo azul-blanco ya que contiene la secuencia que codifica el péptido α funcional de *lacZ* que complementa al fragmento ω del gen *lacZ* expresado por la cepa hospedera. Por tanto como resultado se obtiene una β -galactosidasa activa que corta el sustrato cromogénico X-Gal, produciendo un fenotipo azul en las colonias. Por ello, cuando se clonan productos de PCR en cualquiera de los sitios únicos de restricción del plásmido incluidos en el sitio de clonación múltiple (MCS), localizado dentro de la región codificante del péptido α , se interrumpe su función, y las colonias recombinantes presentan un fenotipo de color blanco.

Dentro del gen *bla*, que codifica para la enzima que confiere la resistencia a carbenicilina y otros antibióticos como la ampicilina, del vector pT7Blue(R) y de sus derivados existe un sitio de reconocimiento, también único, para la enzima *Ec/HKI*.

3. OBJETIVOS

Objetivo general:

- ❖ Modificar el vector de clonación pT7Blue de tal forma que la digestión de este plásmido con la enzima de restricción *Ec/HKI* genere extremos cohesivos con timidinas 3' salientes.

Objetivos particulares:

- ❖ Diseñar dos oligonucleótidos complementarios excepto en una adenina en los extremos 3' de cada uno de ellos para obtener un fragmento de DNA que además lleve dos sitios de restricción para la enzima *Ec/HKI* (casete ECLHKI).
- ❖ Clonar el casete mencionado en la región de clonación múltiple del vector pT7Blue(R), conservando el frente de lectura abierto.
- ❖ Eliminar el sitio de restricción para la enzima *Ec/HKI*, localizado a 1658 pb sobre el gen que confiere resistencia a ampicilina (*bla*) en el plásmido pT7Blue(R).
- ❖ Validación del sistema mediante la clonación directa de un fragmento de DNA del gen *crr* del operón del sistema fosfotransferasa (PTS) amplificado por PCR.

4. MATERIAL Y METODOS

❖ Creación del casete ECLHKI e inserción del mismo en el vector pT7Blue(R)

1. Para obtener el casete ECLHKI se diseñaron 2 oligonucleótidos (denominados cade1TA y cade2TA, figura 3) que fueron fosforilados y alineados, para ello se mezclaron:

- 1 μ l de cada iniciador (cade1TA: 423 ng y cade2TA: 423 ng)
- 1 μ l de cinasa (10 unidades)
- 5 μ l de dATP 10 mM
- 5 μ l de amortiguador para cinasa 10X
- 38 μ l de H₂O
- 50 μ l = volumen final de reacción

a) incubar a 37°C por 30 min

b) pasar el tubo a un baño con agua a 80°C, y dejar enfriar hasta que llegue a temperatura ambiente

c) pasar a hielo y ligar con el vector pT7Blue(R).

2. Las reacciones de ligación y de control de la ligación del vector pT7Blue(R) y de sus derivados (tablas I y V, respectivamente), digeridos con las enzimas de restricción adecuadas, se realizaron en una relación de 1:1 ó de 1:2 entre vector e inserto (el tipo de extremos se considero de tipo rasurado)

1.0 μl de buffer 10X para ligasa (200mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM MgCl_2)

0.5 μl de ditiotreititol 100mM (DTT)

0.5 μl de ATP 100mM

X μl de vector-T

0.5 μl de DNA ligasa T4 (2 a 3 unidades)

Y μl del DNA a ligar

Z μl de H_2O

10 μl = volumen final de reacción

Nota: X, Y, y Z se agregarán en función de la concentración deseada de DNA en la reacción, tanto del vector como del fragmento a ligar.

Tabla I

Reacciones de ligación y reacciones de control

# mezcla	DNA del vector T pT7Blue(R)	DNA del casete ECLHKI	Enzima ligasa T4
1	1 μl (50ng)	no	no
2	1 μl (50ng)	no	1 μl (control +)
3	1 μl (50ng)	6 μl (51 ng)	1 μl (muestra)

a) incubar a 16°C durante toda la noche

b) transformar en **células competentes** el volumen total de la mezcla de ligación.

3. La transformación de las mezclas de ligación del punto anterior, en células competentes de *Escherichia coli* cepa **XL1Blue** ($F'::\text{Tn}10$ $proA^+B^+$ $lacI^f$ $\Delta(lac Z)$ $M15/recA1$ $endA1$ $gyrA96(\text{Nal}^r)$ thi $hsdR17(\text{r}_k^- \text{m}_k^+)$ $supE44$ $relA1$ lac), y del DNA de los vectores derivados del plásmido pT7Blue(R), en la cepa antes mencionada y en la cepa **CJ236** (F' cat $dut1$ $ung1$ $thi-1$ $relA1$), se realizó de la siguiente forma:

a) colocar 50 μl de células competentes (tratadas con Ca^{++} , ver apéndice # 1), en un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril frío. Adicionarles de 1 a 10 μl del DNA que se va a transformar

* Como control de las células empleadas en la transformación, éstas se transforman con el mismo volumen que se utilizó de DNA, pero en este caso se usa el buffer en el que esta disuelto éste último (ver el esquema de transformación de las ligaciones y de los controles en la **tabla II**)

b) incubar la mezcla 60 min. en hielo, agitando suavemente cada 10 min., y dar un choque de calor a 42°C durante 1 min.

c) pasar inmediatamente a hielo e incubar por 5 min. más

d) adicionar a la mezcla de transformación 0.5 ml de medio **YT2X** e incubar por 1 hr. a 37°C, en agitación constante (300 rpm)

e) distribuir de 0.1 a 0.2 ml de mezcla de transformación por caja (50 µl cuando se transforma **plásmido superenrollado**). Utilizar el marcador de resistencia adecuado para seleccionar las células transformadas con cada uno de los plásmidos utilizados. En este trabajo se usó como medio de selección el Luria-Bertani (**LB**) con carbenicilina (50 µg/ml), adicionado también con X-Gal e IPTG.

f) el control de las células competentes se diluye hasta 10^{-5} , y se distribuye en medio sin antibiótico para conocer el estado de viabilidad de las células.

Tabla II			
Cepa a transformar XL1Blue	DNA transformante (# mezcla de ligación)	Medio de selección y fenotipo esperado (100µl distribuidos)	
		LB	LBCb₅₀X-Gal e IPTG
50 µl	0	C	N
50 µl	1	-	N
50 µl	2	-	A
50 µl	3	-	A
A: azul N: ninguno - no se distribuyó C: control de viabilidad celular			

NOTA: distribuir es utilizado aquí como sinónimo de platear o plaquear

4. A partir de las células transformantes obtenidas se realiza la **purificación del DNA plasmídico** mediante **lisis alcalina** (Rodríguez, R. L. and Tait, R. C., 1983.) y procedemos de la siguiente manera:

a) se inoculan 3 ml de medio LB con una colonia bacteriana, adicionando el antibiótico de selección adecuado y se incuba toda la noche a 37°C en agitación constante (300 rpm). El cultivo debe llegar a fase estacionaria

b) centrifugar el cultivo de toda la noche en un tubo eppendorf de 1.5 ml durante 30 seg.

c) desechar el sobrenadante y lavar la pastilla resuspendiéndola en 1 ml de **buffer SET helado (solución I)**

d) centrifugar a una velocidad de 12,000 a 14,000 rpm en la micro-centrífuga por 1 min. Quitar el sobrenadante por aspiración para dejar la pastilla de células lo más seca posible y resuspenderla en 150 µl de buffer SET helado, y adicionar 5 µl de Ribonucleasa pancreática A (**RNAsa**) volviendo a mezclar con vortéx

e) agregar 350 µl de **solución de lisis (solución II)** recién preparada y a temperatura ambiente. Cerrar el tubo y mezclar por inversión repetida. Incubar 10 min en hielo

f) agregar 250 µl de solución de **acetato de sodio (solución III)**. Cerrar el tubo y mezclar perfectamente por inversión repetida hasta que desaparezca la viscosidad

g) incubar 30 min en hielo y centrifugar durante 5 min en la micro centrífuga y pasar el sobrenadante (aproximadamente 700 µl) a un tubo eppendorf limpio

h) adicionar un volumen de isopropanol, mezclar invirtiendo el tubo varias veces y centrifugar inmediatamente durante 15 min. Desechar el sobrenadante e invertir el tubo abierto sobre una toalla de papel para secarlo lo mejor posible

i) lavar con 1 ml de etanol al 70% a temperatura ambiente y agitar en el vórtex por un espacio de tiempo breve. Centrifugar por 5 min y desechar el sobrenadante, secando la pastilla a temperatura ambiente o durante 10 minutos en el Savant

j) resuspender la pastilla en 50 μ l de **buffer TE 10/1**, pH 8.

5. Una vez purificado el DNA plasmídico se llevan a cabo las **reacciones de restricción** del pT7Blue(R) y los derivados de este plásmido obtenidos en el presente trabajo. Para ello se mezclaron:

2 μ l del buffer adecuado para cada enzima o enzimas (doble digestión)
2 μ l de albúmina sérica bovina (BSA 100 μ g / μ l) en caso de requerirse
5 μ l de DNA del plásmido purificado por lisis alcalina (40 a 100 ng/ μ l)
X μ l de la enzima conveniente (1 unidad/ μ g de DNA)
Y μ l de agua
20 μ l totales

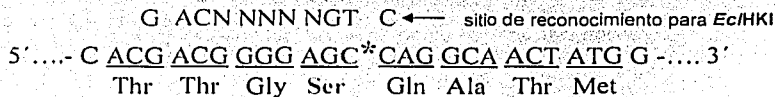
6. Análisis del DNA digerido de los plásmidos utilizados y construidos en este trabajo por patrón de restricción mediante **electroforesis** en gel de agarosa y/o de acrilamida

El volumen total de las reacciones de restricción (200-500 ng de DNA) se cargó en geles de agarosa al 1.2% en **buffer TBE 1X** con pozos de 5 mm de ancho, y se corrió a 100-120 V de corriente

Al terminar la electroforesis se tiñe con una solución diluida de bromuro de etidio 1:100 por 10 segundos y se observan en el transiluminador de luz ultravioleta. Siempre se usó como marcador de tamaño molecular la llamada escalera de 1 Kb.

- ❖ **Eliminación del sitio de restricción adicional *Ec/HKI* presente en el vector pT7Blue(R) y en su derivado pTA5 (lleva insertado el casete ECLHKI)**

Para lograrlo se diseñó un **oligonucleótido** de 26 bases que se llamó **KI-Ap^R** con la siguiente secuencia:



Este oligonucleótido sólo lleva un cambio, de una timina por una citosina * en la tercera posición del codón que codifica para serina (AGT), y que al hibridar con el DNA del plásmido pTA5, corresponde al sitio 1662 de su secuencia. Esta sustitución no altera el marco de lectura del gen *bla*, aunque sí elimina el sitio de restricción para la enzima *Ec/HKI* localizado alrededor de este codón, y esto es precisamente lo que se pretende. La mutación dirigida de este nucleótido (T) es muy importante ya que permite tener solamente dos sitios de restricción para la enzima mencionada, situados precisamente en el casete ECLHKI que lleva insertado este vector pTA5, derivado del pT7Blue(R). Una vez lograda la mutación se puede escindir el casete mediante la restricción del nuevo plásmido, así generado, con la enzima *Ec/HKI* para obtener el vector T deseado.

7. El oligonucleótido KI-Ap^R fue utilizado para obtener el cambio de base mencionado por medio de **mutagénesis sitio dirigida** (Kunkel, T. A. *et al.*, 1991). El procedimiento es el siguiente:

A. Preparación de DNA templado de cadena sencilla

1. **Transformar** 1 µl de DNA de cadena sencilla o doble del plásmido a mutagenizar (pTA5) en células competentes de *E. coli* **CJ236** y distribuir en

medio LB + carbenicilina (50 µg/ml) + cloranfenicol (10 µg/ml), siguiendo el esquema de la tabla que a continuación se presenta:

Tabla III					
Cepa a transformar CJ236	DNA transformante pTA5	Medio de selección y fenotipo esperado (100 µl distribuidos)			
		LB	LB+Cm ₁₀	LB+Cb ₅₀	LB+Cm ₁₀ Cb ₅₀
50 µl	no	C	B	N	N
50 µl	1 µl (75 ng)	-	B	B	B
B: blanco N: ninguno - no se distribuyó C: control de viabilidad celular					

2. De las transformantes obtenidas, escoger una colonia para preparar DNA de cadena sencilla con dU, inocularla en 25 ml de medio YT2X, agregar 1 ml de fago ayudador KO7, y el o los antibióticos requeridos: en este caso los mismos que en el punto anterior

a) incubar toda la noche a 37°C en agitación constante (300 rpm)

b) centrifugar 10 min a 10,000 g y a 4°C. Recuperar el sobrenadante y precipitar con 1/5 de volumen de solución PEG 8000/NaCl 0.5 M durante 1 hr. a temperatura ambiente

c) centrifugar 10 min a 10,000 g y 4°C. Desechar el sobrenadante y resuspender en 1 ml de **buffer STE**. Pasar a un tubo eppendorf de 1.5 ml y repetir la precipitación durante 20 min. Resuspender en 0.6 ml de buffer STE con 0.1 mg/ml de RNAasa A.

3. Extraer la solución del fago 3 veces con fenol:cloroformo (1:1 v/v) centrifugando a 3,000 rpm por 5 min y recuperar la fase acuosa.

4. Después agregar al sobrenadante 1/4 de volumen de acetato de amonio 8 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Dejarlo de 10 a 20 min. a temperatura ambiente y centrifugar a 1,4000 rpm por 15 min.

5. Lavar la pastilla de DNA de cadena sencilla con etanol frío al 70% y secarlo en el Savant. Resuspender en 50 μ l de buffer TE 10/1 pH 8.

B. Fosforilación del oligonucleótido KI-Ap^R

a) mezclar en un tubo eppendorf de 0.6 ml:

7 μ l de oligonucleótido KI-Ap^R (291 ng/ μ l)
3 μ l de buffer cinasa 10X
1 μ l de ATP 10 mM
20 μ l de H₂O
1 μ l de polinucleótido cinasa (10 unidades)
32 μ l

b) incubar durante 1 hr. a 37°C y congelar los productos durante toda la noche o continuar de inmediato.

C. Alineamiento del oligonucleótido y reacción de llenado

a) mezclar en un tubo eppendorf de 0.6 ml:

32 μ l de H₂O
2 μ l de dNTPs 2.5 mM
2 μ l de ATP 10 mM
5 μ l de buffer 10X
4 μ l de DNA templado de cadena sencilla/dU (pTA5: 160 ng)
4 μ l de solución de **oligonucleótido fosforilado** (cinado, 37 ng)
49 μ l

- b) calentar a 80°C por 5-10 min. en un baño de agua y dejar enfriar hasta temperatura ambiente. Enfriar en hielo antes de adicionar las enzimas
- c) agregar en hielo 1 μ l de DNA ligasa T4 concentrada (40 unidades)
- d) agregar en hielo 1 μ l de DNA polimerasa T7 (2 unidades)
- e) dejar a temperatura ambiente por 1 hr. y después a 4°C durante toda la noche
- f) llevar el volumen a 150 μ l con buffer TE 10/1 y congelar o continuar.

D. Extracción de DNA de cadena sencilla para transformación

- a) extraer de 2 a 3 veces con 1/2 de volumen de fenol:cloroformo en proporción 1:1 v/v
- b) agregar 1/4 de volumen de acetato de amonio 8M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Incubar a temperatura ambiente por 1 hr.
- c) centrifugar en la micro-centrífuga por 5 min., desechar el sobrenadante y lavar con 0.5 ml de etanol frío al 70%. Centrifugar por 3 min. y desechar el sobrenadante, secar la pastilla de DNA de cadena sencilla. Resuspender en 20 μ l de buffer TE 10/1.

8. Transformación mediante electroporación del DNA de cadena sencilla mutagenizado del vector pTA5 en células electrocompetentes de *E. coli* XL1Blue:

- a) colocar 50 μ l de células electrocompetentes en tubos eppendorf de 0.5 ml fríos y adicionar de 1-5 μ l del DNA que se va a transformar, ver **tabla IV**
- b) mezclar bien y pasar a celdas de electroporación frías, de 2.0 mm y electroporar a 2.5 KV, 25 μ Fa de capacitancia, y 200 Ω de resistencia

c) agregar inmediatamente 1 ml de **medio SOC** a las células electroporadas y pasar con pipeta Pasteur a un tubo de ensaye estéril e incubar durante 1 hr. a 37 °C en agitación constante (300 rpm).

Cepa a transformar XL1Blue	DNA a transformar pTA5 mutagenizado	Medio de selección y fenotipo esperado (50 µl distribuidos)			
		LB	LBT _{c30}	LBC _{b50}	LBT _{c30} Cb ₅₀
50 µl	no	C	B	N	N
50 µl	5 µl (375 ng)	-	-	B	N

B: blanco N: ninguno - no se distribuyó
C: control de viabilidad celular

❖ Validación del vector construido

1. La **preparación del DNA del plásmido pTA57** (así denominado después de obtenerlo mediante mutagénesis sitio dirigida) por escisión del casete ECLHKI insertado en este vector, utilizando la enzima de restricción *Ec/HKI*, a fin de dejarlo con timidinas 3' salientes en ambas cadenas del DNA, se hizo de la siguiente forma:

- 21 µl de agua
- 3 µl de buffer E 10X
- 5 µl de DNA del plásmido pTA57 (150 ng/µl)
- 1 µl de enzima *Ec/HKI* (10 u/µl)
- 30 µl totales

a) una vez restringido el DNA del vector, éste se ligó al fragmento de PCR, poniendo los controles convenientes como se esquematiza en la **tabla V** de la siguiente página.

Reacciones de ligación y reacciones control			
# mezcla de ligación	DNA digerido del vector T pTA57	DNA fragmento de PCR (\approx 480 pb)	Enzima ligasa T 4
4	no	1 μ l	no
5	1 μ l (25 ng)	no	no (control -)
6	1 μ l (25 ng)	no	1 μ l (control +)
7	1 μ l (25 ng)	1 μ l (175 ng)	1 μ l (muestra)
8	1 μ l (25 ng)	1 μ l (175 ng)	2 μ l (muestra)

El volumen total de las mezclas de ligación anteriores se transformó en células competentes de *E. coli* XL1Blue y se distribuyó en medio LB con carbenicilina (50 μ g/ml), X-Gal e IPTG, ver **tabla VI**

Cepa a transformar XL1Blue	DNA transformante (# de mezcla de ligación)	Medio de selección y fenotipo esperado (100 μ l distribuidos)		
		LB	LBCb ₅₀	LBCb ₅₀ X-Gal e IPTG
50 μ l	0	C	N	N (d = sensibilidad)
50 μ l	4	-	N	N (d = pureza)
50 μ l	5	-	N	N (d =control negativo)
50 μ l	6	-	B	A (d = eficiencia)
50 μ l	7	-	B	B
50 μ l	8	-	B	B
A: azul B: blanco d. : control		- no se distribuyó		
C: control de viabilidad celular		N: ninguno		

2. Debido a que se presentaron inconvenientes con respecto a la purificación del vector pTA57, mediante lisis alcalina, que afectaron la transformación de las mezclas de ligación anteriores se decidió hacer una **purificación** adicional del fragmento de DNA digerido, correspondiente al vector **pTA57** con timidinas salientes, de la siguiente forma:

a) para purificar el DNA del vector, se cargó el volumen total de la reacción de restricción (30 μ l) en un gel preparativo de agarosa al 1.5% en **buffer TAE 1X** pH 8 y se corrió por electroforesis a 100 V de corriente para lograr la separación de las bandas correspondientes al plásmido pTA57 y la del casete ECLHKI escindido durante la restricción enzimática

b) se procedió a cortar la banda de DNA del vector pTA57 con timidinas 3' salientes del gel, ésta se maceró en un tubo eppendorf de 1.5 ml, y se adicionaron 100 μ l de fenol por cada 0.1 gr de peso de agarosa del gel y se mezcló usando el vortéx por 10 seg.

c) congelar a -70°C de 5 a 15 min. Centrifugar por 15 min. a 14,000 rpm y pasar el sobrenadante que contiene el DNA a un tubo limpio y extraerlo dos veces con un volumen equivalente de fenol y volver a centrifugar de 3 a 5 min.

d) precipitar el DNA con 1 ml de etanol absoluto frío y 15 μ l de cloruro de sodio 5M por cada 100 μ l de sobrenadante. Centrifugar 10 min. y lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 70%, secar la pastilla de DNA y resuspender en buffer TE 10/1 pH 8. De esta forma el vector-T (pTA57) queda listo para insertarle directamente productos generados por PCR, mediante el proceso de ligación de la forma en que se esquematizó en la **tabla VI**.

Entonces a partir de las transformantes obtenidas se escogieron colonias recombinantes al azar (fenotipo azul y resistentes a carbenicilina) para seleccionar aquellos plásmidos que llevaran clonado el casete, para esto se purificó el DNA plasmídico y se restringió con la enzima *Ecl*/HKI. Con el análisis del patrón de restricción, después de correr una electroforesis, se observó que 4 de los 9 plásmidos purificados tenían el patrón esperado (**figura 5**: carriles 1, 4 y 5 y 8), es decir, presentan tres fragmentos de DNA, dos de ellos visibles de 1538 y 1386 pb; el tercero no se aprecia porque es muy pequeño, sólo tiene 47 pb (**figuras 4 y 5**) mientras que, en el carril 10 aparece el DNA del vector original, pT7Blue(R), digerido con la misma enzima, el cual únicamente tiene un sitio de reconocimiento para la enzima *Ecl*/HKI, de tal forma que se obtiene solamente un fragmento de 2887 pb, que corresponde al vector linearizado, éste último demuestra que se logró la clonación del casete en el vector. Además hizo la restricción de 3 de estos plásmidos con la enzima *Eco*RV (**figura 6**), ya que en el casete **ECLHKI** existe un sitio de reconocimiento para ésta, confirmando así también la inclusión del casete en el vector.

De los **plásmidos** obtenidos en la **primera selección** que presentaron clonado el casete, se **escogió el número 5 (figuras 5 y 6)** para continuar con el proyecto; a partir de aquí se le llamó **pTA5**, éste se muestra en la **figura 7**. Debido a que en el vector original pT7Blue(R), existe un **sitio de restricción *Ecl*/HKI** en la **posición 1658**, y por consiguiente en su derivado pTA5 (en este caso en la **posición 1718**), en la secuencia del gen *bla* (que codifica para la β -lactamasa y por tanto confiere resistencia a ampicilina, ver **figuras 4 y 7**) fue necesario eliminarlo porque interfería con la preparación del vector T, pues lo que se pretende es que al digerir al vector pTA5 con la enzima *Ecl*/HKI se escinda únicamente el casete y de esta forma quede listo el plásmido con las timidinas 3' salientes necesarias para la clonación directa de productos de PCR. El **sitio** en cuestión fue **eliminado** por medio de **mutagénesis sitio dirigida**. Para esto, se diseñó un **oligonucleótido** con una longitud de **26 nucleótidos**, su secuencia puede verse en los materiales y métodos (página 22).

De las colonias Cm^R y Cb^R se seleccionó una para preparar DNA d/U de cadena sencilla del plásmido pTA5, a partir del **origen de replicación f1** (proveniente del fago M13) incluido en el vector (**figura 7**), para ello se utilizó el fago ayudador KO7 (ver materiales y métodos, página 23), el cual empaqueta la cadena (+) del vector, ésta cadena lleva uracilos en lugar de timinas; el fago es extraído de las células y el **DNA de cadena sencilla** del pTA5 es obtenido mediante extracción con fenol cloroformo. Este DNA d/U purificado se fosforiló para ser usado como templado y así polimerizar la cadena complementaria del pTA5, para realizarlo, éste DNA se alineó con el **oligonucleótido KI-Ap^R (hibridación)** que funciona como iniciador, de esta forma se obtiene la cadena que lleva el cambio de base (incluido en el oligonucleótido) puesto que la cadena que contiene los uracilos es degradada. A partir de aquí se extrae el **DNA mutagenizado** de cadena sencilla del vector pTA5 (pTA5_m), el cual se transformó por electroporación en células competentes de la cepa XL1Blue obteniendo los siguientes resultados:

Tabla IV (ver material y métodos)					
Cepa a transformar XL1Blue	DNA transformante pTA5 _m	Medio de selección # de colonias y fenotipo (100 µl distribuidos)			
		LB	LBTc ₃₀	LB Cb ₅₀	LB Tc ₃₀ Cb ₅₀
50 µl	-	C= 2355	B= 2024	0	0
50 µl	5 µl	-	-	B= 72	B= 60
B: blanco		- no se distribuyó			
C= control de viabilidad celular					

Se seleccionaron algunas transformantes Tc^R Cb^R y fueron sembradas en el mismo medio utilizado, adicionado ahora con X-Gal e IPTG para comprobar si conservaban el fenotipo azul. Esto corroboraría que la mutagénesis no alteró el marco de lectura; todas las transformantes resultaron ser de color azul. Se escogieron las colonias numeradas con el 1, 3, y 7, para purificar DNA de plásmido y analizarlo por patrón de restricción y comprobar que presentaran el patrón esperado. Para llevar a cabo este análisis se escogieron las enzimas de restricción *SspI* y *Ecl/HKI*. Para la primera enzima

hay dos sitios de reconocimiento en las posiciones 360 y 913 y para *Ec/HKI*, si la mutagénesis sitio dirigida tuvo éxito, también hay dos sitios en las posiciones 102 y 149 (**figura 7**), el patrón de restricción es el siguiente:

- 1 banda *Ec/HKI* de 47 pb
- 1 banda *Ec/HKI-SspI* de 211 pb
- 1 banda *SspI* de 553 pb
- 1 banda *SspI-Ec/HKI* de 2136 pb

Uno de los tres plásmidos purificados tuvo el patrón esperado (**figura 8**: carril 5), el fragmento de 47 pb no se ve en el gel por ser muy pequeño, pero con esto se demuestra que sí se eliminó el sitio de restricción deseado, y esto se corrobora al comparar el patrón de restricción de éste último vector (denominado ahora **pTA57**) con el del plásmido pTA5. La digestión del plásmido original con las mismas enzimas produce cinco fragmentos de 1331, 805, 553, 211, y 47 pb (**figura 8**, carril 2), esto es lo esperado puesto que el pTA5 tiene un sitio de restricción más para la enzima *Ec/HKI* en la posición 1718 (**figura 7**). El plásmido **pTA57** sólo tiene dos secuencias de reconocimiento para la enzima *Ec/HKI* y son justamente las que se incluyeron en el casete diseñado (**figura 9**).

Para validar el nuevo vector T construido como sistema de **clonación directa** para fragmentos amplificados por PCR, se preparó DNA del vector dTs pTA57 (**figura 9**), el plásmido se digirió con la enzima *Ec/HKI* con el fin de escindir el casete del mismo nombre y tener listo el vector con las timidinas 3'salientes en ambas cadenas de DNA. Este vector se ligó con un fragmento del gen *err* (operón del sistema fosfotransferasa, PTS) de aproximadamente 480 pb, amplificado por PCR (**figuras 9 y 10**). Esta mezcla de ligación fue transformada en la cepa XL1Blue. En una primera transformación sólo se obtuvieron colonias azules, debido a que había DNA de cadena sencilla (**figura 11**) por lo que se decidió realizar una purificación adicional de DNA del vector pTA57 a partir de un gel de agarosa (**figura 12**). El vector fue, ligado nuevamente al fragmento mencionado y transformado una vez más en la cepa XL1Blue siguiendo el esquema de la **tabla VI** (ver tabla V de material y métodos, para identificar las mezclas de ligación). Los resultados que se obtuvieron son los siguientes:

Tabla VI				
Cepa transformada XL1Blue	DNA transformante (# mezcla de ligación)	Medio de selección # de colonias y fenotipo (100 μ l distribuidos)		
		LB	LBCb ₅₀	LB Tc ₃₀ Cb ₅₀ X-Gal e IPTG
50 μ l	0	C=2031	0	0
50 μ l	4	-	0	0
50 μ l	5	-	0	0
50 μ l	6	-	B=895	A=773
50 μ l	7	-	B=917	A=867
50 μ l	8	-	B=934	A=728 B=2
B: blanco A: azul - no se distribuyó C= control de viabilidad celular				

De esta última transformación se seleccionaron las colonias Tc^R Cb^R con fenotipo blanco (recombinantes) ya que son las que llevan el plásmido pTA57 con el inserto clonado, el color blanco se debe a que el marco de lectura de la subunidad α del gen *lacZ* es alterado por la clonación del fragmento mencionado anteriormente.

Finalmente se extrajo el DNA plasmídico de estas colonias blancas y se hizo el análisis por medio de su restricción con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* para comprobar que sí llevaban clonado el inserto, con esta digestión se obtuvieron dos fragmentos, uno de 2825 pb y otro de 555 pb como se esperaba (**figura 13**) certificando así que el vector pTA57 funciona como sistema de clonación directa para productos amplificados por PCR. El DNA plasmídico de una de las dos colonias recombinantes (**figura 13**: carril 3) no perdió el casete ECLHKI y por ello después de restringirlo aparece un fragmento que migra aproximadamente a los 600 pb.

6. DISCUSION Y CONCLUSION

Con los oligonucleótidos autocomplementarios cade1TA y cade2TA se logró obtener el casete ECLHKI con una dA saliente en cada extremo, su clonación en el vector TA pT7Blue(R) no alteró el frente de lectura abierto de *Lac Z* en el plásmido, obteniéndose así el vector derivado pTA5, que tras ser retransformado produce colonias azules y resistentes a carbenicilina. La eliminación del sitio adicional de reconocimiento para la enzima *Ecl*/HKI existente en el gen *bla* incluido en el plásmido pTA5 permite generar un vector con extremos T 3' salientes (llamado pTA57) para la clonación de productos amplificados por la PCR cuando se restringe precisamente con la enzima *Ecl*/HKI pues con ello se escinde únicamente el casete ECLHKI

En la transformación de las células XL1Blue con el vector pTA57 ligado al fragmento del gen *arr* amplificado por la PCR se presentó siempre un fondo elevado de colonias con fenotipo azul (plásmido sin inserto), desde el principio se pensó que podría deberse a que el DNA de cadena sencilla del vector era más bien lo que estaba transformando. El por qué del fenotipo azul en todas las colonias se debió precisamente a la presencia de DNA de cadena sencilla producido por el vector, este tipo de ácido nucleico aparece como una banda por abajo del DNA superenrollado del vector purificado por lisis alcalina cuando se corre por electroforesis en gel (**figura 11**), además este tipo de DNA tiene una gran capacidad de transformación y por eso se obtienen solamente colonias sin inserto.

Recientemente se demostró que ese fragmento "fantasma" no es resultado de la cepa hospedera, ya que se creía que al existir fagos integrados en el cromosoma de las bacterias, y que como algunos de ellos son muy semejantes al fago M13, se estuviese expresando una proteína que reconociera el sitio de replicación *f1* (proveniente del M13) y que entonces el vector entraba a la fase de replicación de DNA de cadena sencilla, la causa real de esto es más bien una cuestión de tipo metodológico, es decir, es el resultado de la lisis alcalina de las bacterias, lo cual fue demostrado recientemente por Sayers, et al. 1996.

Debido a lo anterior fue necesario purificar el DNA del nuevo vector T pTA57, restringido con la enzima *Ec/HKI*, a partir de un gel preparativo (figura 12) mediante el corte de la banda de DNA correspondiente al vector con las T 3' salientes, con el fin de evitar el fondo de colonias azules producido por el DNA de cadena sencilla. Aún cuando se procedió de esa manera, la transformación de la mezcla de la reacción de ligación del vector con el fragmento generado por PCR presentó un fondo de colonias con fenotipo azul, que si bien fue menor al ocurrido anteriormente, no fue el esperado ya que únicamente hubo dos colonias recombinantes (fenotipo blanco), es decir, la eficiencia de clonación del inserto fue muy baja, esto se debe posiblemente a que el DNA purificado por lisis alcalina este demasiado sucio (residuos de fenol presentes) lo cual limita la restricción y como consecuencia se obtuvo un vector parcialmente digerido, es decir la enzima de restricción *Ec/HKI* solamente cortó en un sitio y entonces el casete ECLHKI no fue escindido del vector pTA57, por esto durante la reacción de ligación resultó más probable y sencilla la ligación del vector sobre sí mismo que la ligación del fragmento de PCR con el vector debido a la falta de un segundo extremo con una T 3' saliente en el vector que fuera complementaria a la dA del producto amplificado. Para comprobar si el casete es escindido o no del vector puede hacerse un análisis de restricción con la enzima *EcoRV* cuyo sitio de reconocimiento se encuentra localizado en la región de Tet del pBR322 utilizada para separar los dos sitios para *EclHKI*. Esto de hecho fue realizado con el DNA plasmídico proveniente de las colonias azules de la última transformación, con lo cual se concluyó que únicamente hubo digestión parcial del vector, ya que éste fue linearizado al cortarlo con la enzima *EcoRV* (figura 14)

Por otra parte no se intentó optimizar las eficiencias de ligación y de transformación con el vector derivado pTA57 obtenido en este trabajo. Solamente se comprobó que éste sistema funciona para la clonación de secuencias de DNA amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando una enzima que adicione un residuo de desoxiadenosina en sus extremos, tal como la DNA *Taq* polimerasa. A pesar de que el sistema fue probado con la clonación de un fragmento solamente, éste vehículo sirve para clonar cualquier fragmento amplificado por la PCR.

Este vector además de facilitar la clonación de productos amplificados asegura que, después de su digestión total, todas las moléculas del plásmido lleven timidinas 3' salientes estables, a diferencia de los vectores comerciales usados para el mismo fin, ya que durante la preparación de éstos últimos no se asegura que por medio de la actividad transferasa independiente de templado de la DNA *Taq* polimerasa se adicione dichos residuos en todos los extremos y moléculas del vector. Los extremos T 3' salientes facilitan la clonación de los fragmentos amplificados por PCR al no permitir la autoligación del vector cuando el casete ECLHKL es escindido.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

secuencia del vector pT7Blue(R)

5' ... tgg atT ... 3'
3' ... acc ta ... 5'

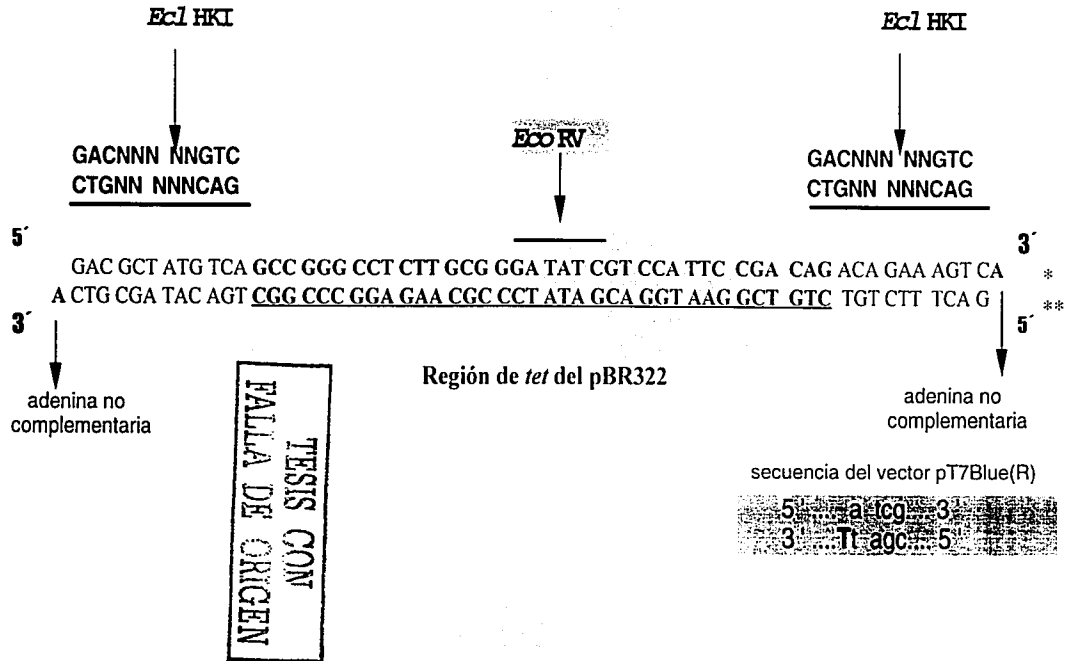


Figura 3. Casete ECLHKL obtenido después de clonar y alinear los oligonucleótidos cade1TA * y cade2TA**.

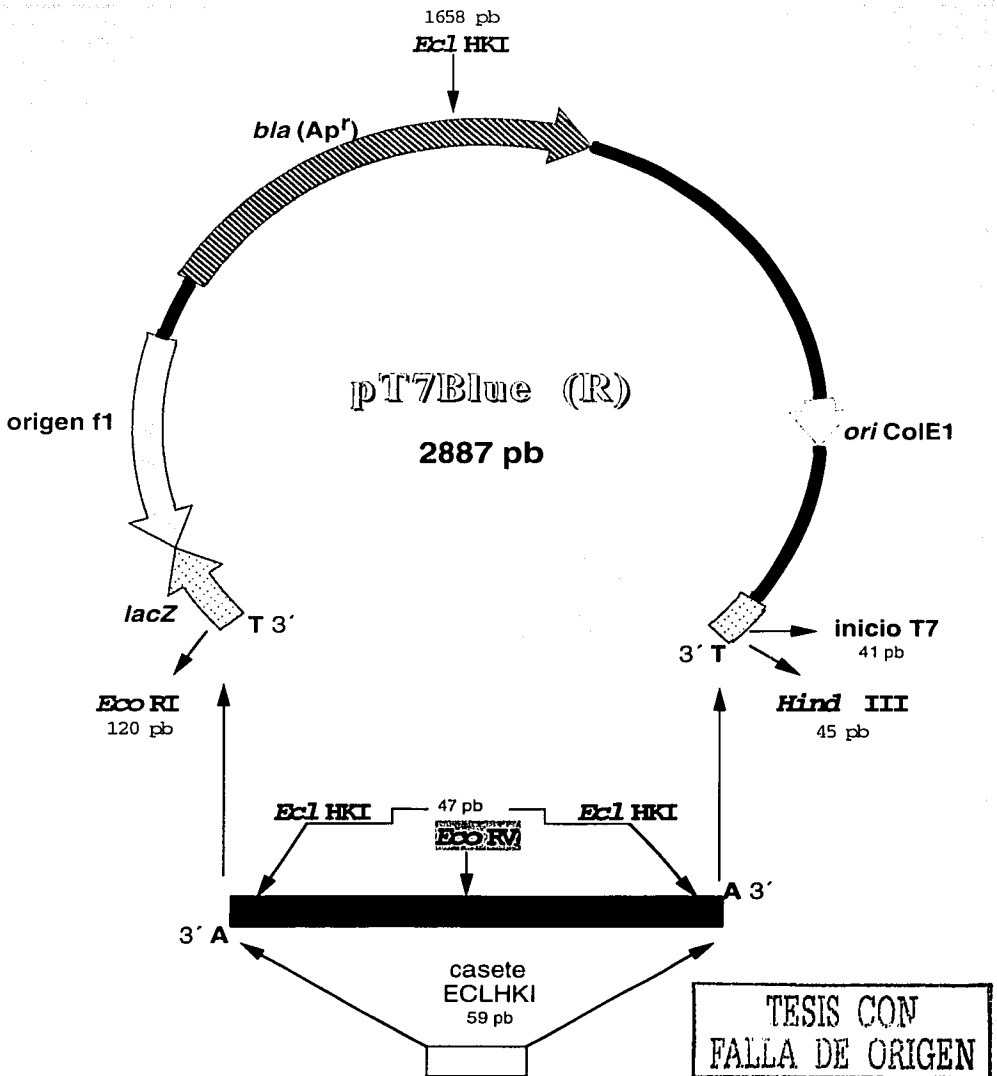
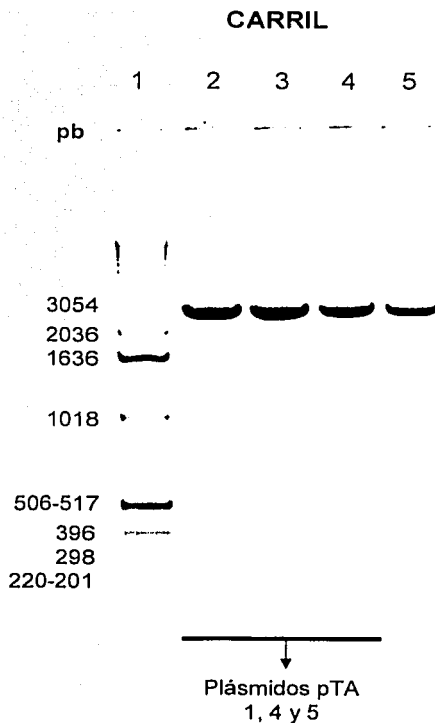


Figura 4. Esquema de ligación del casete ECLHKI en el vector pT7Blue(R).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 6. Restricción con la enzima *EcoRV* del DNA de los plásmidos derivados del pT7Blue (R) y que llevan clonado el casete *ECLHK1*. Carril 1: marcador de tamaño molecular. Carriles 2-4 (plásmidos derivados 1, 4 y 5) Carril 5: pT7 Blue (R).

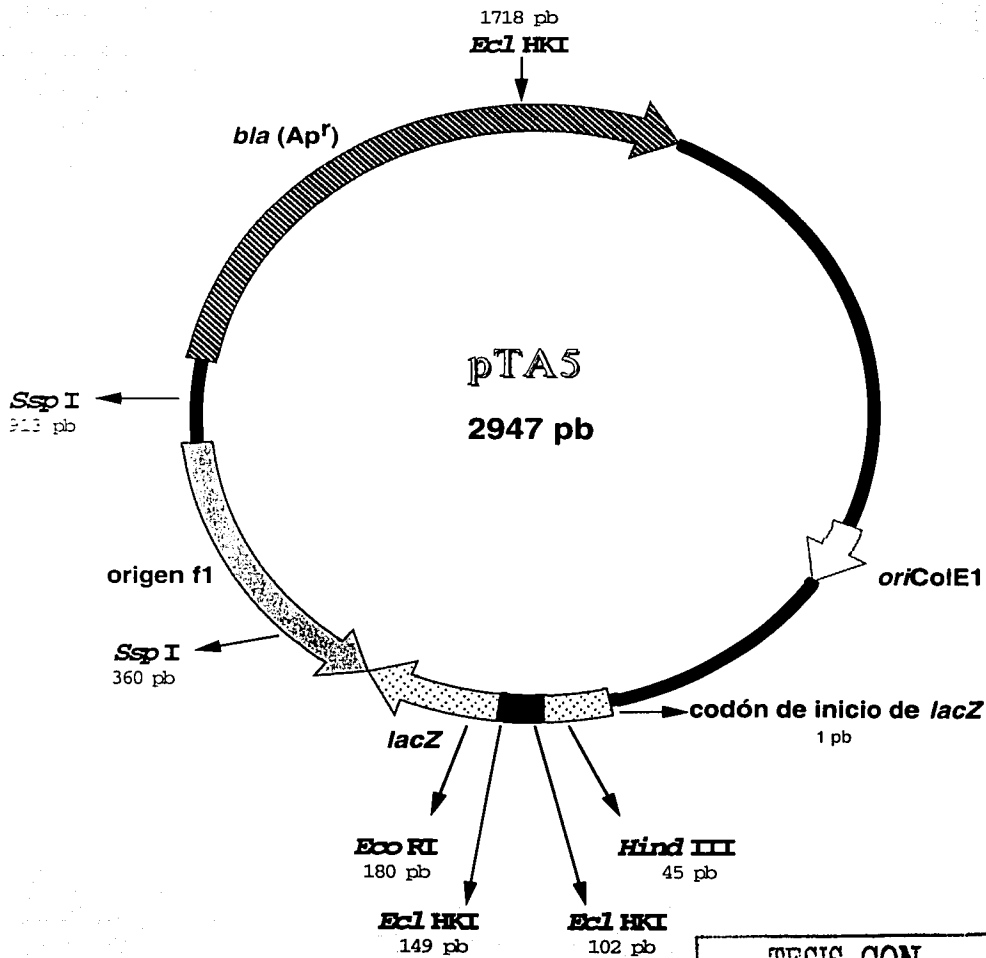


Figura 7. El vector seleccionado (pTA5) con el casete ECLHKI ya clonado.

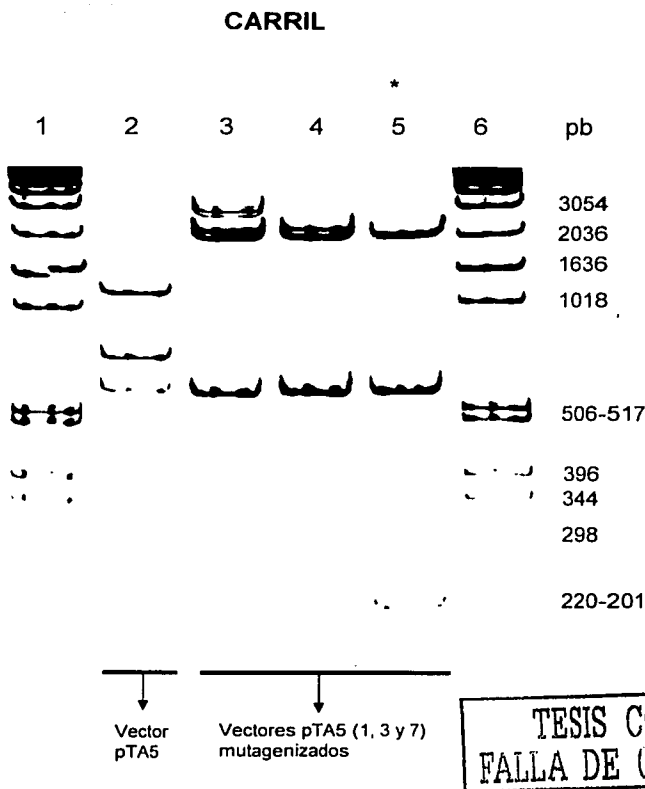


Figura 8. Gel nativo de acrilamida al 8%: se pueden apreciar los fragmentos de DNA producidos por la doble digestión con las enzimas de restricción *Ecl*/H₁K₁ y *Ssp*I. Carril 2: plásmido pTA5. Carriles 3-5: plásmidos pTA5 sin el sitio de restricción adicional para *Ecl*/H₁K₁ en la posición 1658 pb en el gen *bla*.

* Plásmido seleccionado

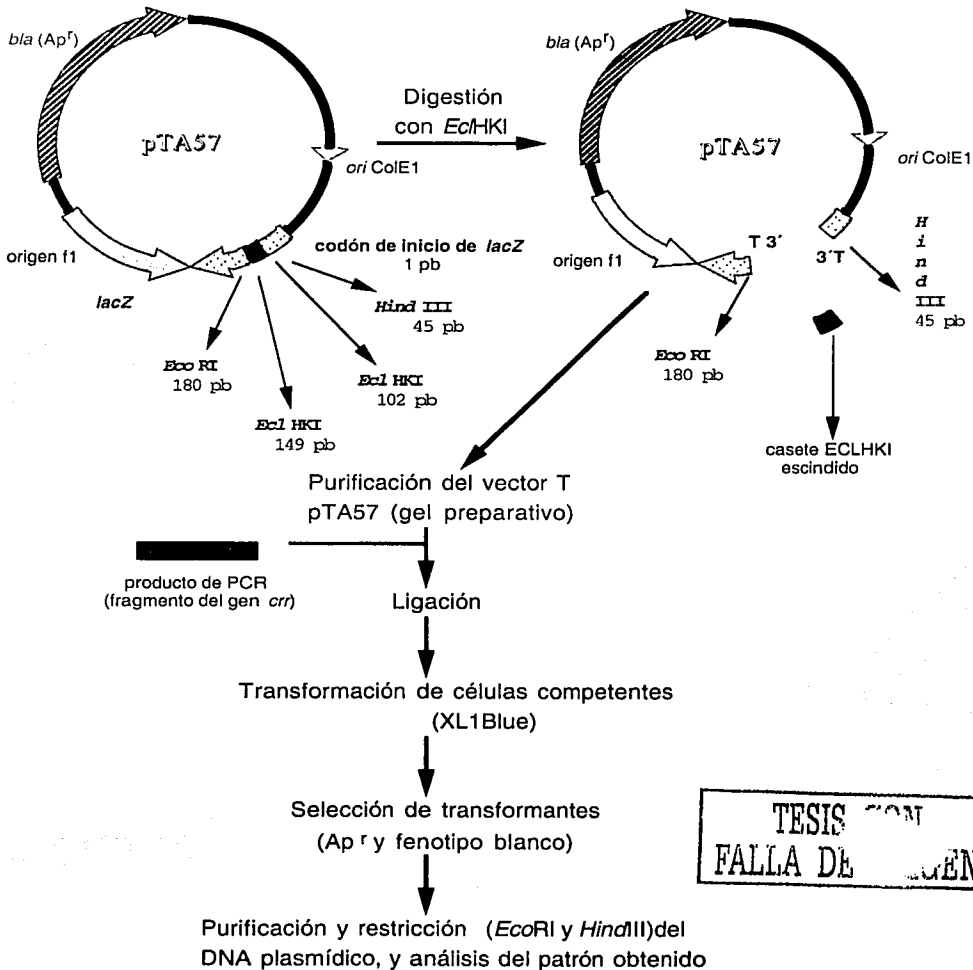
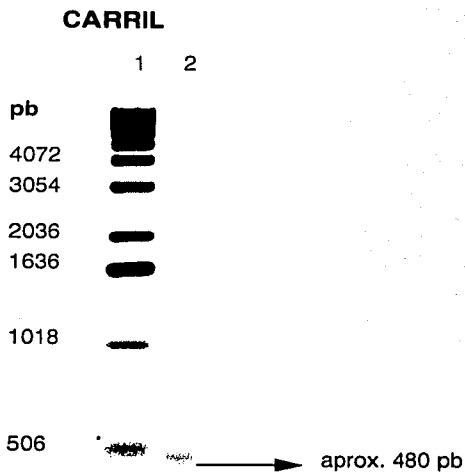
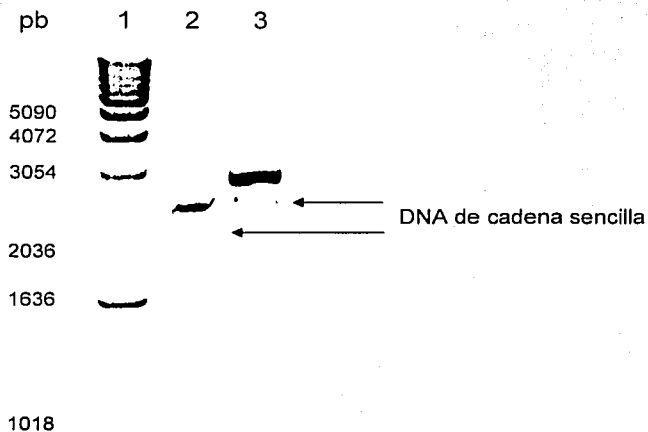


Figura 9. Diagrama de flujo de la clonación directa del producto de PCR en el vector pTA57 (validación del sistema).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 10. Carril 1: marcador de tamaño molecular 1 Kb. Carril 2: DNA amplificado por PCR (fragmento del gen *crr*, operón del sistema fosfotransferasa o PTS)



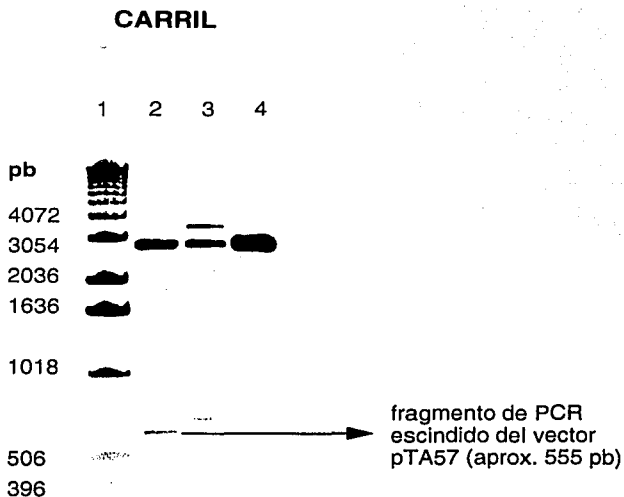
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 11. Se observa el DNA de cadena sencilla del plásmido pTA57 purificado de colonias con fenotipo azul. Carril 1: Marcador de tamaño molecular. Carril 2 y 3: pTA57 sin digerir y digerido con la enzima *Eco*HKI, respectivamente



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 12. Carril 1: marcador de tamaño molecular. Carril 2: DNA del plásmido pTA57 restringido con la enzima *EcH*KI y purificado mediante extracción en gel preparativo.



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 13. Carril 1: marcador de tamaño molecular 1 Kb. Carril 2: DNA del plásmido pTA57 + inserto de PCR (purificado de una colonia transformante, fenotipo blanco). Carril 3: vector pTA57 + doble inserto de PCR (purificado de otra colonia recombinante). Carril 4: vector pTA57. En todos los casos el vector fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

7. APENDICE 1 (preparación de soluciones y medios)

❖ Preparación de células competentes XL1Blue tratadas con calcio

- a) inocular 25 ml de LB con la cepa a transformar e incubar toda la noche a 37°C y 300 rpm
- b) inocular 1000 ml de medio Luria con el cultivo de toda la noche y crecer a 37°C hasta una densidad de 0.6 DO a 560 nm (fase exponencial). Esta se alcanza en 2.5 hrs. aproximadamente
- c) obtener las células por centrifugación durante 5 min a 5,000 rpm (3840 g) y 4°C
- d) desechar el sobrenadante y lavar la pastilla de células con 400 ml de CaCl

❖ Preparación de medios de cultivo y cajas de Petri con medio sólido

Medio Luria-Bertani (100 ml)

Extracto de levadura	0.5 g
Bactotripton	1.0 g
NaCl	1.0 g

Medio YT2X (100 ml)

Extracto de bacto-levadura	1.0 g
Bactotripton	1.6 g
NaCl	0.5 g

Disolver los solutos en H₂O desionizada, en los dos casos se debe ajustar a pH 7.0 con NaOH 5N, y esterilizar durante 20 minutos a 1Kg/cm²

Para el medio sólido agregar 1.5 g de bacto-agar por cada 100 ml

Medio SOB (100 ml)

H ₂ O	95 ml
bacto triptona	2 g
extracto de bacto levadura	0.5 g
NaCl	0.5 g

Una vez disueltos los solutos adicionar 1 ml de KCl 250 mM. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5N. Ajustar volumen a 100 ml y esterilizar. Justo antes de usarlo se agregan 0.5 ml de una solución estéril de MgCl₂

Medio SOC (adicionar 2 ml de glucosa 1 M en 100 ml de **medio SOB**)

❖ Antibióticos de selección

carbenicilina (50 mg/ml)
tetraciclina (30 mg/ml)

Las soluciones de antibióticos disueltos en H₂O deben ser esterilizadas por filtración a través de un filtro de 0.22 µm

❖ Sustrato cromogénico e inductor del operón *LacZ*

X-gal (solución 20mg/ml disuelto en dimetilformamida)

Usar tubo de vidrio de polipropileno, envolver en aluminio, y almacenar a -20°C, no se necesita esterilizar por filtración.

IPTG (10 ml)

IPTG 2 g
H₂O cbp 10 ml

Disolver el IPTG y ajustar con agua a 10 ml, esterilizar con filtro de 0.22 μ l, y almacenar a almacenar a -20°C

❖ Preparación de soluciones para la lisis alcalina

* Buffer SET (solución I: sacarosa 20%, EDTA 50 mM; Tris-HCl 50 mM, pH 7.6)

* RNAsa 10 mg/ml; acetato de sodio 100 mM; EDTA 0.3 mM, pH 4.8

* Solución de lisis (solución II: SDS 1%; NaOH 0.2 N)

* Solución de acetato de sodio (solución III 3 M, pH 4.8)

❖ Preparación de buffers

* Buffer TE 10/1 pH 8 (Tris · Cl 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM pH 8)

* Buffer TBE 1X (100 ml de solución concentrada 5X: 5.4 g Tris base; 2.75 ml ácido bórico; 2 ml EDTA 0.5 M, pH 8)

* Buffer TAE 1X (100 ml solución concentrada 50x: 24.2 g Tris base; 5.71 ml ácido acético glacial; 10 ml EDTA 0.5 M, pH 8)

Buffer STE (Tris HCl pH 8/EDTA 1 mM/NaCl 100 mM)

8. APENDICE 2 (Glosario de términos)

- **Actividad exonucleasa 3' - 5'**: Es la capacidad de algunas enzimas DNA polimerasas para corregir la adición errónea de nucleótidos durante la síntesis de nuevas cadenas de DNA, la dirección de edición se da en sentido contrario a la de polimerización, i.e., de 3' a 5'. Esta actividad solo rompe enlaces fosfodiéster en regiones de bases apareadas, liberando mononucleótidos. Por tanto las DNA polimerasas que poseen esta actividad tienen tasas de error mucho menores, comparadas con las enzimas que no la poseen, esta característica es muy importante de tomar en cuenta cuando se pretende clonar secuencias de ácidos nucleicos.
- **Alineamiento o hibridación (fase 2 en PCR)**: Una vez que el DNA de doble cadena ha sido desnaturalizado (separado en cadenas sencillas), queda expuesta la secuencia de bases que lo componen. Entonces se disminuye la temperatura para permitir que los iniciadores aparezcan y formen nuevos enlaces con las secuencias que les son complementarias en las cadenas abiertas del DNA. La temperatura de alineamiento depende del tamaño y composición de bases de los iniciadores
- **Carbencilina**: Es una carboxipenicilina sintética con actividad antimicrobiana para organismos Gram-negativos
- **Células competentes**: El término competente se refiere al estado fisiológico de las células bacterianas en el que éstas tienen la capacidad para unir e introducir DNA exógeno, como el de plásmidos. El tratamiento de células de *E. coli* con metales divalentes, las hace competentes para tomar DNA de plásmidos: La combinación de calcio, manganeso y rubidio permite obtener del orden de 10^3 a 10^4 células transformadas por ng de plásmido
- **Ciclos (PCR)**: Después del primer ciclo de PCR, el fragmento deseado de DNA aún no tiene el tamaño correcto, debido a que cada iniciador se une a su secuencia complementaria en las cadenas del DNA, delimitando el ini-

cio de la síntesis del fragmento a amplificar, más no se delimita aún en este ciclo, el final de la misma

En el segundo ciclo continúa la obtención de copias de tamaño incorrecto. Solo después del tercer ciclo se comienza a tener copias de tamaño correcto del fragmento de DNA de doble cadena de interés. A fin de tener mayor número de copias se deben realizar varios ciclos

- **Clonación:** Se deriva de la palabra griega **klon**, que significa retoño o brote. En el ámbito de la Ingeniería Genética, clonar es aislar y multiplicar en tubo de ensayo un determinado gen o, en general, un fragmento de DNA. Sin embargo, en el contexto de la clonación de la oveja Dolly (no es en si un producto de Ingeniería Genética), clonar significa obtener un individuo a partir de una célula o de un núcleo de otro individuo
- **Desnaturalización del DNA (fase 1 en PCR):** Se aplica calor para romper los enlaces de hidrógeno que mantienen unidas en forma de hélice doble a las dos cadenas del DNA. La temperatura de 94 °C es suficientemente alta para romper los enlaces de hidrógeno.
- **Desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs):** Son las unidades estructurales del DNA, en otras palabras desoxiadenina, desoxitimina, desoxiguanina, y desoxicitocina (dATP, dTTP, dGTP, y dCTP). Son el material del cual se parte para hacer copias de moléculas de DNA, son ensamblados por enzimas DNA polimerasas (como la *Taq*) en el orden correcto y complementario a la cadena de DNA que se esta copiando
- **DNA *Taq* polimerasa:** Enzima aislada del microorganismo termofilo *Thermophilus aquaticus*, es estable a temperaturas tan altas como 95 °C, cataliza la síntesis de DNA, como otras DNA polimerasas no termofílicas, ambos tipos de enzimas son dependientes de un molde o templado de DNA. Tiene una actividad óptima en un intervalo de temperatura de 72 °C a 80 °C
- **DNA:** Ácido desoxirribonucleico, material genético de todos los organismos celulares y de casi todos los virus. El DNA lleva la informa-

ción necesaria para la replicación del mismo y la síntesis de proteínas

- ***Ec/HKI***: Es una enzima de restricción purificada de *Enterobacter cloacae*
- **Electroporación**: Es una técnica similar a la transformación en la que el DNA entra a las células. En éste método las bacterias son sometidas a un campo de fuerza eléctrica elevada que desestabiliza las membranas e induce la formación de poros en las células para que pueda entrar el DNA a su interior
- **Endonucleasas de restricción**: La mayoría de las enzimas de restricción reconocen secuencias palindrómicas (también llamadas invertidas repetidas) y catalizan la ruptura de enlaces fosfodiéster en las cadenas del DNA. La concentración de DNA en las reacciones de restricción debe ser de 20 a 100 µg/ml, ya que a concentraciones mayores existe el riesgo de inhibir las enzimas por contaminantes tóxicos
- **Extensión o polimerización (fase 3 en PCR)**: Una vez que se unen los iniciadores (hibridación) se eleva la temperatura a 72 °C, óptima para la actividad enzimática de la DNA polimerasa
- **Extracción de DNA plasmídico de bacterias**: Se obtiene lo que se considera un producto purificado, pero habitualmente habrá moléculas de DNA del plásmido en tres formas topológicas diferentes, conocidas como superenrollada, relajada y lineal de longitud completa, todas tienen el mismo tamaño molecular (nº de pb), pero diferente forma
- **Gen *lacZ***: Codifica la enzima β-Gal, la cual participa en el metabolismo de la lactosa. La porción N-terminal del gen, con sus regiones reguladoras se utiliza en la construcción de plásmidos, en los que se le sitúa hacia el 5' de la región del MCS
- **IPTG**: Es un análogo no fermentable de la lactosa, que inactiva el represor de *lac Z*, por tanto es inductor de la transcripción del operón de lactosa

- **Lisis alcalina:** Es un método para aislar DNA de plásmido a partir de colonias de bacterias. Estas se tratan con EDTA para romper la membrana externa y con lisozima para digerir la pared célula, a continuación las células bacterianas se lisan por completo con el detergente iónico duodecil sulfato de sodio (SDS) e hidróxido de sodio (NaOH)
- **MgCl₂:** El cloruro de magnesio se requiere para que la enzima DNA polimerasa funcione de manera efectiva. Cuando la enzima se une a la cadena de DNA, requiere de iones magnesio con grupos hidróxido para quitar un protón de hidrógeno de la desoxirribosa del nucleótido que va a ensamblar, con el fin de agregarlo en la cadena que esta sintetizando
- **Mutagénesis sitio dirigida:** Es un método versátil y preciso para la inserción, extensión y corte de nucleótidos del DNA. Se basa en el uso de oligonucleótidos que llevan en su secuencia las bases nucleotídicas específicas que se quieren cambiar. Estos iniciadores hibridan con la región del DNA que se desea modificar
- **Oligonucleótidos o iniciadores para PCR:** Son fragmentos de DNA de cadena sencilla y complementaria a una secuencia corta del DNA que va a ser copiado. Se utilizan, en exceso molar (10^6 a 10^{10}) con respecto a la secuencia complementaria, para comenzar el proceso de copiado, para ello deben tener un extremo con un hidroxilo 3' libre. Comúnmente tienen de 15 a 30 pb de longitud. Se diseñan para unirse a secuencias únicas del DNA. Ambos iniciadores, 5' y 3' (forward and reverse primers) tienen puntos de "fusión" a los que el DNA de cadena doble es desenrollado o linearizado (T_m)
- **Plásmidos:** Moléculas de DNA extracromosomal, la mayoría de cadena doble, circulares y unidas por enlace covalente, tienen un tamaño de 1 a más de 200 Kb. Se comportan como unidades genéticas accesorias que se replican y heredan de forma independiente del cromosoma bacteriano. Contienen genes que confieren diversos fenotipos, tales como producción y resistencia de antibióticos, producción de enterotoxinas, y degradación de compuestos orgánicos complejos, entre otros

- **Plásmido superenrollado:** Una de las tres formas topológicas diferentes del DNA plasmídico extraído de las bacterias, todas tienen el mismo tamaño molecular (n° de pb), pero diferente forma. El superenrollamiento resulta del efecto de la enzima girasa (es una topoisomerasa I) sobre dos hélices de cadena doble de DNA que se le unen.
- **Reacciones de ligación:** Son catalizadas por enzimas (ligasas) que unen dos fragmentos de DNA, mediante enlaces covalentes, es decir formando enlaces fosfodiéster entre el fosfato 5' de una molécula de DNA y el grupo hidroxilo 3' de la otra
- **Sitios de restricción:** Se trata de las secuencias específicas en el DNA que son reconocidas por enzimas de restricción definidas, es decir, son los sitios donde tales enzimas cortan la cadena doble de DNA. Estas secuencias tienen en general una longitud de 6 pb
- **Sitios múltiples de clonación (MCS):** son porciones del DNA, algunas veces sintéticas, que contienen sitios de restricción para endonucleasas, contiguos o que se sobrelapan.
- **Transformación:** en el contexto del DNA recombinante, este término se usa para definir la adquisición, transporte e integración de DNA plasmídico a través de la membrana de las células, así como su mantenimiento como elemento estable en las mismas, y finalmente su expresión en las células, confiriéndoles nuevos fenotipos, como por ejemplo la resistencia a antibióticos
- **Vectores T:** son moléculas de DNA de plásmidos o fagos que llevan un nucleótido de timidina sin aparear en el extremo 3' de cada una de las cadenas de DNA
- **X-Gal:** sustrato cromogénico no fermentable, el cual es hidrolizado por la β -galactosidasa (producida por *E. coli*) en un compuesto denso e insoluble de color azul

7. REFERENCIAS

Barnes, M. W. PCR amplification of up to 35 Kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates. *Proc. Natl Acad Sci U.S.A.* 91, 2216, 1994.

Clark, J. M. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 16, 9677, 1988.

Cha, J., *et al*, New vectors for direct cloning of PCR products. *Gene.* 136, 369, 1993.

Erlich, A. H., *et al*. Specific DNA amplification. *Nature*, 331, 461, 1988.

Hadjeb, N., and Berkowitz, A. G. Preparation of T-overhang vectors with high PCR product cloning efficiency. *Biotechniques.* 20, 20, 1996.

Hengen, N. P. Cloning PCR products using T-vectors, *TIBS*, 20, 85, 1995.

Higuchi, R. In PCR Technology (Principles and Applications for DNA amplification): Using PCR to engineer DNA, ed. Erlich, H. A., 1989, pp 61-70.

Holton, T. A., and Graham, M. W. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Res.* 19, 1156, 1991.

Ichihara, Y. And Kurosawa, Y. Construction of new T vectors for direct cloning of PCR products. *Gene*, 130, 153, 1993.

Jung, V., *et al*. Efficient cloning of PCR generated DNA containing terminal restriction endonuclease recognition sites. *Nucleic Acids Res.* 18, 20, 6156, 1990.

Kauffman, D. L., and Evans, G. A. Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products. *Biotechniques*. 2, 304, 1990.

Kovalic, D., et al. General method for direct cloning of DNA fragments generated for the polymerase chain reaction. *c.* 19, 4560, 1991.

Kunkel, T.A. Rapid and efficient site specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 488, 1985.

Kunkel, T. A. Site directed mutagenesis. *Methods Enzymol.* 204, 125, 1991.

Lail-Trecker, M. Cloning PCR products utilizing the T/A overhang and a kit. *Methods Mol. Biol.* 67, 79, 1997.

Marchuk, et al. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* 19, 1154, 1991.

Mead D. A., et al. A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. *Biotechnology*. 2, 657, 1991.

Mezei, M. L. and Storts, R. D. InPCR Technology Current Innovations: Cloning PCR products, eds. Griffin, A. M., and Griffin, H. G. (CRC Press, Fda.), 1994, pp21-36

Mullis, K. B. and Falona, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335, 1987.

Rodríguez, R. L. and Tait, R. C. 1983. Recombinant DNA Techniques: an Introduction. pp 50-51.

Saiki, R. K., et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermoestable DNA polymerase. *Science*, 239, 487, 1988.

Sambrook, J., et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed. CSHP, 1989.

Sharf, J. S.; In PCR Protocols (A Guide of Methods and Applications): Cloning with PCR, Academic Press, N. Y., 1990, pp 85-91.

Sharf, J. S.; et al. direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science*, 233, 1076, 1986.

Schutte, C. B., et al. Optimized conditions for cloning PCR products into a XcmI T-vector. *Biotechniques*. 22, 40, 1997.

Testori, A., et al. Direct cloning of unmodified PCR products by exploiting an engineered restriction site. *Gene*, 143, 151, 1994.

White, J. T. the polymerase chain reaction. *Trends in Genetics*. 5, 185, 1989.

Zhou, M. et al. Universal cloning method by TA strategy. *Biotechniques*. 19, 34, 1995.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA