

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

NOT C.

IDENTIFICACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA LA α-AMILASA INTRACELULAR DE Streptococcus bovis A57206 AISLADO DEL POZOL.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

TANIA RAQUEL OROZCO AMARO



MEXICO, D. F.

m. 343645



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

2005



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. o Jurado asignado:

Presidente	Profra. Velázquez Madrazo Olga
Vocal	Profra. Wacher Rodarte Ma. del Carmen
Secretario	Prof. Ruiz Terán Francisco
1 ^{er} . Suplente	Prof. Bustos Jaimes Ismael
2º. Suplente	Prof. Salazar Zazueta Alfredo

o Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Biotecnología y Alimentos. Laboratorio 321. Conjunto E de la Facultad de Química.

Asesor del tema:

Supervisor técnico:

Dra. Díaz Ruiz Gloria

Dr. Ruiz Terán Francisco

francis Fiki

107

o Sustentante:

Orozco Amaro Tania Raquel

INDICE	Página
1. RESUMEN	
2. ANTECEDENTES	1
 2.1 El proceso de elaboración del pozol. 2.2 Carbohidratos del maíz y del nixtamal. 	1
2.2.1 Composición química del maíz.	2
 2.2.1 Carbohidratos presentes antes y después de la nixtamalización. 	2
2.3 Bacterias lácticas amilolíticas presentes en el pozol y probable función de <i>Streptococcus</i> bovis durante la fermentación del pozol	3
2.4 α -amilasas y diferencias fisicoquímicas de las α - amilasas producidas por <i>Streptococcus bovis</i> que se encuentran reportadas en la literatura y las producidas por Streptococcus bovis A57206 aislado del pozol.	4
3. INTRODUCCIÓN	6
4. OBJETIVO GENERAL	7
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
6. METODOLOGÍA	8
6.1 Obtención de la cepa de <i>Streptococcus bovis</i> A57206 aislado del pozol y comprobación de su	9
6.2 Diseño de los primers para la reacción de PCR.	9
6.3 Extracción del DNA genómico de Streptococcus bovis A57206 aislado del pozol.	10
6.4 Detección y cuantificación del DNA genómico de Streptococcus boyis aislado del pozol.	11
6.5 Selección de las condiciones de PCR.	12
6.6 Detección del producto de PCR.	14
6.7 Purificación del producto de PCR.	14
6.8 Reacción de clonación en un sistema comercial (PCR 2.1-TOPO® de INVITROGEN)	14
6.9 Preparación de células competentes.	15
6.10 Transformación de células competentes.	15
6.11 Análisis de las transformantes.	16
6.12 Digestión con enzimas de restricción para liberar el producto de PCR del plásmido.	17
6.13 Reamplificación de los fragmentos obtenidos	18

mediante PCR.	18
(Miniprep).	10
6.15 Secuenciación de los fragmentos amplificados.	19
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
7.1 Reactivación de la cepa de Streptococcus bovis A57206 aislado del pozol y comprobación de la actividad amilolítica.	20
7.2 Diseño y alineamiento para la síntesis de los primers.	21
7.3 Extracción y cuantificación del DNA genómico de Streptococcus bovis A57206 aislado del pozol.	24
7.4 Electroforesis horizontal sumergida en un gel de agarosa para la detección del DNA genómico de Streptococcus bovis A57206 aislado del pozol	25
7.5 Determinación de las condiciones de la PCR para amplificación del gen de la α-amilasa de Streptococcus bovis A57206.	26
 7.5.1Efecto de la variación de la Temperatura de alineamiento en la PCR. 7.5.2 Efecto de la concentración de MgCl₂ y del 	26
7.5.3 Efecto de la concentración de MgCl ₂ y del templado en la PCR utilizando combinaciones de	28
primers inicio, medio y reverso.	30
7.6 Clonación con el Vector PCR 2.1-TOPO de los productos de PCR y análisis de las trasnformantes.	35
7.7 Análisis de las transformantes.	36
7.7.1 Digestión con enzimas de restricción para liberar el fragmento de PCR ligado al vector.	36
7.7.2 Liberación de los fragmentos de PCR ligados al vector por reacción de PCR.	38
 7.8 Secuencias obtenidas de los fragmentos de PCR. 7.9 Alineamientos de los fragmentos de PCR obtenidos con las secuencias nucleotídicas de las α-amilasas reportadas de las cenas IB1 y 148 	40 40
8. CONCLUSIONES	51
9. PERSPECTIVAS	52

- 10. BIBLIOGRAFÍA 53
- 11. APÉNDICE

1. RESUMEN

Streptococcus bovis es una bacteria láctica amilolítica que interviene durante la fermentación del pozol debido a que produce α -amilasas. Este tipo de enzimas son las que, probablemente, se encargan de proporcionar los sustratos para el resto de la microbiota del pozol después de degradar el almidón (Díaz y col., 2003)

Las características fisicoquímicas de las α -amilasas de *S. bovis* A57206 aislado del pozol, mostraron tener propiedades diferentes a las otras α amilasas ya reportadas en la literatura procedentes de *S. bovis* (Tinoco, 2003).

El objetivo de este trabajo fue identificar el gen que codifica la α -amilasa intracelular de *S. bovis* A57206 aislado del pozol. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificaron dos fragmentos y se secuenciaron. Las secuencias obtenidas se alinearon con las ya reportadas en el GeneBank. Se determinó que el porcentaje de identidad entre las secuencias varía del 20 al 40%. Esto sugiere que las diferencias encontradas en las propiedades fisicoquímicas de la α -amilasa intracelular de *S. bovis* A57206 podría deberse a sus diferencias en las secuencias nucleotídicas.

2. ANTECEDENTES

2.1 El proceso de elaboración del pozol

El pozol es una bebida ácida, refrescante, no alcohólica que se obtiene de la fermentación de maíz nixtamalizado. Para su consumo, se diluye en agua y se le puede agregar posteriormente sal, cocoa, azúcar, miel o chile, según el gusto del consumidor. Es de origen prehispánico pero actualmente lo han seguido consumiendo grupos indígenas y mestizos del Sureste de México (Ulloa y col., 1983).

Para su elaboración, primero se elimina la materia extraña y los granos de maíz en mal estado. Posteriormente, se lleva a cabo el proceso de nixtamalización, durante el cual los granos de maíz son cocidos con agua e hidróxido de calcio, con el objetivo de remover el pericarpio, suavizar la estructura del grano e impartir el sabor característico (Camacho y col. 2001).

El nejayote, que es el agua de cocimiento, es desechado y después el maíz cocido se lava y frotan manualmente hasta que el agua residual es transparente.

El nixtamal se muele manualmente hasta obtener una masa martajada, a la que se le da una forma esférica. Estas bolas se envuelven en hojas de plátano o también es común que se utilicen bolsas de plástico, con el fin de evitar la pérdida de agua.

Las bolas de masa se dejan fermentar a temperatura ambiente de 1 a 14 días o más, dependiendo del gusto del consumidor, posteriormente, se disuelven en agua.

-1-

2.2 Carbohidratos del maíz y del nixtamal.

2.2.1 Composición química del maíz

El grano de maíz está compuesto por cuatro partes principales: cáscara o salvado (pericarpio y cubierta de la semilla), germen, endospermo y pedículo. El pedículo generalmente es eliminado del grano durante el desgrane. El salvado constituye el 5 a 6% del grano; el germen varía de un 10 a 14% y el resto corresponde al endospermo (Hoseney, 1991). El maíz dulce crudo contiene 3.5% de proteína bruta, 1% de grasa, 20% de carbohidratos digeribles y 0.7% de fibra bruta (Osborne, 1986). Los cereales, en general, contienen muy pequeñas cantidades de carbohidratos, dado que la mayor parte del azúcar transportado a la semilla es convertido en almidón. El grano de maíz contiene de 0 a 2% de D-glucosa, 0.1 a 0.4% de D-fructosa y de 1 a 2% de sacarosa (Fennema, 1993).

2.2.2 Carbohidratos presentes antes y después de la nixtamalización

El almidón es el principal carbohidrato del maíz, siendo su concentración alrededor de un 73%; los mono y disacáridos, principalmente glucosa, fructosa y sacarosa representan del 1 al 3% en el grano (Boyer y col., 1987). Sin embargo, la concentración de estos disacáridos disminuye en el proceso de la nixtamalización, debido a que en el nejayote y los lavados del nixtamal se pierden dichos azúcares. De los carbohidratos solubles de la harina de maíz nixtamalizada se han encontrado la glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa, siendo ésta última la que se encuentra en mayor concentración (Santillana, 1995). El almidón está constituido básicamente por polímeros de α -D-glucosa. Químicamente, al menos se pueden distinguir dos tipos de polímeros, que son la amilosa y la amilopectina.

La amilosa es un polímero lineal de α -D-glucosa que contiene alrededor de 1500 unidades de glucosa anhidra unidas mediante enlaces α -1,4 presentando ligeras ramificaciones en la molécula. Los puntos de unión son enlaces α -1,6, iguales a los encontrados en la amilopectina. Las ramificaciones de la amilosa son tan largas y tan escasas, que en varios sentidos la molécula actúa como una entidad sin ramificar. (Hoseney, 1991).

La amilopectina está formada por α -D-glucosa, concatenada fundamentalmente por enlaces α -1,6 y se encuentra ramificada con un 4 a 5% de enlaces α -1,6. Este nivel de ramificación indica que, en promedio, la cadena unitaria de la amilopectina tiene de longitud, solamente de 20 a 25 unidades de glucosa (Hoseney, 1991)

2.3 Bacterias lácticas amilolíticas presentes en el pozol y probable función de *Streptococcus bovis* durante la fermentación del pozol.

La fermentación del pozol se lleva a cabo de manera espontánea, probablemente debido a la contaminación del nixtamal durante la molienda, dado que se encuentran presentes bacterias (en las que se encuentran bacterias lácticas amilolíticas), hongos y levaduras (Wacher y col., 1993). Durante la fermentación del pozol, las bacterias lácticas amilolíticas juegan un papel muy importante, ya que, se cree que estos microorganismos son los que se encargan de degradar el almidón y proporcionar los sustratos del resto de la microbiota debido a las amilasas que producen. Un estudio de la diversidad de las bacterias lácticas amilolíticas en el pozol, reveló que las cepas más amilolíticas, basándose en los diámetros de hidrólisis, en las que cepas de *Streptococcus bovis* (incluida la cepa A57206) fueron las bacterias lácticas amilolíticas dominantes durante la primera fase de la fermentación, mostrando esta cepa los halos de hidrólisis más grandes (Díaz y col., 2003).

Streptococcus bovis es una bacteria gram positiva que se encuentra normalmente en el rumen; algunas cepas pueden crecer en presencia de glucosa, sacarosa, lactosa y almidón, así como, de los productos de degradación de éste, probablemente debido a que produce α -amilasas intra y extracelulares (Cotta y col.).

2.4 α-amilasas y diferencias fisicoquímicas de las α-amilasas producidas por Streptococcus bovis que se encuentran reportadas en la literatura y las producidas por Streptococcus bovis A57206 aislado del pozol.

Los enzimas son catalizadores específicos: cada enzima cataliza un solo tipo de reacción, y casi siempre actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos. Los enzimas, a diferencia de los catalizadores inorgánicos catalizan reacciones específicas. Sin embargo hay distintos grados de especificidad. Las amilasas se encuentran entre las enzimas más importantes en la industria, están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son producidas por animales, plantas y microorganismos. Las amilasas provenientes de fuentes microbianas, tienen gran demanda en las industrias químicas, farmacéuticas y de alimentos (Vihinen y col., 1989) Estas enzimas hidrolizan enlaces α -glucosídicos de almidón. Existen enzimas de actual importancia comercial de origen microbiano que hidrolizan enlaces de tipo α -1,4 y/o α -1,6 y se pueden clasificar de la siguiente manera:

- La α-amilasa es una endoenzima que hidroliza enlaces internos α-1,4 y en ocasiones puede hacerlo en α-1,6 de moléculas de almidón, glucógeno y otros 1,4-α-glucanos. Cortan enlaces de manera azarosa en el interior de la molécula, y a partir de la amilosa se liberan oligosacáridos de 6-7 unidades de glucosa.
- 2. Enzimas que hidrolizan enlaces α -1,4 y que no pueden hacerlo en ramificaciones de uniones tipo α -1,6; por ejemplo la β -amilasa.
- Enzimas que hidrolizan enlaces α-1,4 y α-1,6; por ejemplo la amiloglucosidasa.
- Enzimas que hidrolizan únicamente enlaces α-1,6, como lo hace la pululunasa.
- Enzimas que preferentemente hidrolizan enlaces α-1,6 en cadenas pequeñas de oligosacáridos generados por la acción de otras enzimas sobre la amilasa y amilopectina, por ejemplo la αglucosidasa (Fogarty y col., 1979).

Se han estudiado las cepas JB1 y 148 de *S. bovis* aisladas del rumen. *S. bovis* 148 produce amilasas intra y extracelular que están codificadas por diferentes genes. Las dos enzimas han sido purificadas y caracterizadas. El patrón de hidrólisis de la enzima intracelular mostró ser del tipo endo amilasa, cuyo principal producto de la hidrólisis del almidón fue la maltotriosa. Presentó la mayor actividad a un pH de 6.5 y 40°C. La secuencia de aminoácidos correspondió a 484 codones con una masa molecular de 56.65 KDa. Para la enzima extracelular se determinó la mayor actividad a un pH de 5.5 y 50°C. La secuencia de aminoácidos correspondió a 703 codones y tiene una masa molecular de 79 kDa (Satoh y col., 1993; 1997). La cepa de *S. bovis* JB1 también produce amilasas intra

y extracelulares, las cuales presentan características bioquímicas muy similares a las que se describen para las amilasas de la cepa 148. La secuencia de la amilasa intracelular de la cepa 148 es 83.2% homóloga a la amilasa intracelular de la cepa JB1. En 1993, Freer y col. purificaron y caracterizaron una α -amilasa extracelular de *Streptococcus bovis* JB1. Presentó un punto isoeléctrico de 4.5 y una masa molecular de 77 kDa. La actividad de la enzima fue óptima a pH de 5.0 a 6.0 y estable a temperaturas por debajo de 50°C.

3. INTRODUCCIÓN

En un trabajo reciente, se identificó la cepa amilolítica *Streptococcus bovis* A57206 aislada de un pozol de Villahermosa, Tabasco, así como también, se purificaron y caracterizaron sus α -amilasas intra y extracelular (Tinoco, 2003). En este trabajo se reporta que la enzima intracelular se induce en presencia de almidón como única fuente de carbono, presentando una mayor producción cuando se incubó a un pH de 7.5 y temperatura de 37°C. La masa molecular estimada de la enzima fue de 44.5 KDa. La enzima purificada mostró un pH óptimo de actividad de 8.0 y presentó un rango de estabilidad entre 7.0 y 8.5; la temperatura óptima de actividad fue de 55°C y fue estable en un rango de 40 a 65°C. Presentó un punto isoeléctrico de 5.5. El patrón de hidrólisis de la enzima dió como principal producto la maltotriosa, seguida de maltosa y glucosa en menor cantidad. Por las características de la enzima se determinó que es una α -amilasa productora de maltotriosa, termoestable y alcalifílica (Tinoco, 2003).

Satoh y col., en 1997 determinaron que la α -amilasa intracelular de la cepa 148 presenta un rango de estabilidad de pH de 4 a 8, un pH óptimo de 6.5, y extracelulares, las cuales presentan características bioquímicas muy similares a las que se describen para las amilasas de la cepa 148. La secuencia de la amilasa intracelular de la cepa 148 es 83.2% homóloga a la amilasa intracelular de la cepa JB1. En 1993, Freer y col. purificaron y caracterizaron una α -amilasa extracelular de *Streptococcus bovis* JB1. Presentó un punto isoeléctrico de 4.5 y una masa molecular de 77 kDa. La actividad de la enzima fue óptima a pH de 5.0 a 6.0 y estable a temperaturas por debajo de 50°C.

3. INTRODUCCIÓN

En un trabajo reciente, se identificó la cepa amilolítica *Streptococcus bovis* A57206 aislada de un pozol de Villahermosa, Tabasco, así como también, se purificaron y caracterizaron sus α -amilasas intra y extracelular (Tinoco, 2003). En este trabajo se reporta que la enzima intracelular se induce en presencia de almidón como única fuente de carbono, presentando una mayor producción cuando se incubó a un pH de 7.5 y temperatura de 37°C. La masa molecular estimada de la enzima fue de 44.5 KDa. La enzima purificada mostró un pH óptimo de actividad de 8.0 y presentó un rango de estabilidad entre 7.0 y 8.5; la temperatura óptima de actividad fue de 55°C y fue estable en un rango de 40 a 65°C. Presentó un punto isoeléctrico de 5.5. El patrón de hidrólisis de la enzima dió como principal producto la maltotriosa, seguida de maltosa y glucosa en menor cantidad. Por las características de la enzima se determinó que es una α -amilasa productora de maltotriosa, termoestable y alcalifílica (Tinoco, 2003).

Satoh y col., en 1997 determinaron que la α -amilasa intracelular de la cepa 148 presenta un rango de estabilidad de pH de 4 a 8, un pH óptimo de 6.5, así como su temperatura óptima de 40°C. Presentó una masa molecular de 56.65kDa.

Es por esto, que, al presentar características diferentes de las α -amilasas de *Streptococcus bovis* ya reportadas, se propuso identificar el gen que codifica la α -amilasa de *Streptococcus bovis* A57206 aislado del pozol mediante la técnica de PCR con el fin de secuenciarlo y compararlo con las ya reportadas para determinar si son diferentes.

4. OBJETIVO GENERAL

Identificar el gen de la α -amilasa intracelular de *Streptococcus bovis* A57206 aislado del pozol.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar primers específicos para identificar el gen de la amilasa intracelular de *Streptococcus bovis utilizando la técnica de PCR*.
- Establecer las condiciones óptimas de la reacción de PCR para amplificar el gen de la amilasa intracelular.
- Amplificar la secuencia del gen de la α-amilasa intracelular y compararlo con las secuencias reportadas en el Gene Bank.
- Determinar si son diferentes.

así como su temperatura óptima de 40°C. Presentó una masa molecular de 56.65kDa.

Es por esto, que, al presentar características diferentes de las α -amilasas de *Streptococcus bovis* ya reportadas, se propuso identificar el gen que codifica la α -amilasa de *Streptococcus bovis* A57206 aislado del pozol mediante la técnica de PCR con el fin de secuenciarlo y compararlo con las ya reportadas para determinar si son diferentes.

4. OBJETIVO GENERAL

Identificar el gen de la α -amilasa intracelular de *Streptococcus bovis* A57206 aislado del pozol.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar primers específicos para identificar el gen de la amilasa intracelular de *Streptococcus bovis utilizando la técnica de PCR*.
- Establecer las condiciones óptimas de la reacción de PCR para amplificar el gen de la amilasa intracelular.
- Amplificar la secuencia del gen de la α-amilasa intracelular y compararlo con las secuencias reportadas en el Gene Bank.
- Determinar si son diferentes.

6. METODOLOGÍA

DIAGRAMA DE FLUJO



6.1 Obtención de la cepa de *Streptococcus bovis* A57206 aislado del pozol y comprobación de la actividad amilolítica.

Streptococcus bovis A57206 fue aislada e identificada en un estudio previo (Díaz y col. 2003). La cepa se conserva a -70°C en perlas de vidrio con glicerol. Para su reactivación, se inóculo una perla de vidrio en 100mL de caldo MRS (apéndice) y se incubó a 37°C durante 18h. Este cultivo se almacenó a -80°C en microtubos, colocando 1.5mL de la cepa en 20% de glicerol.

La cepa de *Streptococcus bovis* A57206 fue inoculada por estría en agar MRS-almidón (apéndice) al 1.5% y se incubó a 37°C durante 24h, a fin de corroborar la actividad amilolítica de la cepa al observarse halos claros debido a la hidrólisis del almidón.

6.2 Diseño de los primers para la reacción de PCR

Se utilizó el programa MULTALINE (Corpet F, 1988) para alinear las secuencias de los genes de las α -amilasas de *Streptococcus bovis* ya reportados de las cepas JB1 y 148, y a partir de secuencias consenso, se mandaron sintetizar tres primers (figura 2).

Posteriormente, se seleccionaron las regiones conservadas de amilasas de diferentes microorganismos y se hizo un alineamiento con las secuencias de *Streptococcus bovis* reportadas en el GeneBank (Whitehead y col., 1995) y se mandaron a sintetizar tres primers degenerados a partir de las mismas (figura 3).

Tabla 1. Secuencias de los primers sintetizados para la amplificación del gen de la α-amilasa de *Streptococcus bovis* A57206 aislado del pozol.

PRIMER	5´ → 3´
Inicio	AIG CAA TAC III GAA IGG TAC CIG
Medio	GGC AAT TAC GAC TAT CIT ATG TA
Reverso	TTC ACC TGA AAT GCC GTA GTA GTC
R1	GAT GTY GTC TTA AAY CA
R2	GGT TT CGC TTK GAY GC
R4 (reverso)	ATC ATG GTT GTC AWC GWA

6.3 Extracción del DNA genómico de *Streptococcus bovis* A57206 aislado del pozol.

Se tomó un microtubo que contenía la cepa almacenada a -80°C, se inoculó 1mL de la cepa en 100mL de caldo MRS y se incubó a 37°C en agitación a 200rpm durante 6.5h. El cultivo se centrifugó en una microcentrífuga 5415D a 4°C durante 5min. A continuación se colocó una muestra de las células centrifugadas (del tamaño de un grano de arroz) con una espátula estéril en 4 microtubos y se les adicionaron 700µL de buffer TES (apéndice), se les agregó 10µL de lisozima (100µg/µL) y se incubaron a 37°C durante 1h. Posteriormente, se agregaron 15µL de proteinasa K (20mg/µL) y 5µL de RNAasa (10mg/mL) y se incubaron a 65°C durante 30min. A continuación, se les agregó a cada tubo, 150µL de SDS al 10%, se agitaron e incubaron 10min a 65°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después, se les agregaron 800µL de fenolcloroformo y se agitó vigorosamente. Se centrifugaron 10min a 13500 rpm a 4°C. Se tomó la fase superior de cada tubo y se pasaron a otro tubo nuevo, al que se les agregaron 500μL de fenol-cloroformo y se centrifugaron en las mismas condiciones. Se tomó la fase superior, se colocaron en otro tubo nuevo y se les agregó 1mL de etanol al 100% frío. Posteriormente, se agitaron los microtubos y dejaron en refrigeración toda la noche. Al día siguiente, se centrifugaron a 14,000rpm durante 10min a 4°C y con una micropipeta se vació todo el etanol y se dejaron airear hasta secar.

Finalmente, el DNA se resuspendió en 70µL de agua desionizada (Lawson y col, 1989).

6.4 Detección y cuantificación del DNA genómico de Streptococcus bovis A57206 aislado del pozol.

Espectrofotometría

El DNA genómico de la cepa fue cuantificado espectrofotométricamente. Se tomaron 2µL de cada muestra, mismos que se llevaron a 500µL en agua destilada estéril y se hicieron las lecturas a 260nm y 280nm. A 260nm se mide la concentración de DNA, debido a la elevada absorbancia de la luz UV por las bases de ácidos nucleicos (Lodish y col., 2002). Las proteínas se cuantifican a 280nm, debido a los grupos aromáticos de sus aminoácidos y a los puentes disulfuro (Laguna y col., 2002).

Una vez leída la absorbancia en las dos longitudes de onda, se realizó el cálculo de la relación de la densidad óptica (OD). Una solución que contiene 50µgDNA/mLH₂O (DNA de doble cadena), tiene una absorbancia de 1 a 260nm (Sambrook y col., 1989). La relación OD₂₆₀/OD₂₈₀ puede ser utilizado como un indicador de la pureza de los ácidos nucleicos (Ausubel, 1995). El valor de la relación debe estar en el

rango 1.8-2.0 aproximadamente (Sambrook y col., 1989). Por lo que, se realizó el cálculo de la relación de la OD₂₆₀/OD₂₈₀ de las muestras del DNA genómico de *Streptococcus bovis* A57206 aislado del pozol,

Electroforesis horizontal sumergida en agarosa para la detección del DNA de *Streptococcus bovis* A57206 aislado del pozol.

Se preparó un gel al 1%, agregando 0.3g de agarosa a 30mL de buffer TBE 1X (apéndice) al cual se le adicionó 1.4µL de bromuro de etidio (10µg/µL). Se mezcló 1µL de buffer de carga para DNA por cada 5µL de muestra. Esta mezcla se colocó en los pozos correspondientes y el gel se sometió a una corriente continua de 90volts durante 1hora. La detección del DNA se hizó al observar el gel en un Transiluminador de UV DUAL-INTENSITY UVP. Se utilizó un equipo digital KODAK EDAS 290 para adquirir la fotografía del mismo.

6.5 Selección de las condiciones de la PCR

La reacción en cadena de la polimerasa se utiliza para amplificar un segmento de DNA que se encuentra entre dos regiones de DNA conocidas; utilizando dos oligonucleótidos como iniciadores (primers) mediante una serie de reacciones que son catalizadas por una DNA polimerasa (Ausubel, 1995). La reacción de PCR está en función de diferentes factores, principalmente de la concentración del templado, la concentración del cloruro de magnesio, de la temperatura de alineamiento y del tiempo de elongación (Alkami, 1999). La reacción de PCR se hizo en un termociclador 2400(Perkin Elmer). Para establecer las condiciones óptimas de reacción se varió la temperatura de alineamiento

en un rango de 45 a 60°C, y la concentración de $MgCl_2$ de 1 a 4mM, así como la concentración del templado utilizando 79,158, 237 y 316ng.

Las condiciones generales de la reacción fueron: 94°C/10min para desnaturalizar el DNA; 35 ciclos con una temperatura de 94°C por 1minuto, la temperatura de alineamiento que fue *variable*, y la temperatura de extensión a 72°C por 1ó 1.5 minutos (en algunas ocasiones). Finalizados los ciclos, se sometió a 72°C durante 10minutos con el objeto de que terminara el proceso de extensión.

Los reactivos utilizados para la reacción de PCR se muestran en la tabla 1.

Tabla 2. Concentra	ción de reactivos	s para la rec	acción de PCR.				
Reactivos	Concentración inicial.	Cantidad de reactivos por mezcla de reacción	Concentración final				
Agua desionizada		variable					
Buffer de PCR*	10X	5µL	1X				
Cloruro de magnesio	5mM	variable	(1, 1.5, 2 y 2.5mM)				
Desoxinucleótidos	10mM	1µL	0.2mM				
Primer inicio(Ver tabla 1)	10µM	2µL	0.4µM				
Primer reverso(ver tabla 1)	10µM	2µL	0.4µM				
DNA genómico	79µg/µL	variable	79, 158, 217 y 316ng				
DNA polimerasa**	5U/µL	0.5 µL	0.5U				
	V.final	50 µl					

*contiene Tris-HCI 20mM (pH 8.0) y KCI 500mM

**Taq DNA polimerasa de la marca INVITROGEN Cat. No.18038-018

6.6 Detección del producto de PCR

Una vez terminada la reacción de PCR, se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa para DNA, con el fin de detectar el producto de PCR amplificado.

6.7 Purificación del producto de PCR

La purificación del producto de PCR se realizó mediante un sistema comercial de purificación (Rapid Gel Extraction System de MARLIGEN BIOSCIENCE INC.).

Se cortó el área de gel que contenía el fragmento de DNA (alrededor de 400mg) y se colocó en un microtubo. Se le adicionaron 30µL del buffer de solubilización (apéndice) por cada 10mg de gel y se incubó a 50°C durante 20min hasta disolverlo. Una vez disuelto, se colocó dentro de la columna, misma que se introdujo en un tubo de lavado de 2mL y se centrifugó a 11,400rpm durante 1min. Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 700µL de L2 (apéndice) en la columna y se centrifugó a 11,400rpm durante 1min. Se colocó la columna dentro de un microtubo de 1.5mL, se agregaron 50µL de agua desionizada a 60°C y se centrifugó a 11,400rpm durante 2min.

6.8 Reacción de clonación en un sistema comercial (PCR 2.1-TOPO® de INVITROGEN)

Una vez obtenido y purificado el producto de PCR, se clonó en un vector, mediante el uso de un sistema comercial (PCR 2.1-TOPO® de INVITROGEN). Se preparó una mezcla de reacción en la cual se agregó el producto de PCR fresco en un rango de 0.5 a 4.0µL, 1µL de la solución salina, 1µL del vector y se llevó a un volumen final de 6μ L con agua estéril. Se mezcló la reacción con una micropipeta de 10μ L y posteriormente se incubó durante 25min a temperatura ambiente. Finalmente, se almacenó a -20°C hasta su utilización en la transformación.

6.9 Preparación de células competentes

Se adicionaron 10µL del stock de *Escherichia coli* DH5α (en 20µL de glicerol a -70°C) y se incubó toda la noche a 37°C con agitación constante. Posteriormente, se tomaron 0.2mL del cultivo anterior y se agregaron en 20mL de medio LB (apéndice) a 37°C hasta que se alcanzó un valor de OD 600 = 0.4 (alrededor de 3h de incubación). Después se centrifugó a 4000rpm durante 5min a 4°C en un tubo estéril, se decantó el sobrenadante y resuspendió el precipitado en 1mL de la solución A (apéndice) fría sobre hielo, llevando a las células a un volumen final de 10mL. Se centrifugó a 4000rpm durante 5min a 4°C y se decantó el sobrenadante. Se resuspendió en 1mL de la solución B (apéndice) fría en hielo y se llevo a un volumen final de 10mL con la misma. Posteriormente, se incubó en hielo durante 30min. Se centrifugó a 4000rpm durante 5min a 4°C y se decantó el sobrenadante. Después el precipitado se resuspendió con cuidado en 1mL de la solución B y se hicieron alícuotas de 200µL. Se les adicionó 10% de glicerol estéril y mezclaron por inversión.

Finalmente, se congelaron las células en hielo seco y se almacenaron a -70°C hasta ser utilizadas.

6.10 Transformación de células competentes.

Para cada transformación se usaron 2 tubos con 200µL de células competentes y 2 cajas selectivas con Kanamicina.

Se mezclaron 200µL de células con los 6µL de la mezcla de ligación con el vector y ésta se colocó en hielo durante 30 minutos. Las células se introdujeron posteriormente en un baño a 42°C durante 2 minutos y después se enfriaron las células por unos segundos sobre hielo. A continuación se les agregó 1mL de medio LB sin antibiótico (apéndice) y se resuspendieron por inversión. Posteriormente, fueron incubadas por 1 hora a 37°C. Se centrifugó a 2500rpm durante 5min a 4°C y se decantó el sobrenadante, después se agregaron 200µL de medio LB y se resuspendieron por inversión. Finalmente, se agregaron los 200µL de células a una caja de cultivo LB con Kanamicina (50µg/mL), 40µL de X-gal (40mg/mL) en dimetilformamida y 40µL de IPTG 100mM y se incubaron en una estufa a 37°C toda la noche.

6.11 Análisis de las transformantes

Colonias positivas

Con una punta estéril de 10μ L se tomaron las unidades formadoras de colonias blancas y se colocaron en tubos para centrífuga de 50mL que contenían 5mL de medio LB con Kanamicina (50 μ g/ μ L) y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación a 170rpm.

Método de Lisis Alcalina para aislar el DNA plasmídico.

Se guardó 1mL de las bacterias transformadas en 500µL de glicerol y se almacenaron a -70°C. El resto (los 4mL), se centrifugaron a 5,000rpm durante 5 minutos. El precipitado se resuspendió en 100µL de la solución l (apéndice) estéril y almacenada a 4°C. Se transfirieron a un microtubo de 1.5mL y se almacenó a temperatura ambiente durante 5min. Posteriormente, se agregaron 200µL de la solución II (apéndice), se mezcló por inversión 5 veces y se colocaron en hielo 5min. Pasado este tiempo, se adicionaron 150µL de la solución III (apéndice) almacenada a 4°C, se mezcló y se dejaron durante 10min en el hielo. Los tubos se centrifugaron a 14,000rpm durante 10min a 4°C, se recuperó la fase superior y se pasó a otro microtubo nuevo. Se agregó 1/10 parte del volumen de Tris-HCI 1M (pH=8) y 1 volumen de fenol-cloroformo y se agitó vigorosamente en vortex durante 15 segundos. Los tubos se centrifugaron a 14,000rpm durante 2min a 4°C y se recuperó la fase superior, misma a la que se le agregó nuevamente 1 volumen de fenol-cloroformo y se centrifugaron a 14,000rpm durante 2min. Se recuperó la fase superior y se le adicionaron 2 1/2 volúmenes de etanol al 100% (frío). Esta mezcla se almacenó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se centrifugó a 14,000 rpm durante 20min a 4°C, se decantó y el precipitado se lavó con 1mL de etanol al 80% y se centrifugó a 14,000rpm durante 3min. Finalmente, se decantó el sobrenadante y los residuos de etanol se quitaron con una micropipeta y se dejó secar para posteriormente resuspender el DNA en 40µL de agua desionizada.

6.12 Digestión con enzimas de restricción para liberar el producto de PCR del plásmido.

La digestión del DNA plasmídico se realizó con la enzima de restricción EcoR1, colocando 4µL del DNA, 1µL del buffer para la enzima, así como 1µL de EcoR1, 1µL de RNAasa (con el fin de degradar el RNA que pudiera estar presente) y esto se llevó a un volumen final de 10µL con agua desionizada. Posteriormente, se mezcló con una micropipeta de 10µL y se incubó durante 2 horas a 37°C en una incubadora para microtubos. Los fragmentos de la digestión se observaron mediante una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1%.

6.13 Reamplificación de los fragmentos obtenidos mediante PCR.

Se realizó una reacción de PCR en las mismas condiciones en que se obtuvó previamente el fragmento de DNA amplificado, con el objeto de confirmar que al DNA plasmídico se le había insertado dicho fragmento. Esto se determinó ya que, al realizar una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1%, se observaron bandas amplificadas con el peso que ya se habían amplificado anteriormente.

6.14 Extracción y purificación del DNA plasmídico (Miniprep).

Se inocularon 200µL de las bacterias transformadas en 6mL de medio LB con Kanamicina (50 µg/µL) y se cultivaron durante toda la noche a 37°C con agitación a 170rpm. Se guardó 1mL en glicerol a -70°C y los 5mL restantes se centrifugaron a 5000rpm durante 5min. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron agregándoles 250µL de buffer de suspensión de células G1 (Tris-HCI pH 8.0, EDTA 10mM, 20mg/mL de RNAasa A) al precipitado y se resuspendieron las células hasta homogenizar. Posteriormente se le adicionó 250µL de solución de lisis G2 (NaOH 200mM, SDS 1%) y se mezcló cuidadosamente por inversión 5 veces. Se incubó a temperatura ambiente durante 5min, después se agregaron 350µL de buffer de buffer de neutralización M3 (contiene acetato y clorohidrato de guanidina) y se mezcló inmediatamente por inversión 5 veces. Se centrifugó a 12,000xg durante 10min y el sobrenadante se pasó por una columna, se

centrifugó a 11,400rpm por 1min y se desecho el residuo del centrifugado. La columna se colocó dentro de un tubo de 2mL y se le adicionó 500µL de la solución **GX** (contiene acetato, clorohidrato de guanidina, EDTA y etanol), posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 1min y se centrifugó a 11,400rpm por 1min. Se descartó el residuo del centrifugado y se colocó la columna dentro de un tubo de 2mL. Se adicionaron 700µL del buffer de lavado **G4** (NaCl, EDTA, Tris-HCl pH 8.0 y etanol), se centrifugó a 11,400rpm por 1min y se desechó el residuo del centrifugado. Se centrifugó a 11,400rpm durante 1min para remover el buffer residual. Posteriormente, para la elusión del plásmido se colocó la columna dentro de un microtubo y se le adicionó 75µL de agua desionizada (a 67°C) directamente al centro de la misma y se centrifugó a 11,400rpm durante 2min.

6.15 Secuenciación de los fragmentos amplificados.

Una vez obtenido el DNA plasmídico ya purificado, se secuenció en un Secuenciador ABI 377 utilizando los primers M13 reverso y M13 (-20) forward del vector de clonación de un sistema comercial (PCR 2.1-TOPO® de INVITROGEN).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Reactivación de la cepa de *Streptococcus bovis* A57206 aislado del pozol y comprobación de la actividad amilolítica.

Se reactivó la cepa de *Streptococcus bovis* A57206 y se corroboró la actividad amilolítica de la misma, sembrando por estría en agar MRSalmidón al 1.5% (apéndice).



Figura 1. Hidrólisis del almidón mediante una amilasa secretada por *Streptococcus bovis* A57206 aislado del pozol.

La figura 1 muestra los halos de la hidrólisis del almidón efectuada por una amilasa secretada por *Streptococcus bovis* A57206. Durante las primeras 24horas que se incubó la cepa a 37°C, no mostró hidrólisis. Posteriormente se almacenó a 4°C durante 120h y transcurrido este tiempo fue aumentando el tamaño de los halos de hidrólisis.

7.2 Diseño y alineamiento para la síntesis de los primers.

Se diseñaron seis primers tomando como base las secuencias de las α -amilasas de las cepas 148 y JB1 ya reportadas.

Tabla 3.	Secuencias de los primers para amplificación del gen de la $\alpha\text{-amilasa}$ intracelular de
	Streptococcus bovis A57206 aislado del pozol.

PRIMER	5´→ 3´							
Inicio	ATG CAA TAC ITT GAA TGG TAC CTG							
Medio	GGC AAT TAC GAC TAT CTT ATG TA							
Reverso	TTC ACC TGA AAT GCC GTA GTA GTC							
R1	GAT GTY GTC TTA AAY CA							
R2								
R4 (reverso)	ATC ATG GTT GTC AWC GWA							

*En donde Y puede ser T o C, K puede ser G o T y W puede ser T o A.

En la tabla 3 se muestran los 6 primers diferentes que se utilizaron para realizar la reacción de PCR, en donde inicialmente se utilizaron los pirmers *inicio, reverso y medio,* sin embargo, se mandaron a sintetizar 3 primers degenerados ya que con los anteriores no se obtuvieron resultados positivos.

En la figura 2, se muestra el alineamiento de las secuencias de las enzimas con los primers: Inicio, Medio y Reverso. En la figura 3, se muestra el alineamiento de las mismas enzimas reportadas, pero con los primers degenerados R1, R2 y R4.

	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480
JB1-intracelular 148-extracelular intracelular-148 reverso inicio nedio	CTTT	CTGCTAF Tattgaf	IAATAAAAAGAA Itatgcaacco	IAAAGTCTTTCT Gattg-Caaaat	CTTTGAGGTAC Taaaagagtgt	TCTATCATGAC T-TAGGAGGAG AC	AAATGAAACTTI Agcttatacgti Taatgaaactti	TGATGCAATAC TAATCATAA TAATGCAATAC AtgcAATAC	TTTGAATGGT TAGCAGTGTT TTTGAATGGT TTTGAATGGT	ATTTACC ATTTAC ACCTGCC ACCTGC
601301303	****					•••••			0444U4084U	,0
	1041	1050	1060	1070	1080 1	11090 110	00 1110	1120	1130	114
JB1-intracelular 148-extracelular intracelular-148 reverso inicio	CI CAATCI C	AAAT AAATCAG AAAT	ICAAGGAGACA ICAAGAAATCA ICAGGGTGACA	ACARAG AARACATCCCTF ACARAG	GTTGGGCAAACO Actggacacaca Gttgggcaaato	CAAGACTTG GGAAACACTCTC CAAGATTTG	GTTGACGGTGAAA Attictgattggc Gttgatggcgaaa	ATGGAAATTAC Ataatcgctac Atggcaattac	CGAT-TACCTC CGATGTTACTC CGAC-TATCTT	ATGTATGI AAAATGCI Atgtatgi
nedio								GGCAATTAC	.GAC-TATCTT	ATGTA
Consensus	••••	******	• • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • •	•••••		• • • • • • • • • • • • • • •	tac	:gatct.	a
		1821 	1830 +	1840	1850	1860	1870	18	30 :	L 89 0
JB1-intracelu	ılar	ACCAR	GCTAACTG	TATAGGCTG	GACTTG	-CCTTGGAG	RTGACGAACA	CCCAACTG	CTCTTGCT	GTCTCI
148-extracelu intracelular-	11ar 148	ACAAT	GCAAACTG	HHUUTUUTU Cattggttg		HCCTTGTTG CTT66861	HUGGUGHUHH Rtabagagca	HUNHHIINI TCCTACTTI	HI IL IG hn Ctcttgcti	ILTHHT GTTTTAL
reve ini	rso Icio Icio	nonin	ooninio ra			CTGATG	ATGCCGTAAA	GTCCACTT	CAATTC	
Conser	ISUS					tee	aaa	a.t.	t	

Figura 2. Alineamiento de los primers Inicio, Medio y Reverso con las secuencias nucleotídicas de la α -amilasa intracelular de la cepa JB1, de la intracelular y extracelular de la cepa 148 utilizando el programa MULTALINE (Corpet F, 1988), en donde se muestra las regiones consenso de las secuencias que se utilizaron para sintetizar los primers.

	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760
JB1-intracelular 148-extracelular intracelular-148 Reg4reverso Reg2 Reg2	AR-AG TCTAG AR-AG	GAACCGT GTTCATT GGACTAT	TCGAACAAAATI GCTTATTTTAAU CCGAACAAAATI	ICGGAACAAAA Cagctattggt ICGGAACCAAA	GCTGATTACCT GCTGGCGGATT GCTGACTATCT	AGAAGCTATT' Agttcaagti Acaagcaatt	TCAGCTCTT Raagtcgtt TCTGCTTTI	TAAAAA TAAT Taatgcagat Aaaagaaaat	GGTATTGAGCC GAACAAGTGTCI CATATTGCACC	TTTAGCTGACI Aatganagati Ittagctgati	STCATTTTAA Sgtacgatac Sttgtcttaa	ATCATRAI TTCATGCI ATCACAAI
Consensus	•••••	*****	*****	•••••	•••••	••••	• • • • • • • • •	•••••	••••	ĝ	;ta.	**Cg***
		1171	1180	1190	1200	1210)	1220	1230	1240	125	i0
JB1-intracelu 148-extracelu intracelular- Reg4reve	lar lar 148 rso	CAAAA Aatga Caaaa	ATATCTACG Atatgtcca Atatctatg	ATTGGGCAG Acaatatti Actgggcag	ATTG-GTT Gttgagtti Aatg-gtti	TGTTGAAAO Atttgaaao Cgtcgaaao	:AA :AAGCAG :AA	CTGGF TAGCTGAT CAGGF	IGTTAAGG Iggtgcggac Igtttgtg	-GGTTCCG GGTTTCCG -GTTTTCG CGTTTTCG	TTTAGACO Ctatgato Cttggato	iccat iccgci ictati
R Conser	leg1 Isus	••••	••••	•••••		•••••	••••	••••	• • • • • • • • • •	•g•tt•cg	.tga.(;C
				1	561	1570		1!	580	1	1590	
JB1-intracelular 148-extracelular intracelular-148 Reg4reverso Reg2 Reg1				r T r T 8 T 2	TTTGT TGGAT TTCGT THCGH	TGAT GAAT TGAC ITGAC	AATO GATA AACO AACO	CATGA AGTGA CATGA CATGA	ATACCI ATATTI ATACCI AT	CAACI GGTC ⁻ CAACI	GTGG GTGGI GAGGI	rca Atg Aca
	I	Con	sensu	is "I	.taatgat							

Figura 3. Alineamiento de los primers R1, R2 y R4 (reverso) con las secuencias nucleotídicas de la α-amilasa intracelular de la cepa JB1, la extracelular e intracelular de la cepa 148 con el programa MULTALINE (Corpet F, 1988), en donde se muestran las regiones consenso, mismas que se utilizaron para sintetizar los primers.

7.3 Extracción y cuantificación del DNA genómico de *Streptococcus bovis* A57206 aislado del pozol.

Una vez extraído el DNA genómico de *Streptococcus bovis* A57206 con la técnica enzimática ya descrita (metodología), se cuantificó el DNA espectrofotométricamente y se comprobó la pureza mediante la relación OD_{260nm} / OD_{280nm}. La densidad óptica a 260nm es la lectura de absorbancia que nos indicó la concentración de ácidos nucleicos (AN) que contenía cada muestra.

Muestra	Abs (280nm)	Abs (260nm)	OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀	μ gAN/μL
M1	0.421	0.297	0.6	3.71
M2	0.114	0.252	2.2	3.15
M3	0.143	0.316	2.2	3.95
M4	0.171	0.381	2.2	4.76

Tabla 4. Cálculo de la relación de OD a 260 y 280nm y concentración de ácidos nucleicos.

La tabla 4 nos muestra los datos obtenidos de la relación de la densidad óptica de las proteínas y los AN, así como, el cálculo de los ácidos nucleicos en cada muestra. La muestra M1 tiene una relación de OD₂₆₀/OD₂₈₀= 0.64, y dado que el valor es significativamente menor a lo esperado (1.8-2.0), esto nos indica que está contaminada con proteína o restos fenólicos. Las muestras M2 y M3 presentaron valores de la relación de OD de 2.2, que de acuerdo con la literatura no es significativamente mayor que 2.0 (Ausubel, 1995), sin embargo, la cantidad de AN es ligeramente mayor en la M3 que la M2. La muestra M4 presentó un valor de OD = 2.2 y además la cantidad de AN mayor a todas las muestras, siendo de 4.76 μ g AN/ μ L, lo que nos indicaría ser la muestra más apropiada para utilizar en la reacción de PCR.

7.4 Electroforesis horizontal sumergida en un gel de agarosa para la detección del DNA genómico de *Streptococcus bovis* A57206 aislado del pozol.

Para corroborar la presencia e integridad del DNA genómico se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1%, así como para corroborar los datos obtenidos cuantitativamente de la técnica espectrofotométrica.



Figura 5. Electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. MP: Marcador de peso λ DNA/Hindi III fragments. M1: Muestra 1. M2: Muestra 2. M3: Muestra 3. M4: Muestra 4.

En la figura 5 se observa que 3 de las 4 muestras de DNA obtenido: M1, M2 y M4 presentan degradación del DNA, así como una mancha al final de cada carril. Esto indica que presenta restos fenólicos o de RNA. Después de un tratamiento con RNAasa se confirmó que la mancha correspondía a RNA. La M3 no presentó barrido ni residuos fenólicos o de RNA, además la relación de OD fue de 2.2. Por su pureza y concentración, la muestra M3 fue la que se utilizó para llevar a cabo la reacción de PCR.

7.5 Determinación de las condiciones de la PCR para amplificación del gen de la α -amilasa de *Streptococcus bovis* A57206.

7.5.1 Efecto de la variación de la temperatura de alineamiento en la PCR utilizando los primers inicio, medio y reverso.

Las temperaturas de alineamiento que primeramente mostraron un amplificado fueron de 50 y 51°C con una concentración de 1.5mM de MgCl₂, en donde se utilizaron los iniciadores Inicio-Reverso.



Figura 6. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. 1: Marcador de peso ¢X174RFDNA/*Hae*III Fragments. 2: Producto de PCR con una temperatura de alineamiento de 51°C. 3: Producto de PCR con una temperatura de alineamiento de 50°C.

En la figura 6 se aprecia en el carril número 2, la amplificación de 2 fragmentos con peso muy cercano, una banda de aproximadamente 900pb (DOWN) y la otra muy cercana a 1,100pb (UP) con una temperatura de alineamiento de 51°C, mientras que a una temperatura de alineamiento de 50°C sólo se observa la amplificación de una sola banda con un peso aproximado a 1000pb. Se repitió la PCR en esas condiciones (a 51°C) y se obtuvieron dos bandas nuevamente, por lo que se realizó la purificación de cada una. Se realizó una PCR nuevamente utilizando como templado cada una de las purificadas (UP y DOWN), esto con el fin de corroborar si se reamplificaban ambas bandas.



Flgura 7.Electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. Carriles 1: Marcador de Peso ¢X174RFDNA/*Hae*III Fragments 2: PCR, utilizando como templado a "UP". 3:PCR, utilizando como templado a "DOWN".

En la figura 7, se puede observar los resultados obtenidos de la reamplificación de las dos bandas nuevamente, pero una con mayor intensidad que la otra. Al utilizar el DNA "UP" como templado, la banda de mayor peso presentó una mayor intensidad, mientras que, al utilizar el DNA

"DOWN" como templado, la de menor peso se obtuvo con mayor concentración. Se mandaron a secuenciar las dos bandas, por separado. Sin embargo, no se pudo obtener una secuencia, esto se pudo deber a las secuencias estuvieran contaminadas una de la otra **(apéndices F y G)**. Debido a esto, se realizaron nuevas reacciones de PCR, pero utilizando nuevas variables, con el objeto de obtener un solo producto de PCR.

7.5.2 Efecto de la concentración de MgCl₂ y del templado en la PCR.

Se utilizaron nuevamente los primers "inicio" con "reverso" y el "medio" con el "reverso", preparando 3 mezclas de reacción. La temperatura de alineamiento fue de 51°C y únicamente se varió la concentración de MgCl₂, desde 1mM hasta 2mM, utilizando 158µg de DNA como templado.



Figura 8. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñldo con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. Carriles 1: Marcador de peso molecular λ DNA/Hindi III fragments. 2, 3 : Primer inicio-reverso; Primer Medio-reverso (con CIMg2). 4,5 : Primer inicio-reverso; Primer medio-reverso (MgCl₂ 1.5mM). 6,7 : Primer Inicio-reverso; Primer medio-reverso (MgCl₂ 2.0mM).

En la figura 8, se puede apreciar la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1400pb obtenido con los primers "inicio" y "reverso", utilizando una concentración de MgCl₂ de 2mM. La intensidad de la banda no fue suficiente para secuenciar, ya que se requiere una concentración de 50ng de DNA / μ L. Se realizó otra reacción de PCR en las mismas condiciones, pero ahora variando la concentración del templado en donde se agregaron 79,158, 237 y 316ng, con el objeto de obtener un fragmento de mayor concentración. También se aumentó la concentración de MgCl₂ a 2.5mM para determinar si la concentración del amplificado también aumentaba.



Figura 9. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. Carriles 1: Marcador de Peso λ DNA/Hindi III fragments y ϕ X174RFDNA/*Hae*III Fragments. 2,3 4:PCR con 79ngDNA y 2mM MgCl₂. 5,6 y 7: PCR con 158ngDNA y 2mM MgCl₂. 8 y 9: PCR con 237ngDNA y 2mM MgCl₂. 10 y 11: PCR con 316ngDNA y 2mM MgCl₂. 12, 13 y 14: PCR con 316ngDNA y 2.5mM MgCl₂.

En la figura 9, podemos observar que al agregar 316µg/µL de templado y una concentración de 2.5mM de MgCl2 se obtiene un producto de PCR de mayor intensidad, por lo que estas condiciones fueron las que se utilizaron para obtener suficiente cantidad de producto de PCR (DNA amplificado). Se purificó y mando a secuenciar. Sin embargo, no se logró obtener la secuencia de dicho fragmento.

7.5.3 Efecto de la concentración de MgCl₂ y del templado en la PCR utilizando combinaciones de los primers degenerados R1, R2 y R4 con los primers inicio, medio y reverso.

Se llevó a cabo nuevamente una reacción de PCR, haciendo combinaciones de los primers anteriores (inicio, reverso y medio) con los primers degenerados (R1, R2 y R4). En esta reacción, la temperatura de alineamiento fue de 54°C, esto con el objeto de que se hiciera más específica la hibridación (Alkami, 1999). Las combinaciones de los primers fueron: R1-R4, R2-R4, Inicio-R4, Medio-R4, R1-Reverso y R2-Reverso y se utilizó una concentración de 2.5mM de MgCl₂ con 316µgDNA/µL de templado, como ya se había optimizado anteriormente (ver figura 9).



Figura 10.Electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. Carriles 1 y 10:Marcador de Peso λ DNA/Hindi III fragments y ϕ X174RFDNA/*Hae*III Fragments. 2 y 3:Primers R1yR4. 4 y 5: R2 y R4. 6 y 7: Inicio y R4. 8 y 9: Medio y R4. 11 y 12: R1 y Reverso. 13 y 14: R2 y Reverso. 15 y 16: Inicio y Reverso. 17 y 18: Medio y Reverso.

En la figura 10, se puede apreciar la amplificación de una banda muy ligera de aproximadamente 650pb con los primers R1-R2 (carriles 2 y 3). En los carriles 4 y 5 se observa la amplificación de 3 bandas de diferente peso molecular, una de aproximadamente 1300pb, otra de 650pb -al parecer la misma banda antes mencionada-, y la tercera banda de menor peso molecular, aproximadamente de 400pb, dichas bandas obtenidas con los primers R2 y R4. En cuanto a la reacción de PCR con los primers "Inicio" y R4 no se logró amplificar algo (carril 6 y 7). Con los primers "Medio" y R4 podemos ver la amplificación de dos bandas, una con masa molecular aproximada de 1350pb -como si fuera nuevamente la anterior de mayor masa molecular- y la otra banda de aproximadamente 310pb (carril 9). Con los primers R1 y "Reverso" no se observa amplificación alguna (carril 11 y 12). Con los primers R2 y "Reverso" se amplificaron tres bandas, como podemos notar, una de aproximadamente 1,450pb y la segunda de una masa molecular de 1000pb aproximadamente, y la tercera banda de 350pb (carril 14). Con los primers "Inicio" con "Reverso" y "Medio" con "Reverso" no se observó alguna amplificación (carril 15 al 18). Con estos resultados, se decidió realizar más reacciones, pero utilizando únicamente los primers con que se obtuvieron amplificaciones, así como, también se utilizó el producto de PCR de R2 y R4 con 5µL como templado. La reacción fue sometida a temperaturas de alineamiento de 53 y 55°C con el objeto de aumentar la especificidad de la reacción y por consecuencia del fragmento amplificado (Alkami, 1999).



Figura 11. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. Cariiles 1: Marcador de Peso ¢X174RFDNA/*Hae*III Fragments. 2 y3: Producto de PCR (R2-R4). 4 y 5: Primers R1-R4. 6 y 7: Primers R2-R4. 8 y 9: Primers Medio-R4. 10: Primers R2-Reverso.

La figura 11 muestra las bandas que se amplificaron a una temperatura de alineamiento de 53°C. Se observa la reamplificación de los tres fragmentos del producto de PCR con los primers R2 y R4 (carril 2 y 3). Sin embargo, también se aprecia (carril 4 y 5) que se amplificó muy tenue, únicamente una banda de aproximadamente 650pb con los primers R1 y R4, que probablemente se deba a que no es tan específica la hibridación a 53°C. Con los primers R2 y R4, se amplificó una fragmento de aproximadamente 1000pb (carril 6 y 7). En cuanto a los primers "Medio" y R4, no se observa alguna amplificación (carril 8 y 9). Con los primers R2 y "Reverso" se observan 2 fragmentos, uno de aproximadamente 1000pb y el otro de 650pb (carril 10), bandas que no se aprecian bien a 54°C en la reacción de

PCR anterior (ver figura 10). Esto implico realizar otra reacción de PCR con una temperatura de alineamiento de 55°C, con el objeto de hacer más específica la hibridación y esperando que amplificaran menos bandas por cada combinación de primers y así mandar a secuenciar sin que pudiera haber contaminación de las bandas. Se utilizaron las mismas condiciones y combinaciones de los primers anteriores de la reacción a 53°C.



Figura 12. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. Carriles 1: Marcador de Peso φX174RFDNA/Haelll Fragments. 2 y 3:Producto de PCR (R1-R2). 4 y 5: Producto de PCR (R2-R4). 6 y 7: Primers R1-R4. 8 y 9: Primers R2-R4. 10 y 12: Primers Medio.R4. 11: Marcador de Peso λDNA/Hindi III fragments. 13 y 14: Primers R2-Reverso.

La figura 12 nos muestra que utilizando el producto de PCR de los primers R1 y R2 como templado, se presenta un barrido (ver carriles 2 y 3), y esto probablemente se deba a que hay inespecificidad. Sin embargo, al utilizar el producto de PCR de los primers R2-R4 como templado, podemos observar que se reamplificaron las 3 bandas anteriores (ver figura 10 y 11). Al haber amplificación en las temperaturas de alineamiento de 53, 54 y 55°C se purificaron las bandas por separado, mismas que se les denomino **fragmentos A, B y C** (de 1300pb, 650pb y 400pb respectivamente). Posteriormente se introdujeron en el vector y se realizó la transformación (ver adelante). Puesto que, en el resto de las reacciones de PCR (carriles del 6 al 10 y 12 al 14), se observa que hay amplificación pero con una concentración muy baja, el enfoque se hizo en las bandas de mayor intensidad. Se realizó nuevamente una reacción de PCR con una temperatura de alineamiento de 54°C, con las combinaciones de primers R2-R4, R1-R4, Medio-R4 y R2-Reverso, con el fin de corroborar que bandas se amplificaban nuevamente.



Figura 13. Electroforesis en un gel para DNA de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. Carriles 1: Marcador de Peso λDNA/Hindi III fragments y φX174RFDNA/ HaellI Fragments. 2, 3, 4 y 5: Primers R2-R4. 6 y 7: Primers R1-R4. 8 y 9: Primers Medio-R4. 10: Primers R2-Reverso.

En la figura 13, se puede apreciar que, al realizar una PCR con los primers R2 y R4 hay una banda amplificada de **1000pb** aproximadamente y que se le denominó *fragmento D*, mismo que se introdujo en el vector para después hacer la transformación (ver adelante). También se observa una banda amplificada con los primers R1 y R4, sin embargo, al ser de una masa muy grande -mayor a 2000pb- no se tomó en cuenta para introducirla en el vector, ya que, bandas amplificadas de muy alto peso molecular no son confiables (Alkami, 1999). La reacción de PCR en la que se utilizaron los primers R2 y Reverso, mostró amplificación de dos bandas, y además, con intensidad tal, que se realizó la purificación de cada una de ellas, sin embargo, solo se logró obtener la banda de mayor peso molecular -de aproximadamente **1400pb**- que se le denominó *fragmento E*, debido a que en la purificación se perdió la banda de menor masa molecular. Posteriormente se introdujo al vector (ver adelante).

7.6 Clonación con el Vector PCR 2.1-TOPO de los productos de PCR y análisis de las transformantes.

Los *fragmentos A* de 1300pb, *B* de 650pb y *C* de 400pb aproximadamente, así como la banda de 1000pb (fragmento D) y la banda de 1400pb (fragmento E) se ligaron al vector PCR 2.1-TOPO siguiendo las especificaciones del proveedor (ver metodología). Los productos de la ligación se utilizaron para transformar a células competentes TOPO 10F del Kit y células competentes DH5 α . Posteriormente, se inocularon cajas LB con $70\mu g/\mu L$ de Kanamicina con los productos de la ligación. A las cajas con medio LB, se les agregó previamente X-gal en DMF (dimetilformamida), así como IPTG 100mM, debido a que el vector posee el marco de lectura abierto (ORF) del gen de la β -galactosidasa. Las colonias de color azul indicaron que no se incorporó el fragmento en el vector, ya que no se está interrumpiendo el marco de lectura de dicho gen, mientras que las UFC de color blanco, indicaron que si se había incorporado el fragmento de PCR provocando la ruptura del ORF de la β-galactosidasa. Se esperaba mayor eficiencia con las células competentes del Kit, sin embargo la eficiencia de transformación fue mayor en las células DH5α, por lo que se decidió utilizar esta cepa en las siguientes transformaciones.

Se obtuvo **una** colonia de color blanco a partir de la reacción de ligación del *fragmento C* (ver figuras 10,11 y 12) y **tres** colonias de color blanco a partir de la reacción de ligación del *fragmento D* (ver figura 13 en los carriles 2 al 5). De las UFC positivas obtenidas, se realizó una miniprep, mediante el método de lisis alcalina, obteniendo así el DNA plasmídico. Para eliminar el RNA se le agregó 10u de RNAasa a los 40µL totales del DNA plasmídico. La cuantificación del DNA se realizó por espectrofotometría y se obtuvieron 300ng/µL.

7.7 Análisis de las transformantes.

7.7.1 Digestión con enzimas de restricción para liberar el fragmento de PCR ligado al vector.

Dado que el vector presenta 2 sitios de restricción para la enzima *EcoR1* a los lados de donde se introduce el producto de PCR, se realizaron digestiones con la enzima para analizar de manera pre eliminar si se había introducido el fragmento (figura 14).



Figura 14. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. Carriles 1: Marcador de Peso λ DNA/Hindi III fragments y ϕ X174RFDNA / *Hae*III Fragments. 2: Muestra 1: *Fragmento C* de la reacción de ligación de la banda pequeña amplificada con los primers R2-R4. 3,4 y 5: Muestras 2,3 y 4 de la reacción de ligación a partir del fragmento D amplificado con los primers R2-R4.

En la figura 14, se puede observar que al digerir las muestras 1 a 4, se obtuvo una banda de aproximadamente 4000pb, que corresponde al vector ya linearizado. Sin embargo, esperábamos un fragmento de aproximadamente 400pb en el carril 2, que correspondía al peso aproximado del *fragmento C*. En los carriles 3, 4 y 5 se esperaba una banda de aproximadamente 1000pb que correspondía al *fragmento D*. Esto indica que probablemente no se había ligado ningún producto de PCR. Para corroborar esto, se realizó una reacción de PCR utilizando los primers R2 y R4 para reamplificar los *fragmentos C* y *D*. Las condiciones que se utilizaron fueron: 2.5mM de MgCl₂ y una temperatura de alineamiento de 54°C. Se realizó una dilución de 1 en 10µL del DNA plasmídico y se adicionaron 30ng como DNA templado para la reacción (ver figura 15).

7.7.2 Liberación de los fragmentos de PCR ligados al vector por reacción de PCR



Figura 15. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. Carriles 1: Marcador de Peso λ DNA/Hindi III fragments y ϕ X174RFDNA / Haelll Fragments. 2, 3 y 4: Reacción de PCR a partir de los primers R2-R4 (*fragmento D*). 5: Reacción de PCR a partir de los primers R2-R4 (*fragmento C*)

La figura 15 nos muestra que en los carriles 2, 3 y 4 en donde se hizo la reacción de PCR para las 3 muestras en donde se esperaba la reamplificación del *fragmento C* –1000pb aproximadamente- no hubo reamplificación, la cual nos confirmó que no se insertó el producto de PCR en el vector, mientras que en el carril 5 se observa una reamplificación de la banda de aproximadamente 400pb –que corresponde al *fragmento C*-. El fragmento de 400pb se mandó a secuenciar.

Por otra parte, el *fragmento E* - de 1400pb aproximadamente- (ver figura 13 en el carril 10), que corresponde a la banda superior. En la transformación de las células competentes con esta reacción de ligación, se obtuvieron 7 colonias positivas (color blancas), mismas que se pusieron a crecer y se les realizó la extracción del DNA plasmídico (ver metodología). Posteriormente. cuantificó espectrofotométricamente, se el DNA obteniendo una concentración de 350ng/µL. Se hizo una dilución de 1en 10µL. Para corroborar la ligación del fragmento de PCR, se realizó una reacción de PCR utilizando los primers del vector M13 (forward) y M13 (reverso). Se agregaron 35ng de DNA templado, una temperatura de alineamiento de 54°C y 1.5minutos de tiempo de extensión, debido a que la DNA polimerasa amplifica 1000pb por minuto (Alkami, 1999).



Figura 16. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro te Etidio y sometido a 90V/60min. Carriles 1: Marcador de Peso λ DNA/Hindi III fragments y ϕ X174RFDNA / *Hae*III Fragments. Carriles 2 al 8: Producto de la PCR con DNA plasmídico de la transformación a partir de los primers R2-Reverso que contiene el **fragmento E**.

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA En la figura 16, podemos observar la amplificación en las 7 muestras de DNA plasmídico. Todas las muestras fueron positivas, lo que indicó que todas las UFC que se picaron tenían un fragmento de aproximadamente 1800pb amplificado con los primers M13 (forward) y M13 (reverso) del vector PCR 2.1-TOPO. Se obtuvo la banda del peso esperado, de 1400pb que corresponden al fragmento de PCR más 380pb aproximados al fragmento del vector ligado. En la figura 16 se aprecia un fragmento de 1800pb aproximadamente y que nos confirma que en el vector se introdujo el *fragmento E* (ver figura 13 en el carril 10, corresponde a la banda superior). Posteriormente, el DNA plasmídico se mandó a secuenciar.

7.8 Secuencias obtenidas de los fragmentos de PCR.

Las secuencias obtenidas fueron 3, una que corresponde a la banda de 400pb aproximadamente (*fragmento C*), amplificada al utilizar los primers R2 y R4. Las otras dos secuencias son el *fragmento E*, amplificado con los primers R2 y "Reverso", dividido en dos secuencias que se obtuvieron utilizando los primers del vector: el M13 forward y el M13 reverso.

7.9 Alineamientos de los fragmentos de PCR obtenidos con las secuencias nucleotídicas de las α -amilasas reportadas de las cepas JB1 y 148.

Finalmente se hicieron los alineamientos de las 3 secuencias obtenidas con las secuencias nucleotídicas de las enzimas ya reportadas en le GeneBank de las cepas de *Streptococcus bovis* cepas JB1 Y 148, mediante el programa MULTALINE (ver figuras 17 a 25).

	J21	3 <i>3</i> V	9 9 0	900	30V	3/ V	38 0	330	bVV.	PTA	6CV	63V	69V	630
INTRA148 anitopoM13-forward	AAATTO	AGGGTGACA	ACAAAGGTTG	IGGCAAATCAA	IGATTTGGTTG	ATGGCGAAR	ATGGCAATTA	CGACTATCT	TATGTATGCTG GG	ACCTTGATTI TTTTCGCTTI	TARACACCCI GacgeCi	AGAAGITATCA Igatgcgatco	INAAATATCTI GTGAAAT	TGACTG
Lonsensus	*****	*******	******				•••••	•••••	•••••	accicuaiii	ghaal,,,li	anhancaulta	199911911 * * *	,++gg10
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
INTRA14B amitopol(13-forward Consensus	GGCAGA AGCCAA aGCaal	NATGETTCET NATGEGTC NATGEgTC.,	CGAARCAACH AARAACCT AARaAaCa	IGGAGTTTGTO IAGTGAA DaGaGaa	GTTTTCGCTT GCTA GCTa	GGATGCTAT AAATTCAA aaATgCaA,	CAAGCATATC CAAACGTACC CARACGTACC	GATTCATTC GTAACATTA GaaaCATTa	TTTATGAGCAR TCARACAR TcaRa,,,CAR	TTTCATCCGO TCAAAAGO T.,CAaaaGO	CGATATGAAG AGCTGCAG AgaTGaAG	GAAAAATACGO CAAAAGCTAAA CAAAAacaaaa	TAAGGATTT AAATAATCT AAAAgaATcT	ITATGTT ITACGCT ITACGCT
	781	790	800	810	820	830	840	B 50	B 60	870	BB 0	890	900	910
INTRA148 anitopoM13-forward Consensus	TTT660 TT	CGAATTCTGG	AACGGTGATC GGTTTGG ,GGTgaga	XAMAAAACTAA Inaaactaa Inaaactaa	ICARTGACTAC IAGGCGGATGA IaaacGaaTaa	CTTGCAACG CTT-ATTG CTT,,AacG	ACTGGACACC TTTGATAGTT acTGaaaacc	GCTTCGATC TTTGACCTT gcTgacaTc	TRATTGATGTT Acatachagtc aaAtachagtc	CGTCTCCACI AGTCTTTARI aGTCTCCAal	CAARATCTTT CAARA-CGTT CAAA.,CgTT	TTGAAGCRAGU TTCGAGU TT,CaAGU	CARAGAAAAAA CRCAGA CRCAGA,	GCTCATT GCTCAGA GCTCAGA GCTCAga
	911	920	930	940	950	96 0	970	98 0	99 0	1000	10 10	1020	1030	1040
INTRA148 anitopoM13-forward Consensus	ACGAT AATI A.,AT	TTACGACAR GRATGACTCF gaAcGACaaf	NTTTTAATCI NGTTGGCTCAI NgTTggaacai	ATACCTTGGT(CCRACTGGGT acRaCTgGGT;	GARAAATCAGO TTTTTCTRAGT gaaaaaTaAGo	CTRRCTCTG ICTAATTCC= £TRRcTCc,	CCGTTACTTT CTTATTAGAA CcgaTaagaa	CGTTGACAA Agaagattc agaagacaa	ICCATGATACCO TATGGATAATA IcaagGATAaca	ARCGAGGAC IGACCAATTG IGACCAagac	ARGCTCTTGR GTTTTTTAGA aagcTcTaGR	ATCTACRATTI TTCTGGAGTTI atCTacRatti	GACGAATGGT Gotggtttra GacGaaTgaa	TCRARCC -CR6TTG ,CRaacc
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
INTRA148 anitopoM13-forward Consensus	AGCGG TGCGT aGCGg	CTTACGCTC GRATTGATG caaacGaTc,	-TCATCTTA CGTCAACTAC , TCAaCTaa	CTTC-GCCRA CACATGAAGA Caca,GaaaA	RCTGGTCTTCI RATTGTATATI RatgGTaTaca	ATGCATCTT ATTGGAGACT BatgcAgact	ICTACOGTOAC ICAGCAAGAGO ICaaCaagaaO	TACT-ACGO TCCTTACGO TCCTTACGO	CATTICRGGIO Gicciagaccio Gicciagaccio Gicaciagaccio	WATTTGCAC GC-TGAGCAA Ga,TgaGCAa	RACAAGACTT Attrgagaaat AacAaaaaat	TCAAGATGATI ACACTTGGGR aCAagag6aal	ATTGATA rg t Attgatarat Attgatarat Attgatarat	TACTITI TICTIGT Tactigt
	1171	1180	1190	1200	12 1 0	1220	1230	1240	1250	1260	1270	<u>1280</u>	1290	1300
INTRA148 anitopoM13-forward Consensus	 Ctiar T C	GACAAGCAG GACAAGCAG AA ,Aa	CTGATTIATGG CTAAAAATGT CTaaaaATGg	TARAGRAATG TARAGATGATT TARGATGATT TARaaaaATg	ARCTATTTTG GTCTTTGCTTG aaCTaTgcTg	RCAATCCAAA GTAATACAG acaatacaa	ACTECATTEG •CEACAECAE •CEACAECAE •CgaCAgcaE	ITGGTCATAI ITGCITGI ITG.,CaTag	ICTTGGRGATRI GAAAGAAGTTA gaaaGaAGaTA	HAGAGCATCC HAGAGAAAACT HAGAGAAAACT	TRCTTCTCTT TGATATTCCT TgaTacTCc1	GCTGTTTTAA GTTCTTGGTG GCTcTTggaa	TCAACAACGC TTATTTACC TcAacaaacC	TCATTCT AGGTTCT AGGTTCT acaTTCT
	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
INTRA148 anitopoM13-forward Consensus	ACAGC AGTGC AcaGC	AAAACGAAT CGCGATT Caa,,CGRaT	GTTTGTAGGC ARATCGACGC aaaTcgAcGC	AARAARTGGG GTAR aaAA,	CAGGAAAAAC CAGGAAAAAAC CAGGAAAAATT CaGgAAAAAc	¢ GTTTACAGA1 GGGA1 GaGA1	TTATCTCGGA TTATCGGA TTATCGGA	AATCAAAAAT Actcccatci RatCaaAagi	TCTACTATCGT RCCATTAAT-TI RCCATTAAT-TI RCCACTAAC,TI	CATTGACGAA CAGA CAGA CAga	GAAGGTTACO	GCAGTTTTCC	AGTTGGCGCF	GAATCCG

Figura 17. Alineamiento de la secuencia obtenida con el *fragmento E* utilizando el primer M13 (forward) del vector 2.1-TOPO (amitopoM13-forward) con la secuencia nucleotídica de la α -amilasa intracelular de la cepa 148 (intra148).

	1951	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080
extra148 anitopoM13forward Consensus	CCATC	ACGCTCAGC	CGTTGTTTTG	TATGATGAC	CAAGCTAGCCI	AGCAGCTCA	AGTITCAGTT	GATGGTTACA	IAAGAAGGCGAI GG Ga	CHATAGCATT ITTICGCTTT CaaTa6CaTT	TCTARAGCCA GACGCCTI aAaSCCa	CAGRAGTAAC Gatgcgatcc cAgaaGaaaC	ATTGAAAGCTI GTGAAATGATI aTgaAAaGaTa	AAAAATG GAGCCAA BAggccaa
	2081	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	2210
extra148 anitopoM13forward Consensus	CTGRC ATGGG aTGac	TCTGCGACT TCAARAACC TCaaaaACc	TACAAACTIG TAGTGAA-G TacaaAa6	IGTRATGGTCI ICTRARATTCI IcTRAaagTCI	IAGAGGTAGC IACAAACI IACAAaC;	TTATAAAGAC Staccgtaac gTAccaaaaAC	GGTGATAAAG Attatcaaac agtaacAAAc	TCACTGTTGG AATCAAAAGG aaaCaaaaGg	STGAAGGGCTTI XAGCTGCAGGCA XaGaaGcacca	GRAGCTGGTC TRAGCTAARA BRAGCTAARA	RATCAACTAC Rataatcttt Rataaactac	TCTAACATTG ACGCTTTG aCaCattG	ACTGCAACAG GTTTGRAARA acTgcAAaAa	GAGETGA •TGETAA •GETaA
	2211	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310	2320	2330	2340
extra148 anitopol113forward Consensus	CGGTC AGG=C aGG_C	CAATCAACAF Co Ca	+ HCGANGACATA GATGACTTA ,,GRaGACaTA	CACTITCAC Itectite Itectite Icactite	AATGAAAAGAC RGTTTTTGAC RaTgaaaGAC	CCRAGIGCIG CTTACATACA CcaAcagaca	AGACTAACAT Agtcagtctt AgacaaaCat	TTACTTCCAA TAACARACGT TaACaaaCaa	AAACCCAGATA TTTTCGAGCAC BaacCcAGaaa	ATTEGTCAGA Rgagctcaga Agagctcaga	AGTGTATGCT AATGAATGAC AatgaAtgac	TACATGIAIT TCAGITGGCT TaaaTggacT	CAGCARAAGA CACCAACTGG CACCAAaaGa	TRATRAA GTTTT gaaTa
	2341	2350	2360	2370	2380	2390	2400	2410	2420	2430	2440	2450	2450	2470
extra148 anitopoM13forward Consensus	•TTCT •TTCT •TTCT	ITGGCGCATU IRRGTCTARI IaaGcccRag	66CCT66AAC TTCCCT ggCCCT	TAAGATGACT TATTAGAAA TaAgaaGAaa	ARAGAAGCAT GAAGATTCTA aAAGAagCaa	CAGGTCGTTA TGGATAATAG caGaTaaTaa	ITTCRATCACA ACCAATTGGT IacCRATcaca	GTTCCTGCTT TTTTTAGAT gTTccaGaT	TCATATGCTGA TCTGGAGT TCTGcaGa	AGAAGGTGTG TGGTGGTTTR aGaaGGTgTa	ARAGTAATCT Acagtigt Aaagtaat,,	TCACAAATAA GCGTGAAT ,,aCaaaaAa	TCAAGGCTCA TGATGCGTCA TCAaGccTCA	CRATATC AC aC
	2471	2480	2490	2500	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600
extra148 anitopoM13forward Consensus	CACH TACCI cACal	RAATGAAGGI Acatgaagai Raatgaagai	ATTIGATITCI Rattgtatati Rattgaataci	AAAGCAGAA Attggagact Raagcagaa,	•GGCTTGTAC CAGCARGAGC ₊aGCaaGaaC	TC AAAAGCT G TCCTTA CG TCaaaA . ,cC	GTTTGATGCC GTCCTAGACC GTCcgAgaCC	TGATGTGCC TGCTGAGCA TGaTGaGCa	RGCAGGARAA AATTAGAGAAA AacaagRaAA,	ACTCGTGTA ACACTTGGGA ACaCgTGgaA	CCTT-TGATA Attggtaaa Iactg,taaa	ACCCTGGCGG TTCTTGTTAF hacCcTGgcaa	STTGGGATAGT IctaaaAaaGT IctaaaAaaGT	GCGAATG TRAGATG 'gaaaATG
	2601	2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700	2710	2720	2730
extra148 anitopoH13forward Consensus	CTTR Attg atta	CCTCTACTA TCTTIGCTT CCTCTaCTa	CGGAAATCCTI GTARTACA GaaataCa	GTTCRATACC GCGACAGC G.,CaAcAcC	CTCTAGGTGT AGTTGC AGgTGc	GTGGCCTGGF TTGGAAAGAF gTGGaaaGaf	HACACAAATGI Rgttraagagi RacaaAAaaGi	ICTANAGATG Haacttgata IaaaaaGATa	ATGCTGGTAAT TTCCTG=TTCT aTcCTG,TaaT	TTCTACCTCC TGGTGTTF TgcTaTca	ATCTCCCAGE ATTTACCAGE Batctaccage	IAGAATATGCI STTCTAGTGCI BagaaaaTGCo	IGATGTAAATG XCCGATTAAAT XGagaTaAAaş	CARAAAA CGACGCG (CaAaaag
	2731	2740	2750	2760	2770	2780	2790	2800	2810	2820	2830	2840	2850	2860
extra148 anitopoM13forward Consensus	CATC TARC cAaC	T-TTARTCA GGTAARATT g,TaARaca	GCCTGGAACA GGGATTATCG GccaggAaCa	AGCRACCAAT GARCTCCGAT aaaaaCCaAT	ATCCITATAC GaccataaAş JaaccataaAş	STGAAGGATT TCAGA YTCAGA	TAACCTTGTA	AATCTGGAR	ACTATAATAA	GATGGGCTA	AATAATTGTI	CTTATCTCA	RTTCTARCTCI	::::::::::::::::::::::::::::::::::::::

Figura 18. Alineamiento de la secuencia obtenida con el *fragmento E* utilizando el primer M13 (forward) del vector 2.1-TOPO (amitopoM13-forward) con la secuencia nucleotídica de la α -amilasa extracelular de la cepa 148 (extra148).

	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
INTRAJBI anitopoM13forward Consensus	RAACT	TATGATTTA	GTCAGATTTT	CGAGCAAAC	CTTGGTGAAAA	ATCATCCRG GG aG	ATICIGCIGI TITICGCITI aticcGCIgi	TACTTITGTT GACGCCTGAT gACgccTGaT	GATAATCATG GCGATCCGTG GagAacCaTG	ATACCCAACO AAATGATGAG AaAccaaaad	TEGTCAAGCA CCAAATGGGT CCAABATGGGT	ICTGGAATCAA 'CAAAAAAC C,AAaaAa	CTATCGARGE CTAGTGARGE CTAgcGARGA	RATGGTT CTRARAT BababaaT
	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
INTRAJB1 anitopoN13forward Consensus	TARAC TCRAC Tarac	CAGCAGCTTI Anacgtacci anacggacci	ATGCCCTCATT Staacatcatca aTaacatcatc	TTACTTCGT RAACAAT :aaACaaT	CRAACTGGACT CRAAAGCAGCT CAAAagcaaCT	TCCTTGCAT GCAGCAAAA gCagcaaAa	TTTCTACGGA GCTAAAAAAT gcTaaAaaaa	GATTATTACG AATCTTTACG AATcattacG	GCATTICGGG HCTTIGGTTT LCattgcggg	ACAATTIGCI GAAAAATGCI aaAAaaTGCI	TCAGGAAAAGCT TAAAGGCGGGAT TaRaGaaaGaT	TCCARACTGT GACTTATTGT gaCaaAcTGT	CATTGATAAA TTGATAGI TTGATAG	ATTGATT ITTTT ATTTT
	1431	1440	1450	1.460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560
INTRAJB1 anitopoN13forward Consensus	GAACT Gacct Gract	TAGAAAAAA TACATACAA TACATACAA TACAAAAAA	CGCCGTTTATE STCAGTCTTT• cgCaGTcTat,	GTCAAGAAA AACAA AaaAA	TGGATTACTTO ACGTTTTCGAO acGaTTaCgao	CACCAAGCT Cacagagct Cacagagct	AACTGTATAG CAGAAAATG CaGaAaaG	GCTGGACTTG RATG-ACTC- aatg.ACTc.	CCTTGGAGAR AGTT AGaT	GRCGRACRCO GGCTCACCAI GaCgaACaaa	CCAACTGCTCT ACTGGGTTTTT ACTGGGTTTTTT ACTGGGCTCT	ITGCTGGTCTC ITCTRAGTCTA ITCCaaGTCTa	AT-CAATAAT Attccctta Attcaataa	TRECRAA TTREARA Taacaar Taacaar
	1561	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690
INTRAJB1 amitopol113forward Consensus	GCCAC GAAGA Gaaaa	ATCAAAGCG ITTCTATG IaTCaAaG	CATGTTTGTTC GATAATAC ,GataataC	GTGAAAAAT Gaccaatt GaaaAAat	GGGCTTGCAAA GGTTTTTTAGA GGgcTTgcAaA	ATTGTTCACT AttCT AttCT	GATGCTCTTG GGAGTTGGTG GaaGcTcgTG	GCAACCAAGC GTTTAACAGT GcaaaaaAGc	TGCGCATGTC TGTGCGTGAA TGCGCaTGaa	CARATCGATE ITTGATGCGTE IcaaATccaTe	ANGCANGGCTH CANCTACCACH Chacanccach	ATGGTGATTTC Atgaagaaatc Atgaagaaatc	CTAGTCGGT GTATATATAT cTAgacagTi	GARAAAT GGRGACT Gararat
	1691	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820
INTRAJB1 axitopoM13forward Consensus	CAGTO CRGCA CRGCA	AGCGCT IAGAGCTCCT AGaGCT	TGGATACCAC TACGGTCCTAI TacagaCCaa	TACCAAAATA Gacctgctga gaccaaaagA	ATGATATAAN Igcaaataataa Iacaaaataa	ARAAGCGAT Gratacact Braacaat	IANGAAAAGTGT IGGGAATTGGT IaaGARaggGT	TTCTAATCGC AAATTTC aAATCgC	CTTTTTACGTA CTTGTTAACTA CTTgTTRacTA	ITTTATATTT IAAAATGTTR IaaaATaTTa	RTGTRACARAI RGATGATTGTI RgaTaAcaaa	ACAAATTCTCT CTTTGCTTGTF acaaacTcgca	ATCCAGCTTI ATACAGCGA ATaCAGCGa	GTGCTGT CRGCAGT caGCaGT
	1821	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	192 0	1930	1940	195 0
INTRAJB1 anitopoM13forward Consensus	TTGCA T=GC= T_GC,	ATTTGATAAT TTGGAAAG TTGaaAAg	RAACGCCTTG AAGTTA ARaTTa	TTTTGTCATT RAGAGARACT aagaGaaAct	AGCTCGTCATI TGATATTCCTI IaGaTagTCaTI	56GTACCGTI G	ATTCTACGATO •TTCTT-GGTO •TTCTa.Gato	iTCACCATCAF iTTAT iTcAc	ACCATTACTA TITACCA attacca	IGATACAGT- Igitctagtg Igatacagt,	CGGCTGATTG CCGC-GATTA CCGC,GATTA	AATCGTTGACH Ratcgacgcgt Aatcgacgaca	IAACGGTGRG IAACGGTARA IAACGGTaRa	CGATGAT RTTGGGA agagGaa
	1951	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080
INTRRJB1 anitopoM13forward Consensus	AAAG(TTAT(aaAg(CTIGTACGAC CG-GRAC-TC Cg.GaAC.aC	CTITCATCAA CGATGACCAT CgatcAcCAa	TTITTCAAA TAATTCAGA TaattCAaA,	GCCTCTTGAR	CRAGGATTT	CTGTACGAGTI	RECORTAGATO	GATGTCGCTT	CGTCCAAAAT	CRAGATTIT	GGTRATTTCA	CAARAATACG	 1 Agcgata

Figura 19. Alineamiento de la secuencia obtenida con el *fragmento E* utilizando el primer M13 (forward) del vector 2.1-TOPO (amitopoM13-forward) con la secuencia nucleotídica de la α -amilasa intracelular de la cepa JB1(intraJB1).

	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
INTRA148 anitopoM13-reverso Consensus	GGCRG	AATGGTTC	STCGAARCAA	CRGGAGTTTC	IGGTTTTCGCT GGTTTTCGCT GGTTTTCGCT	ITGGATGCTA ITTGATGC ITgGATGC	TCARGCATATC CTAGTT CaaaTc	GATTCATT(G-TTCRAA G.TTCRAA	CTITATGAGCAI Cattatagagaa Cattatagaa	ATTICATCCG ATTCTT ATTCcg	CGATATGRAG TGGTTTTACC cGaTaTgAac	GARARATACG TTCATTGCGT gaaAaagacg	GTAAGGATTT GTAGCAATCA GTAacaATca	TTATGTT Agatggt agatggt
·	781	790	800	810	820	830	840	850	85 0	870	880	B 90	300	910
INTRA148 amitopoM13-reverso Consensus	ITTGG Atcac atcac	CGAATTCTI CARATGCA CaAATgCa	GGAACGGTGA ITTTCAGA ggaaCaGA	IGAAAAAARCT Igattttccf IgAaaaaaCa	AACAATGACTI IAAAAAGGCTGI ARAAAgGacgi	ICCTTGCAAC ICGCAGCAAC ICccaGCAAC	GACTGGACACC ACCGTCTTC aaC.,GaCacC	GCTTCGAT TGGTAGATI gcgTaGAT,	CTAATTGA GCACAPATARCI CaAATaaa	IGTICGTC-T Aftiggtcat Battcgtc,t	CCACCARAAT CCTCAGTAAC CCaCaaaAAc	CTTTTTGAAG Cacaaccaaa Cacaaccaaa	CAAGCAAAAGA CCCGCAC-GT CaagCAa,Ga	AARAGCT TGTAGCA aaaAGCa
	911	920	930	940	950	96 0	970	980	990	1000	1010	1020	1030	10 4 0
INTRA148 anitopoN13-reverso Consensus	CATTA C-TTC C,TTa	CGATTTAC TARATGAC IcaAaTgAC	GACAAATTTT Gattagtttc Gacaaatttc	TAATCATACI TTCGTTARTI TaagcaaAcl	TTGGTGAAAAA Atgccaacaa atgccaaaaa	NTCAGCCTAA Caaagcgaat Baaagccaaa	CTCTGCCGTTF CAATTGAAAAA CaaTgcaaaaa	CTTTCGTTI CRGATI CaGaTi	GACAACCATGA GATTTT GAaTga	TACCCARCGA I TARCAACAG I aaaCARCaa	GGACRAGETC TGAC=-GTTG gGACGcTc	TTGAATCTAC TAGCCATTAA TagaaactAa	AATTGACGAA Attcgtc AatcgaC	TGGTTCA TTTA TTcA
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
INTRA148 anitopoM13-reverso Consensus	RACCA TGGCA aacCA	IGCEGCTTA IGCCECCTTI IGCCECCTA	CGCTCTCATC CACCGTGTCC CaCccTcacC	TTACTTCGCI GTGATATTTI gTaaTacgci	CARACTGGTCT CCACAGGCATT CCACAGGCATT	TCCATGCATC TACTTGCARC TaCatgCAaC	TTCTACGGTG AAGTTTTGCGI aacTacgGcGi	ICTRCTACG ICTTGTTGG ICTacTacG	-GCRITTCAGG CTCHATTCATA ,gCAattCAga	TGRATTTGCA AAGATCGTCA aaaATcggCA	CARCARGACT CCACAGACAT CaACRaaaaT	TTCAAGATGA TTCCAAGACC TTCcaAaaaca	TATTGATAAG TGAAA Ta,ARa	TTACTIT TAGCATT TagCatt
	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
INTRA148 anitopoM13-reverso Consensus	TCTTR 6{ g,R	IAGACRAGC IAGCCRCCC IAGaCRacC	AGCTGTTTAT CACTCGCCAA aaCTcgccAa	GGTAAAGAAI Ggaaccaat Ggaaccaat	ATGRACTATTT ITCTTTATCT ATgaacTATcT	TGACAATCCA TTATRCTCAT TgAcAatCaa	IAACTGCATTGI 'AAATTTTY AAATTTgi	ATTGGTCAT Atcagccat Atcagccat	ATCTTGGAGAT TTATT atatt	AAAGAGCATC ACCATC ,AcCATC	CTACTICTCT TCATTICTAT CechctTCTAT	TGCTGTTTTA TTGTTCAA TTGTTCAA	ATCAACAACG CTTTTCCAAA IaTcaaCaAaa	CTCATTC ITTAICA- CTaica,
	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
INTRA148 anitopoM13-reverso Consensus	TACAG TGTTG Tacag	CAAAACGA Cacatc-a Cacatc-a	ATGTTTGTAG Atgtcagttc Atgtcagtac	GCAAAAAATI CTAGCCAGT CCAaaaAaTi	SEGCAGGAAAA ICACCGCAATT YcaCaGcAAaa	ACGTTTACAC TCTTTANAA aCgTTaAaA,	ATTATCTCGGI CGCTGI CgCgGI	IAATCAAAA ICTACT IaaaCa	TTCTRCTATCG TGCTGTTG Tactatc6	TCATTGACGA T-GTAGAAAA T.aTagAaaa	IAGAAGGTTAC Iggtgatctac Nagaaagctac	GGCAGTTTTC AGCA-TTTTC GGCA,TTTTC	CAGTIGGCGC AGTGCGACTA GaggcGaCga	AGRATCC Itgratta Iagratca
	1431	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560
INTRA148 anitopoN13-reverso Consensus	GTCT(ATTTC aTcT(CTGCTTATA CARAGTRAT CaaagTAaa	TTCCACAAGA TTAATA TTAAgA	TCAATAAAT Acactgaca Acactgaca	CATCTTATARA CATCT CG- ART CATCTCa , Ra a	ACAAAAAAAACO Acattcagco Acaaaaaca	XATTAGACTTT XCC Xac	AATCTAAT	CGTTTTTACAT	BATTATTTT	TATGTATTACF	ITTACCCAGCI	TGTGCTGTTT	IGCATTTG

Figura 20. Alineamiento de la secuencia obtenida con el *fragmento E* utilizando el primer M13 (reverso) del vector 2.1-TOPO (amitopoM13-reverso) con la secuencia nucleotídica de la α -amilasa intracelular de la cepa 148 (intra148).

	1691	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820
extra148 anitopoM13reverso Consensus	ATCTTT	ACAAAGACG	CGACAGTGA	CTGCTGTTAA GG	TAAATTCCAT TTTTCGCTTT TaaacgCcaT	AATGCCATGI Gatgcc-tai aatgcc,tai	GTTGGAGAATO GTTGTTO GTTGato	CAGAATACCT Caaacatttt Caaaaacct	ITCGTAATCCTC IACGAAATTCTT IacGaaatcctg	GTGGTGATG -tggtt tggtg	AACAAGTTGC TTAC TTaC	RATGATTGAA CTTCATTGCG BatcAttGaa	CGTGGCACAAI TGTAGCAATCI cGTaGCAaaai	ARGETGC Argatgg Argatgg
	1821	1830	1840	1850	1860	1.870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950
extra148 anitopoM13reverso Consensus	TGITAT TATCAC Tatcac	TGTGAACCT CAAATGCAT CaaaaaCaT	TGTTGACGG TTT TgT	CGACAAACAA CAG CAa	ATTAATICTG Atgatt Atgaatt	AAACTAATT •TCCAAAAA ,aaCaAAaa	TGGCTGATGG Aggctgacgci aggctgacgc:	TACATACACI Igca-Acaco Igca, Acaco	IGACAAGGTTTO XICTTO XGC,,TTO	TGGTCGRCA TGGTAGATG TGGTaGAca	ATTTAATGTT Cacaaataa aacaaataa,	TCARATGGTC -CAATTGGTC ,CAAatGGTC	GTATTACAGG ATCCT-CAGTI aTacT,CAGg	TAGCGTT PACCACA PACCACA
	1951	1950	1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080
extra148 anitopol113reverso Consensus	CCATCA Accoca aCagCA	ICGCTCA-GC ICCCGCRCGT ICCCgCA,Gc	CGTTGTTTT TGTAGCACT CGTaGcacT	GTATGATGAC TCTAAATGAC gcaaaATGAC	CARGC-TAGC GRTTAGTTTC cAaga,TagC	CAAGCAGCT TTCGTTRAT caaGcaaaT	CAAGITITCAG Catgecraca Caagecaaaa	TGATGGTTF ICAAAGCGAF ICAAAGCGAF	ACAAAGAAGGCO Atcaatgaaaaaa AcaAAgaaaaaa	ACANTAGCA Itcagatgat IacAaaagaa	TTTCTAAAGC TTTTTAA TTTcTAA,,	CACAGAAGTA CRACAGTG , ,CRaaAGTa	ACATTGARAG Acgttgtagc Acgttgaaac	CTARAAA Cattaa Caaaaaa Caaaaaa
	2081	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	2210
extra148 amitopoN13reverso Consensus	TGCTGF TTC=GT TgC,Ga	ACTCTGCGAC ICTTTATGGC ACTcTacGaC	TTACAABCT A-GCCGCCT a,aCaaaCT	TGGTAATGGT TCACCGTGTC TcacaaTGgc	CAAGAGGGTAG CGTGATAT C.,GagatAg	CTTATARAG TTGCCACAG cTgacAaAG	RCGGTGATARI CATTTACTTG aaggTaaTaa	NGTCACTGTI CAACAAGTTI BaaCAaggTI	TGGTGAAGGGCT TTGCGACTTG=1 TgGcGAaggG,1	TGAAGCTGG TGGCTCAAT TGaagCaag	TCAATCAACT TCATAAAGAT TCATAAAGAT TCAaaaAaaT	ACTCTAACAT CGTC-ACCAC actC, RaCAc	TGACTGCAAC Agacatttcc agacagcaaC	AGGAGECT ARGACCT Ragacct
	2211	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310	2320	2330	2340
extra148 anitopol113reverso Consensus	GAC661 GA GA,	ICAATCAACH AATAGCH ,,,AacAaCh	IACGAAGACA Ittgragcca Iacgaagaca	TACACTTTCA -CCCCACTCG I, aCaCacTCa	CAATGAAAGA CCAAGGAA CaaagaAA,,	ICCCAAGTGC ICCAATTTTC ICCAAagTgC	TGAGACTAAC TITATCTITA TgaaaCTaaa	ATTIACTIC IACTCATAA BacTaaTaa	CAAAACCCAGA Attitatcagci aaaaaacCAGa	IAATTGGTCA XITTATTAC Xattagtaa	GAAGTETATE CATCTCATTT cAacTcaaTg	CTTACATGTA CTATTTG CT,ATgTa	TTCAGCAAAA TTCAACTTTT TTCAACaaaa	GATAATA CCAAATT CCAAAATT CCAAAATA
	2341	2350	2360	2370	2380	2390	2400	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470
extra148 anitopoH13reverso Consensus	AACTTI AACATI AACATI AACATI	CTTEGCECAT Sttg-Cricat Cttg.Cacat	IGGCCTGGAA ICAATGTC I,,CaagGaa	ICTAAGATGAC AGTTCCTAGC IagaacaTaal	TAAAGAAGCA CAGTTCACCO CcAaagaAcCa	NTCAGGTCGT Schatttctt AcaAggTCgT	TATTCAATCR TARAACG TA,,,AAaCa	CAGTTCCTGI CTGACTAI CaGa,,CTai	CTTCATATGCTI CTTGCTGTTGTI CTTcaTaTgcTi	GAAGRAGGTO Stagra Gargar,,	TGPAAGTAAT ATGGTGAT AaaGTaAT	CTTCACAAAT Ctaca -gc at Ctaca,aaAt	AATCAAGGCT TTTCAGTGCG aaTCAagGCg	CRCAATA -ACTAT- ,RCaAT,
	2471	2480	2490	2500	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600
extra148 anitopol113reverso Consensus		RAAATGAAG (GATTTGATTT Gaattaattt Gaattaattt	CAAAGCAGAA CARAGTAATI CARAGCAaaa	IGGCTTGTACT TRATAACA IgaaTaACa	ICAAAAGCTG ICTGACACAT ICTGACACAT	GTTTGATGCC CTCGAATACA cTcgaATaCa	TGATGTGCC TTCAGCACC TgaaGcaCC	AGCAGGAAARA	CTCGTGTAA	CTTTGATAAC	CCTGGCGGTT	GGGATAGTGC	GRATECT

Figura 21. Alineamiento de la secuencia obtenida con el *fragmento E* utilizando el primer M13 (reverso) del vector 2.1-TOPO (amitopoM13-reverso) con la secuencia nucleotídica de la α -amilasa extracelular de la cepa 148 (extra148).

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	13
INTRAJB1 anitopoM13-reverso Consensus	CTGCAG	ACTTACTGG	TTATGTTAGC	AGCTCTCAG	TAACATGCCA	TTAAAACCT	TCGCTAGAAT	CATCATTIGC	TGCAAACCCA	TCTCAATTAI	TTGGTCACATT GGT agT	TTACTGCTTT TTTC-GCTTT TTac.gCTTT	TTTATGGTGG GATGC GatGc	TGAAT CTAGT cgRat
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	26
INTRAJB1 anitopoM13-reverso Consensus	GGTCAT GTTCAA GgTCAa	TCRTATCATI Acatitta= acatatca,	CTAA <mark>g</mark> ttcta Cgaaattctt Cgaaattcta	IGGATTTTTT TGGTTTTAC IgGaTTTTac	CTTAGAACTT CTTCATTGCG CTTaaaaccg	TITAGTTATT TGTAG TgTAG	TTTACRACGC CARTCA CAAcca	AAACGTTTGC Agatggtatc AaAcggtagC	ATTATTIGAA Accaratgca Accaratgaa	CTITICTGCTA ITTTTCAGATO IctttCaGato	AARATAAAAGG Gattitcca-A aAaataaaA,A	IAAAAGTCTTT IAAAAGGCTGI IAAAAGgCTga	ICTCTTTGAGG ICGCAGC ICgCAGc	TACTC ARCAC aACaC
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	39
INTRAJ81 anitopoM13-reverso Consensus	ATCATG GTCTT - atcat,	ACRAATGAR CTGG- atga,	ACTITGATGO TAGATGO Tagatgo	CAATACTTTG CRCRAATARC CRCRAATARC	ARTGGTATTT ARTTGGTCAT ARTTGGTCAT ARTgGgacaT	ACCARATGAC CCTCAGTAAC aCcaAaTaAC	GGTAAACACT CacaaacaCaCa CacaaacaCaCa	GGAAACGTTT IC-CCGCACGT IC.aaaCacgT	GGCAGCCGAT TGTAGCA gGcAGCa	GCTTCTCATI -CTTCTAAA CTTCTAAA	CTTGCCCAAAA TGACGATTA TGaCcAaaA	AGGTATCACI GTTTCTT(}GTaTCacl	CAAAATTTGGA CGTTAATC-A CaaaAaTc.,A	TGCCC TGCCR TGCCa
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	48 0	490	500	510	52
INTRAJB1 anitopoM13-reverso Consensus	CTGCTT CARC CaaC,,	TTAAAGCGA AARGCGA ,AARGCGA	CTCATGAC Atcaattgaa atcatgaa	CAGTGRTGTG TAATCAGATG TAATCAGATG	GGCTAT-GGC ATTTTTTAAC agcTaT,aaC	GTCTATGACC ARCAGTGACC aaCaaTGACC	CTTTTTGACCT ATTGTAGCCAT CTTgTaGaCaT	AGGTGAATTT ITAAATTC I,TaAATTC	AACCAAAAAA GTCTTTATGO :aaCcaaAaal	GEARCEGTTE CAGECEGEET GeAaCEGeee	GAACAAAAATAC TCACCGTGTCC gaACaaaaTaC	:GGARCARAR :GTi :Gal	SCTGATTACCT Gatatttgcca GataattacCa	RGAAG CAG IaAG
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	65
INTRAJB1 amitopoM13-reverso Consensus	TATTIC Attia aattaC	XAGCTCTTAA XTTGC X,TTaa	AAATAATGGI AACAAGi ARaaaG	TATTGAGCCT ITTTGCGACT TattgagaCt	TTRECTGACG TGTTGGC- T.,GctGaC,	TCATTTTAAA TCAATTCATA TCAATTCATA	ATCATAAGGCT Hangatcgtcf HaaaaaaggCa	IGCTGCTGACC 1-CCACAGACA 1.CcaCaGACa	ACACCGAAA Atticcaaga AacaCCaAaA	CTITAAGGT CTGAAATAG CTgaAAgag	TGTTGRAGTTO Cattgragcci cattgragcci	SCTCCAGAAG ACCCCACTCG ACCCCACTCG	RCCGAACAF CCAAGGAACCF aCaGAACaf	IAGGTT ATTTT IAggTT
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	78
INTRAJB1 amitopoM13-reverso Consensus	TCAGTO TTTATO Tcaato	CARCCTTTTG Cittatactc Caacatactc	AAATTGAAG ATAAATTGAAG ATAAATTTT AaAaagaag	GGTGGACAAH Atcagccati agcaGaCAaa	ITTTTACCTTT TRTTACCATO Tattaccato	GAGGTCGCCI TCATTTC gaagTcC	ACCGTGCCCTA IATTTGTTCAA aacgTGccCal	ICAACGACTTI ICTITTCCAA ICaacgaCaa,	IGARTGTCAT ATTAACAT , Aataacat	IGGTACCACT -GTTGCACA ,,GTacCACa	TTACGGGCACI TCAA TCAa	AGACTATGAT Igtcagt agacaat,	GTCAAAACTGO •TCCTAGCCAO •TCaaAaCcao	STRAAA Sttcac StaaRa
	781	790	800	B10	820	830	840	850	860	870	880	890	900	91
INTRAJB1 anitopol113-reverso Consensus	TGGCA1 GCA4 GCA3	TTTCCARAT Attiction atticaara	TCAAGGAGA A-ACGCTGA Aa, AagcagA	CAACAAA-GI CTACTTGCTI CaACaaa.gi	STTGGGCAAAQ STTGTGTAGAA STTGgGcAaAa	CAAGACTIG IATGGIGATC IaaaGacaTc	GTTGACGGTGI IACAGCATTT gacaaCagTgi	IARATOGOAR TCAGTGCGAC aafaTGcafai	ITACGATTAC Intgaattan Taacanttaa	CTCATGTATG TTTCAAAGTA cTcaaaaaTa	CCGACCTAGA ATTTARTARC IacgaaaTAaa	TTTCRAACRT Actgacacat actcraacat	CCRGRAGTCRI CTCGAATACRI CcaGAAgaCAI	ICANAN ITCAGC Icanaa
	911	920	930	94 0	95 0	96 0	970	980	990	1000	1010	1020	1030	104
INTRAJB1 anilopoM13-reverso Consensus	TATCTI CC ca	ACGAT TGGGC	CAGATTGGTT	TGTTGAAAC	ACTGGAGTTI	HGCGGTTCC	GTTTAGACGC	CATTARGCAC	RTCGATTCTT	TCTTCATGGG	AAACTTTATC	CGTGATATGA	AAACCRAGTC	CGGCAA

Figura 22. Alineamiento de la secuencia obtenida con el *fragmento E* utilizando el primer M13 (reverso) del vector 2.1-TOPO (amitopoM13-reverso) con la secuencia nucleotídica de la α -amilasa intracelular de la cepa JB1 (intraJB1).

	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	91 0
INTRA148 AMILASA Consensus	TTTGG	CGARTTCTGG	AACGGTGA	ITGARAAAACTA	IACAATGACTI	RCCTTGCRACI	GACTGGACAC	CGCTTCGATCT	ARTTGATGT	ICGTCTCCAC	CAAAATCTTT R	TTGAAGCAAG TCATGGTTGT TcaaaGcaag	CAAAGAAAAAA Catcgaacaaa Caagaaaaaa	CTCATT CTCATT CTCAAC
	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
INTRA148 AMILASA Consensus	ACGAT TC aC	TTACGACAAA TTGC-ACAAA TTaC,ACAAa	ATTITTAAT Ittctggaa Attctgaaa	ICATACCTTGG TGTGCTGG BCaTaC.,TGG	GAAAAATCA Gacgattca Gaaaaatca	GCCTAACTCTI Acttgtaagti acctggaagti	GCCGTTACTT CACGTAATTA caCGTaActa	TCGTTGACAAC TCATGCACAT• TCaTgcACAa,	CATGATACC TAACA aaACa	CAACGAGGAC RAATGA aRAcgA	AAGCTCTTGA CTTGA CTTGA	ATCTACAATT TTCAGAAAGT aTCaaaRAgT	GACGAATGGT GCCTTACI GaCTgaci	ICARACC CAGARCC CAGARCC CaaRACC
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
INTRA148 AMILASA Consensus	AGCGG TGT aGc	CTTACGCTC CAAACCI CaaACCa	ICATCTTAI ICTTTIGGI ICTTTIGGI ICTTIGGI	CTTCGCCAAAC CATCCACAA CatCcaCAA	IGGTCTTCCA TAAT Taaa	TGCATCTTCT Agaatcttct agaatcttct	ACGGTGACTA TCAACCA aCaACcA	CTACGGCATTI Caccagctiti Caacagcatti	ICAGGTGAAT	TTGCACAACF AGCF AaCF	AGACTITCAA Aaggtatcaa Aaggtatcaa	GATGATATTG IAGCTAAT- IaGatAat.	ATAAGTTACT •TCTGTTGCTI •TaaGTTaCT;	TTCTTA ST=CGCG gT_Cgca
	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
.INTRA14B AMILASA Consensus	AGACA TAGCA aaaCA	AGCAGCTGT ACCAG=GGT ACCAG ₊ gGT	TTATGGTAI TTGAAATGI TTaaaaTai	ARGAAATGAAC AATTTTTTACC AAgaaaTgAaC	TATTTTGACA TTTARCATCT TaTaacaaCa	ATCCAAACTG Gtaaactcag IataaAaacag	CATTGGTTGG CCAAAG CaaaaG	ITCATATCTTG ARTATG RacaTG	GAGATAAAGA TAAATTTATT gAaATaaAga	GCATCCTACI CAATGCTTCI caATCCTaCi	ITCTCTTGCTG Atcactagcag Atcactagcag	ATTITANTCAN Gigittitti Gigigiaatcaa	CAACGCTCAT ATACCAT IaaAC,CAT	TCTACAG TTTTCAT TcTaCAg
	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
.INTRA148 Amilasa Consensus	CRAAF ARAGF aARaf	ICGAATGTTT ITACGTTG ITACGTTG	GTAGGCAA Acaaccat Acaaccat	AAAATGGGCAG Gataagggc aaaaggggc	GRAAAACGTT	TACAGATTAT	CTCGGRAATC	CARAARTTCTAC	TATCGTCATT	GACGAAGAA	GGTTACGGCAG	TTTTCCAGTI	GGCGCAGAAT	CCGTCTC

Figura 23. Alineamiento de la secuencia obtenida con el *fragmento C* utilizando los primers R2 y R4 (amilasa) con la secuencia nucleotídica de la α -amilasa intracelular de la cepa 148 (intra148).

	781 I	790	800	810	820	830	840	850	86)	870	880	890	900	910
extra148 amilasa Consensus	GATAAI	IATGCAAGCC	ATTAAAGACG	CAGGTTACAC	ARGIGTTCA	RACGTCCCCA	ATCAACACTG	TTGTAGCTG	GCGAAGGCGGG	ANTANGAGTI	TAAAAATTO	GTACTATCA Atcatogi ,,,Accatca	ATATCAACCAA Itgtcatcgaa atatcaaccaa	CTATTT Chactt Caactt Caactt
	911 	920	930	940	950	96 0	970	980	99 0	1000	1010	1020	1030	1040
extra148 amilasa Consensus	ATRAAN Chacto aaflaaa	RTCGGTAACT CTTGCACAAT aTcGcaaAat	ATCAATTAGG TTCTGGAATG atCaagaAgG	TACTGAAGAA Toctgotgac Toctgotgac Toctgoogaa	GAGTITAAA Gattcaact Gagtcaaaa	GAAATGAATC TGTAAGTCAC gaaAaGaaaC	GTGTGGC- GTAATTATCA GTa.,TagC,	TGATCAATA TGCACATTA TGCACATTA TGaaCAaTA	CGGTATTAAAN AcaaaatataAa acaaaatataAa	ATTATTGTGG Itgattcagai Atgattcagai	H==TGCCGT=(HGTGCCCTTRI H,,TGCCgT,I	CTTARACCACI CCAGAACCTG CCAGAACCCac	ACAA-CTTCAG TCAAACCACTT aCAA,CcaCag	ATTACA TTGGCA aTgaCA
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
extra148 amilasa Consensus	ATCAAI TCCACI acCAai	RTCAGTCARI Rataatagai Aachatagai	XAARTCAAAAA Atcticticaa AtcticticaaaAf	ICATCCCTAAC ICCACACCAGC ICCACACCAGC	TGGHCACAC TTTTAGCAA TggaaaCAa	-GGAARCRCT Aggtatcaar ,ggaaacaa	ICTCATTICTG IGCTAATTCTG IGCCAATTCTG	AT-TEGEAT TTGETETEG at,cgGcag	AATCGCTACGI CGTAGCAACCI IaaTaGCaACCI	ATGITACTCA AGGGT==TTGI AgGgT,,Tcal	HARTGCACTTI Raatgarttt Raatgartti	CITACACTIT TITAC=CTIT CITAC_CTIT	ATGATTGGAAT AACATCTGTAA AacATcg&aAa	ACTCAA ACTCAG ACTCAG ACTCAG
	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
extra148 amilasa Consensus	AAT CCAAR AAa	GAATATGTC Gaatatgt- Gaatatgt,	CAACAATATTT AAATTTT AaATTT	IGTTGAGTTAI Attcaatgo attcaatga	ITTGAAACAA Itcatcacta Itcaaaacaa	GCAGTAGCTI GCAGGTGTT GCAGgaGcT	GATGGTGCGGG ITTTTATAC gaT ₊₊ Tgagaa	ICGGTTTECG CATTITECA CagTTTeCa	CTATGATOCC ItaaagataCG IcaaagataCc	GCAAAACACA TTGACAACCA gcaAaAaaCA	TTGAATTGCC TGATAAGGGC TgaaAagGcC	ACECCANTAC	GGCAGCAACTI	CTGGAA

Figura 24. Alineamiento de la secuencia obtenida con el *fragmento C* utilizando los primers R2 y R4 (amilasa) con la secuencia nucleotídica de la α -amilasa extracelular de la cepa 148 (extra148).

	1821	1830	1.840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950
INTRAJBI amilasa Consensus	ATTTG	ATAATAAAC	GCCTTGTTT	TGTCATTAG	TCGTCATGGI ATCATGGI ,,,aTCATGG	;TACCGTATTC TG=TC TG=TC	TACGATGTC AtcganC Gaacgaa,,C	ACCATCAACCA Arcticaactc Arcticaactc	TTACTARGAT Tigcacaaat Tigcaaaaat	ACAGTCGGCT TCTG aCaG	GATTGAATCG GAATGTGCTG GAATGAaccG	TTGACAAAC GTGAC GTGAC	GGTGAGCGAT	GATABAGC Gattcaac Gataaaac
	1951 	1960	1970	1 98 0	1990	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080 1
INTRAJBI anilasa Consensus	TTGTA TTGTA TTGTA	Ingecente Ingechegen Ingechegen Ingechegen	, ATCRATTTT ATTRTCATC ATcRacaTg	TCRAAGGCCI CACATTAACI YcaaAagaaCi	ICTTGARCARI HAATGACTTI HAAATGACTTI	GGATTTCTGTF GA==TTCAGAF GaTTCaGaf	ICGAGTATCG Angtgcctta Angagcatca	ATAGATGATGT CCAGRACCTGT acAGRacaTGT	CGCTTCGT CANACCACTT Ca.,CcaCgT	CCAAAATCAA TIGGCATCCA CCAAAAATCAA	, GATTTTTGGT Chataataga chataataga	HATTICA-C Hattich-C Hactictic Hactica,C	, AAAAATACGA AACCACACCA AAaaAcACcA	GCGATAGT GCTTTTAG GCgaTaag
	2081	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	2210
INTRAJBI amilasa Consensus	CHARAGE Charage Charage Charage	ICTGRCGTT IG-TATCAAA IG, TaaCaaa	GACCTTGTI GCTAAT G.,CTaat	GACAATGACGO TCTGTTGCTO ,aCaaTgaCgo	CTCCCGCATCI STCGCGTAGCI CTCCCGcAgCI	HGACANGTAN A-ACCAGGGTI A.ACaNGgaaş	STGTCATAAC Itgaaataaa StGaaataAa	CATTIGGCAAC Ittittaccti IcattigaCaac	TGACGAATGA TAACATCTGT TaaCaaaTGa	AGAAATCTGC A-AACTCAGC A,ARatCaGC	GTTGGCTGCT CARAGAR caaaGaa	ITTTGCTGCT TATGTAAAT Tatgcaaat	GCAATCACTT TTATTCAATG gcRatCAatg	CTTCACGT CTTCATCA CTTCATCA CTTCAcca
	2211	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300 23	05 I			
INTRAJBI amilasa Concencue	GTAGO CTAGO CTAGO	CTICTGGGTT XGGTGTT Yaq GqCTT	ACCATAAG ITTTTTATA ITTTTTATA) AATGTTATC) CAT-TTTTC) AT TT3TC	GTGGATTGTA Atagana ta	CCAACTITTA CCAACTITTA C==GTTGACAI	ACCAAGTOTO Accatgataf Accatgataf	TTGCAGAACCA IGGGC	ITACCGATTTO	ittege en ee	 11: 11:			

Lonsensus ciHulag,,bguilaccaiHaalaHi,ilailalaaHga,iHL,,acigacHHLLHabacaaggul,....

Figura 25. Alineamiento de la secuencia obtenida con el *fragmento C* utilizando los primers R2 y R4 (amilasa) con la secuencia nucleotídica de la α -amilasa intracelular de la cepa JB1 (intraJB1).

En las figuras 17 a 25, podemos observar bases en color rojo que indican que son idénticas en ambas secuencias. El porcentaje de identidad entre las secuencias se determinó con el programa MegAling (DNASTAR). El alineamiento de la secuencia del *fragmento E* obtenida con el primer M13forward realizado con las enzimas intra y extracelular de la cepa 148, y con la intracelular de la cepa JB1, mostró un porcentaje de identidad del 37.3%, 29.3% y 32.9% respectivamente. La otra parte del *fragmento E* obtenida con el primer M13reverso, también fue comparada con las enzimas intra y extracelular de la cepa 148 y la intracelular JB1 en donde mostró un porcentaje de identidad de 23%, 27.5% y 31.8% respectivamente. La secuencia obtenida con el *fragmento C* también fue comparada con las mismas enzimas y mostró un 25.3%, 27.1% y 18.5% respectivamente. Una forma de determinar si dos secuencias nucleotídicas son homologas, esto es que dos proteínas tengan la misma función o no, se utiliza un criterio de identidad en el que si dos secuencias tienen al menos el 40% de identidad, se puede inferir que son homologas (From Sequence to function, 2000). Esto indica que si bien las secuencias nucleotídicas de los fragmentos obtenidos son un tanto pequeños con respecto a las secuencias de las enzimas reportadas, tienen un bajo porcentaje de identidad. De acuerdo con los resultados, se puede inferir que el gen de la α -amilasa de Streptococcus bovis A57206 aislado del pozol es diferente al gen de las α amilasas ya reportadas, lo cual explicaría las diferencias en las propiedades fisicoquímicas que presenta esta enzima dado que es termoestable y alcalifílica (Tinoco, 2003).

8. CONCLUSIONES

- ✓ Se determinaron las condiciones de la reacción de PCR para amplificar el gen de la α-amilasa de Streptococcus bovis A57206, siendo éstas: la temperatura de alineamiento de 54°C, 2.5mM de Cloruro de Magnesio y 316ng de templado.
- Los primers específicos para la identificación del gen de la α-amilasa de Streptococcus bovis A57206 aislado del pozol, fue el primer reverso y los degenerados R1 y R4; con los cuales se encontraron dos secuencias, una de 400pb y otra de 1400pb aproximadamente.
- ✓ La secuencia del fragmento E obtenida con el primer M13 forward presenta un 37.3% de identidad con la secuencia nucleotídica de la enzima intracelular de la cepa 148.
- ✓ La secuencia del fragmento E obtenido con el primer M13 forward presenta un 29.3% de identidad con la secuencia nucleotídica de la enzima extracelular de la cepa 148.
- ✓ La secuencia del fragmento E obtenida con el primer M13 forward presenta un 32.9% de identidad con la secuencia nucleotídica de la enzima intracelular de la cepa JB1.
- ✓ La secuencia del fragmento E obtenida con el primer M13 reverso mostró un 23% de identidad con la secuencia nucleotídica de la enzima intracelular de la cepa 148.
- ✓ La secuencia del fragmento E obtenida con el primer M13 reverso presento un 27.5% de identidad con la secuencia nucleotídica de la enzima extracelular de la cepa 148.

- ✓ La secuencia del fragmento E obtenida con el primer M13 reverso mostró un 31.8% de identidad con la secuencia nucleotídica de la enzima intracelular de la cepa JB1.
- ✓ La secuencia obtenida con el fragmento C mostró un 25.3% de identidad con la secuencia nucleotídica de la enzima intracelular de la cepa 148.
- ✓ La secuencia obtenida con el fragmento C mostró un 27.1% de identidad con la secuencia nucleotídica de la enzima extracelular de la cepa 148.
- ✓ La secuencia obtenida con el fragmento C mostró un 18.5% de identidad con la secuencia nucleotídica de la enzima intracelular de la cepa JB1.
- ✓ El porcentaje de identidad es menor al 40%, por lo que se puede concluir que el gen de la α-amilasa de Streptococcus bovis A57206 aislado del pozol es diferente al gen de las α-amilasas ya reportadas, lo cual explicaría las diferencias en las propiedades fisicoquímicas que presenta esta enzima.

9. PERSPECTIVAS

- Amplificar el gen completo de la α-amilasa de Streptococcus bovis
 A57206 aislado del pozol, diseñando primers a partir de las secuencias encontradas.
- Expresar el gen en Escherichia coli y comprobar la actividad amilolítica.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Ampe F. O., Moizan C., Wacher C., Guyot J. P. Polyphasic Study of the Spatial Distribution of Microorganisms in Mexican Pozol, a Fermented Maize Dough, Demostrates the Need For Cultivation-Independent Methods to Investigate Traditional Fermentations. Appl Environ Microbiol. 65(12): 5464-73. 1999.
- Ausubel F. M., Brent R. Short Protocols in Molecular Biology. Ed. Wiley
 4^a edition. 1999.
- Camacho de la Rosa N. A., Díaz G. FçK. M., Santillana H. M., Velázquez M. O. Productos de Cereales y Leguminosas. Manual de Prácticas, Facultad de Química, UNAM. 2001.
- Corpet F. "Multiple Sequence Alignament with Hierarchical Clustering". Nucl. Acids Res., 16(22), 10881-10890, 1988.
- Cotta M. A., Whitehead T. R. Regulation and Cloning of the gene Encoding Amylase Activity of the Ruminal Bacterium Streptococcus bovis. Appl and Environmental Microbiol., 59(1):189-96.1993.
- Díaz R. G., Guyot J. P., Ruiz T. F., Morlon G. J., Wacher C. Microbial and Phisiological Characterization of Weakly Amylolitic but Fasta-Growing Lactic Acid Bacteria: a Functional Role in Supporting Microbial Diversity in Pozol, a Mexican Fermented Maize Beverage. Appl Environ Microbiol. 69(8):4367-74. 2003.
- Escalante A., Wacher C., Farres A. Lactic Acid Bacterial Diversity in the Traditional Mexican Fermented Dough Pozol as Determined by 16S rDNA Sequence Analysis. Int J Food Microbiol. 28(1-2):21-31. 2001.
- Fogarty W., M and Nelly C. T. In Progress in Industrial Microbiology.
 Servier Publishing Company. Amsterdam Vol 15. 1979.

- Freer S. N. Purification and Characterization of the Extracellular Alpha-amylase from *Streptococcus bovis* JB1. Appl Environ Microbiol. 59(5):1398-402, 1993.
- Hoseney R. Carl. Principio y Tecnología de los Cereales. Editorial Acribia, S. A., Zaragoza (España). 1991.
- Laguna J., Piña G. E. Bioquímica de Laguna. Editorial El Manual Moderno. 1ª edición. 2002.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.
 Biología Celular y Molecular. Editorial Panamericana. Buenos Aires
 Bogotá. 4ª edición. 2002.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2^a edition. 1989.
- Satoh E., Nimura Y., Uchimura T., Kozaky M., Komagata K. Molecular Cloning and Expression of two alpha-amylase Genes From *Streptococcus bovis* 148 in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 59(11):3669-73. 1993.
- Satoh E., Uchimura I., Kudo I., Komagata K. Purification, Characterization and Nucleotide Secuence of an Intracellular Maltotriose Producing Alpha Amylase from *Streptococcus bovis* 148. Appl Environ Microbiol. 63(12):4941-4. 1997.
- Tinoco M. J. Producción, purificación y caracterización bioquímica de las amilasas extracelular e intracelular de *Streptococcus bovis*. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. 2003.
- Vihinen M., Manteala P. Microbial Amylolitic Encimes. Department of Biochemistry University of Turku. Vol 24, Issue 4. 1989.
- Alkamy Quick Guide TM for PCR. Alkami Biosystems, Inc. Vol 1. First edition. 1999.

 From Sequence to function: case studies in Structural and Functional Genomics. Chapter 4, 2000.

11. APÉNDICE

Soluciones de Biología Molecular

A.1 Gel de agarosa para DNA.

Gel de agarosa al 1%	
Para preparar 30mL:	
-Agarosa	0.3g
-TBE(1X)	30.0mL
-Bromuro de etidio (10mg/mL)	1.4μL

Solución de stock del buffer TBE	
Para preparar 1L:	
Stock	10X
-Trizma base	108g
-Ácido bórico	55g
-EDTA 0.5M pH 8.0	40mL

Loading Buffer DNA		
Para preparar 10mL:		
-Azul de bromofenol	0.25%	0.025g
-Xileno cianol FF	0.25%	0.025g
-Glicerol	30.0%	3mL
Hacer alieuetas de 1ml y auardar	a 1ºC	

Hacer alícuotas de 1mL y guardar a 4°C

Soluciones para la extracción del DNA plasmídico mediante lisis alcalina

Solución I
 Glucosa 50mM
 Tris-HCI pH 8.0 25mM
 EDTA pH 8.0 10mM
 Preparar en 100mL y esterilizar 15min en autoclave.
 Almacenar a 4°C.

Solución II

	Conc. Final	Stock	2mL
NaOH	0.2N	10N	4μL
SDS	1%	10%	200µL
H ₂ O			1.760µL

Se prepara al momento, generalmente 2mL.

Solución III

Acetato de potasio 5M	60mL
Ac.acético glacial	11.5mL
H ₂ O	28.5mL
El resultado final es 3M de K+ y	5M de acetato.
Esta solución se guarda en hie	lo.

Soluciones para preparar las células competentes

Solución A

MOPS pH 7.0 Cloruro de Rubidio 10mM 10mM

Solución B

MOPS pH 6.5	100mM
CaCl ₂	50mM
Cloruro de Rubidio	10mM

Nota: Estas soluciones se preparan y se filtran un día antes.

Medio LB 1X líquido para bacterias

Bactotriptona	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	10g
Aforar con H2O a:	1000mL

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH y esterilizar en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

Medio LB 1X sólido para bacterias

A 1000mL de LB 1X líquido agregar 15g de agar.

Colocar en cajas y guardar a 4°C.

**Kanamicina (stock de 20mg/mL almacenado a 4°C) agregar 40 μL en cada caja.

Agar MRS-almidón al 1.5%

Para preparar 200mL:	
Peptona universal	2g
Extracto de carne	lg
Extracto de levadura	1g
Almidón	3.0g
K ₂ HPO ₄	0.4g
Tween	0.2g
Hidrogenocitrato Diamonico	0.4g
Acetato sódico	1g
Sulfato de magnesio	0.02g
Sulfato de manganeso	0.05g
Agar-agar	2.4g

Aforar a 200mL de agua desionizada y esterilizar 15min en autoclave. Almacenar a 4°C.

Caldo MRS para el crecimiento de Streptococcus bovis

Para preparar 200mL:	
Peptona universal	2g
Extracto de carne	lg
Extracto de levadura	lg
Glucosa	2.0g
K ₂ HPO ₄	0.4g
Tween	0.2g
Hidrogenocitrato Diamonico	0.4g
Acetato sódico	lg
Sulfato de magnesio	0.02g
Sulfato de manganeso	0.05g

Aforar a 200mL de agua desionizada y esterilizar 15min en autoclave. Almacenar a 4°C.



- E -

	Model 3100 Version 3.7 Basecaller-3100PO BC 1.5.0.0	down_intrainlcio.ab1 Tania Orozco P6SF9952 Cap 1	Signal G:979 A:851 T:1142 C:750 DT3100POP6{BDv3}v1.mob 3100 Points 530 to 8800 Pk 1 Loc: 530	Page 2 of 2 Thu, Apr 29, 2004 9:29 AM Wed, Apr 28, 2004 8:45 PM Spacing: 10.45{10.45}
	BC 1.5.0.0		Points 530 to 8800 Pk 1 Loc: 530	Spacing: 10.45{10.45}
640	650 6	60 670 680 690	700 710 720 730 740	750 760
hon	Antonicant			
ACT ANOT CA		AA CARTINE COM CA AGA A A CANE NEW TOOL AT A COM	እንዲ ዲ አ / እእድን ዲ አ/ / እምስም እንዲ እንዲእም እድረ እእደ አ ጣ እምላእእ. እንዲ ዲ አ / እ እንዲ አ / / / እምላ እንዲ አ / / እምላ እ እንዲ እንዲ / / / / / / / / / / / / / / / / / / /	
170	780 790	800 810 820 830	840 850 860 870	880 890
20000				
NINNNNNNN 300	NNANNNNNNNN 910 920			

ODE.