



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

ENSAYOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA  
GENÓMICA DE LA CEPA: *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

HUGO JOSÉ MARTÍNEZ JUÁREZ



**MÉXICO, D. F**

**2010**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**     **Profesor:** Adriana Guadalupe Mejía Chávez.

**VOCAL:**           **Profesor:** Rosario Adelaida Muñoz Clares

**SECRETARIO:**   **Profesor:** Sergio Sánchez Esquivel.

**1er. SUPLENTE:** **Profesor:** Sobeida Sánchez Nieto.

**2° SUPLENTE:**   **Profesor:** Maricarmen Quirasco Baruch.

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA DEL  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

---

**ASESOR DEL TEMA: DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL.**

---

**SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN B. BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN.**

---

**SUSTENTANTE: HUGO JOSÉ MARTÍNEZ JUÁREZ.**

---

Ensayos para la construcción de una biblioteca genómica de la cepa:  
*Streptomyces peucetius* var. *caesius*

Reconocimientos:

Esta tesis de licenciatura se realizó bajo la dirección del Dr. Sergio Sánchez Esquivel y la asesoría de la M. en B. Beatriz Ruiz Villafán, en el laboratorio de Microbiología Industrial del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce a los sinodales que asesoraron el desarrollo de esta tesis y conformaron el jurado que evaluó el presente trabajo escrito.

Presidente: Adriana Guadalupe Mejía Chávez.

Vocal: Rosario Adelaida Muñoz Clares

Secretario: Sergio Sánchez Esquivel.

Primer suplente: Sobeida Sánchez Nieto.

Segundo suplente: Maricarmen Quirasco Baruch.

## **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS:**

Agradezco al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por darme la oportunidad de trabajar y desarrollar mi proyecto de investigación recibiendo su apoyo incondicional a lo largo de mi estancia en el laboratorio de Microbiología Industrial y Biotecnología de Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Gracias a mi padre y a mi madre que me dieron una educación, los valores necesarios y la fortuna de estudiar esta carrera que me ha traído tantas enseñanzas y satisfacciones.

Gracias a tí mamá, por darme el apoyo cuando más lo necesitaba, confiar y creer en las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida. Eres lo más grande e importante que puede existir.

Gracias a tí papá por enseñarme a ver la importancia que tiene el superarse día a día y a valorar las cosas obtenidas en todo este trayecto. Siempre serás un modelo a seguir y de admiración para esta persona que quiere llegar a ser por lo menos la mitad de lo que tú eres.

A mis hermanas Anahí y Linda que a pesar de todo siempre dedicaron tiempo para apoyarme en las buenas y en las malas. Y lo mas importante, enseñándome día con día el valor y la fortuna de tener una familia. Gracias por sonreír.

A mis amigos Juan Carlos, Enrique, David, Artur, Gabriel, Dulce, Diana, Caro, Paty, Flora, Mónica, Daniela, Elisa, Irys, Maricruz, Fabis, Grace, Kari, Angela, Albis y muchos más que siempre estuvieron ahí para aconsejarme, darme una palabra de apoyo, sonreír y sobre todo recibir un cariño y una amistad incondicional. Siempre serán una parte muy importante de mí.

A los buenos primos Migue, Victor, Marce, René, Tony, Dayan, Alan, Toñito, Pablo, Nahúm, Eder, Gúeris, que me han acompañado en la mayoría de los buenos momentos de mi vida incluyendo esta etapa de mi formación profesional.

A los chicos del buen "merol" Adán, Lalo, Vale, Yolis, Tani, Alba, Aurora, Pao, Mauri, Dianis, Jesus, Fore, Caty, Oliver. Richard. Que siempre me dieron un consejo, un momento ameno, un apoyo, una sonrisa o un consejo a lo largo de mi estancia en el laboratorio. Sé que cada uno de ustedes me dejó una enseñanza que podre aplicarla día con día.

Para tí, que llegaste a mi vida y me diste ese gran sentimiento que me llena de motivación, júbilo y ganas de seguir superándome día con día, ese sentimiento llamado Amor. Gracias Gady.

A ti H. Facultad de Química y a sus profesores por abrirme las puertas al conocimiento, por haber puesto tantas pruebas que no sabía que podía superar y que me hicieron crecer como persona y como profesionista, por darme la respuesta a tantas dudas y hacer de mí un hombre responsable y de bien para la sociedad.

**\*\*Esta tesis es dedicada a todos ustedes\*\***

"Nada es fácil, nada se regala en esta mundo, todo tiene que aprenderse con mucho esfuerzo. Un hombre que va en busca del conocimiento debe comportarse de la misma manera que un soldado que va a la guerra: bien despierto, con inquietud, con respeto, y con absoluta confianza. Siguiendo estos requisitos, podrá perder alguna que otra batalla, pero nunca se lamentará de su destino"... Anónimo.

# ÍNDICE

Pag.

<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>15</b>
Características del género <i>Streptomyces</i>	<b>13</b>
Metabolitos producidos por <i>Streptomyces</i>	<b>17</b>
Composición genética de <i>Streptomyces</i>	<b>18</b>
Características generales de <i>Streptomyces peucetius</i> var. <i>caesius</i> .	<b>20</b>
Características principales de las bibliotecas genómicas	<b>21</b>
Secuencias completas de genomas del género <i>Streptomyces</i> y bibliotecas genómicas reportadas	<b>23</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>25</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>ESTRATEGIA GENERAL</b>	<b>27</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
Microorganismos y su cultivo	<b>28</b>
Cultivo y preservación de células <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	<b>29</b>
Aislamiento y purificación de DNAg de la cepa <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i>	<b>31</b>
Preparación del DNA de <i>S. peucetius</i> var. <i>Caesius</i>	<b>31</b>
Preparación del vector de clonación (SuperCos 1)	<b>32</b>
Ligación de DNAg y vector de clonación (SuperCos 1)	<b>32</b>
Empaquetamiento DNA recombinante e infección a células hospederas	<b>33</b>
Obtención de clones transformantes	<b>33</b>
Verificación de la biblioteca genómica y selección de sondas para	<b>34</b>

la identificación de clonas específicas mediante hibridación	
Obtención de sondas de DNA	<b>35</b>
Hibridación y detección inmunológica	<b>36</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>37</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>58</b>
<b>APÉNDICES</b>	<b>61</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>77</b>



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Características generales de los microorganismos y cósmidos utilizados.

Tabla 2: Características de los oligonucleótidos utilizados como "cebadores".

Tabla 3: Mezclas de reacción para la amplificación por PCR de los genes *hrdB* y *dnaA* en un gradiente de temperatura.

Tabla 4: Mezclas de reacción para la amplificación por PCR de los genes *hrdB* y *SCO2127*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor*.

Figura 2. Características generales del vector de clonación SuperCos 1.

Figura 3. DNA genómico purificado de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.

Figura 4. Digestiones parciales DNA genómico (10 µg) con la enzima *MboI* a 37°C.

Figura 5. Escalamiento en la digestión de DNA genómico (100 µg) con la enzima *MboI* a 37°C.

Figura 6. Linearización de SuperCos 1 con la enzima *XbaI*.

Figura 7. Restricción de SuperCos 1 con la enzima *BamHI*.

Figura 8. Ligación del DNAg con el vector de clonación SuperCos 1.

Figura 9. Clonas de la cepa de *E. coli* VCS257 crecidas en medio selectivo LB+Ampicilina (150µg/mL) obtenidas después de la infección con fagos a una dilución 1:50.

Figura 10. Extracción del cósmido de las clonas recombinantes de *E. coli* VCS257 crecidas en medio selectivo LB+Ampicilina (150µg/mL) obtenidas después de la infección con fagos a una dilución 1:50.

Figura 11. Esquema de temperaturas aplicadas en el sistema PCR para la amplificación de las secuencias de los genes *dnaA* y *hrdB*.

Figura 12. Amplificación por gradientes de temperatura de los genes *hrdB* (pánel A) y *dnaA* (pánel B).

Figura 13. Esquema de temperaturas aplicadas en el sistema PCR para la amplificación de las secuencias de los genes *hrdB* y *SCO2127*.

Figura 14. Productos de PCR de los genes *hrdB* y *SCO2127*.

Figura 15. Aislamiento de clonas recombinantes obtenidas después de la infección con el DNA recombinante.

Figura 16. Hibridaciones reveladas en películas sensibles a rayos X de los genes *hrdB* y *SCO2127*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Amp: Ampicilina.

ATP: Adenosin trifosfato.

CIAP: Fosfatasa alcalina intestinal de carnero.

CSPD: Disodio 3-(4-metoxispiro{1,2-dioxetano-3,2'(5'cloro)tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-yl)fenil fosfato.

dNTP: 5'-trifosfatos de desoxinucleótidos.

DIG: digoxigenina.

DIG-dUTP: digoxigenina-11-dUTP.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

DNAg: ácido desoxirribonucleico de origen genómico.

DNAr: ácido desoxirribonucleico que codifica para el RNA ribosomal.

*dnaA*: gen que codifica para una proteína de iniciación de la replicación.

EDTA: Ácido etilendiamino tetracético.

g: gramo (-s).

*SCO2127*: gen relacionado con la represión catabólica.

h: hora (-s).

HYB: hibridación.

*hrdB*: gen que codifica para el principal factor sigma vegetativo.

kb: kilobases.

LB: Luria Bertani.

M: molar.

Mb: Mega bases.

min: minuto (-s).

mL: mililitro (-s).

mM: milimolar.

M.P.M: Marcador de peso molecular.

nm: nanómetro (-s).

DO: Densidad óptica.

pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

RNA: ácido ribonucleico.

rpm: revoluciones por minuto.

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

seg: segundo (-s).

SSC: citrato salino estándar.

Spvc: *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.

SSI: Solución salina isotónica.

TAE: tris-acetato EDTA (amortiguador).

Taq: DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*.

TE: tris-EDTA (amortiguador).

Tris: tris(hidroximetil)aminometano.

TSB: Caldo de hidrolizado de soya.

U: unidad (-es) de enzima.

UFC: Unidades formadoras de colonia.

V: voltios.

YEME: Extracto de levadura, extracto de malta.

YMG: Medio extracto de levadura, extracto de malta y glucosa.

°C: grado Celsius.

µg: microgramo (-s).

µl: microlitro (-s) .

## **INTRODUCCIÓN**

Un gran porcentaje de las industrias biotecnológicas se sustentan en el aprovechamiento de las actividades metabólicas de microorganismos, plantas y animales para producir una amplia variedad de compuestos, mismos que son utilizados a su vez por otras industrias que producen alimentos; como las del ramo farmacéutico **(Parekh y col, 2000)**.

Desde el último cuarto del siglo XX, los productos microbianos han tenido un éxito aplastante en nuestra sociedad, en especial los metabolitos secundarios por su gran aceptación y diversas aplicaciones ya que son utilizados para combatir infecciones de tipo microbiano y enfermedades como el cáncer por lo que han revolucionado el campo de la medicina hoy en día **(Demain, 2006)**.

Entre los productos microbianos más importantes se encuentran aquellos que son resultado del metabolismo primario: aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, ácidos orgánicos entre otros; así como los que resultan del metabolismo secundario: antibióticos, agentes antitumorales, inmunosupresores, agentes para disminuir el colesterol y antiparasitarios **(Demain, 2006)**.

En la naturaleza, el metabolismo de dichos productos está cuidadosamente controlado para evitar el desperdicio de energía y la acumulación de intermediarios o de enzimas que necesitan para su biosíntesis, esta regulación es controlada finalmente por las secuencias de los nucleótidos en su DNA, que programa todas sus actividades biológicas **(Parekh y col, 2000)**. De esta forma, cuando hay interés en la producción industrial de un metabolito secundario es necesario llevar

a cabo la sobreproducción del mismo a nivel laboratorio, antes de llevarse a una planta piloto para su escalamiento (**Demain, 2006**).

En el año 2002 cerca de 20,000 antibióticos habían sido descubiertos, y se calcula que aproximadamente el 45% de ellos son producidos por actinomicetos; de éstos el 80% se origina por miembros del género *Streptomyces* (**Demain, 2006**).

El género *Streptomyces* posee la capacidad de sintetizar un buen número de enzimas hidrolíticas, permitiéndole utilizar una amplia variedad de polisacáridos y proteínas como fuente de carbono (**Crandall y Hamill, 1986: Frost y Moss, 1987: Rose, 1979**). Los miembros de dicho género producen una gran variedad de metabolitos secundarios, que son de gran importancia debido a sus diversas aplicaciones dentro de las áreas médica, alimentaria y biotecnológica, entre otras. Por lo anterior, se hace evidente la importancia económica de este género para la industria farmacéutica a nivel mundial.

Entre los metabolitos producidos por *Streptomyces* existen agentes antitumorales como las bleomicinas y las antraciclinas por citar un ejemplo. La especie *Streptomyces peucetius* var. *caesius* produce metabolitos secundarios como son la daunorrubicina (DNR) y la doxorubicina (DXR), que pertenecen al grupo de las antraciclinas (**Lomovskaya y col, 1999**). Dichos metabolitos tienen actividad antitumoral, por lo cual se utilizan clínicamente como agentes quimioterapéuticos para distintos tipos de cáncer como el de ovario, pecho y el sarcoma de Kaposi. Se sabe que la producción de estos metabolitos secundarios se ve afectada negativamente por altas concentraciones de glucosa por un fenómeno regulatorio denominado represión catabólica por fuente de carbono (RCC). Si bien se han estudiado algunas de las vías de asimilación de carbohidratos en este

género, los mecanismos regulatorios que las controlan no son completamente conocidas **(Angell y col, 1992; Hindle y Smith, 1994; Titgemeyer y col, 1995; Escalante y col, 1999)**.

Con el advenimiento de la genómica ha sido posible estudiar y caracterizar secuencias de genes que posiblemente regulen rutas de síntesis de los metabolitos secundarios **(Griffiths y col, 2000)**.

Gracias a la construcción de bibliotecas genómicas ha sido posible conocer en detalle el genoma de algunas especies de este género y por ende muchos de sus mecanismos regulatorios para la producción de ciertos metabolitos secundarios. Dentro de este grupo se encuentran: *Streptomyces coelicolor*, *S. avermitilis*, *S. scabies* y *S. griseus*. De mayor importancia ha sido la disponibilidad de la biblioteca de cósmidos del genoma de *S. coelicolor*, lo que ha permitido la determinación de funciones de diversos genes de las vías de producción de sus antibióticos undecilprodigiosina, actinorrodina, metilenomicina y un antibiótico dependiente de calcio (CDA) **(Chater y Hopwood, 1989; Hobbs y col, 1992)**.

Por lo anterior la generación de una biblioteca genómica de la cepa *Streptomyces peucetius* var. *caesius* es de gran importancia ya que con ello sería posible estudiar los aspectos más relevantes de la regulación de las rutas metabólicas implicadas en la producción de antibióticos como la daunorrubicina, doxorubicina y otros metabolitos de importancia a nivel industrial.

## ANTECEDENTES

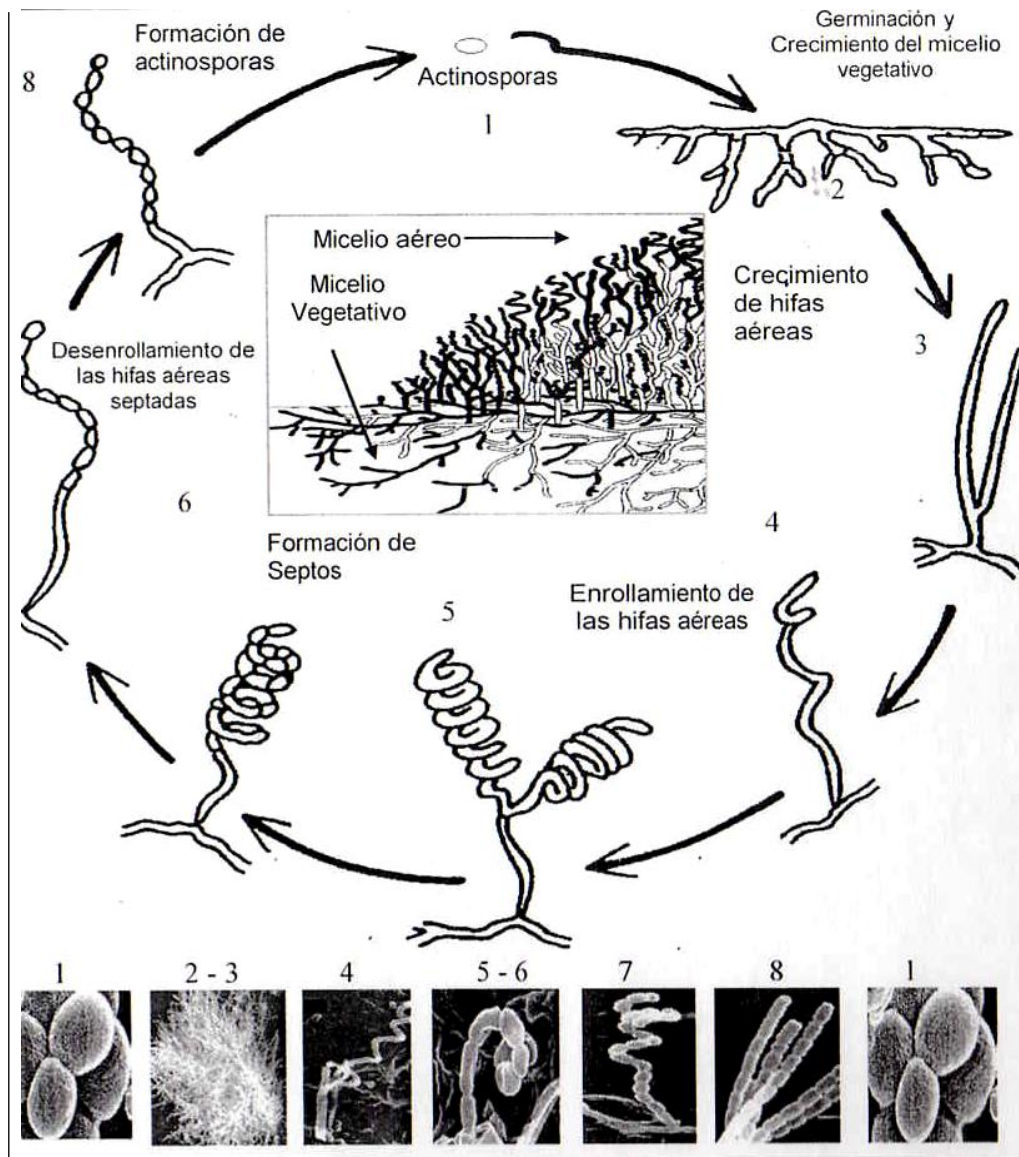
### Características del género *Streptomyces*

El género *Streptomyces* pertenece a la orden de los actinomicetos, que a su vez están divididos en tres subgrupos de acuerdo a estudios de homología del RNA 16S. El primer subgrupo incluye a organismos con células alargadas y delgadas como ocurre con *Arthrobacter* y *Cellulomonas* y también el género *Micrococcus* de células esféricas. En el segundo grupo se encuentran *Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia*, algunas especies de este grupo son organismos que habitan en el suelo y básicamente son aeróbeos, con características particulares en la pared celular, tienen ácidos grasos de cadenas muy largas denominadas ácidos micólicos. El tercer subgrupo contiene a la familia *Streptomyces*, organismos que crecen en agrupaciones de filamentos altamente ramificados y contienen ácido LL-diaminopimélico en su pared **(Demain, 1976)** que es el género más extenso del *phylum* Actinobacteria.

La familia *Streptomyces* posee un ciclo de vida complejo que comprende varias fases de diferenciación morfológica que culmina en la formación de esporas hidrofóbicas unigenómicas. Sus miembros contienen un alto contenido de G-C en su genoma (60-70%). Las bacterias de este género son aerobias estrictas, tienen forma tubular, frecuentemente largas y delgadas, con cierta tendencia a dividirse y formar filamentos ramificados. Son microorganismos saprófitos que se encuentran predominantemente en suelos y vegetación en descomposición, su ciclo de vida presenta una diferenciación morfológica única entre los procariontes. Su ciclo de vida inicia con una spora (Figura 1), la cual germina para formar hifas que crecen por extensión apical, que forman ramificaciones hasta formar un micelio vegetativo, el cual se nutre de



compuestos insolubles presentes en el suelo produciendo una variedad de enzimas extracelulares. Cuando los nutrientes empiezan a agotarse, la diferenciación de las hifas aéreas comienza creciendo a partir de la lisis del micelio vegetativo. Posteriormente las hifas aéreas comienzan a enroscarse y septarse para así formar esporas y comenzar un nuevo ciclo (Fig.1) **(Modificado de Hopwood y col, 1988).**



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor*. **(Modificado de Hopwood y col, 1988).**

Los miembros de la familia *Streptomyces* tienen una gran importancia en el área ambiental pues contribuyen al reciclaje del carbono, debido a

que poseen la capacidad de sintetizar un amplio número de enzimas hidrolíticas, lo cual les permite utilizar una amplia variedad de polisacáridos y proteínas abundantes en su medio ambiente (**Crandall y Hamill, 1986; Frost y Moss, 1987; Rose, 1979**).

### **Metabolitos producidos por *Streptomyces***

Los metabolitos pueden ser clasificados como productos intermediarios, productos terminales del metabolismo, precursores de macromoléculas esenciales o son convertidas en coenzimas (**Demain y Adrio, 2008**). En el metabolismo primario intervienen las reacciones catabólicas y anabólicas que dan como resultado principalmente el incremento de la biomasa. El género *Streptomyces* produce una gran cantidad de enzimas para degradar distintos carbohidratos con el fin de generar productos para llevar a cabo el catabolismo y anabolismo, ejemplos de dichas catalasas son las amilasas, glucanasas, celulasas, laminarinasas, xilanasas, glucuronidasas, estearasas, agarasas, mananasas, quitinasas etc. También, se producen enzimas para la degradación de disacáridos como las maltasas, celobiasas, xilosidasas y galactosidasas. Se ha observado que existe represión catabólica por glucosa, glicerol y fructosa en la producción de enzimas intracelulares y extracelulares (**Bentley, 2002**), así como una represión por fuente de nitrógeno en el catabolismo de carbohidratos.

Los metabolitos secundarios representan sustancias de naturaleza química variable, producidas por unas cuantas especies biológicas usualmente en la fase tardía de su crecimiento (**Demain, 1976; Vining, 1990**), No son necesarios para el desarrollo del microorganismo y suelen producirse como mezclas de productos muy relacionados químicamente entre ellos. Su funcionamiento en muchos grupos taxonómicos se relaciona con la supervivencia de la especie interviniendo como hormonas sexuales, ionóforos, armas competitivas

contra otros organismos, agentes de simbiosis, compuestos sinergistas y efectores de diferenciación **(Demain y Adrio, 2008)**. El género *Streptomyces* se caracteriza por la capacidad de producir una gran cantidad de metabolitos secundarios que tienen aplicaciones tanto en la medicina como en la agricultura y son de extrema importancia para nuestra salud y nutrición **(Demain, 2001)**. Algunas especies son excepcionales productoras de antibióticos, por ejemplo *Streptomyces griseus* que produce al menos 40 antibióticos diferentes.

No se conocen con claridad los factores que ponen en marcha la producción de metabolitos secundarios; sin embargo varios autores han observado en la mayoría de los casos que el inicio de este metabolismo puede correlacionarse con condiciones nutricionales que limitan el crecimiento **(Demain y col., 1983)**. En algunas ocasiones el nutriente responsable es una fuente de carbono y en otras es el nitrógeno o el fósforo. Además de que se ponen en manifiesto la existencia de sistemas de regulación que juegan un papel importante en la síntesis de determinados productos industriales.

### **Composición genética de *Streptomyces***

Como se dijo anteriormente, *Streptomyces* contiene un alto contenido de G-C en su genoma, el cual varía del 70 a 74% y a veces puede aumentar según la especie. Se ha descubierto que en la primera posición hay un contenido medio entre el 76.4%-98.3% mientras que en la segunda posición tiene el contenido mas bajo de G-C y en la tercera posición de los codones se encuentra el mayor contenido **(Fernández-Moreno y col., 1992)**. Se han localizado segmentos cortos de bajo contenido de G-C en regiones no codificantes del grupo de genes de actinorrodina en *S. coelicolor*. Encontrando diferencias poco significativas en cuanto a la composición de los plásmidos nativos y el DNA cromosomal. En cuanto a los fagos nativos el intervalo es mucho

más amplio, del 63% en  $\phi$ C31 y otros que se encuentran entre el 60 y 73%, pero para algunos fagos virulentos se reporta sólo un 49% (**Cox y Baltz, 1984**).

En muchos experimentos se ha calculado el tamaño del genoma de *Streptomyces*, los cuales han revelado tamaños de 8.54, 8.7 y 9.03 Mb para los genomas de *Streptomyces griseus*, *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces avermitilis* (**Ohnishi, 2008; Weber, 2003**). Se ha descubierto que la estructura de algunos cromosomas de estreptomicetos, si no es que de la mayoría, son lineales (**Lin y col, 1993; Leblond y col, 1993; Lezhava y col, 1995**). Localizado en el centro de los cromosomas se encuentra el origen de replicación *oriC* que se encarga de la replicación bidireccional finalizando en los extremos terminales (telómeros).

Este cromosoma tiene proteínas unidas covalentemente a ambos extremos terminales 5'. Éstas actúan probablemente como iniciadores para la síntesis de los fragmentos de Okasaki dándose la replicación bidireccional del DNA después de la apertura típica de *oriC* localizado en la parte central del cromosoma (**Musialowski, 1994**). En los extremos se han observado secuencias que están inversamente repetidas en un intervalo de 24 - 600 kb. Al igual que en algunos plásmidos lineales estas regiones se pueden empalmar para producir un cromosoma circular capaz de replicarse.

Se ha encontrado que las deleciones o amplificaciones pueden ocurrir espontáneamente con una frecuencia del 0.1 al 1% y se vuelven más frecuentes en estas regiones, después de tratar con compuestos que dañan el DNA o interfieren en su replicación. Por eso resulta importante tener secuencias repetitivas para algunos genes, en dado caso de su deleción.

## **Características generales de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.**

La clasificación taxonómica de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* se encuentra en el *phylum* actinobacteria de la siguiente manera:

Dominio: Bacteria  
Phylum: Actinobacteria  
Orden: Actinomycetales  
Familia: Streptomycetaceae  
Género: *Streptomyces* Waksman & Henrici 1943  
Especie: *Streptomyces peucetius*  
Subespecie: *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

*Streptomyces peucetius* var. *caesius* fue obtenida a partir de colonias sobrevivientes de la cepa parental *Streptomyces peucetius* que fueron tratadas con N-nitroso-N-metiluretano (**Arcamone y col, 1969**), con el afán de aislar cepas sobreproductoras de un antibiótico perteneciente a las antraciclinas llamado daunorrubicina el cual actúa como agente quimioterapéutico. Sin embargo, se observó que esta cepa mutante producía también otro antibiótico llamado doxorubicina (versión hidroxilada en el carbono 14 de la daunorrubicina) (**Grein, 1987**).

Posteriormente se encontró que los genes *dnR* y *dxR* codifican para la producción de daunorrubicina y doxorubicina respectivamente por lo cual se llevó a cabo la caracterización de éstos, así como de proteínas involucradas en dicha síntesis (**Jiang y Hutchinson, 2006**), ya que se ha reportado que bajo ciertas condiciones nutricionales y en un medio altamente amortiguado la cepa de *Streptomyces peucetius* produce cantidades significativas de doxorubicina (**Lomovskaya y col, 1998**).

*Streptomyces peucetius* var. *caesius* se caracteriza por la formación de micelio aéreo abundante, con una coloración azul-verde a gris y un

micelio vegetativo color rojo, mucho más intenso en comparación con *Streptomyces peucetius* (**Grein, 1987**).

### **Características principales de las bibliotecas genómicas.**

Una biblioteca genómica es una colección de fragmentos de DNA clonado a partir de células, tejidos u organismos, en la que se espera estén incluidos el mayor número de secuencias posibles de un genoma o las secuencias contenidas en un cromosoma (**Alberts y col, 1994**). Su construcción requiere de la fragmentación de las cadenas de DNA clonado por la acción de enzimas de restricción, estos fragmentos son insertados en vectores de clonación, que tienen la característica de albergar secuencias de DNA donante y éstos, a su vez, queden resguardados en células hospederas teniendo la oportunidad de proliferar y amplificar el fragmento donante insertado dentro del organismo. En una biblioteca genómica es posible seleccionar fragmentos de DNA entre millones de secuencias clonadas en cantidad suficiente para ser analizadas.

Los fragmentos clonados deben ser de tamaño suficiente para contener, en lo posible, genes con sus secuencias reguladoras, pero no tan grandes que dificulten su discriminación cuando se realice el mapa con las enzimas de restricción.

Las características que presentan la construcción de una biblioteca de DNA recombinante son:

- 1) Tener un número manejable de clonas.
- 2) Tamaño de los fragmentos clonados de interés, fáciles de seleccionar.
- 3) Sus secuencias deben ser escrutinizadas y amplificables.

Existen dos tipos de bibliotecas para DNA :

### **a. Bibliotecas genómicas de DNA**

Contienen fragmentos de una secuencia de DNA que se encuentra en un genoma en particular. Es una colección de clonas que contiene el genoma completo de un organismo incluyendo intrones y secuencias reguladoras.

### **b. Bibliotecas de cDNA**

Se hace a partir de DNA sintético obtenido a partir de mRNA por la acción de una transcriptasa inversa. Una genoteca obtenida de esta manera está constituida por las regiones del genoma que se transcriben, por lo que ésta será más pequeña que una genoteca genómica completa.

El tamaño de una biblioteca de DNA genómico necesario para asegurar representatividad de la secuencia de interés estará dictado por el tamaño de los fragmentos clonados y el tamaño del genoma.

$$N = \ln(1-P) / \ln[1-(I/G)]$$

#### ***En donde:***

**N=** es el número de clonas necesarias.

**P=** es la probabilidad de obtener la representatividad.

**I=** es el tamaño promedio del fragmento clonado.

**G=**es el tamaño del genoma blanco.

Asimismo, la estrategia de clonación debe considerar el vector y los tamaños de los fragmentos a clonar para la obtención de la biblioteca.

Hoy día existen diferentes sistemas de clonación para la construcción de bibliotecas genómicas: plasmidos ó vectores basados en bacteriófagos lambda con un tamaño de inserto alrededor de 20 kb; los cósmidos con

capacidad de 30-45 kb; bacteriófagos de tipo P1 que cubren un intervalo de 40-100 kb; y cromosomas artificiales de levaduras cuya capacidad máxima es de 1 Mb.

Una vez construida la biblioteca genómica se puede proseguir con la búsqueda e identificación de aquella secuencia de interés. Un gen en particular sólo representa una muy pequeña parte del genoma de muchos organismos, así como de nuestra cepa de interés. Para identificar estas pequeñas secuencias, el método a utilizar debe seleccionar sólo el clon o los clones que contienen el gen en cuestión y determinar si el clon contiene todo o parte del gen. Para lograr este objetivo existen varios métodos que incluyen el Southern Blot, Western Blot, ELISA o PCR. La elección del método depende de las circunstancias y la disponibilidad de información de la secuencia de interés **(Glick y Pasternak, 1994)**.

### **Secuencias completas de genomas del género *Streptomyces* y bibliotecas genómicas reportadas**

En el 2002 se publicó el genoma completo de *S. coelicolor* A3(2) **(Bentley y col, 2002)**. Para esas fechas era el genoma bacteriano más grande conocido. La secuencia genómica de *S. avermitilis* fue completada en el 2003 **(Ikeda, 2003)**. Éste fue el primer genoma secuenciado de un microorganismo de uso industrial. La secuencia genómica de *Streptomyces scabies* y de *Streptomyces griseus* han sido completadas recientemente. En la actualidad sólo existen reportadas bibliotecas genómicas para las cepas *Streptomyces coelicolor* **(Redenbach y col, 1996)** y *Streptomyces scabies*.

En este trabajo se reporta la construcción de una biblioteca genómica representativa del genoma de la cepa *Streptomyces peucetius* var. *caesius* la cual facilitará el aislamiento de genes con sus respectivas regiones reguladoras y así poder llevar a cabo la identificación de



secuencias que intervengan en la regulación de metabolitos, ya sea primarios o secundarios.

## JUSTIFICACIÓN

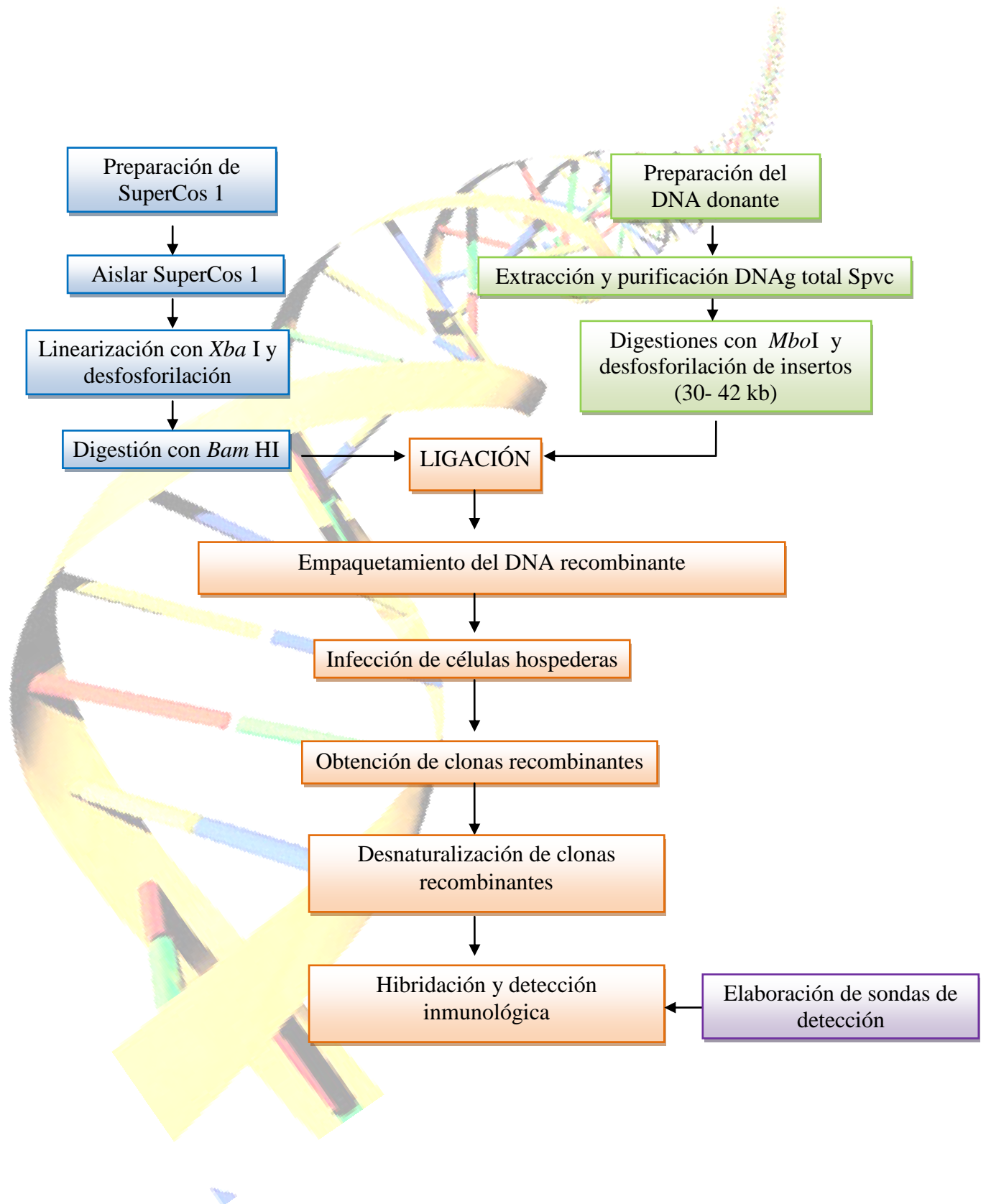
Hasta la fecha no ha sido reportada la existencia de una biblioteca genómica de la cepa *S. peucetius* var. *caesius*. y debido a la importancia y el gran uso de sus metabolitos a nivel industrial, se desea conocer más a detalle los genes y secuencias que intervienen en su regulación metabólica.

Además, se han caracterizado algunos genes de la cepa *S. peucetius* y los de *S. peucetius* var. *caesius* donde se han observado diferencias entre sus secuencias, por lo cual sería importante el estudio de éstos para observar el grado en que podrían afectar en su desarrollo y a su vez en la producción de metabolitos de interés industrial.

## OBJETIVOS

- Establecer una metodología adecuada para la construcción de una biblioteca genómica a partir de DNA genómico (DNAg) de la cepa *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.
- Evaluar y analizar los puntos críticos en la metodología empleada para la elaboración de la biblioteca genómica.
- Construir la biblioteca genómica y resguardarla en un vector de clonación como lo es SuperCos 1.

## ESTRATEGIA GENERAL



## MATERIAL Y MÉTODOS

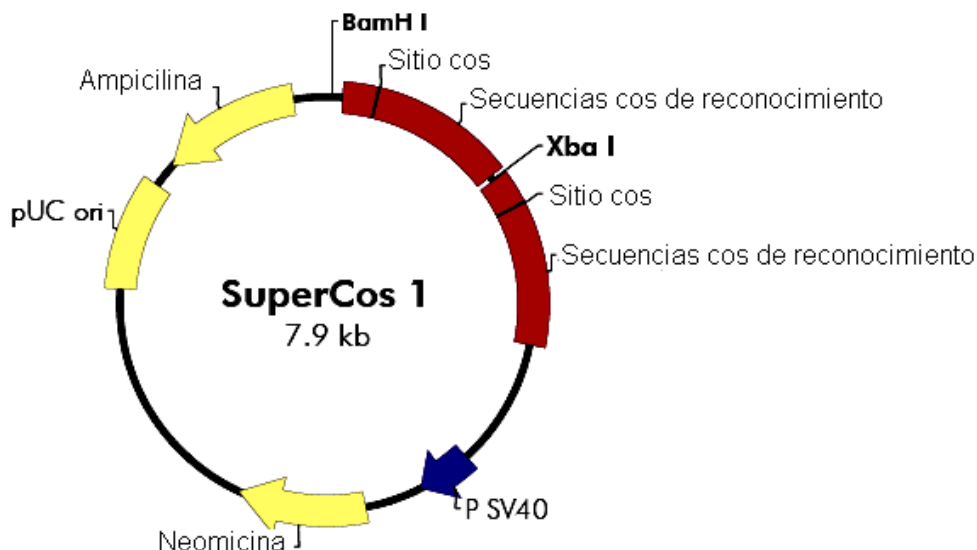
### ***Microorganismos y su cultivo***

Los microorganismos utilizados para este proyecto fueron:

<b>Microorganismo</b>	<b>Características</b>
<b><i>Streptomyces peucetius</i> var. <i>caesius</i></b>	<b>Variedad sobreproductora de doxorrubicina obtenida de la cepa silvestre <i>Streptomyces peucetius</i>.</b>
<b><i>XL1-BlueMR</i></b>	<b><i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ.M15 Tn10</i> (Tetr)].</b>
<b><i>E. coli</i> VSC257</b>	<b>Derivada de DP50supF Nota: DP50supF genotipo; <i>supE44, supF58, hsdS3 (r<sup>-</sup> B, m<sup>-</sup> B), dapD8, lacY1, glnV44, Δ(gal-uvrB)47, tyrT58, gyrA29, tonA53, Δ(thyA57)</i></b>
<b><i>E. coli</i> DH5a</b>	<b><i>supE44 ΔlacU169(Φ80lacZΔM15)hsdR17 recA1 endA1 gyr96 thi-1 relA1</i></b>
<b>Vector</b>	<b>Características</b>
<b>SuperCos1 (Stratagene)</b>	<b>Vector especializado para clonación de insertos largos de DNAg</b>

**Tabla 1:** Características generales de los microorganismos y cósmidos utilizados.

## Vector SuperCos 1



**Figura 2.** Características generales de vector de clonación SuperCos 1

### ***Cultivo y preservación de células *S. peucetius* var. *caesius*.***

Los cultivos de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* se obtuvieron a partir de cepas almacenadas en glicerol resguardados en el cepario del Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM. Para el uso en este proyecto de la cepa, se inocularon 500  $\mu$ l del glicerol en 25 mL de medio YMG-1 (Apéndice 1) contenidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 5 perlas de vidrio (**Segura, 1996**). Se obtuvo micelio después de 48 horas de incubación a 29°C y agitación constante a 180 rpm, del cual se tomó una asada y se resembró en medios sólidos YEME (Apéndice 1) a concentraciones de 1.8%(p/v) y 8%(p/v) de glucosa, con la finalidad de observar el fenómeno de represión catabólica por fuente de carbono en la cepa silvestre y así tener la certeza de que no hubiera mutado o se tratara de alguna cepa contaminante. La cepa *Streptomyces peucetius* var. *caesius* se creció a 29°C por 48 horas, fue inoculada en medios TSB (Apéndice 1) incubándolas a 29°C durante 48 horas y con agitación constante de 180 rpm. Después de la incubación el cultivo se centrifugó a 5000 rpm

durante 10 minutos, lavando 2 veces con 6 mL de solución salina isotónica estéril (SSI; NaCl 0.85%p/v). El micelio recuperado se volvió a resuspender en 5 mL SSI, de los cuales se tomó 1 mL para inocular un matraz Erlenmeyer bafleado con 50 mL de medio TSB (Apéndice 1), suplementado con glicina al 0.5 % incubándose 48 horas a 29°C y 180 rpm. El inóculo desarrollado en este cultivo se utilizó para llevar a cabo la extracción y purificación del DNA genómico.

Para preservar la cepa, se utilizó 1 mL de preinóculo para inocular 50 mL de medio YMG-1 contenido en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. El cultivo se incubó a 29 °C con agitación de 180 rpm durante 48 h. Las células se recuperaron por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min; se lavaron dos veces con SSI y se resuspendieron en 6 mL de SSI y 4 mL de glicerol. Finalmente se hicieron alícuotas de 1 mL y se congelaron a -70°C (**Hopwood, 2000**).

El cultivo de la cepa *Escherichia coli* VCS257 se obtuvo a partir de un stock incluido en el kit "Gigapack III XL-7 packaging extract (red-orange tube)", del cual se tomó una asada, sembrándola en cajas petri con medio LB (Apéndice 1). Esta cepa se incubó toda la noche a 37°C. Cuando fue requerido, al medio se le adicionaron 150 µg/mL de ampicilina (Amp). Para preservar las células se crecen matraces Erlenmeyer con 50 mL de medio LB incubándolos a 29°C toda la noche.

Para recolectar el cultivo se enfría el matraz en hielo por 30 min, centrifugando las células en un rotor frío (4°C) a 2500 rpm en 4 frascos para centrifuga. Se remueve tanto sobrenadante como sea posible y se resuspende el micelio en un total de 1 litro de agua fría (milli-Q estéril) centrifugándolo a las mismas condiciones que en el paso anterior. Se resuspende en 0,5 L de agua fría centrifugándolo como en el paso anterior. El botón de micelio ahora se resuspende en aproximadamente

20 mL de una solución de glicerol al 10%(v/v) fría y estéril centrifugándola como en el paso anterior. Posteriormente se resuspendió nuevamente a un volumen final de 3 mL en una solución de glicerol al 10%(v/v) fría.

En tubos de microcentrifuga se agregan alícuotas de 50 µl congelándolas en un baño de etanol y hielo seco. Estas alícuotas son almacenadas a una temperatura de -70 °C. Para las cepas de *Escherichia coli DH5a* (Multiporator). *XL1-Blue* (Stratagene) se trabajaron con las mismas condiciones a las utilizadas en el desarrollo y preservación de VCS257.

### ***Aislamiento y purificación de DNAg de la cepa Streptomyces peucetius var. caesius***

La obtención de DNAg, aislamiento y purificación se realizó siguiendo la metodología reportada por **Hopwood, 1985** (Apéndice 2) visualizando el estado del DNAg mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.4% según los protocolos estándar usando TAE 1X como amortiguador de corrida (**Sambrook y col, 2001**). El DNAg se corrió durante 20 h a 4°C a una velocidad de 25 V/cm. y fue cuantificado en un espectrofotómetro Biophotometer (Eppendorf AG) a una longitud de onda de 260 nm.

### ***Preparación del DNAg de Streptomyces peucetius var. caesius***

Una condición para clonar en el sitio *Bam*HI en el vector SuperCos 1 es la digestión parcial del DNAg a un tamaño específico y con una enzima de restricción que tenga un sitio de corte homólogo al sitio de inserción en el vector de clonación, por lo que se utilizó la enzima *Mbo*I (Promega).

Se determinaron las condiciones ideales (temperatura óptima para la reacción enzimática y concentración de enzima) y así obtener el tamaño



de inserto deseado (30-42 kb), haciendo una serie de digestiones parciales siguiendo la metodología mencionada en el Apéndice 6.

Ya conocidas las condiciones necesarias para la obtención del tamaño de inserto requerido, se hizo un escalamiento aumentando la concentración de DNAg 10 veces para digerir. Posteriormente se hizo la desfosforilación del mismo utilizando una fosfatasa alcalina comercial (CIAP) (Apéndice 7). Todos los resultados fueron visualizados por electroforésis en geles de agarosa al 0.4%(p/v) corridos durante 45 minutos a 4 °C de temperatura y una velocidad de 25 V/cm.

### ***Preparación del vector de clonación (SuperCos 1)***

El vector de clonación fue obtenido a partir de *SuperCos 1 Cosmid Vector Kit* (Stratagene). Para contar con una adecuada concentración del cósmido, éste se transformó por electroporación en células *DH5a* competentes (Apéndice 3). Una vez obtenida la cepa transformante, se realizó el aislamiento y purificación del SuperCos 1 aplicando la técnica de miniprep (Apéndice 4). Para la linearización de SuperCos 1 se hizo la digestión en el sitio de restricción para *XbaI* con la enzima de restricción del mismo nombre (Apéndice 5). Posteriormente se llevo a cabo la desfosforilación de los extremos digeridos con la enzima *XbaI* prosiguiendo con la digestión del sitio inserción del DNAg con la enzima *BamHI* (Apéndice 5). Todos los resultados fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%(p/v) corridos durante 45 min a temperatura ambiente a una velocidad de 80 V/cm.

### ***Ligación de DNAg y el vector de clonación (SuperCos 1)***

Ya digeridos los sitios de inserción del DNAg y el vector con las enzimas de restricción adecuadas (*MboI* y *BamHI* respectivamente), se llevó a cabo la ligación de éstos con la ayuda de la enzima T4 DNA ligasa (Promega) y así obtener las moléculas de DNA recombinantes listas

para su empaquetamiento. Esto se logró siguiendo los pasos de la metodología propuesta en el Apéndice 8.

### ***Empaquetamiento del DNA recombinante e infección a células hospederas***

Para que el DNA recombinante se pudiera introducir en una célula hospedera, éste fue empaquetado *in vitro* en cápsides de fago lambda, estos fagos mediante la unión con sus receptores específicos contenidos en la pared celular del huésped van a adherirse a las células y mediante infección van a introducir el DNA recombinante en la bacteria hospedera y obtener clones con esa secuencia específica. El kit comercial utilizado para el empaquetamiento del DNA recombinante fue “Kit Gigapack® III XL-7 RXN (Stratagene)” que entre sus características principales se encuentra la alta eficiencia para empaquetar insertos de DNA recombinante de 47 a 51 kb.

Para comprobar que los extractos de empaquetamiento se encontraran en buenas condiciones para su uso, se midió su eficiencia óptima de empaquetamiento, lo que se logró mediante un control positivo incluido en el kit (lambda control DNA). Para medir la eficiencia de empaquetamiento e infección de las células huésped se siguió la metodología incluida en el Apéndice 9.3. Se llevó a cabo correctamente el empaquetamiento y la infección obteniendo colonias resistentes a ampicilina debido al gen de resistencia incluido en el vector de clonación (Ver Figura 2).

### ***Obtención de clones transformantes***

Para comprobar que las clones obtenidas contienen al DNA recombinante se sembraron en medios de cultivo selectivos (LB + Amp) recién preparados para posteriormente, mediante la técnica de miniprep (apéndice 4) extraer y purificar el DNA recombinante. Las

muestras en un gel de agarosa al 0.8%(p/v) para comprobar la presencia del DNA recombinante.

Confirmada la presencia del DNA recombinante, las clonas se aislaron y enumeraron en puntos equidistantes de un medio de cultivo selectivo (LB+Amp) sólido para su mejor localización e identificación. Se prosiguió a incubar las clonas para posteriormente utilizarlas en su identificación y demostrar que la biblioteca genómica era lo suficientemente representativa para contener el genoma completo del microorganismo de estudio. Para corroborar que las secuencias pertenecen a la cepa en estudio se hizo la identificación de algunas secuencias representativas del género *Streptomyces*. Se realizó por medio de sondas que contienen secuencias de genes específicos marcadas enzimáticamente para su detección. Dichas secuencias provienen de genes homólogos de un organismo relacionado y que permiten identificar las clonas que contengan la secuencia de interés mediante la complementariedad de las cadenas sencillas de los nucleótidos del DNA recombinante y el DNA de la sonda.

***Verificación de la biblioteca genómica y selección de sondas para la identificación de clonas específicas mediante hibridación.***

Para tener la certeza de que la biblioteca genómica aislada pertenece al microorganismo de estudio, se analizaron y rastrearon las secuencias de genes de interés en la clonas llevando a cabo su transferencia y desnaturalización en membranas para ácidos nucleicos optimizadas Hybond-N+. Cat no: RPN303B (Amershan Pharmacia Biotech) siguiendo la metodología incluida en el Apéndice 11. Las sondas que se construyeron contienen genes o secuencias que son representativas del género *Streptomyces sp.* Los genes propuestos para la construcción de las sondas fueron los siguientes:

<i>hrdB</i> (factor sigma mayor vegetativo) .....	SC5B8.10
<i>dnaA</i> (proteína de iniciación para la replicación).....	SCH18.16c
SCO2127 (proteína desconocida involucrada en la represión catabólica).....	SC6E10.21c

Debido a que no conocemos la secuencia ni localización de estos genes en la cepa *Streptomyces peucetius var. caesius* se hicieron las sondas con DNAg de una especie cercana filogenéticamente. La cepa elegida para la elaboración de las sondas fue *S. coelicolor*. Esta cepa ha sido la más estudiada para este género, existiendo reportes donde se comparan secuencias de algunos genes de ésta con respecto a *Streptomyces peucetius* poniendo en evidencia la homología entre ellas (**Guzman y col, 2005**). Las secuencias de estos genes fueron obtenidos a partir de la biblioteca genómica de *S. coelicolor* contenida en el vector de clonación SuperCos 1 resguardados en células *XL1-Blue*.

Para aumentar la concentración de las secuencias de cada gen se electroporaron en células competentes *DH5a* para posteriormente hacer la extracción y purificación de DNA. La metodología empleada fue la misma que la aplicada en la obtención de transformantes con SuperCos 1 (Apéndices 3 y 4). Posteriormente, se midió la concentración de DNA obtenida de cada secuencia de DNA recombinante

### **Obtención de sondas de DNA**

Se analizaron las secuencias de nucleótidos de cada gen contenido en los vectores clonación y posteriormente se diseñaron sus respectivos oligonucleótidos para amplificar la secuencia mediante PCR.

Para conocer las condiciones ideales de amplificación se llevó a cabo un PCR por gradiente de temperatura, en donde se corren varias muestras de la misma secuencia variando únicamente la temperatura de alineamiento.

Una vez estandarizada la temperatura de alineamiento para cada una de las secuencias, se realizó la amplificación mediante PCR. Ya amplificados los fragmentos de DNA, se prosiguió a hacer el marcaje de las sondas para llevar a cabo las hibridaciones correspondientes. Para la hibridación se usó un kit comercial **DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit (Roche)** la metodología se describe en el Apéndice 10.

### ***Hibridación y detección inmunológica***

La hibridación se llevó a cabo con el DNA obtenido de las clonas recombinantes fijándolo en las membranas y poniéndolo en contacto con la sonda específica con la secuencia de interés. La sonda está marcada con digoxigenina, siendo detectada con anticuerpos a los cuales está acoplada la enzima fosfatasa alcalina y cuyo sustrato (CSPD) genera cuantos de luz que pueden ser detectados en una placa fotográfica de rayos X. Este procedimiento se llevó a cabo con la metodología presentada en el Apéndice 12.2

La posición de la clona positiva fue revelada por la concentración de la sonda en una región concreta, a menudo en forma de la colonia de donde provino. Ya localizadas las colonias positivas en la caja petri se aislaran para corroborar si contenías la región o el gen de interés.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

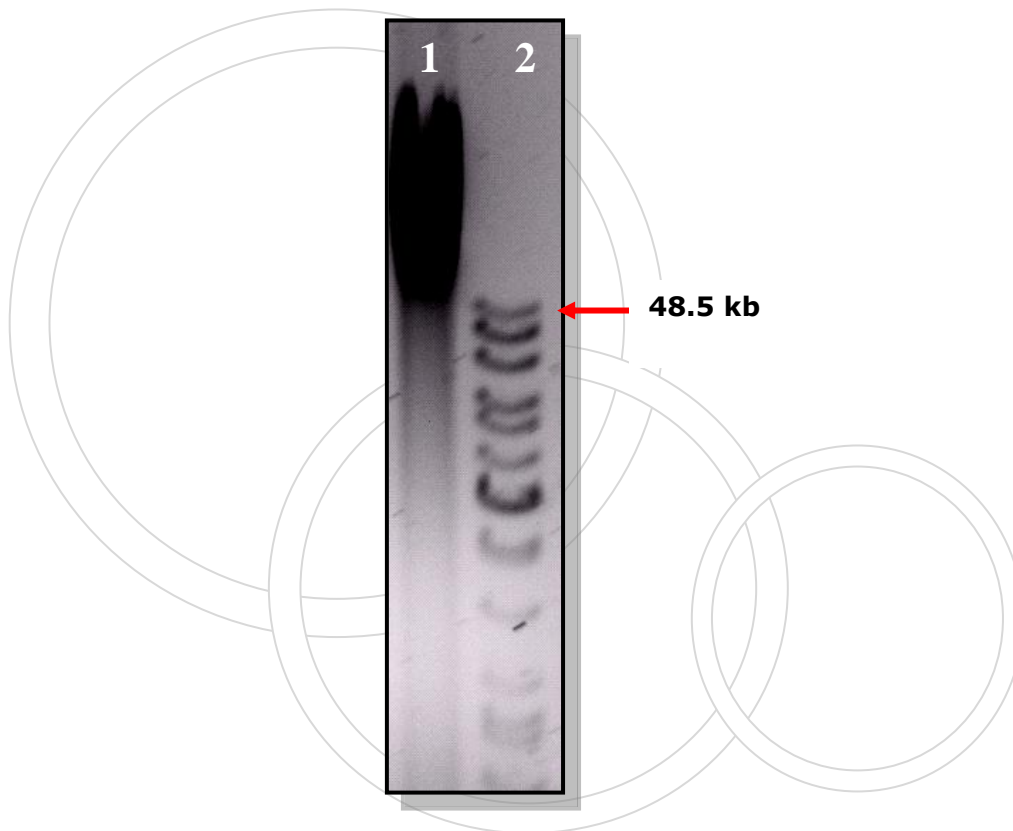
### ***Extracción y purificación de DNAg de la cepa Streptomyces peucetius var. caesius***

Como se mencionó anteriormente, hasta la fecha no se ha reportado ninguna metodología específica para la extracción de DNAg de la cepa *Streptomyces peucetius* var. *caesius* por lo cual el aislamiento se hizo empleando la metodología reportada para la cepa *S. coelicolor*.

Al llevar a cabo dicha metodología (Apéndice 2) se obtenían bajas concentraciones de DNAg, por lo que se tuvo que repetir en varias ocasiones. En cada una de las extracciones se purificó el DNAg con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de algunos contaminantes que pudiesen alterar las condiciones de reacción en pasos sucesivos, como lo son las digestiones parciales o en la ligación del DNAg con el vector de clonación.

Una vez purificado, se midió la concentración de DNAg así como el grado de pureza de éste, mediante medición espectrofotométrica determinando la relación de absorbancias  $A_{260}/A_{280}$ .

Estas mediciones arrojaron valores dentro de los límites (1.89) señalando que el DNAg se encontraba con una pureza adecuada. Del mismo modo, se corroboró que el DNAg se encontraba en buenas condiciones en un gel de electroforesis (Figura 3).

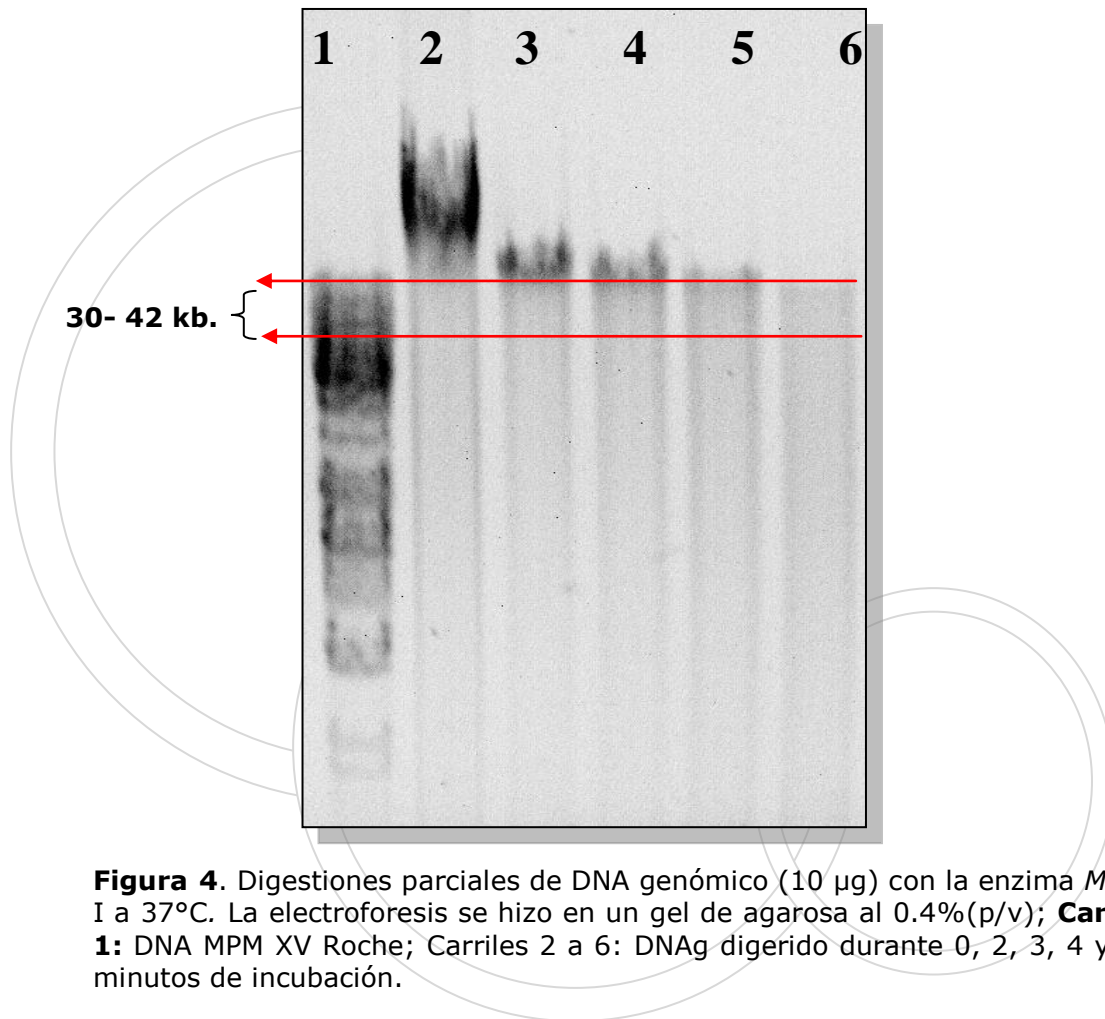


**Figura 3.** DNA genómico purificado de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. La electroforesis se hizo en un gel de agarosa al 0.4%(p/v). **Carril 1:** DNAg *S. peucetius* var. *caesius*; **Carril 2:** DNA MPM XV Roche.

### ***Digestiones parciales de DNAg con la enzima de restricción MboI***

Una vez purificado el DNAg y conocida su concentración, se llevó a cabo la digestión de éste con el fin de obtener un tamaño de inserto adecuado (30 – 42 kb) para que pudiera ser integrado al vector de clonación. Debido a que el sitio de inserción del DNAg en el vector de clonación fue cortado con la enzima *Bam*HI (Ver fig. 2), el DNA genómico fue parcialmente digerido con la enzima *Mbo*I, la cual genera extremos cohesivos con los digeridos con la enzima *Bam*HI. Para determinar los tiempos en las cuales se obtuvieran los tamaños de

inserto adecuados (30 – 42 kb), se hicieron una serie de digestiones parciales con 10 µg de DNA genómico y 10 U de enzima *Mbo*I a una temperatura de 37°C (Figura 4).

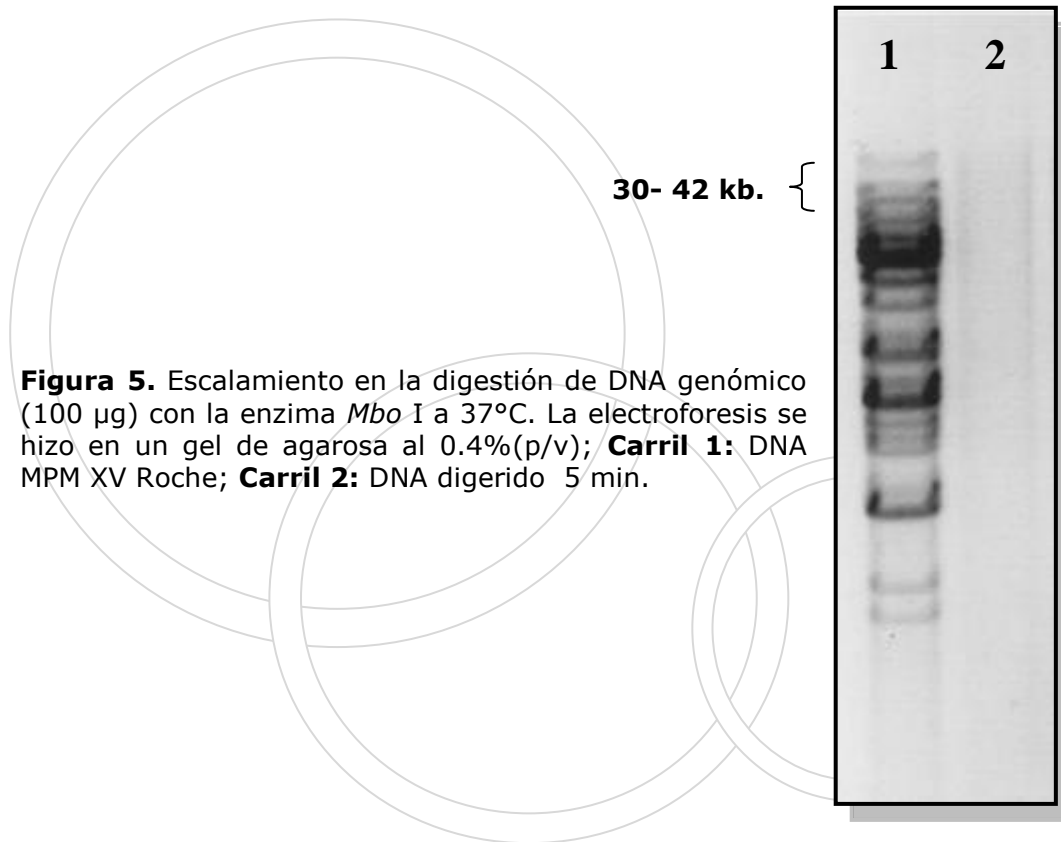


**Figura 4.** Digestiones parciales de DNA genómico (10 µg) con la enzima *Mbo*I a 37°C. La electroforesis se hizo en un gel de agarosa al 0.4%(p/v); **Carril 1:** DNA MPM XV Roche; Carriles 2 a 6: DNAg digerido durante 0, 2, 3, 4 y 5 minutos de incubación.

En la Figura 4 se puede observar que a los 5 minutos de incubación y a una concentración de enzima de 10 U se obtenía el tamaño de inserto adecuado. Posteriormente se llevó a cabo un escalamiento de la digestión, en la cual se colocó 10 veces más la concentración de DNAg (100 µg) por lo que se tuvo que aumentar proporcionalmente la concentración de la enzima (100 U) pero manteniendo la misma temperatura (37 °C) y tiempo de incubación (5 min).



Al llevar a cabo el escalamiento se observó la reproducibilidad de la digestión del DNAg obteniendo tamaños de inserto de 30 a 42 kb (Figura 5).

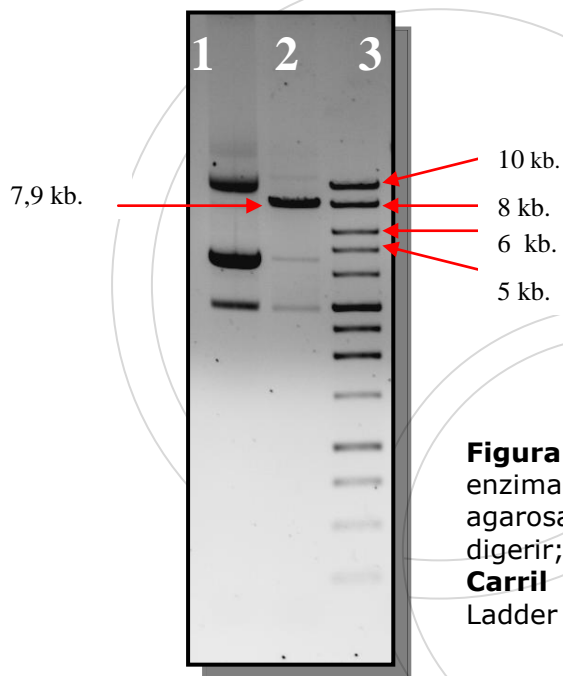


Para prevenir que los extremos terminales de los insertos de DNAg se volvieran a unir se llevó a cabo su desfosforilación con una fosfatasa comercial. Después del tratamiento con la enzima, se lavó el DNA genómico con el fin de retirar sustancias contaminantes que pudieran interferir con la ligación del inserto y el vector de clonación.

### ***Preparación del vector SuperCos 1***

Para la preparación del vector de clonación SuperCos 1, éste se transformó en células *DH5a* y a partir de ellas se amplificó dicho cósmido para su aislamiento en mayor proporción. Una vez aislado y purificado, se hizo una electroforesis en geles de agarosa al 0.8%(p/v) para verificar la presencia del vector.

Con el fin de abrir el vector de clonación y de este modo unirlo posteriormente al DNAg, se procedió a la digestión del cósmido SuperCos 1 con la enzima *XbaI* (Figura 6). Como se puede apreciar en la Figura 6, en el carril 2, al exponer el cósmido a la presencia de la enzima de restricción, ésta digiere el sitio de corte permitiendo la linearización de casi todo el vector de clonación obteniendo una banda de 7.9 kb, que corresponde al tamaño de vector. Para evitar la recircularización del vector de clonación en el subsecuente paso de ligación, se desfosforilaron los extremos terminales con una fosfatasa alcalina comercial.



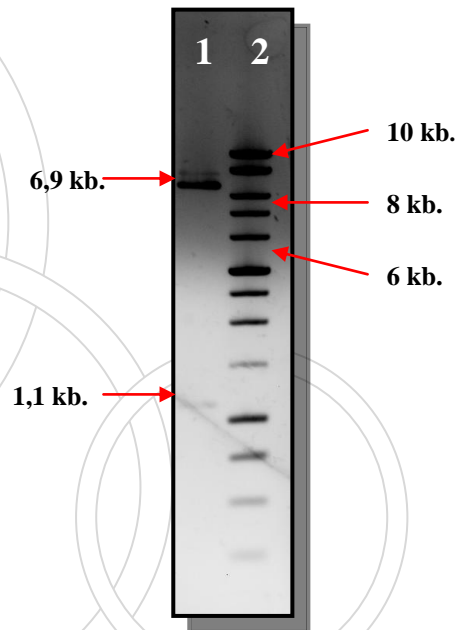
**Figura 6.** Linearización de SuperCos 1 con la enzima *XbaI*. La electroforesis se hizo en un gel de agarosa al 0.8% (p/v); **Carril 1:** SuperCos 1 sin digerir; **Carril 2:** SuperCos 1 digerido con *XbaI*. **Carril 3:** Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder Promega™.

### ***Digestión con BamHI del DNA vector desfosforilado y digerido con XbaI***

Con el fin de abrir los sitios de inserción en el SuperCos 1 que son compatibles con los sitios *MboI* del DNAg digerido, se hizo una digestión con la enzima *BamHI*. Al digerir el vector se esperaba obtener dos bandas de DNA, una de 6.9 y otra de alrededor de 1.0 kb, lo que fue

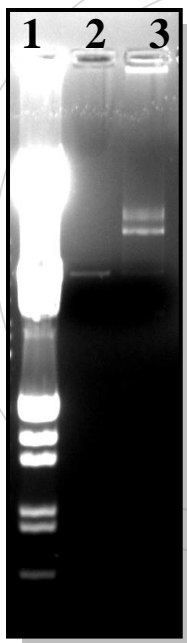
confirmado en un gel de electroforesis de agarosa al 0.8%(p/v) (Figura 7).

**Figura 7.** Restricción de SuperCos 1 con la enzima *Bam*HI. La electroforesis se hizo en un gel de agarosa al 0.8%(p/v); **Carril 1:** SuperCos 1 digerido con *Bam*HI; **Carril 2:** Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder.



### ***Pruebas de ligación del vector de clonación con el DNAg.***

Una vez terminada la preparación del vector de clonación y el DNAg objetivo, se llevó a cabo la ligación de éstos siguiendo la metodología planteada en el Apéndice 8.



**Figura 8.** Ligación del DNAg con el vector de clonación SuperCos 1. La electroforesis se hizo en un gel de agarosa al 0.8%(p/v) **Carril 1:** DNA MPM XV Roche; **Carril 2:** SuperCos 1 preparado con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I; **Carril 3:** Ligación positiva con DNAg.

Llevada a cabo la ligación se monitoreó en un gel de electroforesis obteniendo los resultados mostrados en la Figura 8. En el carril 3 se puso solamente el vector de clonación digerido, mientras que en el carril 4 se corrió la ligación. Observando con detalle el carril de la ligación se miden en conjunto de bandas de mayor peso molecular que el del vector de clonación, sugiriéndonos una ligación del vector con los diferentes tamaños de insertos de DNAg que hay en la solución.

### ***Empaquetamiento e infección***

Para realizar el empaquetamiento se utilizó el sistema **Gigapack III XL Packaging Extract**, que presenta la ventaja de empaquetar insertos de DNA recombinante de 47 a 51- kb evitando así que insertos de mayor o menor tamaño se empaqueten y así aumentar la eficiencia del sistema. La eficiencia del kit se probó empaquetando el control positivo incluido en dicho sistema (**Positive Wild-Type Lambda DNA control**) aplicando la metodología mencionada en el Apéndice 9.3.

Esta prueba se basa en la presencia de placas de lisis que son producto de la infección con  $\lambda$ I857 (Sam7), el cual contiene secuencias que promueven la fase lítica del fago causando la muerte celular. Los resultados obtenidos por la prueba, arrojaron la presencia de 314 placas de lisis a una dilución  $10^{-4}$  del stock original. El proveedor del kit nos indica que a esa misma dilución se deben obtener alrededor de 400 placas de lisis, con lo cual se dedujo que el kit poseía una eficiencia del 78.5%. Se realizó el empaquetamiento e infección del DNA recombinante, aplicando la metodología planteada en los Apéndices 9.1 y 9.2, respectivamente. La infección se llevo a cabo en células de *E. coli* VCS257.

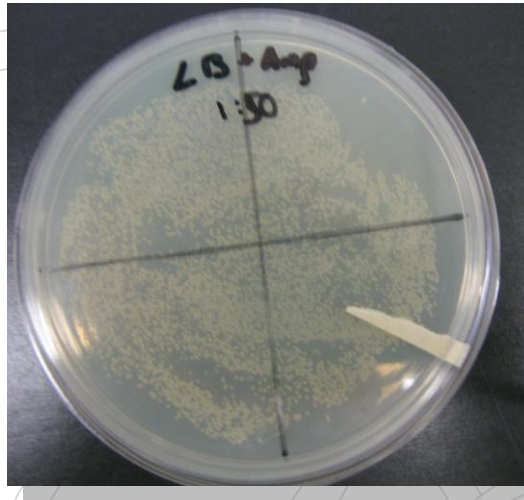
En los 2 primeros intentos en los que se llevó a cabo este procedimiento no se obtuvo ninguna clona en las diluciones manejadas (1:10 y 1:50).

Para descartar el hecho de que las soluciones de trabajo estuvieran contaminadas se prepararon nuevamente y se analizaron con más detenimiento puntos críticos de la metodología que pudieran afectar la infección, entre las que se encontraron los siguientes:

- En el empaquetamiento del DNA recombinante, la reacción se detiene agregando amortiguador SM y 20  $\mu$ l de cloroformo. En este punto se puede correr el riesgo de arrastrar cloroformo a las diluciones y así en el momento de llevar a cabo la infección, provocar la pérdida de viabilidad en las células hospederas disminuyendo la eficiencia de la infección (**Gigapack® III Plus Packaging Extract, and Gigapack®III XL Packaging Extract Instruction manual, 2003**). Debido a ello, antes de tomar la muestra del stock para hacer las diluciones, el stock de fagos se centrifugó brevemente.
- Los métodos de empaquetamiento *in vitro* de  $\lambda$ DNA nos señalan que la excesiva y brusca manipulación de los fagos puede provocar la pérdida de su viabilidad (**Hohn, 1996; Sambrook y col, 2000**). Por lo que se decidió tomar las muestras de fagos suavemente y mezclando delicadamente éstos con las células hospederas.
- El sobrepasar el crecimiento celular en los medios de cultivo puede provocar la formación de metabolitos que provoquen la pérdida en la expresión de algunos receptores así como la pérdida de la viabilidad de las células (**Sambrook y col, 2000**). Por lo que se decidió que las colonias se desarrollaran en los medios de cultivo a una temperatura óptima e impidiendo que sobrepase una OD<sub>600</sub> de crecimiento de 1.0.

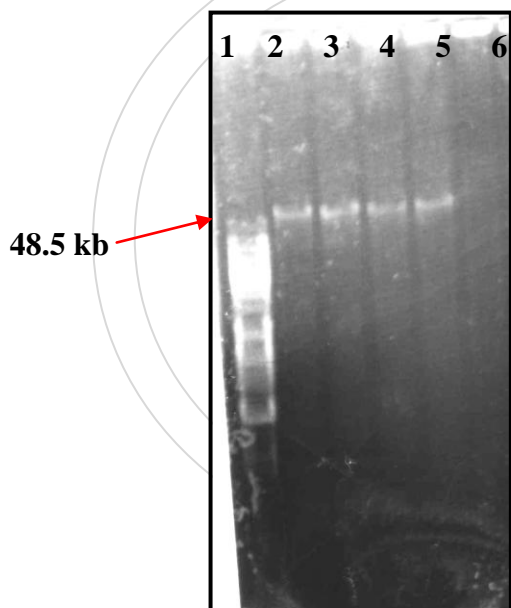
Tomando en cuenta los cuidados anteriores se realizó nuevamente la infección aplicando la misma metodología (Apéndices 9.1 y 9.2). Se

obtuvo un alto crecimiento de clonas, lo que trajo como consecuencia el no poder aislarlas de manera sencilla ya que se corría el riesgo de arrastrar dos clonas que se encontraran demasiado juntas (Figura 9).



**Figura 9.** Clonas de la cepa de *E. coli* VCS257 crecidas en medio selectivo LB+Amp (150 µg/mL) obtenidas después de la infección con fagos a una dilución 1:50.

Para confirmar si las clonas recombinantes contenían DNAg del actinomiceto, se tomaron 4 colonias al azar, creciéndolas en medios de cultivo selectivos (LB + Amp) líquidos. Ya desarrolladas la células se crecieron en medio de cultivo líquido para masificar su crecimiento y posteriormente se aislaron los cósmidos mediante la metodología mencionada en el Apéndice 4. Las muestras obtenidas se corrieron por electroforesis en geles de agarosa al 0.4%(p/v) (Figura 10).



**Figura 10.** Extracción del cósmido de las clonas recombinantes de *E. coli* VCS257 crecidas en medio selectivo LB+Amp (150µg/ml) obtenidas después de la infección con fagos a una dilución 1:50; **Carril 1:** DNA MPM XV Roche; **Carril 2, 3, 4 y 5:** DNA obtenido de las clonas recombinantes de *E. coli* VCS257; **Carril 6:** VCS257 control.

Los resultados obtenidos en el gel de la Figura 10 nos señalaron la presencia de una banda arriba de 48.5 kb en las cuatro colonias probadas. La información del kit nos indica que el empaquetamiento se lleva a cabo solamente con secuencias de entre 47 – 51 kb. Por lo que, al momento de infectar las células sólo se insertarán secuencias entre esos intervalos en las células hospederas. Las bandas obtenidas del aislamiento de cósmido se encuentran dentro del intervalo establecido, por lo que suponemos que éstas corresponden al DNA recombinante infectado. Las colonias obtenidas se almacenaron en refrigeración y se trabajó con dos diluciones mayores de los fagos de empaquetamiento (1:100 y 1:1000) con la finalidad de obtener un menor número de colonias y así facilitar el aislamiento de éstas.

Se trabajó bajo las mismas condiciones y por duplicado, tomando en cuenta los mismos cuidados para hacer la infección y aplicando la misma metodología que la planteada anteriormente. Sin embargo, se obtuvo un bajo crecimiento de 3 a 5 colonias por cada caja petri. Debido a estos resultados se decidió trabajar nuevamente con las diluciones iniciales (1:10 y 1:50) siguiendo la misma metodología. Nuevamente no se volvió a encontrar crecimiento de las células en ninguna dilución. Posteriormente se trató de realizar el crecimiento en células XL- 1 Blue. Esta cepa huésped fue elegida debido a su efectividad en la clonación usando vectores tipo lambda. Se aplicó la misma metodología planteada anteriormente para llevar a cabo la infección, sin embargo no se observó crecimiento de las clonas.

Los protocolos que describen empaquetamientos *in vitro de cósmidos* en fagos  $\lambda$  mencionan algunos factores que pueden afectar la eficiencia de

la reacción de empaquetamiento, llegando al punto de inhibirla. Dentro de estos factores se encuentran los siguientes:

- La pureza del DNA que se va a empaquetar.
- Los volúmenes de amortiguador en donde se agrega el DNA.
- El tiempo en el cual se lleva a cabo la reacción de empaquetamiento.
- El tamaño del DNA que se va a empaquetar.

Analizando los puntos anteriores podríamos decir que en nuestro caso resulta difícil evaluar la pureza de la ligación debido a la baja concentración de DNA manejada, por lo que sólo pudimos asegurarla haciendo los lavados respectivos de la muestra cuidando a su vez de no dejar residuos de reactivos que pudieran desnaturalizar el DNA como el fenol o el cloroformo.

Por lo que respecta al tamaño del DNA, éste fue analizado antes de ligarlo al vector de clonación, asegurando que éste poseía el tamaño requerido. También se ha visto que los tiempos de incubación óptimos para llevar a cabo la reacción de empaquetamiento son mayores a 120 minutos, lo cual realizamos en nuestros intentos de empaquetamiento. El único factor al que se le pudo atribuir la baja eficiencia de empaquetamiento fue la desnaturalización de los extractos para empaquetar.

Dado que se tomaron todas las precauciones necesarias durante el manejo de los empaquetados, así como la preparación reciente y correcta de los reactivos, nuevamente se comprobó la eficiencia y viabilidad del kit haciendo nuestra prueba control con el **Positive Wild-Type Lambda DNA control**, repitiendo la metodología mencionada en el Apéndice 9.1 y 9.3. Realizando las pruebas por duplicado no se observó formación de placas de lisis, indicándonos que los extractos

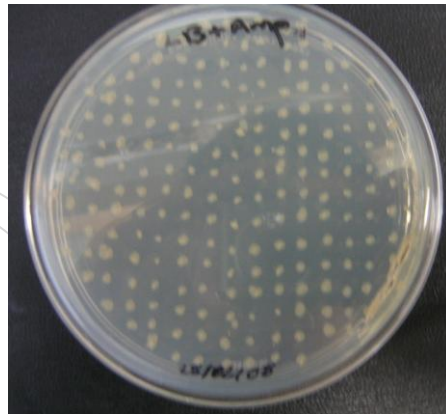


para el empaquetamiento ya no eran viables. Esta pérdida de viabilidad se pudo atribuir a un cambio en la temperatura de almacenamiento de los extractos de empaquetamiento, estos cambios bruscos de temperatura desnaturalizan los empaquetados perdiendo su funcionalidad. Se decidió evaluar la representatividad de la biblioteca genómica parcial de *S. peucetius* var. *caesius* obtenida anteriormente.

### ***Aislamiento de las clonas obtenidas de la infección de células de E. coli VCS257***

La evaluación de la representatividad de la biblioteca parcial se inició con el aislamiento de las colonias obtenidas después de la infección. Se aislaron 857 UFC en cajas petri con medio selectivo (LB+Amp), incubándolas toda la noche a una temperatura de 37°C (Figura 15).

**Figura 15.** Aislamiento de clonas obtenidas después de la infección con el DNA recombinante.



Para hacer una biblioteca genómica representativa es necesario conocer el tamaño del genoma, así como de los fragmentos de DNA para estimar el número de clonas necesarias para asegurar dicha representatividad **(Zilsel, 1992)**.

Una aproximación para calcular el tamaño de una biblioteca genómica se hace con base en la siguiente ecuación:

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-F)$$

**En donde:**

**N**= número de clonas recombinantes necesarias para encontrar las secuencias de interés.

**P**= probabilidad dada para obtener la representatividad (0.99).

**F**= Proporción del tamaño de los insertos con respecto al tamaño del genoma.

Asumiendo que el tamaño promedio de los fragmentos es de 37.5 kb, considerando además que el tamaño del genoma es de aproximadamente 8,700 kb, tomando en consideración algunos genomas ya reportados del género *Streptomyces* (**Ohnishi, 2008; Weber, 2003**) y finalmente, para encontrar una secuencia en particular con una probabilidad del 99 % encontramos:

$$N = \ln(1-0.99) / \ln(1-(37.5/8,700)) = 1,142 \text{ UFC}$$

Por consiguiente, el número mínimo de clonas aproximado para obtener una biblioteca genómica representativa es de 1,142 UFC. Sin embargo, se recomienda sobrestimar de 2 a 4 veces la población de clonas necesarios para aumentar la probabilidad de aislar una secuencia determinada (**Zilsel, 1992**). Entonces, para tener representado al menos 2 veces una secuencia dada en la biblioteca, estimamos un número de clonas de 2, 284. Haciendo una comparación de los datos teóricos con nuestro resultado experimental, encontramos que se obtuvo aproximadamente un 75% de representatividad del genoma con respecto al número mínimo de clonas para la obtención de una biblioteca representativa. Por lo tanto, en el caso de querer aislar una secuencia de interés se tendría una probabilidad de aproximadamente 37.5% de encontrarla.

### ***Elaboración de sondas de detección***

Para dicha evaluación se eligieron tres secuencias del género *Streptomyces*, *dnaA*, *hrdB* y *SCO2127*. De estos se eligió *hrdB* el cual codifica para un factor sigma, *dnaA* para una proteína de inicio de duplicación de DNA y *SCO2127* en el cual nos encontramos interesados, debido a su posible participación en la represión catabólica por fuente de carbono. Elegidos los genes de estudio se prosiguió a elaborar sus respectivas sondas de detección.

### ***Obtención de las sondas para la evaluación de la biblioteca parcial***

Las secuencias que contenían los genes de estudio se tomaron a partir de genotecas obtenidas de la cepa *S. coelicolor*; esta biblioteca se encuentra contenida en el vector SuperCos 1. Los cosmidos que contenían los genes fueron donados por el Dr. Servín del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Con el fin de conservar estos cósmidos y aumentar su concentración, éstos fueron transformados por electroporación en células de *E. coli DH5 $\alpha$*  (Apéndice 3.2). A partir de las células obtenidas, se hizo el aislamiento de cósmido por la técnica miniprep (Apéndice 4). De los cósmidos aislados, se hizo la amplificación de los genes de interés por PCR.

Para realizar la amplificación de los genes se diseñaron los cebadores para PCR, éstos se presentan en la Tabla 2.

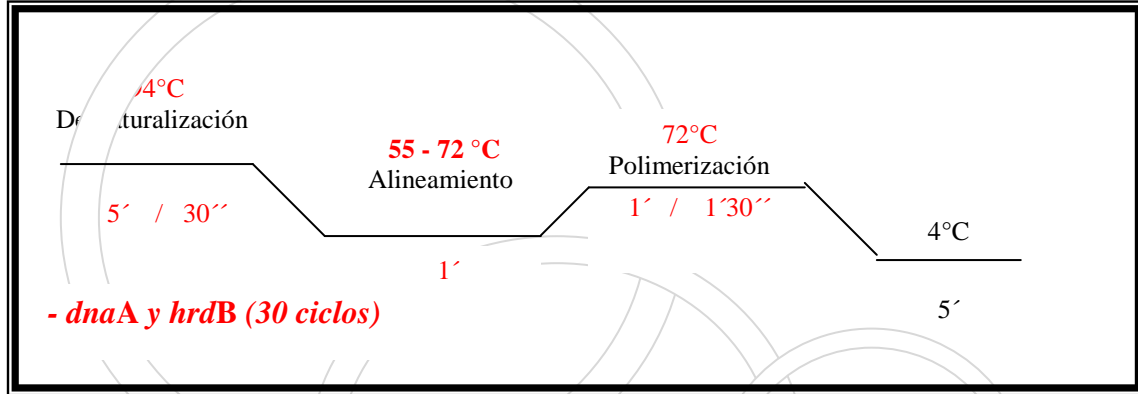
Especie de origen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Cósmido de origen	Longitud	GC %	Tm °C
<i>S.coelicolor</i>	<i>hrdB</i> -Fwd	TCAACCAGATCCTCGAGGAAGA	<i>SC5B8.10</i>	22	50.0	67.1
<i>S.coelicolor</i>	<i>hrdB</i> -Rev	AGAACTTFTAGCCCTTGGTGTAGTCGA ACTT	<i>SC5B8.10</i>	31	45.16	71.1
<i>S.coelicolor</i>	<i>dnaA</i> -Fwd	CGTATTGGAGCAACTTCTCGGAGAG	<i>SCH18.16</i>	25	52.0	75.2
<i>S.coelicolor</i>	<i>dnaA</i> -Rev	ATGGAGTTGATGAACTCGTTGGT AA	<i>SCH18.16</i>	26	42.3	74.3

**Tabla 2.** Características de los oligonucleótidos utilizados como “cebadores”. En la columna “Especies de origen” se indican los microorganismos de los cuales se obtuvieron las secuencias para el diseño de los oligonucleótidos. La columna “Longitud” se refiere al número de nucleótidos que componen el oligo. Se muestra la temperatura de alineamiento, el porcentaje de guanina-citosina, así como la secuencia de los oligos usados para la amplificación por PCR de los genes de *S. coelicolor* contenidos en el vector de clonación SuperCos 1.

Con el fin de determinar la temperatura óptima de alineamiento de los cebadores para la amplificación por PCR de los genes *hrdB* y *dnaA*, se realizó un PCR de gradiente. Las condiciones utilizadas se muestran en la Figura 11 y las condiciones de reacción en la Tabla 3.

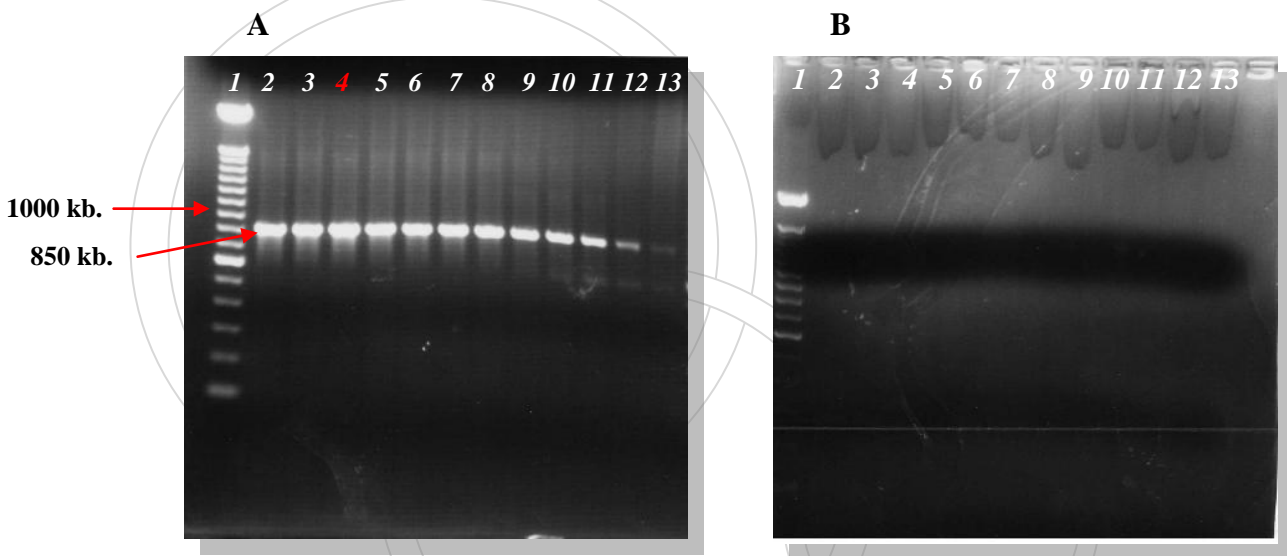
Mezcla de reacción	<i>hrdB</i> y <i>dnaA</i> (gradiente de temperatura)
DNA problema	11.0 µl
Amortiguador 10X	32.5 µl
dNTP´s	52.0 µl
oligos 5´	6.5 µl
oligos 3´	6.5 µl
DMSO	32.5 µl
MgCl <sub>2</sub>	19.5 µl
Taq	3.25 µl
H <sub>2</sub> O	161.2 µl

**Tabla 3.** Mezclas de reacción para la amplificación por PCR de los genes *hrdB* y *dnaA* en un gradiente de temperatura.



**Figura 11.** Esquema de temperaturas aplicadas en el sistema de PCR para la amplificación de las secuencias de los genes *dnaA* y *hrdB*.

Los resultados de la amplificación fueron corroborados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.0%(p/v) (Figura 12).

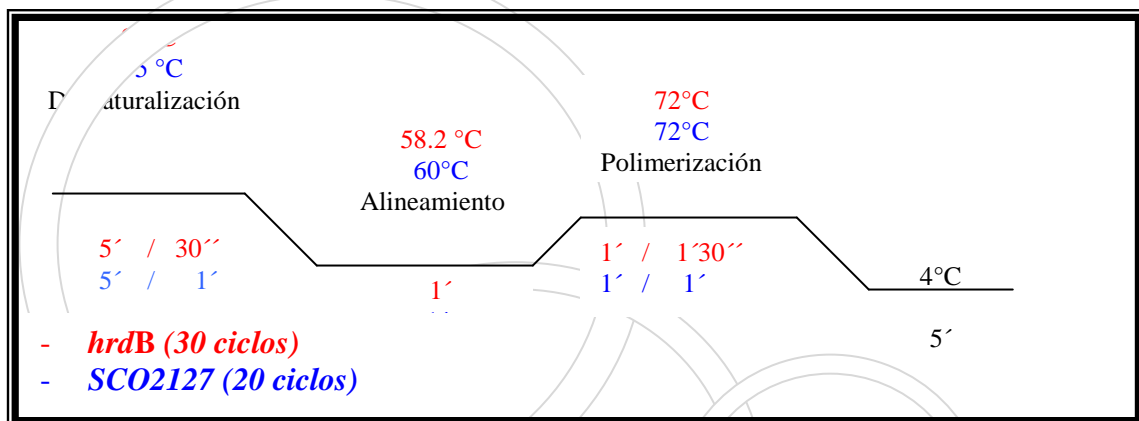


**Figura 12.** Amplificación por gradiente de temperatura de los genes *hrdB* (**panel A**) y *dnaA* (**panel B**). M.P.M: 1 kb plus ladder.

Como se puede apreciar en la Figura 12, para el gen *hrdB* se obtuvo una banda de alrededor 850 pb que corresponde a lo reportado. Además de elegir la temperatura de 58.2 °C como la óptima para el alineamiento.

De la secuencia del gen *dnaA* no se obtuvo amplificación alguna, Para confirmarlo, se repitió la metodología obteniendo el mismo resultado. Para el gen *SCO2127*, los oligonucleótidos y los condiciones óptimas para la amplificación se establecieron en base a estudios realizados anteriormente con la secuencia (**Angell, 1992**).

Debido a los prolongados tiempos de espera para solicitar y recibir los nuevos oligonucleótidos para el gen *dnaA* se determinó trabajar sólo con las secuencias del gen *hrdB* y *SCO2127*. En la Figura 13 se muestran las condiciones finales de trabajo para la amplificación de ambos genes.

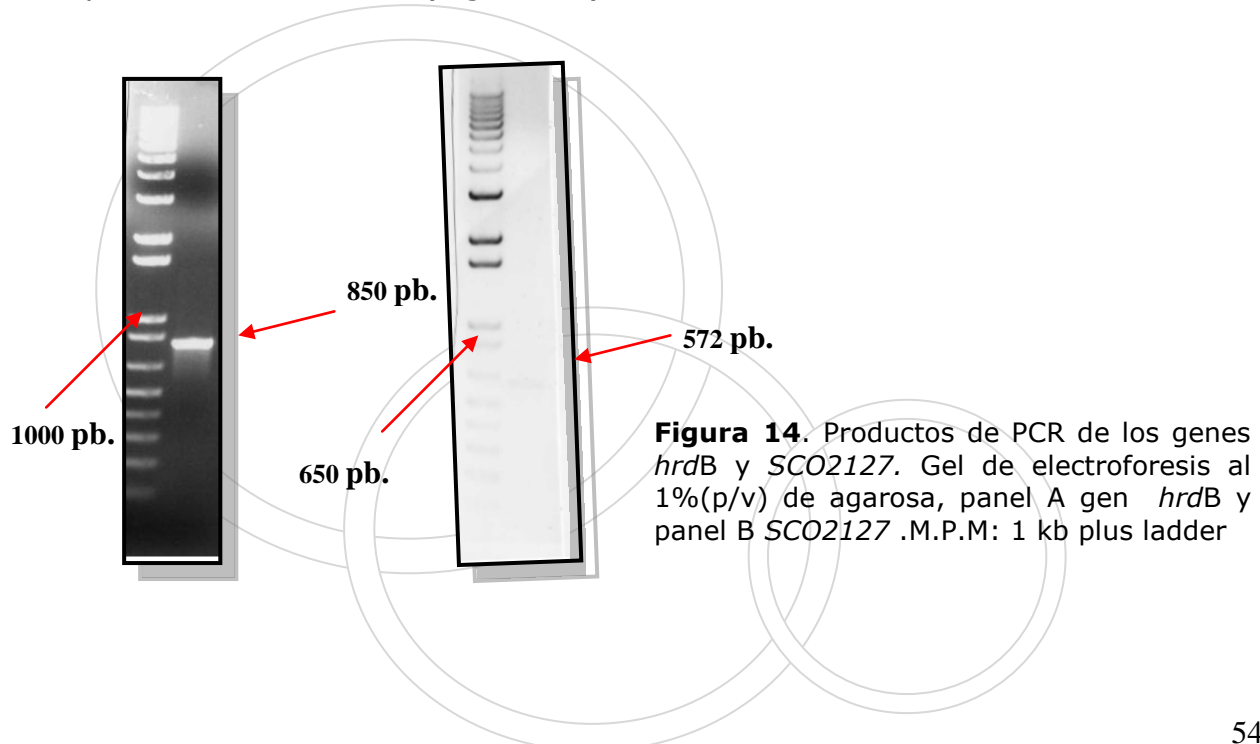


**Figura 13.** Esquema de temperaturas aplicadas en el sistema PCR para la amplificación de las secuencias de los genes *hrdB* y *SCO2127*.

Mezcla de reacción	hrdB y SCO2127.
DNA problema	1.7 $\mu$ l
Amortiguador 10X	5.0 $\mu$ l
dNTP's	8.0 $\mu$ l
oligos 5'	1.0 $\mu$ l
oligos 3'	1.0 $\mu$ l
DMSO	5.0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	3.0 $\mu$ l
Taq	0.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	25.5 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>50.0 <math>\mu</math>l</b>

**Tabla 4.** Mezclas de reacción para la amplificación por PCR de los genes *hrdB* y *SCO2127*.

La amplificación de ambos genes a las temperaturas y condiciones antes señaladas, se realizaron nuevamente y se corroboraron haciendo una electroforesis en geles de agarosa al 1.0%(p/v) para verificar los productos obtenidos (Figura 14).



**Figura 14.** Productos de PCR de los genes *hrdB* y *SCO2127*. Gel de electroforesis al 1%(p/v) de agarosa, panel A gen *hrdB* y panel B *SCO2127* .M.P.M: 1 kb plus ladder

Al analizar el tamaño de la secuencia del gen *hrdB* reportada en el banco de genes de la cepa *S.coelicolor* se reconoce que la secuencia amplificada debe pesar alrededor de 850 kb, lo que coincide con los resultados obtenidos en el gel. En lo que respecta a la secuencia del gen *SCO2127*, se sabe que ésta tiene un peso molecular de alrededor de 572 kb (**Angell, 1992**), que coincide con los resultados obtenidos en la amplificación.

Se midió la concentración de cada una de las secuencias amplificadas obteniendo 757 µg/mL para el gen *hrdB* y 215 µg/mL del gen *SCO2127*. Para hacer el marcaje de las sondas con digoxigenina, se siguió la metodología planteada en el Apéndice 10, desnaturalizando 1 µg de DNA de ambos genes, y posteriormente agregar 4 µl de nucleótidos marcados, dejando las reacciones a 37°C toda la noche para la polimerización. El proveedor del kit señala que largos tiempos de incubación incrementan los rendimientos de obtención de las sondas.

### ***Transferencia e hibridación de clonas recombinantes***

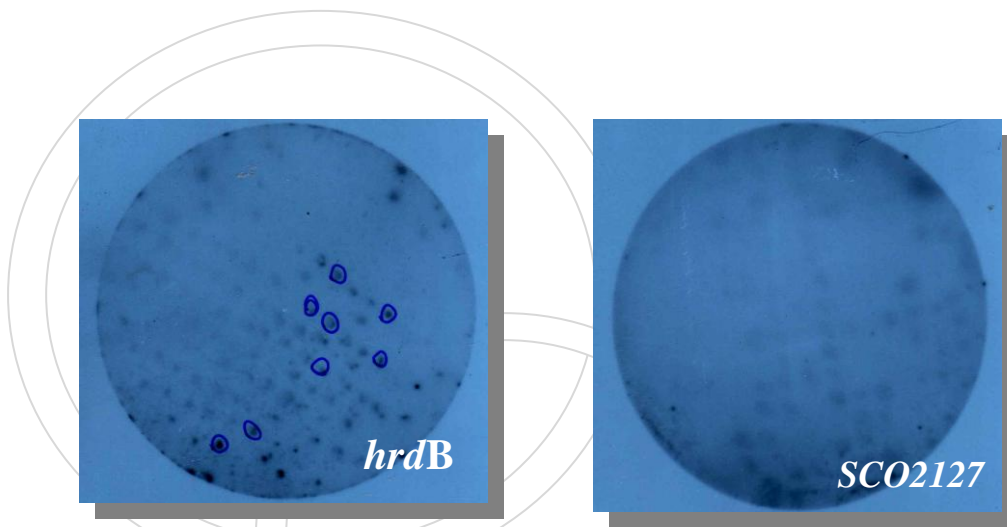
La detección de colonias que posiblemente contengan las secuencias en estudio (*hrdB* y *SCO2127*) se llevó a cabo mediante la técnica de hibridación. Para ello, se transfirieron por "parcheo" las colonias crecidas en las cajas petri a membranas Hybond cargadas positivamente. Las colonias adheridas a la membrana se lisaron *in situ* aplicando la metodología mencionada en el Apéndice 11. Una vez lisadas las colonias, se lavaron para eliminar residuos de proteínas y dejar el DNA de cada clona adsorbida a las membrana. Las hibridaciones se hicieron precalentando una solución de hibridación **DIG Easy Hyb** a 37°C y añadiéndola a las membranas con DNA (Apéndice 12.1).



La sonda se desnaturalizó y se agregó a las membranas, las cuales se dejaron incubando a una temperatura de 37°C, durante aproximadamente 4 horas con agitación suave. Como se mencionó anteriormente, la sonda contenía un marcador enzimático el cual usa digoxigenina (DIG), un esteroide hapteno que hace una reacción enzimática quimioluminiscente con el CSPD (revelador). Esta emisión de luz aproximadamente de 447 nm fue observada en películas de rayos X.

Se realizó una detección inmunológica de la digoxigenina aplicando el método mencionado en el Apéndice 12.2, lavando primero la membrana para someterla posteriormente a un bloqueo. La membrana se incubó entonces 30 min. con el anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina, diluido a una concentración 1:10000 (75 mU/mL) en la solución bloqueadora. Posteriormente, se hicieron lavados con el amortiguador de detección; este amortiguador tiene el pH óptimo de reacción de la fosfatasa alcalina para que ésta actúe sobre el sustrato CSPD. Esta reacción quimioluminiscente emite un fotón de luz que puede ser captado por una película de rayos X. Las membranas fueron incubadas con el sustrato y expuestas a placas de rayos X por alrededor de 24 h.

Para evitar la ocurrencia de falsos positivos en las hibridaciones se hicieron lavados de las membranas con SSC 5X y SDS 0.1%(v/v) a una temperatura de 37°C con agitación constante. Posteriormente, se hizo un segundo lavado pero a una concentración 2X de SSC y SDS 0.1%(v/v) a una temperatura de 42 °C con agitación constante.



**Figura 16.** Hibridaciones reveladas en películas sensibles a rayos X de los genes *hrdB* y *SCO2127*.

En la Figura 16 se puede observar que para los genes *hrdB* y *SCO2127* existen varias clonas candidatas a contener dichas secuencias. Una vez localizadas y aisladas las colonias, se harán estudios más exhaustivos para confirmar la presencia de las secuencias de estos genes en las clonas. Para identificar estas secuencias, el método a utilizar debe seleccionar sólo las clonas que contengan el gen de interés, para determinar si se encuentra todo o sólo parte del gen. La metodología dependerá de los recursos y la disponibilidad de la información de las secuencias de interés.

## CONCLUSIONES

Se obtuvo una biblioteca genómica parcial con un 75% de representatividad del genoma con respecto al número mínimo de clonas para la obtención de una biblioteca representativa. Por lo tanto, en el caso de querer aislar una secuencia de interés se tendría una probabilidad de aproximadamente 37.5% de encontrarla.

- Con la técnica de hibridación se detectaron clonas que posiblemente contienen las secuencias de los genes *hrdB* y *SCO2127*. Estas serán objeto de estudio para excluir y encontrar las candidatas para contener las secuencias de interés. Posteriormente se aislarán los genes para ser caracterizados con el fin de conocer con más detalle sus características físicas, químicas y el papel que juegan en la regulación de los metabolitos secundarios que genera la cepa *Streptomyces peucetius* var. *caesius* y así encontrar la forma en la que se podría manipular el gen para sobreproducir los subproductos secundarios como lo son en este caso la daunorrubicina y doxorrubicina y mejorar los rendimientos en su producción y escalarlos a nivel industrial.

### Recomendaciones:

- De acuerdo a la metodología propuesta, la experiencia obtenida y la bibliografía consultada para la elaboración de bibliotecas genómicas se hacen las siguientes recomendaciones con el fin de manipular de una manera correcta el DNA genómico desde su purificación hasta la infección de las células recombinantes.

Tomando en cuenta estas recomendaciones puede aumentar la probabilidad para obtener una biblioteca genómica representativa y encontrar la secuencia que se quiera estudiar.

Entre las recomendaciones se encuentran:

1. Correcto aislamiento y purificación del DNAg.

En cada una de las extracciones en las que se purifica el DNAg se deberá eliminar la mayor cantidad posible de algunos contaminantes como son: proteínas, alcohol, endonucleasas, fenoles, sales, agentes quelantes etc. ya que pueden alterar las condiciones de reacción en pasos sucesivos, como lo son las digestiones parciales o en la ligación del DNAg con el vector de clonación.

La precipitación de ADN debe realizarse a temperatura ambiente, además de tener el cuidado de que los pellets posteriores al lavado con etanol no se sobresequen.

2. La obtención de tamaños de inserto adecuados.

Si se trabaja con insertos de mayor o menor tamaño que el establecido para el vector de clonación, este no se ligara y por tanto se obtendrán menores rendimientos de DNA recombinante.

3. Establecer una metodología adecuada y confiable para corroborar la eficiencia de la ligación entre el vector y el inserto, así como verificar la concentración y volumen de DNA recombinante que va a ser empaquetada.

En la cuantificación mediante espectrofotometría no se llega a obtener una lectura confiable debido a la baja concentración que se maneja en la reacción de ligación, aunado a la dilución que se deberá hacer para realizar la lectura que es aproximadamente en 50  $\mu$ l de agua grado milliQ.

4. Manejar cuidadosamente los empaquetados (fagos) en la metodología donde están involucrados y hasta el momento de la infección.

Para que la viabilidad de los fagos no se pierda estos deben almacenarse a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , cualquier cambio brusco en la temperatura de los empaquetados pueden provocar un cambio en su conformación y por ende la pérdida en la capacidad de empaquetar las secuencias de DNA recombinante.

Llevando a cabo la reacción de empaquetamiento y seguida la infección de las células. Para tomar la solución de fagos con la micropipeta se hará de forma lenta evitando una succión muy brusca. Esto con el fin de evitar que las cabezas de los fagos se separen de la cola y así perder la viabilidad para infectar el DNA recombinante.

5. Controlar factores que pueden interferir en el crecimiento e infección de las células del hospedero entre los que se encuentran: la OD, la temperatura y la agitación.

El cultivo de las bacterias no debe rebasar una  $\text{OD}_{600}$  de 1.0 ya que se establece como la concentración en donde las células comienzan a generar metabolitos secundarios que pueden alterar la integridad de las mismas, incluyendo la pérdida de receptores entre los cuales se encuentran los que sirven para que se lleve a cabo la inserción del DNA recombinante a las células (receptores a maltosa). Este crecimiento normalmente se da entre las 4 y 6 horas a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  o entre 24 y 30 horas a una temperatura de  $24^{\circ}\text{C}$ .

## APÉNDICES

### Apéndice 1. Preparación de medios de cultivo y soluciones.

<p><b>YMG-1</b></p> <p>Extracto de levadura 4 g/L</p> <p>Extracto de malta 10 g/L</p> <p>Glucosa 4 g/L</p> <p>Ajustar el pH a 7.2 antes de esterilizar</p>	<p><b>LB</b></p> <p>Extracto de levadura 5 g/L</p> <p>Triptona 10 g/L</p> <p>NaCl 5 g/L</p> <p>Ajustar el pH a 7.0</p>
<p><b>YEME</b></p> <p>Extracto de levadura 3 g/L</p> <p>Extracto de malta 3 g/L</p> <p>Peptona 5 g/L</p> <p>Glucosa 10 g/L</p> <p>Sacarosa 340 g/L</p> <p>Agar 15 g/L</p> <p>Después de esterilizar añadir 2 mL de MgCl<sub>2</sub> * 6H<sub>2</sub>O</p>	<p><b>LB agar</b></p> <p>Extracto de levadura 5 g/L</p> <p>Triptona 10 g/L</p> <p>NaCl 5 g/L</p> <p>Agar 20 g/L</p> <p>Ajustar el pH a 7.0</p>
<p><b>TSB</b></p> <p>Caldo triptosa soya 30 g/L</p>	<p><b>LB + Ampicilina Agar</b></p> <p>Extracto de levadura 5 g/L</p> <p>Triptona 10 g/L</p> <p>NaCl 5 g/L</p> <p>Agar 20 g/L</p> <p>Ajustar el pH a 7.0</p> <p>Después de esterilizar agregar 10 mL a una concentración 15 mg/mL de ampicilina previamente filtrada.</p>
<p><b>LB + Ampicilina</b></p> <p>Extracto de levadura 5 g/L</p> <p>Triptona 10 g/L</p> <p>NaCl 5 g/L</p> <p>Ajustar el pH a 7.0</p> <p>Después de esterilizar agregar 10 mL a una concentración 15 mg/mL de ampicilina previamente filtrada.</p>	<p><b>Medio SOC</b></p> <p>Extracto de levadura 5 g/L</p> <p>Triptona 20 g/L</p> <p>NaCl 5 g/L</p> <p>KCl 2.5 mM</p> <p>MgCl<sub>2</sub> 10 mM</p> <p>MgSO<sub>4</sub> 20 mM</p> <p>Glucosa 20 mM</p>
<p><b>Soluciones para aislamiento de cósmidos</b></p> <p><b>Solución I</b></p>	<p><b>Amortiguador P</b></p> <p>Sacarosa 1.0300 g/L</p> <p>Sulfato de potasio 0.0025 g/L</p>

<p>Tris-HCl 50 mM (pH 8) EDTA 10 mM</p> <p><b>Solución II</b> NaOH 200 mM SDS 1%</p> <p><b>Solución III</b> Acetato de potasio 3 M (pH 5.5)</p>	<p>MgCl 0.02020 g/L mL de elementos traza 0.0200 mL</p>
<p><b>Amortiguador TE</b> 10.0 mM Tris-HCl (pH 8.0) 0.1 mM EDTA</p>	<p><b>Amortiguador SM</b> NaCl 5.8 g/L MgSO<sub>4</sub>* 7H<sub>2</sub>O 2.0 g/L Tris-HCl 1M (pH 7.5) 50 mL Gelatina 2% (p/v) 5.0 mL</p>
<p><b>Solución de elementos traza</b> ZnCl<sub>2</sub> * 7H<sub>2</sub>O 40 mg FeCl<sub>3</sub> * 6H<sub>2</sub>O 200 mg MnCl<sub>2</sub>* 4H<sub>2</sub>O 10 mg CuCl<sub>2</sub> * 2H<sub>2</sub>O 10 mg NaB<sub>4</sub>O<sub>7</sub> * 10 H<sub>2</sub>O 10 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> * 4H<sub>2</sub>O 10 mg Cada uno se disuelve en tubos con 5 mL de agua destilada, se juntan todos los tubos y se esteriliza por filtración. Verterlo en un frasco ámbar estéril.</p>	<p><b>Amortiguador de lavado</b> Acido maleico 0.1 M NaCl 0.15 M Tween 20 0.3% (v/v)</p>
<p><b>Amortiguador de detección</b> Tris-HCl 0.1 M NaCl 0.1 M Ajustar a pH 9.5</p>	<p><b>Amortiguador Acido maléico.</b> Acido maleico 0.1 M NaCl 0.15 M Ajustar con NaOH (sólido) a pH 7.5</p>
<p><b>Preparación de la solución de trabajo para hibridación DIG Easy Hyb</b> Agregar cuidadosamente 64 mL de agua bidestilada en dos porciones al frasco de <b>DIG Easy Hyb Granules</b> disolviéndolo inmediatamente a una temperatura de 37°C durante 5 min.</p>	

## **Apéndice 2. Aislamiento y purificación de DNAg.**

1. Se crecieron 2 cultivos de la cepa *Streptomyces peucetius* var. *caesius* cada uno en 50 mL de medio TSB suplementado con glicina al 0.5%(v/v) en un matraz bafleado de 250 mL.
2. Se juntaron los dos cultivos (100 mL) en un tubo estéril y se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min.
3. Se desecha el sobrenadante y las células se lavaron por duplicado con 25 mL de sacarosa al 10.3%(p/v) y se centrifugaron durante 10 min a 5000 rpm.
4. El micelio se resuspendió en 50 mL de Amortiguador P con lisozíma (100 mg/mL) incubándolo a 45°C hasta la formación de protoplastos (tritrandolos c/15 min con una pipeta) durante 1 h y son concentrados a 3000 rpm por 10 min.
5. Centrifugado el lisado y los protoplastos se resuspendieron en 10 mL sacarosa al 10.3%(p/v), adicionando 200 µL de EDTA 0.5 M, posteriormente se adicionó 1 mL de SDS (dodecil sulfato de sodio) al 20% agitando suavemente con una pipeta.
6. Inmediatamente se adicionaron 10 mL de fenol más 15 mL NaCl 5 M. mezclándolo suavemente por 3 o 4 min.
7. Inmediatamente se agregó 1 volumen de cloroformo (10 mL) mezclándolo suavemente por 10 min y se centrifugó a 12000 rpm por 15 min manteniendo en hielo el centrifugado.
8. Se hizo la transferencia con mucho cuidado de la fase superior (acuosa) con una micropipeta a un nuevo tubo estéril.
9. A la fase acuosa se le agrego 1 volumen de isopropanol (12 mL por cada 10 mL de extracto) cuidando de mantener las 2 fases.
10. Con una pipeta Pasteur, enredar el DNA mediante la técnica de spooling, dejándolo secar a temperatura ambiente para posteriormente lavarlo con etanol al 70%(v/v) y despues se deja secar a temperatura ambiente.



11. El DNAG se resuspendió en el menor volumen de Amortiguador TE (5 mL) (Si el DNA no estuviese completamente no se encontraba totalmente disuelto se pone a 30°C o se le agregaba un mayor volumen de Amortiguador TE hasta disolverse).
12. Una vez disuelto el DNA se adicionó RNAsa a una concentración final de 50µg/mL y se incubó a 50°C por una hora.
13. Se añadió pronasa a una concentración final de 100 µg/mL durante 1 h a 37°C. Adicionar NaCl 100 mM y SDS 0.4%(v/v) e incubarse a 37°C por 1 h.
14. Para limpiar el DNA de las enzimas se agregaron alícuotas en tubos de microcentrífuga de 500 µl en cada uno, se agregó 1 volumen de fenol/cloroformo mezclándolo y centrifugándolo a 13000 rpm por 5 min, separando posteriormente la fase acuosa (se hizo por duplicado).
15. Se adicionó 1 volumen de cloroformo (500 µl), mezclándolo y centrifugándolo a 12000 rpm por 5 min y nuevamente se separó la fase acuosa.
16. A la fase acuosa se le adicionó 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto mezclándolo suavemente para después centrifugarlo a 13000 rpm durante 10 min.
17. El botón de DNAG obtenido se lavó con 200 µl de etanol al 70%(v/v) a 10000 rpm por 10 min (por duplicado).
18. Se dejó secar completamente el DNAG y se resuspendió en el menor volumen posible de amortiguador TE estéril y se incubó a 74°C para que se solubilizara.
19. Ya disuelto el DNAG se almacenó en refrigeración.

### **Apéndice 3. Preparación de células competentes y electroporación del cósmido.**

#### **3.1) Obtención de células competentes de la cepa DH5 $\alpha$**

1. Se inoculó un matraz con 50 mL de medio LB y se incubó a 29°C con agitación (200 rpm) por toda la noche.
2. En 1 litro de medio LB se inoculó con 10 mL del preinoculo y se incubó a 37°C con agitación (200 rpm).
3. Se monitoreo su crecimiento a una ABS<sub>600</sub> hasta que alcanzara una densidad óptica de 0.5.
4. Alcanzado el crecimiento, este se recolecta enfriando los matraces en hielo por 15 a 30 min distribuyéndolos en 4 frascos y centrifugándolos a 2500 rpm en frío (4°C) removiendo tanto sobrenadante como fuera posible.
5. El pellet obtenido se resuspendió en 1 litro de agua fría grado milli-Q estéril y se centrifugó nuevamente a las condiciones del paso 4.
6. El pellet se resuspendió en 0.5L de agua fría grado milli-Q estéril centrifugándolo hasta remover todo el sobrenadante.
7. El pellet se resuspendió en 20 mL de glicerol frío al 10% (v/v) estéril y se centrifugó a 2500 rpm en frío (4°C).
8. El pellet se resuspendió en 3 mL de glicerol frío al 10% (v/v)
9. En tubos de microcentrífuga se hicieron alícuotas de 50  $\mu$ L almacenándolas rápidamente en un baño de etanol con hielo seco para posteriormente almacenarla en cámaras de congelación (-70°C) para su posterior uso.

### **3.2) Electroporación del SuperCos 1 para la obtención células transformantes en DH5 $\alpha$**

1. De las células competentes de la cepa *DH5 $\alpha$*  conservadas en glicerol al 10%(v/v), se tomo un tubo de microcentrifuga con 50  $\mu$ L y se agregaron 2  $\mu$ L (2 $\mu$ g) del vector *SuperCos 1*.
2. Éstos se mezclaron y se agregaron en una celda de electroporación, verificando que no hubiera presencia de burbujas.
3. Se electroporó a 1.25 watts para posteriormente agregarle 95  $\mu$ l de medio SOC. Esta solución se pasa a un tubo Eppendorf y se incubó 1 h a 37°C.
4. Ya incubados se procede a sembrarlo en un medio sólido selectivo (LB + Amp) y nuevamente se incubó a 37°C toda la noche para el desarrollo de las células transformantes.

### **Apéndice 4. Extracción y purificación del vector SuperCos 1.**

La extracción y purificación se llevó a cabo mediante la técnica de Miniprep descrita a continuación.

1. Se toma un inóculo de las células transformantes y se siembra en 50 mL de medio de cultivo selectivo (LB + Amp) toda la noche a 37°C con una agitación de 200 rpm.
2. Se hicieron alícuotas de 1 mL pasándolas a tubos de microcentrifuga estériles.
3. Primeramente se agregaron 100  $\mu$ L de solución I (Apéndice 1) agitándolas con un vórtex.
4. Inmediatamente se agregó 200  $\mu$ L de solución II (Apéndice 1) mezclándolo invirtiendo los tubos 10 veces.
5. Inmediatamente se agregó 150  $\mu$ L de solución III (Apéndice 1) y se mezclan invirtiendo los tubos 5 veces.

6. Las células desnaturalizadas se centrifugan a 13500 rpm por 5 min a temperatura ambiente.
7. Inmediatamente se extrajo el sobrenadante y se colocó en 400  $\mu\text{L}$  de fenol/cloroformo (1:1) agitándolo en vortex por 2 min para nuevamente centrifugarlo a 13500 rpm por 5 min.
8. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se le agregaron 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Los tubos se ponen en hielo durante 10 min.
9. Se centrifugó a 10000 rpm y el pellet obtenido se lavó con 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%(v/v).
10. Nuevamente se centrifugó a 10000rpm y el sobrenadante se decantó, el tubo se dejó abierto hasta secar el pellet. Una vez seco el cósmido se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de amortiguador TE.

**Apéndice 5. Digestión con *XbaI* y *BamHI* del SuperCos 1 y desfosforilación del mismo.**

1. La digestión se hizo con 25  $\mu\text{L}$  del *SuperCos 1* (1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y 9 U/ $\mu\text{g}$  de enzima *Xba I* (Fermentas) en un volumen total de reacción de 200  $\mu\text{L}$  por 1 h a 37°C.
2. El vector digerido se extrae una vez con fenol-cloroformo-isopropanol (25:24:1) saturado con 50mM Tris-HCl (pH 8.0) y un volumen de cloroformo.
3. La fase acuosa se extrae y se ajusta con acetato de sodio 0.3 M (pH 5.5) y se precipita con etanol absoluto por 1 h y se centrifuga a 10000 rpm.
4. Se desecha el sobrenadante y el pellet obtenido se lava con etanol al 70% (v/v).
5. El vector digerido se resuspende en agua grado milli-Q estéril a una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

6. La desfosforilación del vector se hizo con una fosfatasa alcalina "CIAP" (Invitrogen). Se utiliza 0.1 U CIAP/20 pmol de DNA en amortiguador CIAP 1X por 30 min a 37°C.
7. La reacción se ajustó a una concentración de 15 mM EDTA y se incubó a 68°C por 10 min para inactivar la CIAP.
8. Para eliminar los residuos de CIAP y otros contaminantes el vector se lavó con una solución de fenol-cloroformo (1:1).
9. Para precipitar el vector la fase acuosa se ajustó con acetato de sodio 0.3 M (pH 5.5) y se limpia con 2.5 volúmenes de etanol absoluto.
10. Se centrifugó a 10000 rpm por 10 min para después lavar el pellet con etanol al 70% (v/v).
11. Se dejó secar perfectamente el DNA para eliminar los residuos del etanol.
12. El DNA vector se resuspende en Amortiguador TE, quedando a una concentración final de 1 µg/µL.
13. Al DNA vector digerido con *Xba* I (~25µg) se trató con 5 U/µg de enzima *Bam*HI (Fermentas) en un volumen de reacción total de 200 µL incubándola por 1 h a 37°C.
14. El vector digerido se lava con fenol-cloroformo-isopropanol (25:24:1) saturado con 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) y posteriormente con 1 volumen de cloroformo.
15. La fase acuosa se ajustó con acetato de sodio 0.3 M (pH 5.5) y se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto.
16. Se centrifugó a 10000 rpm por 10 min para después lavar el pellet con etanol al 70% (v/v).
17. Se dejó secar perfectamente el DNA para eliminar los residuos del etanol.
18. El DNA vector se resuspendió en agua grado milli-Q estéril quedando a una concentración final de 1 µg/µL.

## **Apéndice 6. Digestión parcial de DNA genómico**

1. Para hacer las digestiones parciales con el fin de obtener el tamaño de inserto adecuado se trabajó bajo las siguientes condiciones:  
10 µg. de DNAg *Streptomyces peucetius* var. *caesius*  
10 µL de amortiguador para enzima de restricción 10X.  
Agua destilada a un volumen final de 100 µL.
2. Se pre equilibra la temperatura de la mezcla a 37°C por 5 min y posteriormente se agregar 10 U de *MboI* y llevar a cabo la digestión a temperatura constante.
3. Se removieron alícuotas de 15 µL a diferentes tiempos de digestión: 0, 2, 3, 4 y 5 min. La enzima se inactivó poniendo la mezcla en un baño de agua a 80°C por 5 min. Se tomaron 10 µl de cada digestión de DNAg a los diferentes tiempos y se corren en un gel de electroforesis.
4. Correr en un gel de electroforesis al 0.4%(p/v) de agarosa para monitorear la digestión.
5. Determinado el tiempo óptimo de reacción se hizo una digestión parcial con la misma enzima *MboI* pero con 100 µg de DNAg en un volumen total de reacción de 1 mL.
6. La digestión se detiene igualmente inactivando la enzima poniendo la mezcla en un baño de agua a 80 °C.
7. Verificar una alícuota de 10 µL sobre un gel al 0.4% de agarosa para garantizar una adecuada distribución de tamaño.
8. Se extrajo la digestión del DNAg con 1 volumen de fenol-cloroformo saturado con 50 mM de Tris HCl (pH 8.0) posteriormente un volumen de cloroformo. Ajustar la fase acuosa a 0.3 M de acetato de sodio (pH 5.5) y agregar 2.5 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el DNAg.
9. La mezcla se centrifuga a 10000 RPM durante 5 minutos.

10. Se retira la mayor cantidad de sobrenadante posible y se deja secar el DNA dentro del tubo.
11. La digestión se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua grado milli-Q estéril.

### **Apéndice 7. Desfosforilación del DNAG parcialmente digerido.**

1. Se desfosforilaron los 50  $\mu\text{L}$  de la digestión de DNAG agregando 40  $\mu\text{L}$  de CIAP diluyendo la mezcla a un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  en 1X CIAP amortiguador.
2. La reacción se incubó a 37°C por 1 h.
3. Para detener la reacción se agregaron 3  $\mu\text{L}$  de EDTA 0.5 M y se incubó a 68°C por 10 min.
4. El DNAG se lavó primero con fenol-cloroformo saturado con 50 mM de Tris-HCl (pH 8.0) y posteriormente un volumen de cloroformo.
5. Para precipitar el DNAG digerido, se puso la fase acuosa a una concentración final de 0.3 M de acetato de sodio (pH 5.5) precipitando con 2.5 volúmenes de etanol absoluto.
6. Se resuspende el DNAG a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en agua grado milli Q estéril.

### **Apéndice 8. Ligación de DNAG y vector de clonación (SuperCos1).**

1. Para llevar a cabo la ligación se adicionaron los siguientes componentes a un tubo de microcentrífuga:
  - 2.5  $\mu\text{g}$  de digestión parcial de DNAG desfosforilado.
  - 1.0  $\mu\text{L}$  de SuperCos 1 DNA [*Xba*I – CIAP y digerido con *Bam*HI (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )]
  - 2.0  $\mu\text{L}$  de amortiguador de ligasa 10X.
  - 2.0  $\mu\text{L}$  de rATP 10 mM.Llevando a un volumen final con agua milli-Q de 20  $\mu\text{L}$ .

2. Agregar 1  $\mu\text{L}$  (1U) de T4 DNA ligasa (Promega) a los 19  $\mu\text{L}$  de la reacción e incubar a 4°C toda la noche.

## **Apéndice 9. *Empaquetamiento e infección del DNA recombinante.***

### **9.1) *Empaquetamiento.***

1. Se tomó un tubo de reacción con extractos de empaquetamiento en congelación (-80°C) transportándolo sin que se derritiera en hielo seco.
2. Para derretir poco a poco el extracto de empaquetamiento, se sostuvo el tubo entre los dedos hasta que su contenido del tubo comenzara a derretirse.
3. Inmediatamente se agregó el DNA recombinante a una concentración de alrededor de 0.5  $\mu\text{g}$  al extracto de empaquetamiento.
4. Se mezcló cuidadosamente el contenido del tubo con la punta de una pipeta hasta homogenizarlo.
5. Para asegurarse que todo el contenido estuviera en el fondo de el tubo este se centrifugó rápidamente al 13000 rpm por 5 segundos.
6. El tubo se incubó a temperatura ambiente (22°C) por 2 h.
7. Para detener la reacción se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de amortiguador SM y 20  $\mu\text{L}$  de cloroformo mezclando cuidadosamente todo el contenido.
8. El tubo se centrifugó brevemente para sedimentar los extractos que no empaquetaron y precipitar el cloroformo disuelto.
9. El sobrenadante con los fagos se almacenó a 4°C.



### **9.2) Infección de las células huésped VCS257, XL1-Blue.**

1. A partir de un stock con células competentes, se resembró una asada en una caja petri con medio LB mediante la técnica de estría por agotamiento. Incubándola por toda la noche a 37°C.
2. Se toma una colonia aislada y se siembra en medio líquido LB suplementado con 10mM MgSO<sub>4</sub> y 0.2% (p/v) de maltosa y se crece a una temperatura de 37°C con agitación de 200 rpm por 4 a 6 h.
3. El crecimiento no deberá de sobrepasar una OD<sub>600</sub> de 1.0.
4. Obtenido el crecimiento adecuado se centrifugó a 2750 rpm durante 10 min desechando posteriormente el sobrenadante.
5. Cuidadosamente se resuspenden las células en la mitad del volumen original con MgSO<sub>4</sub> 10 mM estéril.
6. Las células son diluidas, de tal forma que se obtenga una OD<sub>600</sub> de crecimiento de 0.5 en un tubo de microcentrífuga y se incuban a temperatura ambiente por 30 min.
7. Se preparan diluciones 1:10 y 1:50 de la reacción de empaquetamiento en amortiguador SM.
8. Mezclar 25 µL de cada dilución con 25 µL de las bacterias apropiadas a una OD<sub>600</sub> de 0.5 en un tubo de microcentrífuga e incubarlas a temperatura ambiente por 30 min.
9. Posteriormente para que la cepa expresara la resistencia se agregó 200 µL de medio LB a cada muestra y se incubó por 1 h a 37°C, el tubo se mezcló suavemente una vez cada 15 min.
10. Centrifugar en un tubo de microcentrífuga por 1 min, retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 50 µL de medio LB.
11. Usando una L de vidrio estéril, esparcir las células en placas con medio (LB + Amp) selectivo incubándolas toda la noche a 37°C.

### **9.3) Control positivo wild type lambda DNA del Gigapack III.**

1. Se descongela el DNA control, ya descongelado éste se mezcla cuidadosamente, se toma 1  $\mu\text{l}$  ( $\sim 0.2 \mu\text{g}$ ) y se procede siguiendo la metodología del Apéndice 9.1, pero la reacción se detiene con 1 ml de amortiguador SM.
2. Se prepararon 2 diluciones consecutivas,  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  de la reacción de empaquetamiento en amortiguador SM.
3. 10  $\mu\text{l}$  de la dilución  $10^{-4}$  se mezclan con 200  $\mu\text{L}$  de la cepa huésped y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por 15 min.
4. A la mezcla se agregaron 3 mL de LB top agar, el cual debe de estar a una temperatura aproximada de  $48^{\circ}\text{C}$  y rápidamente se vació en cajas de medio LB precalentado.
5. Las cajas se incubaron alrededor de 12 h a  $37^{\circ}\text{C}$ .
6. Para medir la eficiencia se contaron el número de placas de lisis.
7. Aproximadamente 400 placas de lisis pueden ser obtenidas de la dilución  $10^{-4}$  cuando la reacción se detiene con 1 mL de amortiguador SM.

### **Apéndice 10. Elaboración sondas con los genes de interés.**

1. Se utiliza aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  de DNA templado y se le agrega agua grado milli-Q estéril hasta un volumen final de 16  $\mu\text{L}$ .
2. El DNA se desnaturalizó calentándolo en un baño de agua a ebullición por 10 min y rápidamente se enfría en agua con hielo.
3. Mezclando el stock del marcador (DIG-High Prime) se agregan 4  $\mu\text{L}$  de este al DNA desnaturalizado.
4. Mezclarlo y centrifugarlo brevemente.
5. Incubarlo toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$
6. La reacción se detuvo calentando el tubo a  $65^{\circ}\text{C}$  por 10 min.

## **Apéndice 11. *Desnaturalización en placa de las clonas recombinantes.***

1. Las placas donde se encuentran contenidas las clonas recombinantes se enfriaron durante 30 min a 8°C.
2. Con una pinza previamente esterilizada se tomó una membrana (Hybond Blotting paper) centrándola e inclinándola de modo tal que cubriera todas las clonas.
3. Una vez cubiertas, permitir que la membrana tenga contacto con la superficie de las clonas aproximadamente 20 min.
4. Se marca la posición del disco sobre la caja petri para obtener una correcta orientación de las colonias para su subsecuente manipulación.
5. Se despega la membrana del agar y se coloca en amortiguador de desnaturalización durante 5 min.
6. Posteriormente se colocan las membrana en amortiguador de neutralización durante 3 min haciendo este paso por duplicado.
7. Las membranas se lavaron vigorosamente en SSC 2X (Nucleic acid transfer amortiguador) hasta remover los residuos de proteína.
8. Ya eliminados los residuos se removieron las membranas y se pusieron a secar a 37 °C.
9. Para fijar el DNA a la membrana esta se expuso a una temperatura de 80°C por 2 h.

## **Apéndice 12. *Hibridación y detección inmunológica.***

### **12.1) *Hibridación.***

1. Precalentar las membranas y agregar 5.5 µL de DIG Easy Hyb a 37°C.
2. Se prehibridizaron las membranas por 30 min. con agitación suave en tubos de reacción.
3. La sonda se desnaturalizó a ebullición por 5 min. e inmediatamente se dejó enfriar en agua con hielo.

4. Ya desnaturizada se agregó la sonda a 3 mL de DIG Easy Hyb mezclándolo bien, evitando la formación de burbujas.
5. Se incubó a 37 °C la mezcla por 4 h. con suave agitación.

### ***12.2) Detección inmunológica.***

Todas las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C con agitación suave.

1. En los tubos de reacción se enjuagaron cuidadosamente las membranas por 5 min. en amortiguador de lavado.
2. Después se incubaron por 30 min en 100 mL de solución bloqueadora.
3. Posteriormente se incuban por 30 min en 20 mL de la solución de anticuerpos (75 mU/mL).
4. Lavar 2 veces durante 15 min en 100 mL de amortiguador de lavado.
5. Equilibrar por 5 min en 20 mL de amortiguador de detección.
6. Las membrana se colocaron de modo que el lado que contenía el DNA quedara viendo hacia arriba sobre un acetato, se le aplicó en el contorno de las membranas 1 mL de CSPD (sustrato). Inmediatamente estas se cubrieron con un segundo acetato para esparcir el sustrato por toda la membrana cuidando que no se formaran burbujas.
7. Las hojas de acetato se fijaron a una película radiográfica (Medical X-ray General Purpose Blue).
8. Se incubó y reveló la película radiográfica en un cassette de exposición durante 24 h.
9. Para revelar la película radiográfica se utilizó solución reveladora exponiéndose por 1 minuto y posteriormente en una solución de exposición durante 1 minuto.
10. El paso 7,8 y 9 se lleva a cabo en cuarto oscuro.

11. Ya revelada; se observaron las colonias positivas para cada sonda y posteriormente se traslapan con las colonias de las placas para su localización.

## REFERENCIAS

1. Alberts, B, Bray, D, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K y Watson, JD. (1994). Manipulating proteins, DNA and RNA. En: *Molecular Biology of the Cell*. 3ª ed. Garland Publishing. New York, USA.
2. Angell, S, Schwartz, E y Bibb, MJ. (1992). The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A(3): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol. Microbiol.* 6: 2833-2844.
3. Arcamone, F, Cassinelli, G, Fantini, G, Grein, A, Orezzi, P, Pol, C y Spalla, C. (1969). Adriamicyn, 14-Hidroxydaunomicin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.* 6: 1101-1110.
4. Bentley, SD y col. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete "*Streptomyces coelicolor*". *Nature.* 417: 141-147.
5. Chater, KF y Hopwood, DA. (1989). Antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*, En: *Genetics of bacterial diversity*. Academic Press, London, England.
6. Cox, KL y Baltz, LR. (1984). Restriction of bacteriophage plaque formation in *Streptomyces spp.* *J. Bacteriol.* 159(2): 499-504.
7. Crandall, LW y Hamill, RL. (1986). Antibiotics produced by *Streptomyces*: Major structural classes. En: *Antibiotic-producing Streptomyces, The Bacteria. Volume IX*. Queener, SW y Day LE. (eds.). Academic Press. New York, USA.
8. Demain, AL. (1976). Genetic regulation of fermentation organism. *Stadler Genetics Symposium*. University of Missouri-Columbia. 8:41-45.
9. Demain, AL, Aharonowitz, Y y Martin, JF. (1983). Metabolic control of secondary biosynthetic pathways in: *Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important Antibiotics*. Vining L. (Ed). Addison-Wesley Publishing Co. Reading. MA, USA.
10. Demain, AL. (2000). Microbial biotechnology. *Trends Biotechnology.* 18: 26-31.

11. Demain, AL. (2001). Molecular genetics and industrial microbiology-30 years of marriage. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27(6): 352-356.
12. Demain, AL. (2006). From natural products discovery to commercialization: a success story. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33: 486-495.
13. Demain, AL, y Adrio, JL. (2008). Contributions of microorganisms to industrial biology. *Mol. Biotechnol.* 38(1): 41-55.
14. Escalante, L, Ramos, I, Imriskova, I, Langley, E y Sánchez, S. (1999). Glucosa repression of anthracycline formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius* . *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:572-578.
15. Fernandez-Moreno, MA, Martin-Triana, AJ, Martínez, E, Niemi, J, Kieser, HM, Hopwood, DA y Malapartida, F. (1992). *abaA*, a new pleiotropic regulatory locus for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 174:2958-2967.
16. Frost, MG y Moss, DA. (1987). Production of enzymes by fermentations. En *Biotechnology* Rehm, HJ y Reed, G y Kennedy JF. Vol. 7a. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, Germany.
17. Glick, BR y Pasternak, JJ. (1994). *Molecular Biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA*. ASM Press. Washington, USA.
18. Grein, A. (1987). Antitumor Anthracyclines produced by *Streptomyces peucetius*. En: *Advances in Applied Microbiology* Vol. 32. Academic Press Inc. Milan, Italy.
19. Griffiths, AJF, Gelbart, WM, Miller, JH y Lewontin, RC. (2000). The Genetics of Bacteria and Phages, Recombinant DNA Technology y Applications of Recombinant DNA Technology, En: *Modern Genetic Analysis*. 2ª Ed. Freeman WH y Co. Interamericana, España.
20. Guzman, S, Carmona, A, Escalante, L, Imriskova, I, Lopez, R, Rodriguez-Sanoja, R, Ruiz, B, Servín-Gonzales L, Sánchez, S, Langley, E. (2005). Pleiotropic effect of the SCO2127 gene on the glucose uptake, glucose kinase activity and carbon catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Microbiol.* 151: 1717-1723.

21. Heldt, HW. (1997). Natural Products (Secondary Metabolites). En: *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press. New York, USA.
22. Hindle, Z y Smith, CP. (1994). Substrate induction and catabolite repression of the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon are mediated through the GylR protein. *Mol. Microbiol.* 12: 737-745.
23. Hobbs, G, Obanye, AI, Petty, J, Mason, JC, Barratt, E, Gardner, DC, Flett, F, Smith, CP, Broda, P y Oliver, SG. (1992). An integrated approach to studying regulation of production of the antibiotic methylenomycin by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J. Bacteriol.* 174 (5):1487-1494.
24. Hohn, B. (1996). Metodología adaptada para el empaquetamiento  $\lambda$ DNA *in Vitro*. Código N.334 Batch 157.
25. Hopwood, DA, Bibb, MJ, Chater, KF, Kieser, T, Bruton, CJ, Kieser, HM, Lydiate, DJ, Smith, CP, Ward, JM y Scherempff, H. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory manual. John Innes Foundation. Norwich, England.
26. Hopwood, DA. (1988). Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis sporulation and antibiotic production. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 235:121-138.
27. Hopwood, DA, Kieser, T, Bibb, JM, Buttner, MJ y Chater, FK. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics. The John Innes Foundation. Norwich, England.
28. Ikeda, H, Ishikawa, J, Hanamoto, A, Shinose, M, Kikuchi, H, Shiba, T, Sakaki, Y, Hattori, M y Omura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* 21: 526-531.
29. Jiang, H y Hutchinson, CR. (2006). Feedback regulation of doxorubicin biosynthesis in *Streptomyces peucetius*. *Res. Microbiol.* 157: 666-674.
30. Kieser, HM, Kieser, TT y Hopwood, DA. (1992). A combined genetic and physical map of the chromosome of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J. Bacteriol.* 174: 5496-5507.



31. Kieser, T, Bibb, M, Buttner, M, Chater, K y Hopwood, D. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics. The John Innes-Foundation. Norwich, England.
32. Leblond, P, Demuyter, P, Simonet, JM y Decaris, B. (1991). Genetic instability and associated genome plasticity in *Streptomyces ambofaciens*: pulsed-field gel electrophoresis evidence for large DNA alterations in a limited genomic region. J. Bacteriol. 173: 4229-4233.
33. Leblond, P, Redenbach, M y Cullum, J. (1993). Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3 (2). J. Bacteriol. 175: 3422-3429.
34. Lezhava, AL, Mizukami, T, Kajitani, T, Kameoka, D, Redenbach, M, Shinkawa, H, Nimi, O y Kinashi, H. (1995). Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. J. Bacteriol. 177: 6492-6498.
35. Lin, YS, Kieser, HM, Hopwood, DA y Chen, CW. (1993). The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. Mol. Microbiol. 10: 923-933.
36. Lomovskaya, N, Otten, LS, Doi-Katayama, Y, Fostein, L, Liu, X, Takatsu, T, Inventi-Solari, A, Filippini, S, Torti, F, Colombo, AL y Hutchinson, CR. (1999). Doxorubicin overproduction in *Streptomyces peucetius*: cloning and characterization of the *dnrU* ketoreductase and *dnrV* genes and the *doxA* cytochrome P-450 hydroxylase gene. J. Bacteriol. 181: 305-308.
37. Maggon, K. (2005). Best-selling human medicines 2002-2004. Drug Discov. Today 10 (11): 739-742.
38. Musialowski, MS, Flett, F, Scott, GB, Hobbs, G, Smith, CP, Oliver, SG. (1994). Functional evidence that the principal DNA replication origin of the *S. coelicolor* chromosome is close to the *dnaA-gyrB* region. J. Bacteriol. 176:5123-5125.
39. Ohnishi, Y, Ishikawa, J, Hara, H, Suzuki, H, Ikenoya, M, Ikeda, H, Yamashita, A, Hattori, M, Horinouchi, S. (2008). Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. J. Bacteriol. 190(11):4050-60.

40. Parekh, S, Vinci, VA y Strobel, RJ. (2000). Improvement of microbial strain and fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54 (3): 287-301.
41. Patwardhan, B, Pushpangadan, P y Bhatt N. (2005). Ayurveda and traditional Chinese Medicine: A comparative Overview. *eCAM.* 2: 465-473.
42. Redenbach, M, Kieser, HM, Denapaite, D, Eichner, A, Cullum, J, Kinashi, H y Hopwood, DA. (1996). A set ordered cosmids and a details genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3 (2) chromosome. *Mol. Microbiol.* 21: 77-96.
43. Roche applied science. (2004). DIG DNA Labeling Kit Instruction manual. Penzberg, Germany.
44. Rose, AH. (1979). Production and Industrial importance of secondary products of metabolism. En: *Economic Microbiology Vol. 3 Secondary products of metabolism.* Ed. Rose AH. Academic Press. New York. USA. pp. 1-33.
45. Sambrook, J y Russell, D. (2000). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. New York, USA.
46. Segura, D, Gonzales, R, Rodriguez, R, Sandoval, T, Escalante, L y Sanchez, S. (1996). *Streptomyces* mutants insensitive to glucose repression showed deregulation of primary and secondary metabolism. *Asia-Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 4:30-36.
47. Stratagene. (2003). Gigapack®III Gold Packaging Extract, Gigapack® III Plus Packaging Extract, and Gigapack®III XL Packaging Extract Instruction manual. California, USA.
48. Stratagene. (2005). SuperCos 1 Cosmid vector kit Instruction manual. California, USA.
49. Titgemeyer, F, Walkenhorst, J, Reizer, J, Stuver, MH, Cui, X, y Saier, MH, Jr. (1995). Identification and characterization of phosphoenolpyruvate: fructose phosphotransferase system in three *Streptomyces* species. *Microbiol.* 141: 51-58.
50. Vining, LC. (1990). Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity- A review. *Gene* 115:135-140.

51. Weber, T, Welzel, K, Pelzer, S, Vente, A, Wohlleben, W. (2003). Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. *J. Biotechnol.* 106 (2): 221-232.
52. Zilsel, J, Ma, PH y Beatty, JT. (1992). Derivation of a mathematical expression useful for the construction of complete genomic libraries. *Gene.* 120: 89-92.
53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
54. <http://streptomyces.org.uk/>