



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

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

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

TANIA RAQUEL OROZCO AMARO



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2005

m. 343645



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

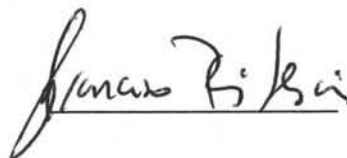
2^o. Suplente Prof. Salazar Zazueta Alfredo

o Sitio donde se desarrolló el tema:

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

o **Asesor del tema:**

Dr. Ruiz Terán Francisco




o **Supervisor técnico:**

Dra. Díaz Ruiz Gloria



o **Sustentante:**

Orozco Amaro Tania Raquel



INDICE	Página
1. RESUMEN	iii
2. ANTECEDENTES	1
2.1 El proceso de elaboración del pozol.	1
2.2 Carbohidratos del maíz y del nixtamal.	
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 bovis</i> 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 <i>Streptococcus bovis</i> A57206 aislado del pozol.	4
3. INTRODUCCIÓN	6
4. OBJETIVO GENERAL	7
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
6. METODOLOGÍA	8
Diagrama de flujo	
6.1 Obtención de la cepa de <i>Streptococcus bovis</i> A57206 aislado del pozol y comprobación de su actividad amilolítica.	9
6.2 Diseño de los primers para la reacción de PCR.	9
6.3 Extracción del DNA genómico de <i>Streptococcus bovis</i> A57206 aislado del pozol.	10
6.4 Detección y cuantificación del DNA genómico de <i>Streptococcus bovis</i> 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.	
6.14 Extracción y purificación del DNA plasmídico (Miniprep).	18
6.15 Secuenciación de los fragmentos amplificados.	19
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
7.1 Reactivación de la cepa de <i>Streptococcus bovis</i> 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 <i>Streptococcus bovis</i> A57206 aislado del pozol.	24
7.4 Electroforesis horizontal sumergida en un gel de agarosa para la detección del DNA genómico de <i>Streptococcus bovis</i> A57206 aislado del pozol	25
7.5 Determinación de las condiciones de la PCR para amplificación del gen de la α -amilasa de <i>Streptococcus bovis</i> A57206.	26
7.5.1 Efecto de la variación de la Temperatura de alineamiento en la PCR.	26
7.5.2 Efecto de la concentración de $MgCl_2$ y del templado en la PCR.	28
7.5.3 Efecto de la concentración de $MgCl_2$ y del templado en la PCR utilizando combinaciones de los primers degenerados R1, R2 y R4 con los 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 transformantes.	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.	40
7.9 Alineamientos de los fragmentos de PCR obtenidos con las secuencias nucleotídicas de las α -amilasas reportadas de las cepas JB1 y 148.	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 frota 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.

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:

-
1. 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.
 3. Enzimas que hidrolizan enlaces α -1,4 y α -1,6; por ejemplo la amiloglucosidasa.
 4. Enzimas que hidrolizan únicamente enlaces α -1,6, como lo hace la pululunasa.
 5. 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 α -glucosidasa (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 (Sato 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).

Sato 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).

Sato 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

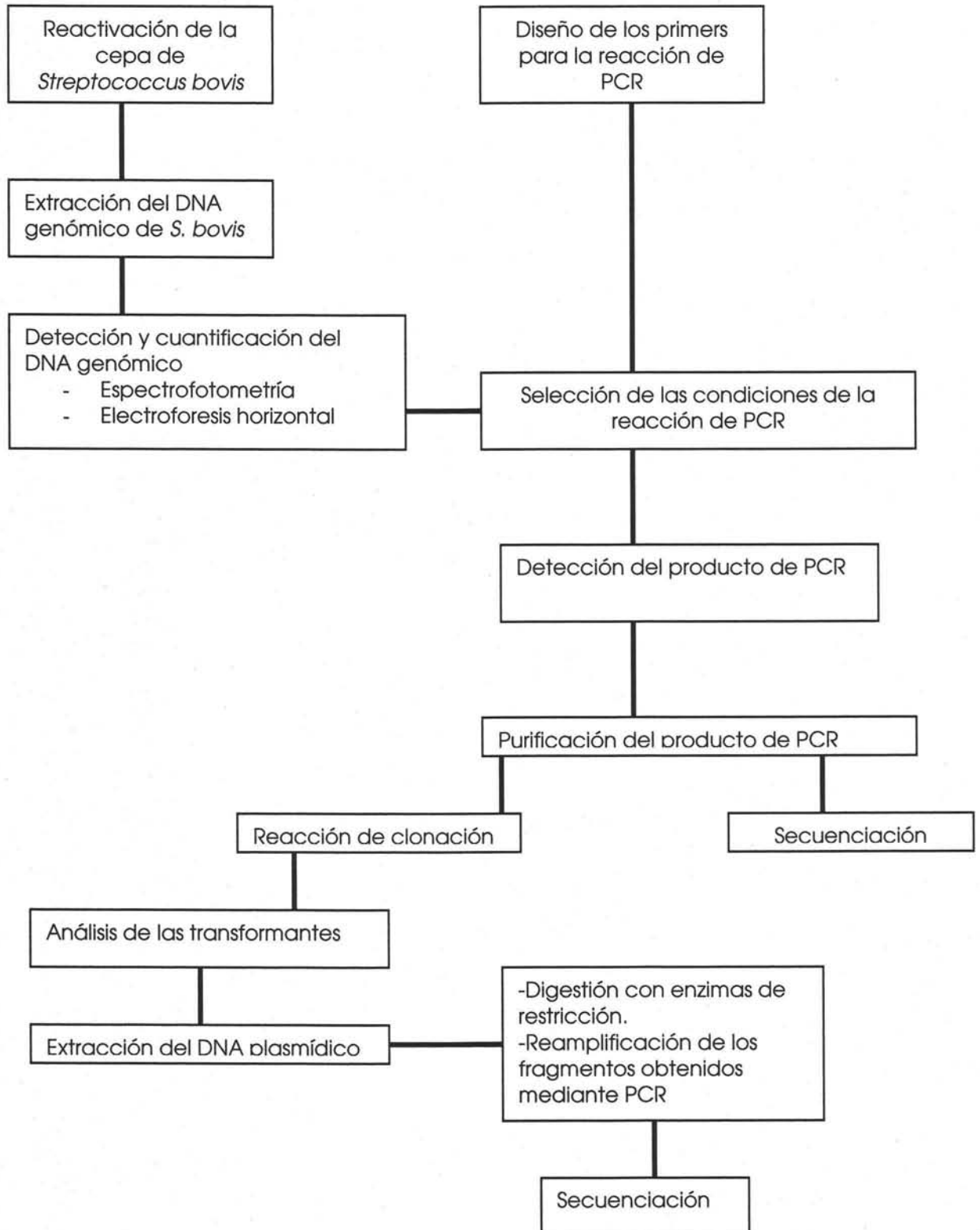
Identificar el gen de la α -amilasa intracelular de *Streptococcus bovis* A57206 aislado del pozol.

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	ATG CAA TAC TTT 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	GGT TTT 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 700 μL de buffer TES (apéndice), se les agregó 10 μL de lisozima (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y se incubaron a 37°C durante 1h. Posteriormente, se agregaron 15 μL de proteinasa K (20mg/ μL) y 5 μL de RNAasa (10mg/mL) y se incubaron a 65°C durante 30min. A continuación, se les agregó a cada tubo, 150 μL de SDS al 10%, se agitaron e incubaron 10min a 65°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después, se les agregaron 800 μL de fenol-cloroformo 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 1 hora. La detección del DNA se hizo 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 MgCl₂ 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 1 minuto, la temperatura de alineamiento que fue *variable*, y la temperatura de extensión a 72°C por 1 ó 1.5 minutos (en algunas ocasiones). Finalizados los ciclos, se sometió a 72°C durante 10 minutos 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. Concentración de reactivos para la reacción de PCR.			
Reactivos	Concentración inicial.	Cantidad de reactivos por mezcla de reacción	Concentración final
Agua desionizada		<i>variable</i>	
Buffer de PCR*	10X	5µL	1X
Cloruro de magnesio	5mM	<i>variable</i>	(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	<i>variable</i>	79, 158, 217 y 316ng
DNA polimerasa**	5U/µL	0.5 µL	0.5U
	V.final	50 µl	

*contiene Tris-HCl 20mM (pH 8.0) y KCl 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 30 μ L 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 700 μ L de L2 (apéndice) en la columna y se centrifugó a 11,400rpm durante 1min. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente durante 1min. Se colocó la columna dentro de un microtubo de 1.5mL, se agregaron 50 μ L 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 4.0 μ L, 1 μ L de la solución salina, 1 μ L del

vector y se llevó a un volumen final de 6 μ L con agua estéril. Se mezcló la reacción con una micropipeta de 10 μ 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 10 μ L del stock de *Escherichia coli* DH5 α (en 20 μ L 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 OD₆₀₀ = 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 200 μ L. 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 200 μ L de células competentes y 2 cajas selectivas con Kanamicina.

Se mezclaron 200 μ L de células con los 6 μ L 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 1 mL 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 200 μ L de medio LB y se resuspendieron por inversión. Finalmente, se agregaron los 200 μ L de células a una caja de cultivo LB con Kanamicina (50 μ g/mL), 40 μ L de X-gal (40mg/mL) en dimetilformamida y 40 μ L 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 10 μ 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 500 μ L 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 100 μ L de la solución I (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 200 μ L de la solución II (apéndice), se mezcló por inversión 5 veces y se colocaron en hielo 5min. Pasado este tiempo, se adicionaron 150 μ L 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-HCl 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 ½ 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 40 μ L 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 4 μ L del DNA, 1 μ L del buffer para la enzima, así como 1 μ L de EcoR1, 1 μ L de RNAasa (con el fin de degradar el RNA que pudiera estar presente) y esto se llevó a un volumen final de 10 μ L con agua desionizada. Posteriormente, se mezcló con una micropipeta de 10 μ L 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 obtuvo 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 200 μ L de las bacterias transformadas en 6mL de medio LB con Kanamicina (50 μ g/ μ L) 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 250 μ L de buffer de suspensión de células **G1** (Tris-HCl pH 8.0, EDTA 10mM, 20mg/mL de RNAasa A) al precipitado y se resuspendieron las células hasta homogenizar. Posteriormente se le adicionó 250 μ L 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 350 μ L de buffer de neutralización **M3** (contiene acetato y clorhidrato 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 MRS-almidón 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 24 horas 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 α -amilasa intracelular de *Streptococcus bovis* A57206 aislado del pozol.

PRIMER	5' → 3'
Inicio	ATG CAA TAC TTT 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	GGT TTT CGC TTK GAY GC
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 primers *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.

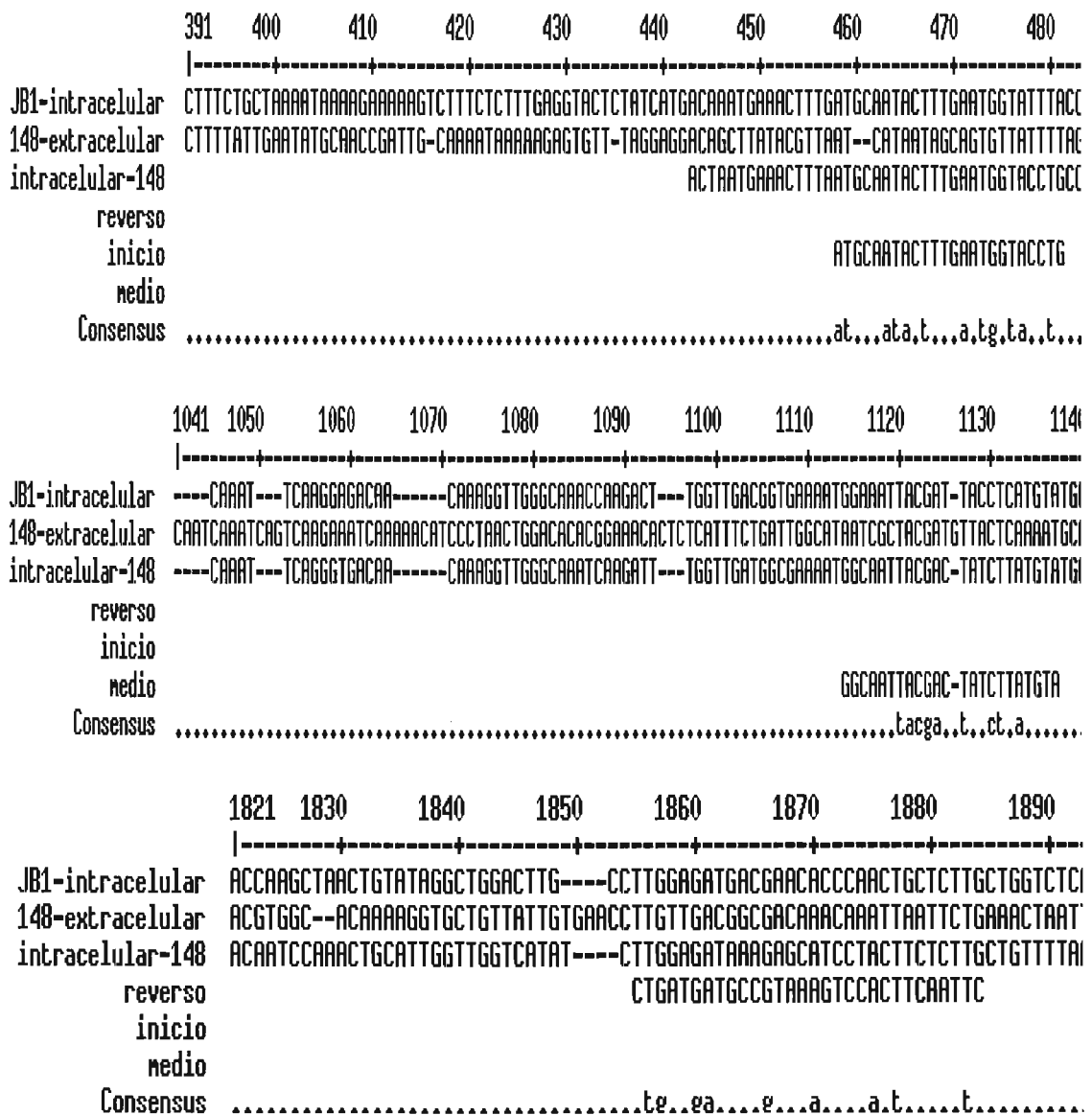


Figura 2. Alineamiento de los primers Inicio, Medio y Reverso con las secuencias nucleotídicas de la α -amilasa intracelular de la cepa JB1, de la intracelular y extracelular de la cepa 148 utilizando el programa MULTALINE (Corpet F, 1988), en donde se muestra las regiones consenso de las secuencias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

	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760		
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----													
JB1-intracelular	AA	AGGARCCGTT	CGARCAAAATAC	GGARCAAAAGCT	GATTACCTAG	AGCTATTT	CAGCTCTTAA	AAATATAT	GGTATTG	AGCCTTTAG	CTGACGTC	ATTTAATC	ATAA	
148-extracelular	TCT	AGGTT	CATTGCTT	ATTTAACAGCT	ATGGTGCT	GGCGATTAG	TTCAAGTTA	AGTCGTTA	ATGCAGAT	GARCAAGT	GTCATG	AAAGATGG	TACGATACT	CATGC
intracelular-148	AA	AGGGACTAT	CCGARCAAAATAC	GGARCCAAAGCT	GACTATCTAC	AGCAATTTCT	GCTTTAAAG	AAATCAT	ATTGCACCTTT	AGCTGAT	GTGTCTT	AAATCACA	AA	
Reg4reverso														
Reg2														
Reg1													GATGTGCTTAAAYCA	
Consensus	ga.g.....ta...ca...	

	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250						
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----														
JB1-intracelular	CA	AAATATCT	ACGATTGG	GGCAGATTG	-GTTT	GTTGA	AACAA-----	CTGG	AGTTA	AGG---GGT	CCGTT	AGAC	GCCAT		
148-extracelular	AAT	GAATAT	GTCC	AACATATTT	GTTG	AGTTATTT	GAAC	AGCAG	TAGCTG	ATGGT	GC	GGAC	GTTCCG	TATGAT	GCCGC
intracelular-148	CA	AAATATCT	ATGACT	GGGCAG	AATG-GTTC	GTCC	GAACAA-----	CAGG	AGTTT	GTG---GTTT	CCGTT	GGAT	GCTAT		
Reg4reverso															
Reg2													GGTTTCGCTTKGAYGC		
Reg1															
Consensus	g.tt.cg.t..ga.gc...		

	1561	1570	1580	1590
	-----+-----+-----+-----			
JB1-intracelular	TTTT	GTTG	AATCAT	GATACCC
148-extracelular	TTGG	ATGAT	GATAGT	GATATTGG
intracelular-148	TTTC	GTTG	ACACCC	ATGATACCC
Reg4reverso	TWCG	HTGAC	AACCAT	GAT
Reg2				
Reg1				
Consensus	.t.....	a..a...	tgat.....

Figura 3. Alineamiento de los primers R1, R2 y R4 (reverso) con las secuencias nucleofídicas 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.

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

Muestra	Abs (280nm)	Abs (260nm)	OD_{260} / OD_{280}	$\mu gAN/\mu L$
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

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 $OD_{260}/OD_{280}= 0.64$, 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.

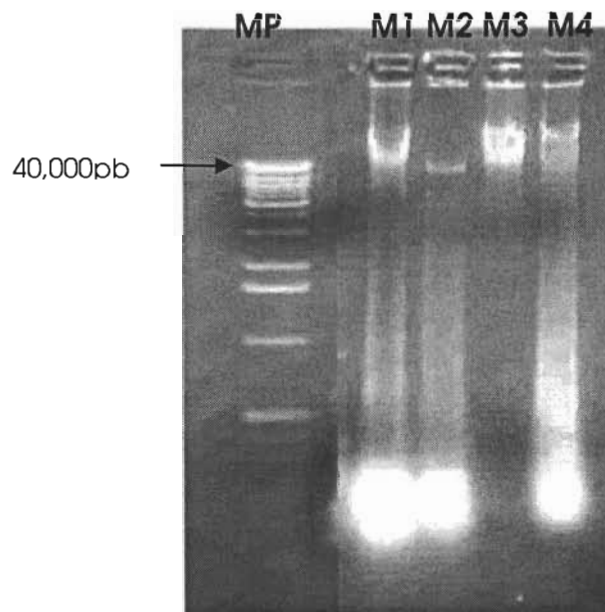


Figura 5. Electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. MP: Marcador de peso λ DNA/Hind III fragments. M1: Muestra 1. M2: Muestra 2. M3: Muestra 3. M4: Muestra 4.

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.

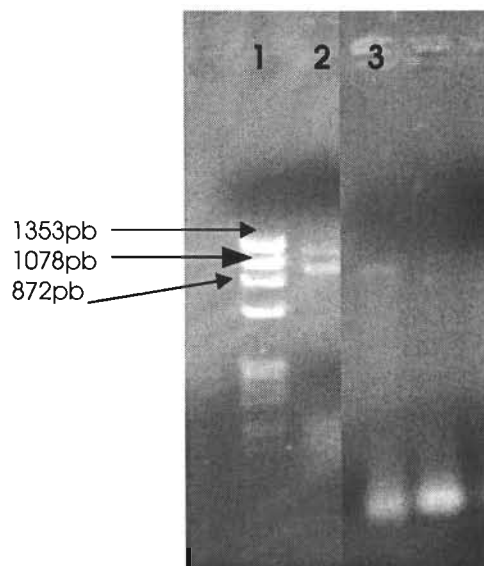


Figura 6. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. 1: Marcador de peso ϕ X174RFDNA/*Hae*III Fragments. 2: Producto de PCR con una temperatura de alineamiento de 51°C. 3: Producto de PCR con una temperatura de alineamiento de 50°C.

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.

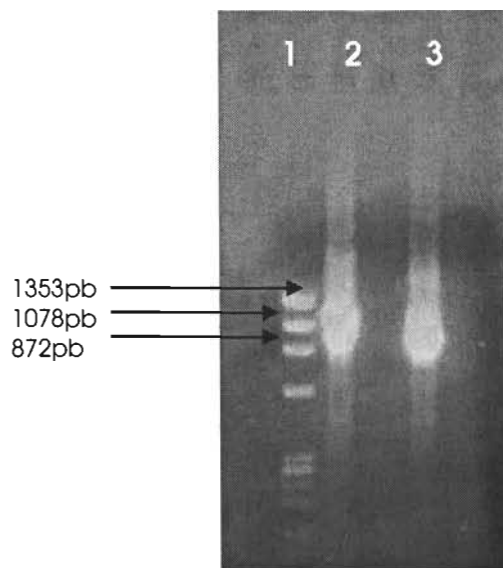


Figura 7. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. Carriles 1: Marcador de Peso ϕ X174RFDNA/*Hae*III Fragments 2: PCR, utilizando como templado a "UP". 3: PCR, utilizando como templado a "DOWN".

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 $MgCl_2$ 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 $51^{\circ}C$ y únicamente se varió la concentración de $MgCl_2$, desde 1mM hasta 2mM, utilizando $158\mu g$ de DNA como templado.

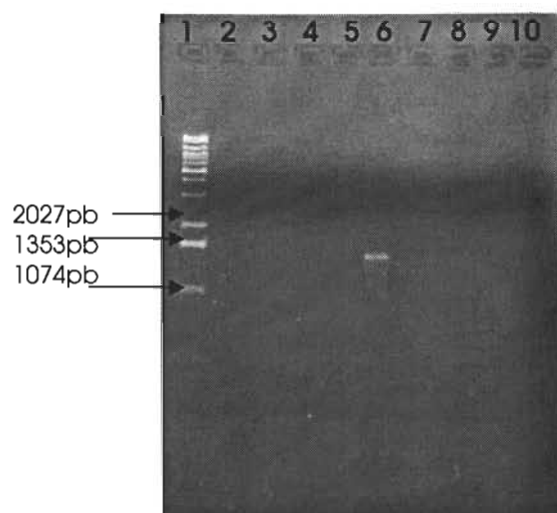


Figura 8. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. Carriles 1: Marcador de peso molecular λ DNA/HindIII fragments. 2, 3 : Primer inicio-reverso; Primer Medio-reverso (con $1.5mM$ $MgCl_2$). 4,5 : Primer inicio-reverso; Primer medio-reverso ($MgCl_2$ 1.5mM). 6,7 : Primer inicio-reverso; Primer medio-reverso ($MgCl_2$ 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 / μL. 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.

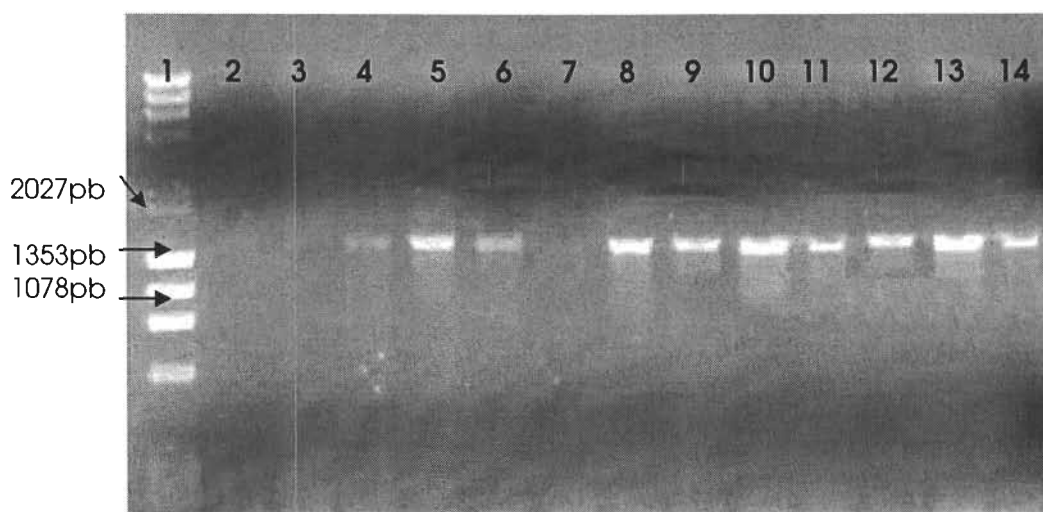


Figura 9. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidilo y sometido a 90V/60min. Carriles 1: Marcador de Peso λDNA/HindIII fragments y φX174RF DNA/HaeIII Fragments. 2,3 4: PCR con 79ngDNA y 2mM MgCl₂. 5,6 y 7: PCR con 158ngDNA y 2mM MgCl₂. 8 y 9: PCR con 237ngDNA y 2mM MgCl₂. 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 $MgCl_2$ 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 $54^{\circ}C$, 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 $MgCl_2$ con $316\mu gDNA/\mu L$ de templado, como ya se había optimizado anteriormente (ver figura 9).

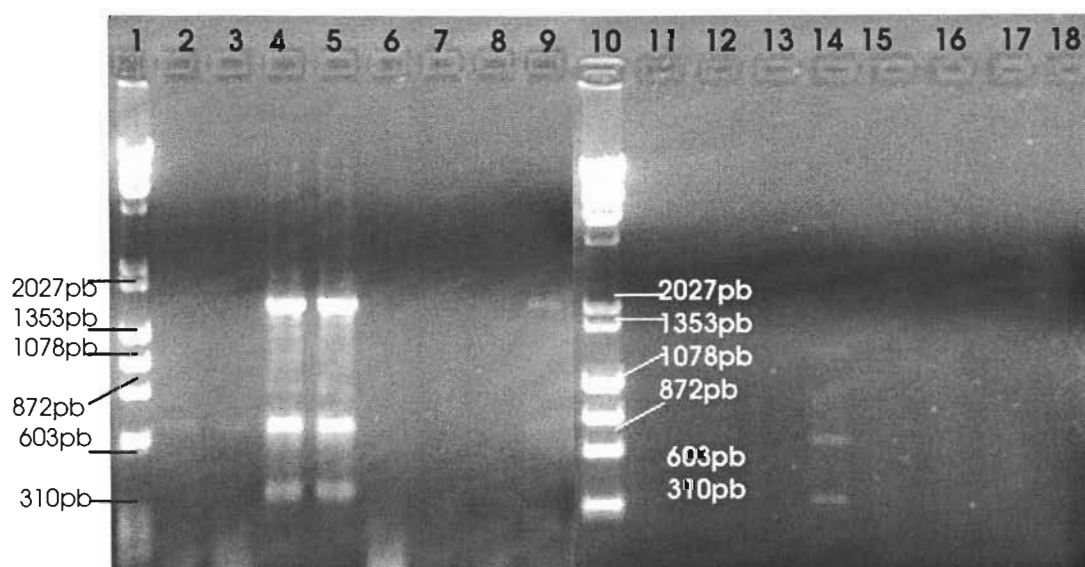


Figura 10. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y sometido a $90V/60min$. Carriles 1 y 10: Marcador de Peso λ DNA/HindIII fragments y ϕ X174RF DNA/HaeIII Fragments. 2 y 3: Primers R1 y R4. 4 y 5: R2 y R4. 6 y 7: Inicio y R4. 8 y 9: Medio y R4. 11 y 12: R1 y Reverso. 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).

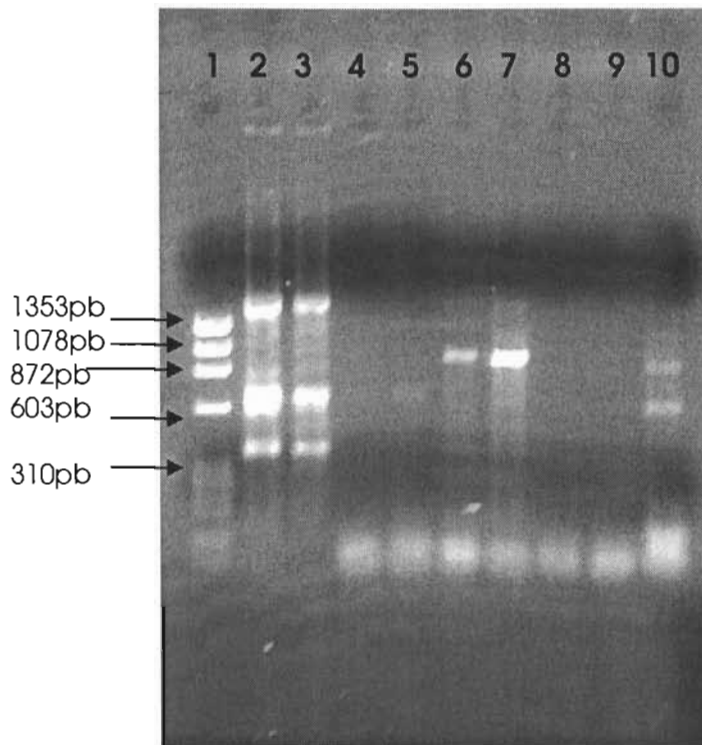


Figura 11. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. Carriles 1: Marcador de Peso ϕ X174RFDNA/*Hae*III Fragments. 2 y3: Producto de PCR (R2-R4). 4 y 5: Primers R1-R4. 6 y 7: Primers R2-R4. 8 y 9: Primers Medio-R4. 10: Primers R2-Reverso.

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 un 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 implicó 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.

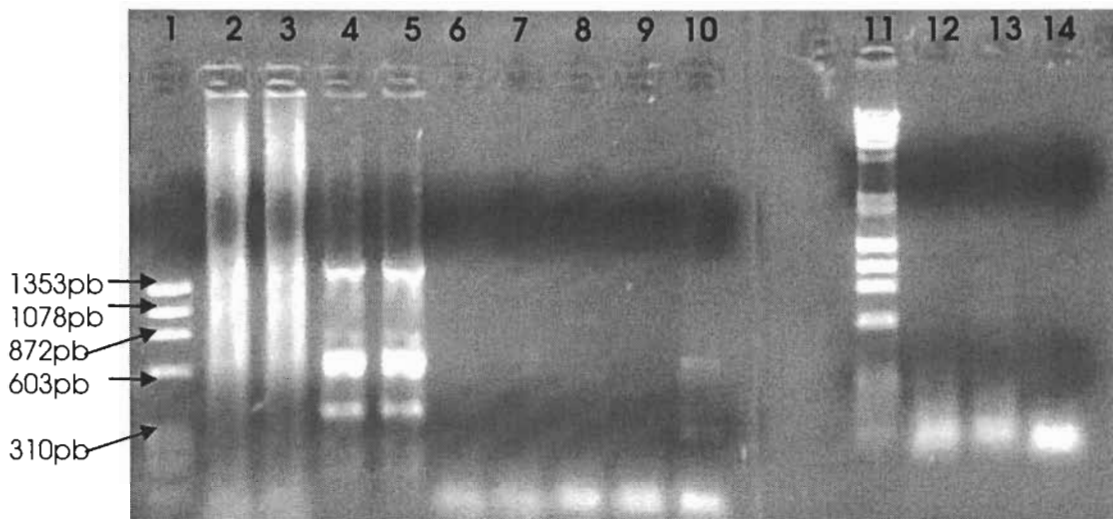


Figura 12. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. Carriles 1: Marcador de Peso ϕ X174RFDNA/HaeIII Fragments. 2 y 3: Producto de PCR (R1-R2). 4 y 5: Producto de PCR (R2-R4). 6 y 7: Primers R1-R4. 8 y 9: Primers R2-R4. 10 y 12: Primers Medio.R4. 11: Marcador de Peso λ DNA/HindIII 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 denominó **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.

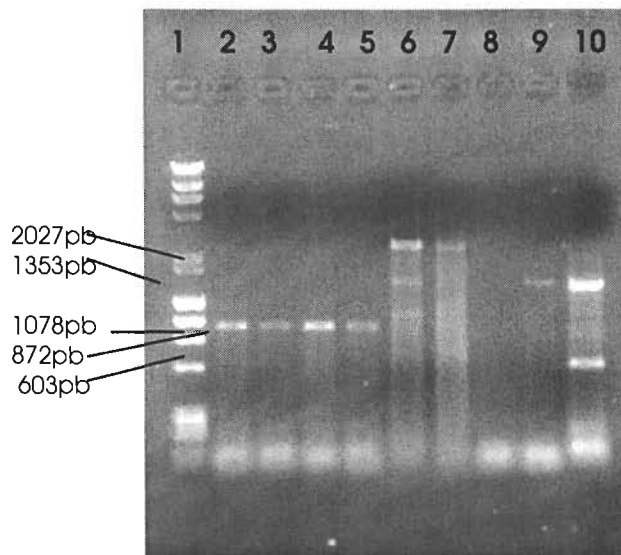


Figura 13. Electroforesis en un gel para DNA de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. Carriles 1: Marcador de Peso λ DNA/HindIII fragments y ϕ X174RFDNA/HaeIII Fragments. 2, 3, 4 y 5: Primers R2-R4. 6 y 7: Primers R1-R4. 8 y 9: Primers Medio-R4. 10: Primers R2-Reverso.

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 μ g/ μ 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 DH5 α , 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 40 μ L totales del DNA plasmídico. La cuantificación del DNA se realizó por espectrofotometría y se obtuvieron 300ng/ μ L.

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 *EcoRI* 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).

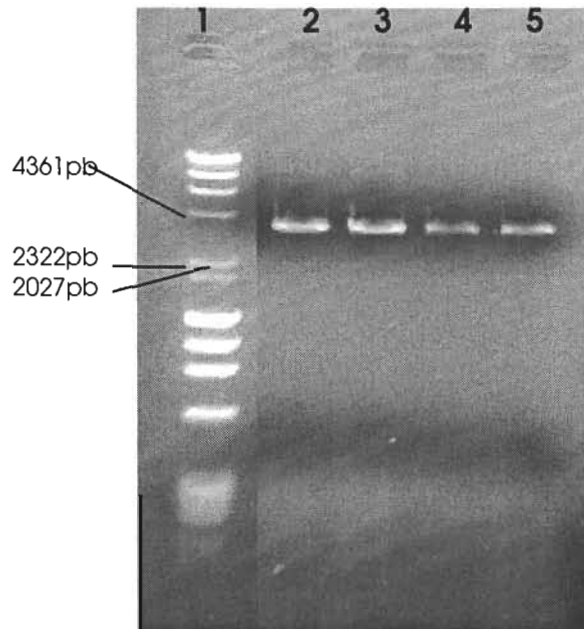


Figura 14. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. Carriles 1: Marcador de Peso λ DNA/HindIII fragments y ϕ X174RFDNA / *Hae*III Fragments. 2: Muestra 1: **Fragmento C** de la reacción de ligación de la banda pequeña amplificada con los primers R2-R4. 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 $MgCl_2$ y una temperatura de alineamiento de 54°C. Se realizó una dilución de 1 en 10 μ L 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

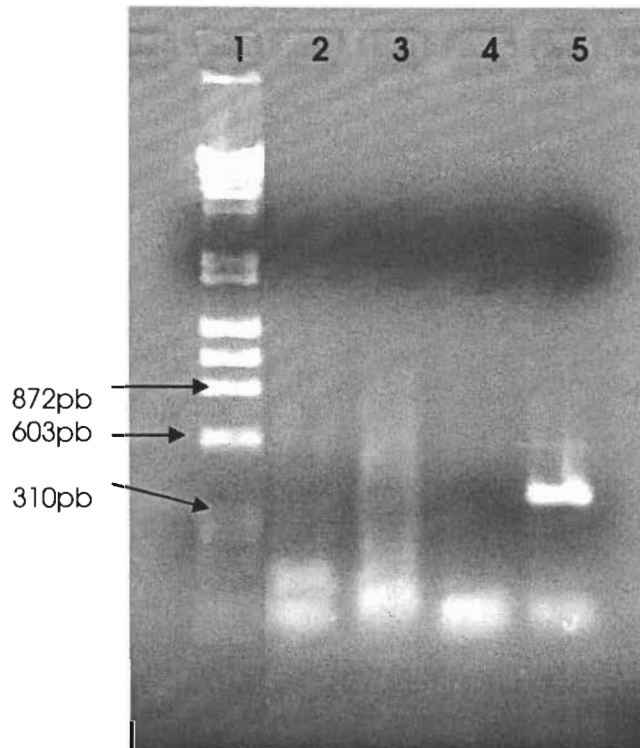


Figura 15. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. Carriles 1: Marcador de Peso λ DNA/HindIII fragments y ϕ X174RFDNA / *Hae*III Fragments. 2, 3 y 4: Reacción de PCR a partir de los primers R2-R4 (**fragmento D**). 5: Reacción de PCR a partir de 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, se cuantificó el DNA espectrofotométricamente, obteniendo una concentración de 350ng/μL. Se hizo una dilución de 1 en 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).

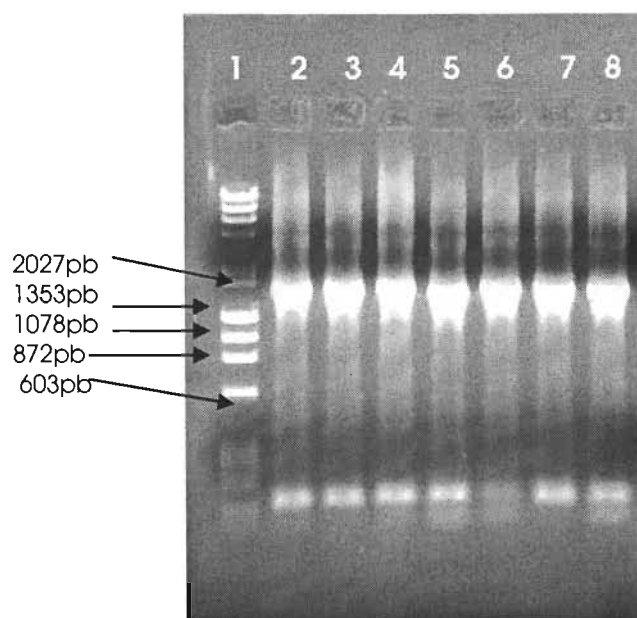


Figura 16. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y sometido a 90V/60min. Carriles 1: Marcador de Peso λDNA/HindI III fragments y φX174RFDNA / HaeIII Fragments. Carriles 2 al 8: Producto de la PCR con DNA plasmídico de la transformación a partir de los primers R2-Reverso 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).

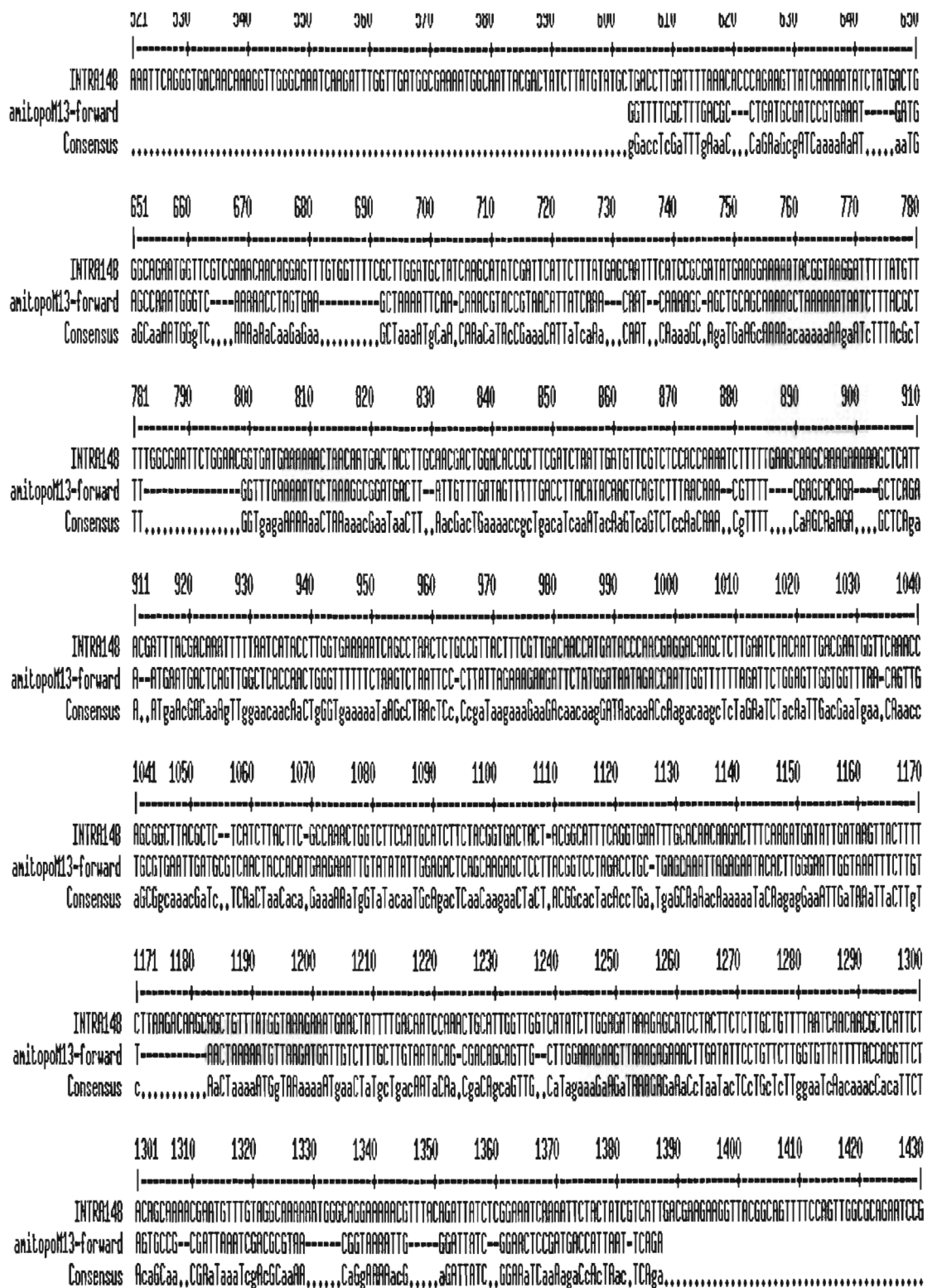


Figura 17. Alineamiento de la secuencia obtenida con el *fragmento E* utilizando el primer M13 (forward) del vector 2.1-TOPO (amitopoM13-forward) con la secuencia nucleotídica de la α -amilasa intracelular de la cebada 148 (intra148).

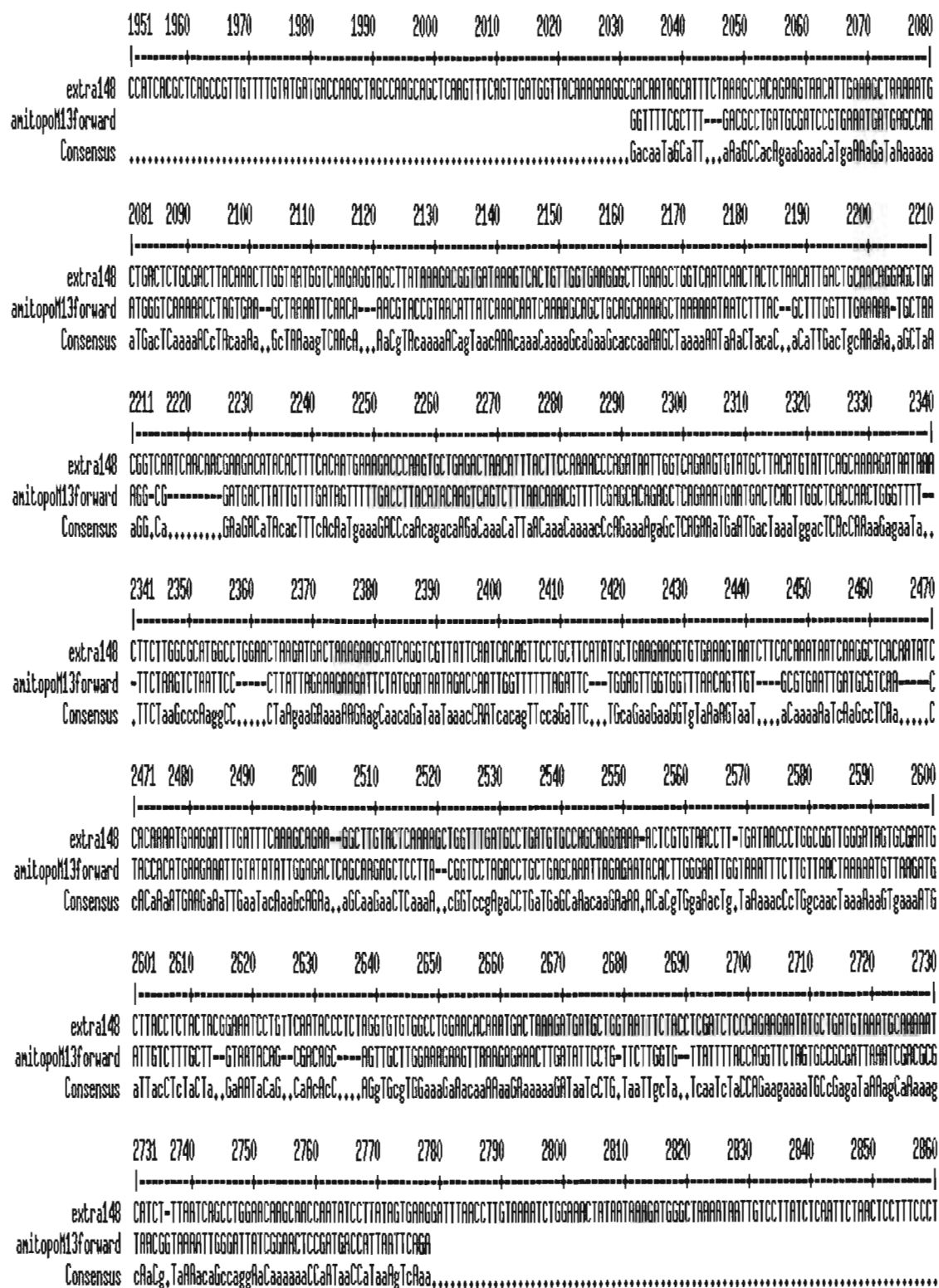


Figura 18. Alineamiento de la secuencia obtenida con el *fragmento E* utilizando el primer M13 (forward) del vector 2.1-TOPO (amitopoM13-forward) con la secuencia nucleotídica de la α -amilasa extracelular de la cepa 148 (extra148).

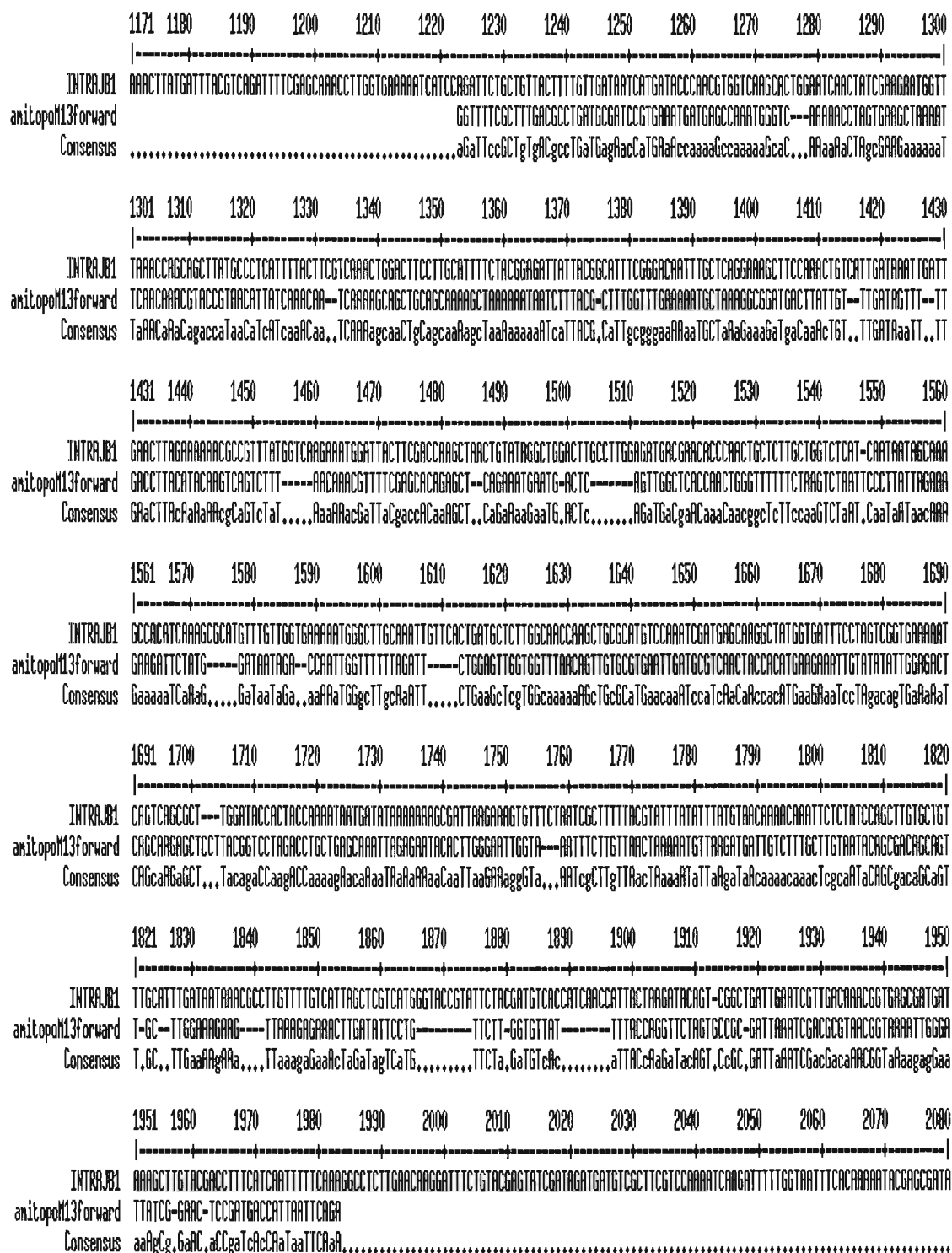


Figura 19. Alineamiento de la secuencia obtenida con el *fragmento E* utilizando el primer M13 (forward) del vector 2.1-TOPO (amitopoM13-forward) con la secuencia nucleotídica de la α -amilasa intracelular de la cepa JB1 (intraJB1).

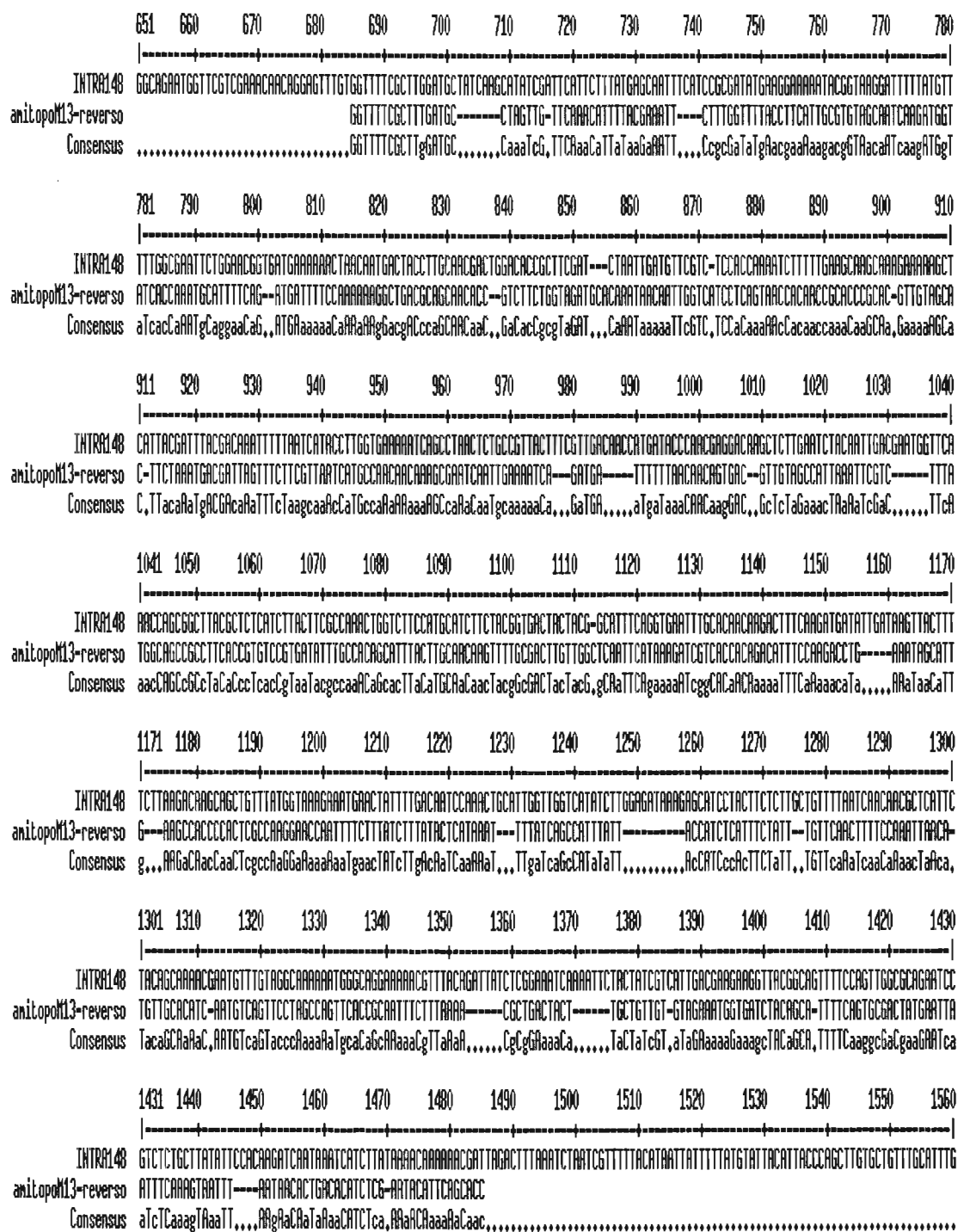


Figura 20. Alineamiento de la secuencia obtenida con el *fragmento E* utilizando el primer M13 (reverso) del vector 2.1-TOPO (anitopoM13-reverso) con la secuencia nucleotídica de la α -amilasa intracelular de la cepa 148 (intra148).

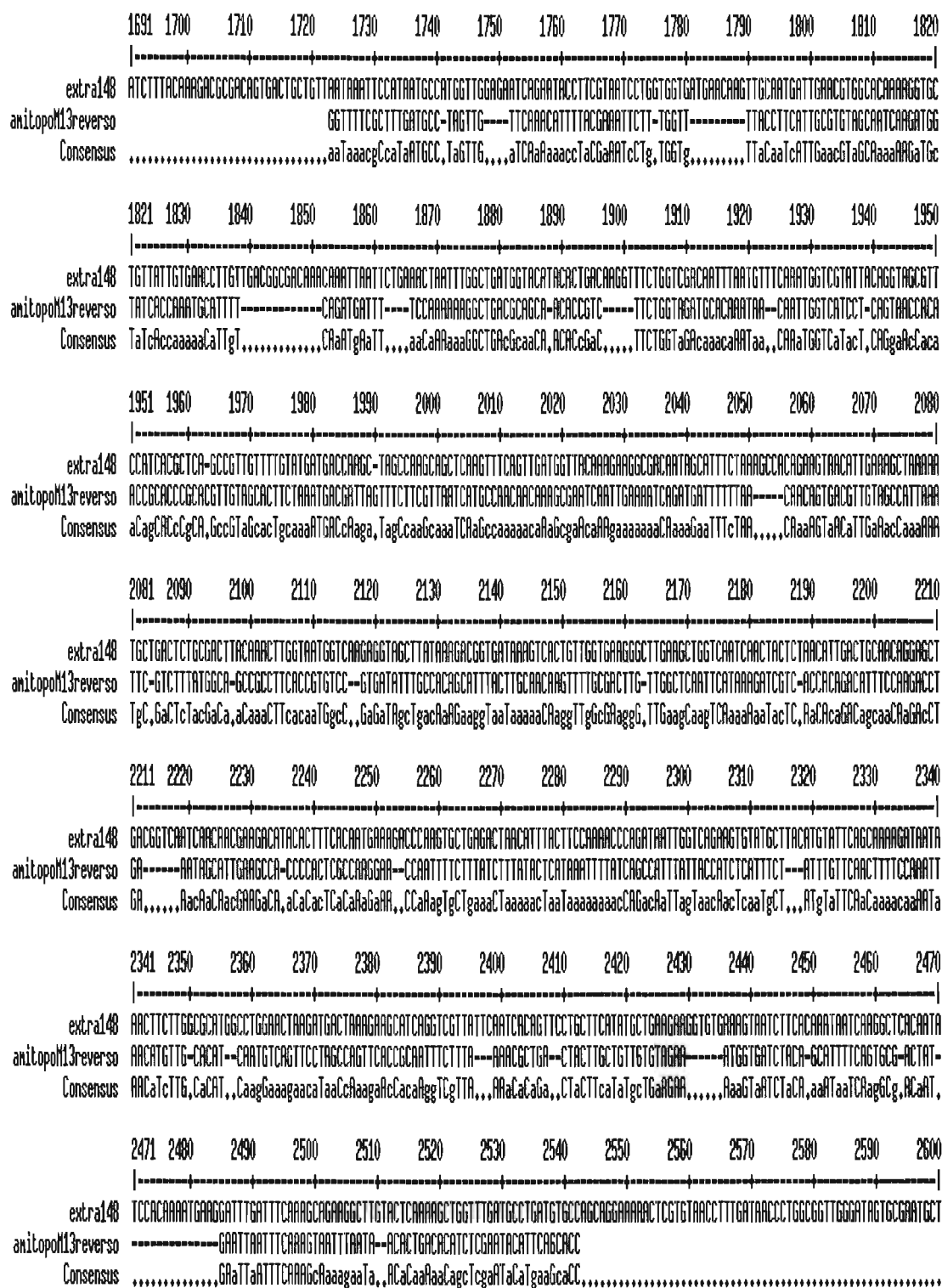


Figura 21. Alineamiento de la secuencia obtenida con el *fragmento E* utilizando el primer M13 (reverso) del vector 2.1-TOPO (amitopoM13-reverso) con la secuencia nucleotídica de la α -amilasa extracelular de la cepa 148 (extra148).

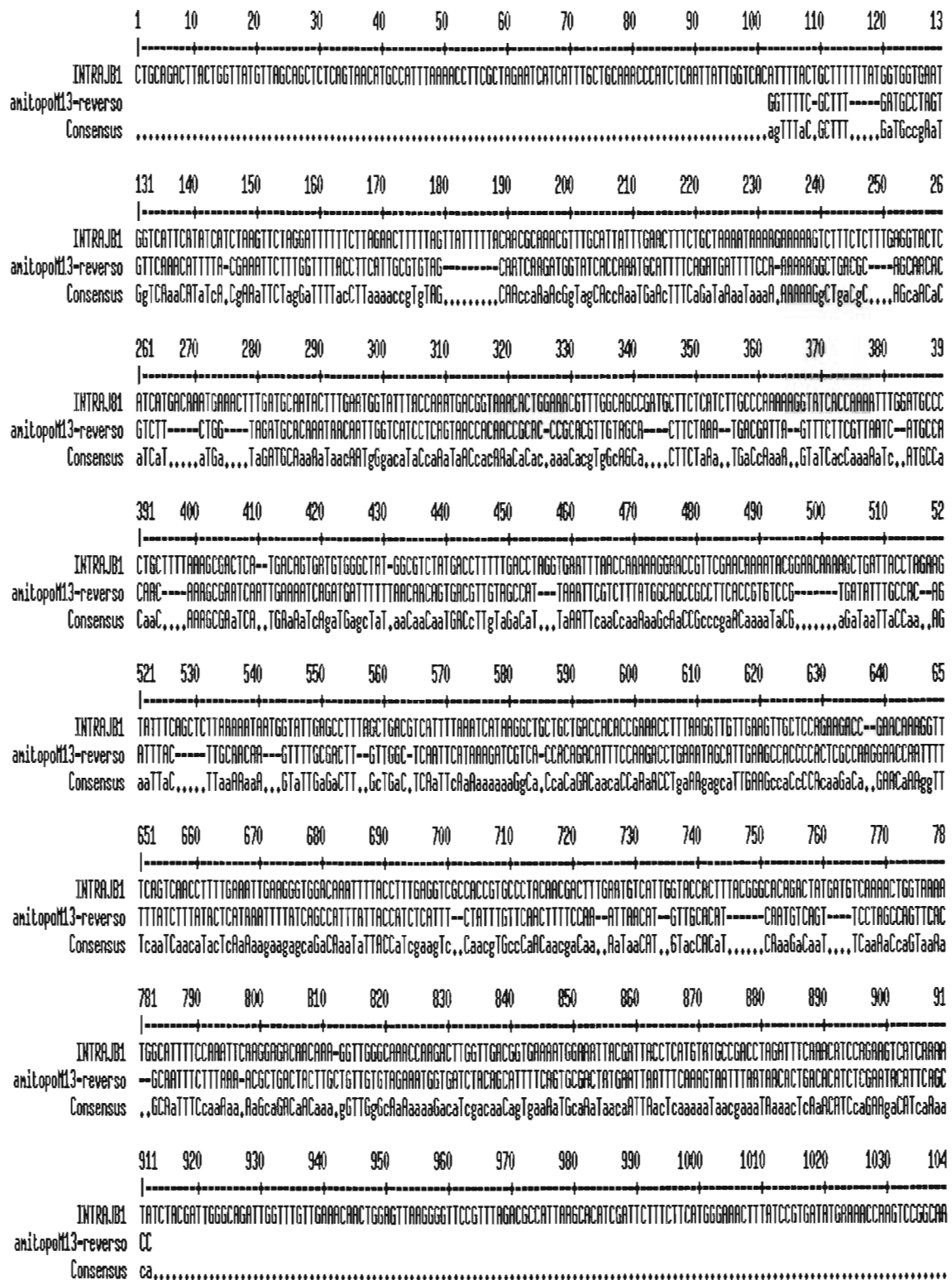


Figura 22. Alineamiento de la secuencia obtenida con el *fragmento E* utilizando el primer M13 (reverso) del vector 2.1-TOPO (anitopoM13-reverso) con la secuencia nucleotídica de la α -amilasa intracelular de la cepa JB1 (intraJB1).

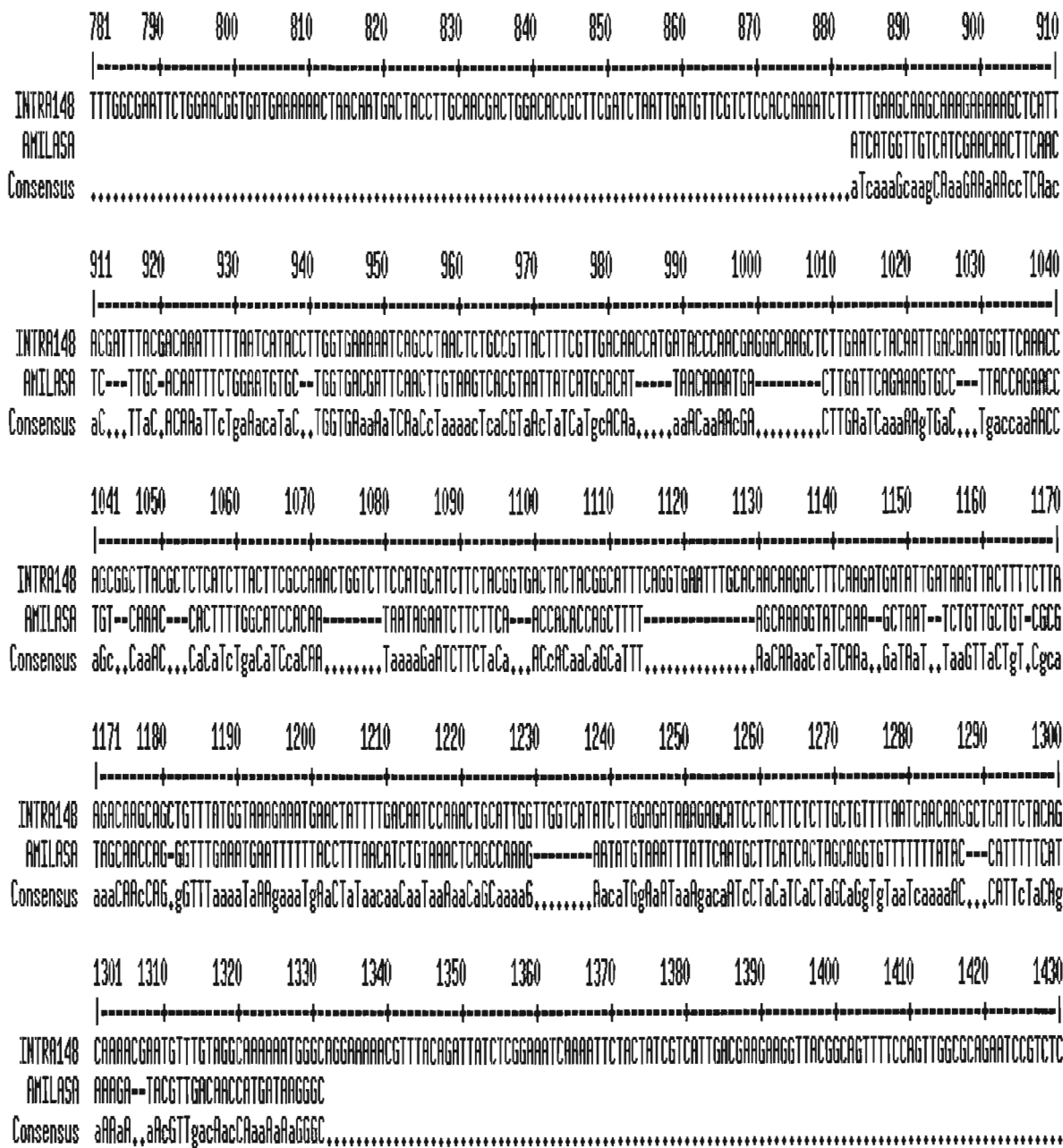


Figura 23. Alineamiento de la secuencia obtenida con el *fragmento C* utilizando los primers R2 y R4 (amilasa) con la secuencia nucleotídica de la α -amilasa intracelular de la cepa 148 (intra148).

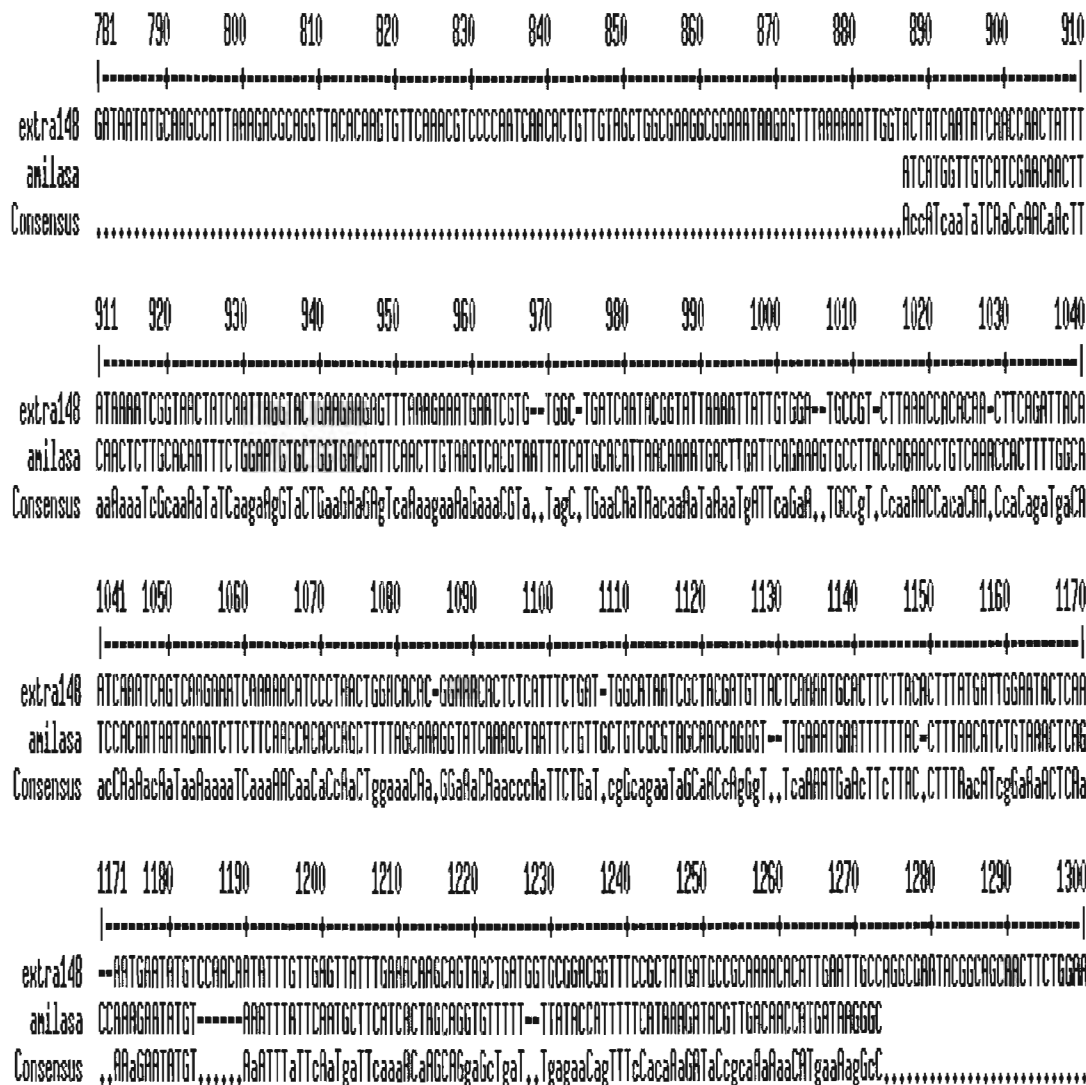


Figura 24. Alineamiento de la secuencia obtenida con el *fragmento C* utilizando los primers R2 y R4 (amilasa) con la secuencia nucleotídica de la α -amilasa extracelular de la cepa 148 (extra148).

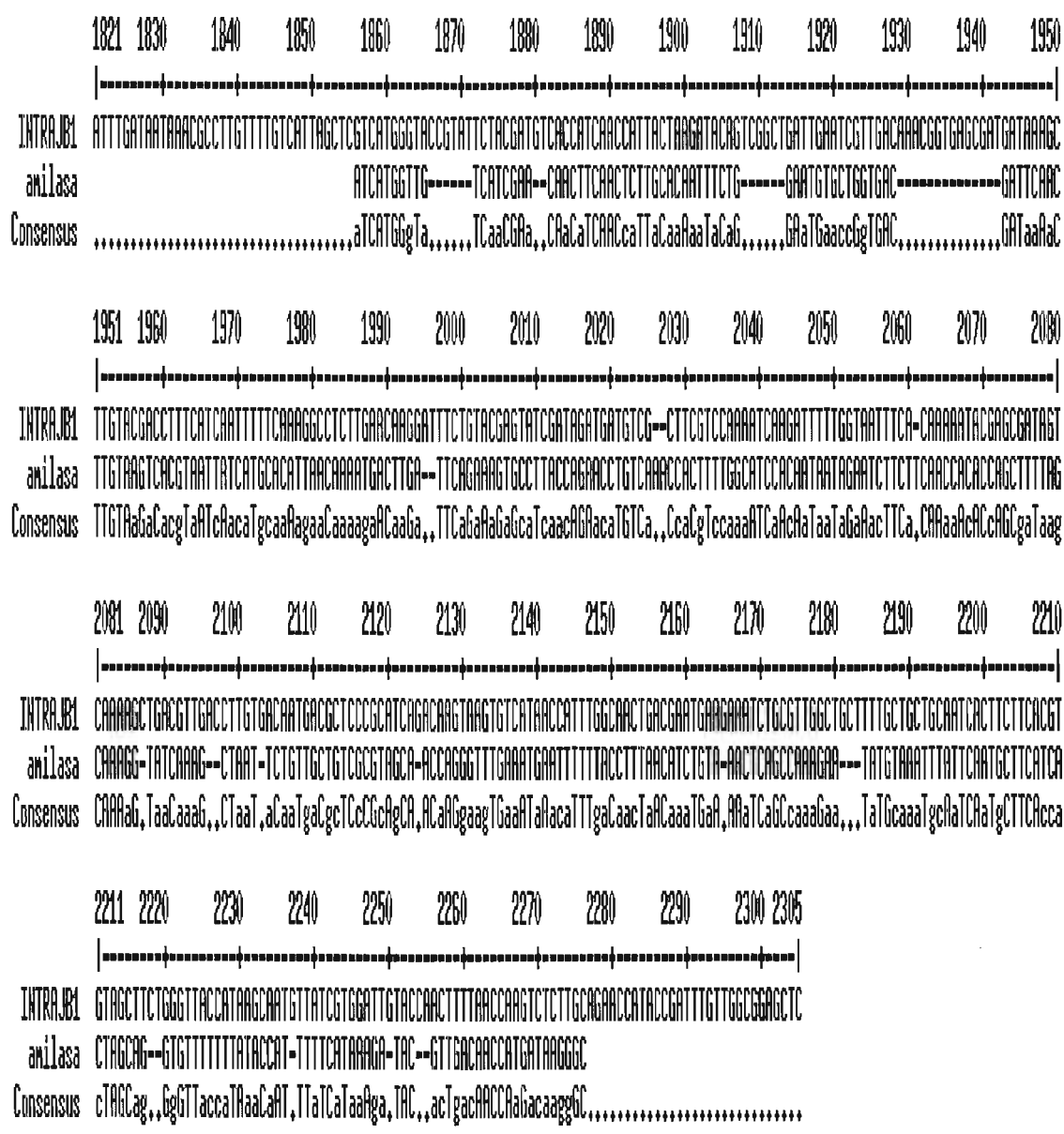


Figura 25. Alineamiento de la secuencia obtenida con el *fragmento C* utilizando los primers R2 y R4 (amilasa) con la secuencia nucleotídica de la α -amilasa intracelular de la cepa JB1 (intraJB1).

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 MegAlign (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., Wachter C., Guyot J. P. Polyphasic Study of the Spatial Distribution of Microorganisms in Mexican Pozol, a Fermented Maize Dough, Demonstrates 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 Alignment 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 Enviromental Microbiol.*, 59(1):189-96.1993.
- Díaz R. G., Guyot J. P., Ruiz T. F., Morlon G. J., Wachter 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., Wachter 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.
 - Hosney 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. 2ª 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 Sequence 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 Amylolytic Encimes. Department of Biochemistry University of Turku. Vol 24, Issue 4. 1989.
 - Alkamy Quick Guide TM for PCR. Alkamy 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)	1.4 μ L

- 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 alícuotas de 1mL y guardar a 4°C

Soluciones para la extracción del DNA plasmídico mediante lisis alcalina

➤ Solución I

Glucosa 50mM

Tris-HCl 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

H₂O 28.5mL

El resultado final es 3M de K⁺ y 5M de acetato.

Esta solución se guarda en hielo.

Soluciones para preparar las células competentes

➤ Solución A

MOPS pH 7.0	10mM
Cloruro de Rubidio	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

Bactotripton	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	10g
Aforar con H ₂ O 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 40µL en cada caja.

Agar MRS-almidón al 1.5%

Para preparar 200mL:

Peptona universal	2g
Extracto de carne	1g
Extracto de levadura	1g
Almidón	3.0g
K ₂ HPO ₄	0.4g
Tween	0.2g
Hidrogenocitrato Diamónico	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	1g
Extracto de levadura	1g
Glucosa	2.0g
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

Aforar a 200mL de agua desionizada y esterilizar 15min en autoclave.

Almacenar a 4°C.



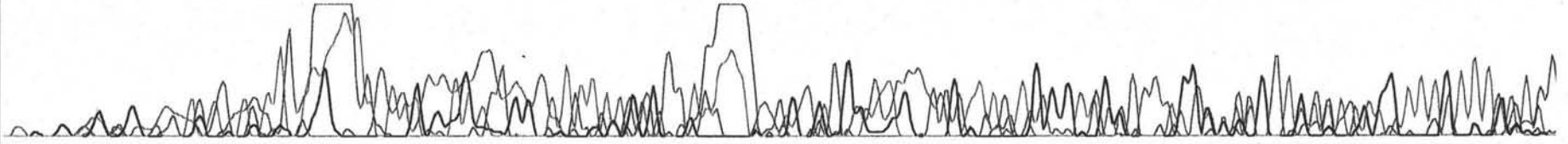
Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100POP6SF9952
BC 1.5.0.0

down_intrainicio.ab1
Tania Orozco
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 1 of 2
Thu, Apr 29, 2004 9:29 AM
Wed, Apr 28, 2004 8:45 PM
Spacing: 10.45(10.45)

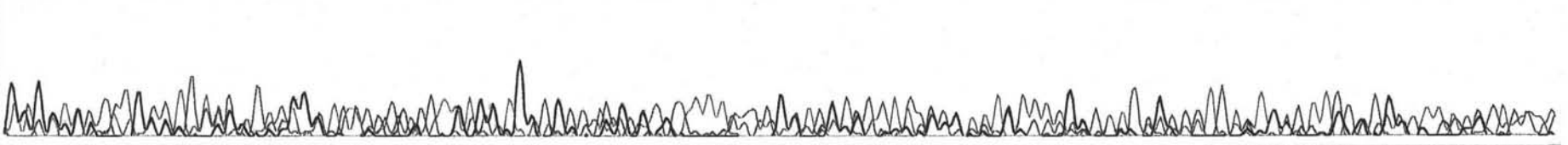
ANGNCGNCGATAACATCAINTTCCNCNICATAGAAATG AACNGATTCITTTGNG AA TCNCCACGAG CCGGATAACCGNTTCATGGGT CGNCAANGG G NACG ATGNNTAG GG TTTGTTTNTTCC
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120



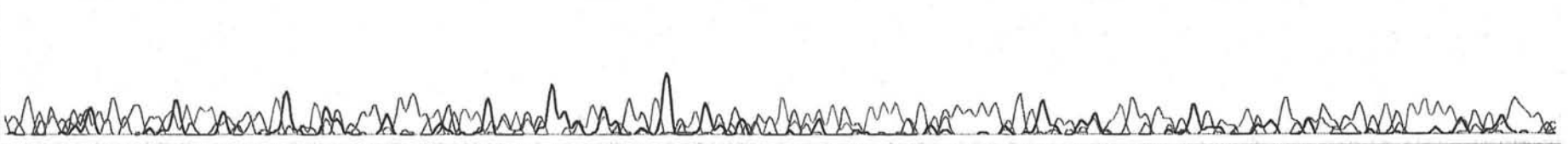
ICTT CNGGATTCFC CGCACTTGN CGNNNGT CATCAA GGACAT C NCACIC GNGC TGNGT NTGGGTCATGNNCT AA ACT AC GNNGGG NAGAANCNNCTT TCA TATIG NNAANGN
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250



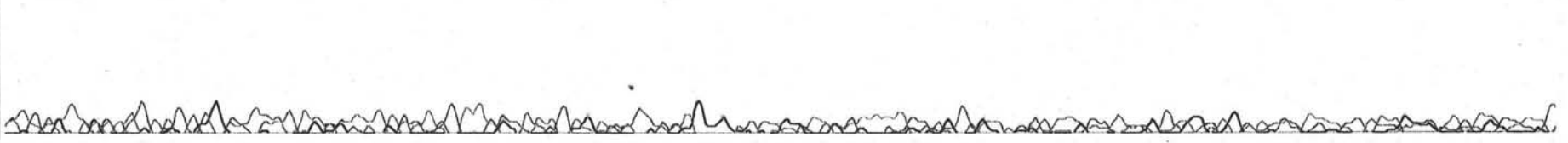
G GG GT GA ACG NC TCNNCN ATAGGN TCNACACN AT GTGGTGGC GCA TA GCGAGATTTNC C GG TCG ANCAT NAN G TTTNAAAAGGCNTCNGC CATCTA TNNC TTACGA GCA TTTT NATCNAN
260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380



AATNACNC CACANGTTGNAC TGNTGNAAA GAAANC TTGNTCNGGG TGGCCTGATGA /GNNTCNTANTTTNANAAAANATGNAGGN TCCAACGCNNTNGANNAACCATCTTTTGCTGAACI
390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500



NACNNAAGCNICATCATG NCANN TNNANATCATACTTACCATNATGNNAN CNIGGG TCAAGG TG ATTTTCCTGAIN CACACAAGCCA TNGATGNGTANTN ICCATTGGNATCTNCCTTA
510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630





Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100POP6SF9952
BC 1.5.0.0

down_intrainicio.ab1
Tania Orozco
Cap 1

Signal G:979 A:851 T:1142 C:750
DT3100POP6{BDv3}v1.mob
3100
Points 530 to 880 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}

CCNIGNAAANNCNNTONAGNCACCATGGCANGAGCGTANNTTTACGNGAGCGTG'CCOONNGONGGGCAAGGTANATT'TTTCNCCN'NNGTAGTTNNGCCCAAGANNNNCAGNTNGGTTCGNN'CA.
640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760

AGTANCTGACCAATCGGGTNNCGGTGAAACAT'NAGGACAAGAAACANANNIC'ONICNTGTGACCNAAACNNCAACGNTTNGANNNCNCNNA'NGNNNCNNCCGNANGNTTNGCTCTCTCGGCNNNN
770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
900 910 920