

80
Rej.



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACION DE PLASMIDOS EN LA
BACTERIA XANTHOMONAS SP.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A

LETICIA GONZALEZ GARFIAS

MEXICO, D. F.

1987



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 está 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.

ÍNDICE

. ÍNDICE.....	1
. RESUMEN.....	11
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. GENERALIDADES.....	3
1. Residuos Lignocelulósicos.	
2. Cultivo Mito.	
3. Sistema Enzimático Celulolítico.	
4. Mejoramiento Genético del Cultivo Mito.	
III. OBJETIVOS.....	18
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
V. RESULTADOS.....	42
VI. DISCUSIÓN.....	51
VII. CONCLUSIONES.....	60
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	61

RESUMEN

El cultivo mixto bacteriano integrado por Cellulomonas flavigena y Xanthomonas sp tiene capacidad de degradar el bagazo de caña de azúcar y utilizarlo como única fuente de carbono y energía para la producción de proteína unicelular. En el cultivo, C. flavigena tiene actividad celulolítica, pero su sistema enzimático está regulado metabólicamente, siendo ésto una limitante para aumentar la productividad de proteína unicelular. Estudios previos han demostrado que al adicionar celulasas al medio de cultivo la producción de biomasa aumenta de 1.25 g/l a 3.25 g/l por lo que un incremento en la síntesis de celulasas daría como resultado un aumento en la producción de proteína unicelular.

El trabajo aquí reportado es parte de un proyecto cuyo objetivo es: aumentar la tasa de crecimiento del cultivo mixto mediante la sobreproducción de celulasas por medio de la clonación molecular y la expresión de los genes que codifican para estas enzimas en cualquiera de las dos cepas bacterianas.

El objetivo del presente trabajo fue la identificación de plásmidos en Xanthomonas sp con el fin de posteriormente, construir un vehículo de clonación molecular para los genes que codifican para la síntesis

de las celulasas de C. flavigena. Se utilizaron distintas técnicas para la identificación de plásmidos: lisis alcalina (6), lisis "in situ" (18), técnica de Kado y Liu (25), de Maniatis (31), extracciones rápidas de plásmidos (3,24) y de DNA total (2,43).

Estas técnicas fueron desarrolladas por primera vez en el laboratorio y se adaptaron para trabajar con Xanthomonas sp; el método más apropiado para la extracción de su DNA resultó ser el de Silhavy, 1984 (43). Se concluye que con las técnicas utilizadas no se tiene evidencia experimental de la presencia de plásmidos en Xanthomonas sp.

IDENTIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS EN LA BACTERIA Xanthomonas sp.

I INTRODUCCIÓN

El crecimiento demográfico del país ha traído como consecuencia una demanda cada vez mayor de proteínas tanto para la alimentación animal como para la humana, esto ha llevado a que la investigación se enfoque a satisfacer estos requerimientos.

Las fuentes convencionales de proteína para la alimentación de los animales y del hombre han sido los vegetales y los animales. En estudios recientes se ha hecho factible la utilización de las fuentes no convencionales de proteína, como ejemplo las de origen microbiano (bacterias, hongos, algas) llamadas proteína unicelular (PUC), que son nutricionalmente adecuadas comparándose con las proteínas provenientes de fuentes convencionales. Esta fuente de proteína se emplearía en la elaboración de alimentos balanceados sustituyendo parcialmente a otros materiales, siendo sus aplicaciones variadas: alimento en forma líquida, emulsionada, semisólida, sólida, para consumo humano o en forrajes. El producto crudo es casi insípido de manera que con ciertos aditivos se le da un sabor específico.

Actualmente muchas de estas proteínas se destinan al

consumo animal ya que su empleo en la alimentación humana aun no ha sido probado por falta, principalmente, de estudios toxicológicos. Sin embargo, utilizando proteína unicelular en la alimentación del ganado se podrían liberar una gran cantidad de granos que se emplearían en la dieta del hombre y como consecuencia los costos de producción ganadera se reducirían notablemente; además de que no se descarta su empleo futuro por el hombre.

Se ha visto que algunos microorganismos son una fuente de proteína muy importante, pueden utilizar sustratos muy baratos y abundantes, como lo son los residuos agrícolas e industriales en nuestro país, que en muchos de los casos no tienen un uso específico y que en un momento dado podrían causar problemas de contaminación al acumularse en el ambiente.

El uso de estos microorganismos como fuente de proteína no convencional tiene ventajas: como es el corto tiempo de duplicación, alta producción en espacios pequeños, control de sus condiciones de crecimiento y son susceptibles a mejoras genéticas.

En el departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV se realizan estudios para la producción de proteína unicelular a partir de bagazo de caña utilizando un cultivo mixto bacteriano integrado por Cellulomonas flavigena y Xanthomonas sp. Se tiene por objetivo el mejoramiento genético de este cultivo para una mayor producción de proteína unicelular.

II GENERALIDADES

RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Algunos microorganismos son una fuente importante de proteína unicelular (23,30) entre los sustratos utilizables por estos microorganismos está la celulosa, que es una fuente de carbono renovable disponible en grandes cantidades en la tierra (42). La celulosa es un polisacárido estructural y constituyente de la pared celular de las células vegetales, por tanto se encuentra en abundancia en residuos agrícolas como el bagazo de caña de azúcar, bagazo de piña, paja de cebada, trigo, etc.

La celulosa es un polímero lineal de la D-glucosa que posee enlaces glucosídicos $\beta(1-4)$ y por su configuración β todas las uniones hidroxilo están en el mismo plano. Por tanto en una microfibrilla de celulosa, donde las cadenas están ordenadas, se forman puentes de hidrógeno, dando lugar a una configuración cristalina (28), esto le da propiedades como insolubilidad, fuerza de tensión y resistencia a enzimas y a agentes químicos. Cuando las cadenas están menos ordenadas la celulosa es amorfa, se hidrata más rápido y es más accesible a las

enzimas (42).

La celulosa se encuentra, naturalmente, asociada con hemicelulosa y lignina (12). La lignina es un compuesto heterogéneo de polifenoles que es difícil de degradar y por su asociación con la celulosa impide el acceso de las celulasas a el polisacárido, es por esto que es necesario llevar a cabo un pretratamiento que permita dejar a la celulosa accesible al ataque de las enzimas; este pretratamiento puede ser alcalino utilizando hidróxido de sodio (34,45). La hemicelulosa es un polímero de pentosas (D-xilenos) que tiene enlaces $\beta(1-4)$ y con cadenas de arabinosa y otros azúcares.

CULTIVO MIXTO

En estudios de biodegradación de materiales celulósicos se encontró que el cultivo mixto bacteriano integrado por Cellulomonas flavigena y Xanthomonas sp. tiene capacidad de degradar diferentes tipos de desechos agrícolas y utilizarlos como única fuente de carbono y energía para la producción de biomasa principalmente (14,16).

Cada uno de los géneros que constituye este cultivo mixto requiere, por separado, de algunos factores de crecimiento. Cellulomonas flavigena necesita de tiamina y biotina, mientras que Xanthomonas sp. requiere de

factores complejos y usualmente incluye metionina, ácido glutámico y ácido nicotínico en distintas combinaciones. En el cultivo mixto se satisfacen en forma natural estos requerimientos, ya que ambas especies se proveen los factores necesarios (15).

El género Xanthomonas es una bacteria que se distingue morfológicamente por las siguientes características (5): es alargada, presenta un flagelo polar, es aerobia, su tinción Gram es negativa y sus colonias presentan un color amarillo. C. flavigena es circular, anaerobia facultativa, no presenta flagelos y sus colonias son de color marfil (3).

Dentro del cultivo, la bacteria con actividad celulolítica es Cellulomonas flavigena (15,33), así, este microorganismo le proporciona azúcares solubles y factores de crecimiento a Xanthomonas sp y ésta a su vez proporciona las vitaminas o sus precursores a C. flavigena estableciéndose entre ambas bacterias una relación mutualística (41), además de una competencia por los azúcares solubles provenientes de la hidrólisis enzimática de la celulosa.

En el cultivo mixto, C. flavigena con su actividad celulolítica, proporciona una manera de convertir desechos celulósicos a proteína unicelular con alto valor nutricional (14).

SISTEMA CELULOLÍTICO

El sistema celulolítico de Cellulomonas está compuesto por un complejo enzimático que incluye al menos, endo $\beta(1-4)$ glucanasas, exo $\beta(1-4)$ glucanasas y β -glucosidasas (4,27,46). Las endo $\beta(1-4)$ glucanasas son celulasas que hidrolizan las cadenas de la celulosa de manera azarosa dando como resultado una reducción en el grado de polimerización de la cadena, junto con un incremento lento en los grupos reducidos; el producto final es una mezcla de glucosa y celobiosa. Las exo $\beta(1-4)$ glucanasas o celobiohidrolasas son celulasas que remueven unidades de glucosa o celobiosa de extremos no reductores de la cadena de celulosa resultando en un incremento rápido en los grupos reducidos. La celobiasa o β -glucosidasa actúa en β -glucósidos dando como producto glucosa (4,12,27). Estas enzimas deben actuar sinérgicamente para una hidrólisis completa de la celulosa a glucosa.

Un modelo que explica el modo en que se lleva a cabo esta hidrólisis es el propuesto por Monteneccourt (12): Las endoglucanasas atacan azarosamente la molécula de celulosa y las exoglucanasas remueven unidades de celobiosa de los extremos no reductores recién formados. Estas dos enzimas actúan sinérgicamente y degradan la celulosa cristalina; por último los oligosacáridos pequeños y celobiosas son hidrolizados a glucosa por la

MODO DE ACCION DE LAS ENZIMAS CELULOLITICAS

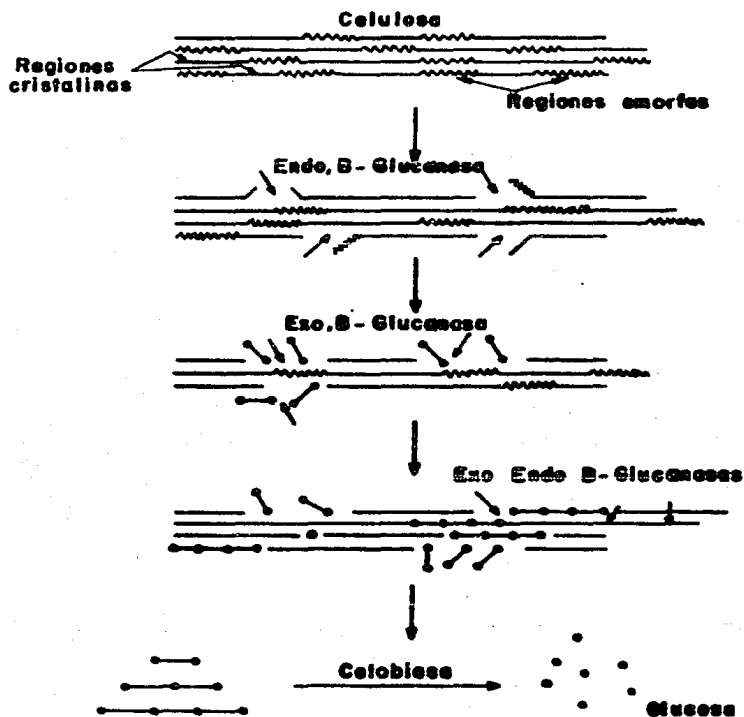


Fig. 1 Representación esquemática de la acción de las enzimas celulolíticas. (Montencourt 1979)

acción de la celobiasa. (figura 1).

El sistema enzimático celulolítico es inducible. La celulosa es el mejor inductor conocido y entre otros inductores están la soforosa y lactosa (36,42).

Estas enzimas celulolíticas son reprimidas con la adición de glucosa; es decir presentan represión por catabolito o efecto de glucosa (37,42).

Ponce N. (41) reporta que al adicionar celulasas al cultivo mixto, crecido en un sistema continuo, con sales minerales y bagazo de caña, la concentración de biomasa aumenta de 1.5g/l a 3.25g/l, es decir 1.75g/l más que sin la adición de celulasas, suponiéndose así que la velocidad de hidrólisis de bagazo de caña se incrementa.

Con lo anteriormente mencionado se sugiere que un incremento en la producción de celulasas dará como resultado un aumento en la tasa específica de crecimiento del cultivo y por tanto una mayor productividad y rendimiento en la obtención de proteína unicelular.

MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL CULTIVO MIXTO

Para incrementar la producción de celulasas del cultivo mixto se tienen dos estrategias: obtención de mutantes hiperproductoras de celulasas y clonación de los

genes que codifican para estas enzimas (19,20,48), utilizando técnicas de ingeniería genética. La ingeniería genética comprende una serie de técnicas por medio de las cuales se puede manipular el DNA de un organismo "in vitro" (40).

Así, con la ingeniería genética el DNA de un organismo puede ser cortado en fragmentos y estos pueden ser unidos nuevamente; pueden ligarse dos o más fragmentos de distinta procedencia como el proveniente de una bacteria con otra distinta, o con un virus, o plantas, (21,40); formándose entonces el DNA recombinante.

De manera general la clonación molecular involucra el uso de enzimas de restricción que cortan en sitios específicos al DNA de interés, las DNA ligasas que unen cadenas de DNA de cualquier procedencia al DNA de vehículos de clonación, dando una molécula de DNA recombinante que por transformación o transducción genética se introduce a una bacteria; luego por división celular se transmite a las células hijas, obteniéndose así gran cantidad del fragmento de DNA específico unido al DNA del vector. Entonces empleando un DNA recombinante adecuado se puede lograr que la bacteria produzca o aumente la producción de proteínas de nuestro interés, que en este caso son las celulasas.

A) Vehículos de clonación

De la metodología del DNA recombinante se desprende que uno de los componentes básicos es el vehículo de clonación, el cual debe permitir la replicación estable del fragmento de DNA insertado, de otra manera, este fragmento introducido en la célula receptora normalmente sería degradado en el citoplasma de la misma (33).

Dentro de los vehículos de clonación utilizados se encuentran los plásmidos, fagos y cósmidos.

a) En 1974 se demostró la factibilidad de utilizar al bacteriófago lambda como vehículo de clonación molecular (29). El bacteriófago lambda es un virus de DNA lineal, de doble cadena con extremos de 12 nucleótidos de cadena sencilla y complementarios (secuencias cos).

Los fagos pueden ser utilizados como vectores de inserción, estos tienen un sólo sitio en donde el DNA a clonar puede ser insertado; o como vectores de sustitución en donde se tienen 2 sitios de reconocimiento para una enzima de restricción, en la región no esencial del genoma, y puede ser reemplazada por el DNA a clonar. Los fagos de sustitución pueden aceptar fragmentos de DNA más grandes y son útiles para clonar segmentos del DNA cromosómico de eucariontes.

b) Los cósmidos fueron desarrollados por Collins y Hohn en 1978 (11); son vectores híbridos formados por secuencias de plásmidos pero conteniendo los sitios cos

del fago lambda. Presentan como características: un marcador con resistencia a algún antibiótico y el origen de replicación de un plásmido; uno o dos sitios únicos de restricción; un fragmento de DNA que lleve los extremos cohesivos (cos) del bacteriófago lambda y un tamaño pequeño.

c) Los plásmidos son moléculas circulares de DNA de doble cadena, extracromosómicos que se multiplican independientemente en las células que los alojan y controlan autónomamente su número de copias (9,39).

Los plásmidos constituyen del 1 al 30% del genoma celular y no son esenciales para el metabolismo usual de la célula (39). Su información hereditaria determina rasgos genéticos accesorios, pero importantes que no son codificados por el cromosoma del microorganismo. Algunos plásmidos portan información para la conjugación bacteriana, también tienen información para la resistencia a antibióticos y tóxicos, así como la información genética que produce varias enfermedades en plantas y animales.

Los plásmidos pueden adquirir nuevos genes y reorganizar extensamente los que ya poseen y mantener una información genética que puede ayudar a otras necesidades de la célula sin comprometer la eficacia de su propia replicación (9,35,39).

El tamaño de los plásmidos varía de 5×10^6 daltons a órdenes de 10^8 daltons. Los plásmidos pequeños pueden

mantenerse hasta en 20 copias por célula aproximadamente, y los grandes con 1 o 2 copias.

Los plásmidos presentan incompatibilidad (38) es decir, dos o más plásmidos con las mismas funciones de replicación son incompatibles y ambos no pueden mantenerse establemente en la célula huésped. Cuando dos plásmidos isogénicos se introducen en una misma célula uno de ellos se pierde por ser incompatible. Esta incompatibilidad resulta de una relación muy estrecha de los mecanismos por los cuales regulan su número de copias por célula; así en una célula con plásmidos incompatibles la replicación es bloqueada (9,38). En contraste, los plásmidos no relacionados son compatibles porque sus sistemas de replicación son diferentes y no interactúan.

Las características principales de los plásmidos son (26):

- i) El control de su replicación, lo cual mantiene su número fijo de un ciclo a otro de división celular.
- ii) La capacidad de algunos plásmidos sexuales y de resistencia de transferirse a otras células mediante transducción por virus o mediante apareamiento a través de los pili (conjugación).
- iii) La capacidad de algunos plásmidos, llamados episomas, de integrarse al cromosoma del huésped.
- iv) La capacidad de transferirse, por conjugación, del cromosoma del huésped después de integrarse a él.
- v) La variedad de productos génicos de los plásmidos que

confieren rasgos característicos a las células que los poseen como son (13,22):

- . Resistencia a antibióticos: cloranfenicol, kanamicina, tetraciclina, sulfamidas, ampicilina, etc.
- . Resistencia a metales pesados: cromo, zinc, plomo, cadmio, plata, iones arsenito y arseniato.
- . Producción de antibióticos.
- . Producción de hemolisinas.
- . Degradación de compuestos orgánicos complejos: tolueno, xileno, naftaleno, DDT.
- . Fermentación de algunos azúcares.
- . Producción de enterotoxinas.
- . Inducción de tumores y nódulos en plantas.

Extracción de plásmidos:

El DNA de plásmidos es un DNA circular, cerrado covalentemente (ccc) lo que lo hace más resistente a condiciones de desnaturalización que el DNA lineal (25) y es por esto que existen diversos métodos para su aislamiento tales como, extracciones alcalinas (6), lisis por calentamiento (24) y otros.

En general, para la extracción de plásmidos las células son tratadas con lisozima en una solución isotónica amortiguadora. Después se les aplica un tratamiento con detergente (SDS, Sarkosyl, Tritón), para llevar a cabo una lisis celular completa. Las condiciones

bajo las cuales se lleva a cabo esta extracción deben ser de tal manera que el DNA cromosómico de la bacteria y otros restos celulares precipiten al ser centrifugados y el DNA del plásmido quede en solución (6).

En algunas técnicas (3) se utiliza un gradiente isopícnico de Cloruro de Cesio con bromuro de etidio para separar las distintas especies de DNA. El bromuro de etidio es una molécula plana intercalante del DNA: En el DNA circular cerrado se intercala en menor cantidad que en el DNA lineal, lo que da como resultado una diferente densidad para cada tipo de DNA. Al someter el DNA a un gradiente isopícnico de CsCl con bromuro de etidio el complejo de DNA-colorante migra de acuerdo a su densidad, así el DNA ccc tiene una mayor densidad que el DNA lineal y pueden ser separados.

En las técnicas, a continuación descritas, se han utilizado distintas especies de bacterias y los plásmidos encontrados varían en tamaño:

Kado y cols. en 1981 (25) emplearon un método que utiliza las características de círculo cerrado covalentemente de DNA de un plásmido, que es liberado de la célula bajo condiciones de desnaturalización del DNA cromosómico utilizando SDS a pH de 12.6 y una temperatura elevada. Las proteínas y restos celulares son removidos con extracciones de fenol-cloroformo. Bajo estas condiciones el DNA cromosómico residual puede observarse como una banda que migra entre 17 y 20 megadaltons en gel

de agarosa. Los plásmidos encontrados con esta técnica varían en tamaño de 2.6 a 350 megadaltons; en diferentes especies de bacterias.

Eckhardt en 1978 (18) reportó la presencia de plásmidos, de diferentes especies de bacterias, en un intervalo de tamaño de 2 a más de 150 megadaltons. La técnica que utilizó consistió en una lisis celular completa con un mínimo de manipulación del DNA. La lisis se llevó a cabo directamente en los pozos del gel de agarosa; así el DNA cromosómico y el del plásmido son separados por electroforesis. Con las condiciones utilizadas menos del 0.5 % del DNA cromosómico total migra dentro del gel como una banda lineal de DNA en un intervalo de 15 a 20 megadaltons de peso molecular.

Tadahiro Oshida en 1986 (44) utilizó la técnica de lisis alcalina y lisado claro, seguido de electroforesis en un gel de agarosa, para la identificación de plásmidos en Micromonospora ziomensis y M. rosaria. Reporta la presencia de tres plásmidos con su respectivo patrón de restricción: el pMZ1 de 9.9 Kb, pMR1 de 53.5 Kb y pMR2 de 110 Kb.

Dobritsa en 1985 (17) aisló el plásmido R15 de 62.3 Kb con la técnica de Eckhardt y obtuvo pequeñas cantidades del plásmido con las técnicas de Birnboim - Doly y Holmes - Quigley.

Casse en 1979 (10) aisló DNA ccc de alto peso molecular de 22 cepas de Rhizobium meliloti utilizando

una solución amortiguadora de lisis (SDS a pH de 12.6) seguido de electroforesis en un gel de agarosa. Los plásmidos que encontró tienen un peso molecular dentro de un intervalo de 90 a 200 megadaltons.

Mevers en 1977 (32) reportó la electroforesis en gel de agarosa como un método efectivo para la caracterización de plásmidos en cepas de microorganismos Gram (-). Este método es comparable con los resultados obtenidos con microscopía electrónica de plásmidos purificados en gradientes de densidad. El DNA cromosómico está presente en las preparaciones, pero generalmente aparece como una banda de menor peso molecular que la del DNA ccc. El cromosoma no interfiere con la detección de plásmidos. Este método es bueno para detectar y estimar plásmidos en un intervalo de 0.6 a 95 megadaltons.

Para el género Xanthomonas se reporta (25) la presencia de plásmidos en las especies: X. pruni de 26 megadaltons; X. vitians de 43 megadaltons y en X. manihotis un plásmido críptico del cual no se mencionan más datos.

B) Enzimas de restricción

Una herramienta indispensable en la clonación molecular son las enzimas de restricción. Estas enzimas

son importantes en el mapeo y análisis de secuencias del DNA (47).

Las bacterias poseen cierta inmunidad frente al DNA extraño; ciertos mecanismos enzimáticos modifican el DNA propio de la célula de una manera característica y degradan o restringen las moléculas de DNA que no se ajustan al modelo distintivo de modificación; este es el sistema de modificación-restricción de la bacteria (8) y tiene 2 características esenciales: a) El DNA que entra en una célula con una especificidad de restricción (rx) es degradado si viene de células que carecen de la correspondiente especificidad de modificación (mx). b) Una célula con especificidad de restricción (rx) tiene también una actividad mx que protege su propio DNA frente a la actividad rx.

Las metilasas de modificación son enzimas que metilan el DNA en sitios específicos, como resultado el DNA esta protegido frente a la ruptura por una endonucleasa de restricción correspondiente que reconoce este sitio sólo cuando no está metilado (26).

Las proteínas que llevan a cabo la restricción se denominan endonucleasas de restricción; y sus propiedades son (8):

- a) Reconocer una secuencia de oligonucleótidos específico en el DNA dúplex.
- b) Hacer cortes en esta secuencia en algunos casos o a cierta distancia de ella en otros, y

son importantes en el mapeo y análisis de secuencias del DNA (47).

Las bacterias poseen cierta inmunidad frente al DNA extraño; ciertos mecanismos enzimáticos modifican el DNA propio de la célula de una manera característica y degradan o restringen las moléculas de DNA que no se ajustan al modelo distintivo de modificación; este es el sistema de modificación-restricción de la bacteria (8) y tiene 2 características esenciales: a) El DNA que entra en una célula con una especificidad de restricción (rx) es degradado si viene de células que carecen de la correspondiente especificidad de modificación (mx). b) Una célula con especificidad de restricción (rx) tiene también una actividad mx que protege su propio DNA frente a la actividad rx.

Las metilasas de modificación son enzimas que metilan el DNA en sitios específicos, como resultado el DNA esta protegido frente a la ruptura por una endonucleasa de restricción correspondiente que reconoce este sitio sólo cuando no está metilado (26).

Las proteínas que llevan a cabo la restricción se denominan endonucleasas de restricción; y sus propiedades son (8):

- a) Reconocer una secuencia de oligonucleótidos específico en el DNA dúplex.
- b) Hacer cortes en esta secuencia en algunos casos o a cierta distancia de ella en otros, y

c) No ser capaz de cortar el DNA si no está el sitio de reconocimiento o bien éste está modificado por metilación en uno o en varios nucleótidos.

Las endonucleasas de restricción pueden agruparse en (26):

i) Enzimas de tipo I.- dependen de S-adenosil metionina, de ATP y de magnesio. Son potentes ATP asas, dependientes de DNA y no producen en el DNA extremos distintivos de ruptura. La enzima reconoce un sitio distintivo sobre el DNA dúplex, se une, y luego la enzima recorre el DNA de un lado a otro haciendo cortes. Dentro de este tipo están Eco k, Eco B, EPI, Hind I.

ii) Enzimas de tipo II.- no requieren de S-adenosil metionina, ni ATP. Solo requieren magnesio. Originan cortes bien definidos en la doble cadena de DNA en un sitio específico. Los cortes son en forma de zig-zag haciendo posible el acoplamiento de los extremos, que se juntan o se recombinan con otros extremos creados por la ruptura de cualquier molécula de DNA con la misma enzima. Ejemplos: Eco RI, Pst I, Hpa I, Hind III, Bgl II...

Las técnicas de DNA recombinante son una herramienta muy útil, no sólo para resolver incógnitas relacionadas con el fenómeno de la vida sino también para conferir a los organismos nuevas propiedades y capacidades teniendo aplicación a nivel de la industria, agricultura, medicina, biotecnología, etc (47).

III. OBJETIVO.

En el cultivo mixto integrado por Cellulomonas flavicena y Xanthomonas sp. se intenta aumentar la tasa de crecimiento específica mediante la sobreproducción de celulasas por medio de la clonación molecular y la expresión de los genes que codifican para las celulasas en ambas bacterias. Para ello es necesario contar con un vehículo de clonación apropiado como puede ser un plásmido de la misma bacteria o utilizando alguno otro que transforme genéticamente a las bacterias.

En este trabajo se investigará sobre la presencia de plásmidos en Xanthomonas sp, con el fin de emplearlo como vehículo de clonación molecular para los genes que codifican las celulasas. Para lograr este objetivo se realizará lo siguiente:

1. Determinar la curva de crecimiento de Xanthomonas sp. en Infusión Cerebro-Corazón (BHI).
2. Determinar las condiciones óptimas de lisis de Xanthomonas sp. para la extracción de DNA.
3. Purificar las diferentes especies de DNA utilizando diversos métodos, para determinar la presencia de DNA extracromosómico.

4. En caso de encontrar un elemento extracromosómico (plásmido) caracterizarlo con enzimas de restricción.

IV MATERIALES Y MÉTODOS.

a) MATERIALES

1. REACTIVOS:

Acetato de sodio CH_3COONa	Sigma
Ácido acético glacial CH_3COOH	Baker
Ácido etilén diaminotetracético.dihidratado (EDTA)	Sigma
Agar bacteriológico	DIFCO
Agarosa tipo I y IV	Sigma
Albúmina sérica de bovino fracc.IX (BSA)	Sigma
Alcohol etílico absoluto $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Baker
Alcohol isoamílico absoluto	Baker
Alcohol isopropílico absoluto	Baker
Bactotripton	DIFCO
B-mercaptoetanol $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	Sigma
Carboximetil-celulosa (CMC)	Sigma
Cloroformo CHCl_3	Baker
Cloruro de Cesio CsCl	BioRad
Cloruro de magnesio $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Baker
Cloruro de potasio KCl	Baker
Cloruro de sodio NaCl	Baker
DNA de lambda digerido con Hind III	Sigma
DNA de salmón	Sigma

Dodecil sulfato de sodio (SDS)	BDH
Fenol C ₆ H ₅ OH	Merck
Ficoll tipo 400	Sigma
Glicerol C ₃ H ₃ (OH) ₃	Baker
Glucosa anhidra C ₆ H ₁₂ O ₆	Baker
Hidróxido de sodio NaOH	Baker
Infusión Cerebro-Corazón (BHI)	BIOXON
Lisozima	Sigma
Proteinasa K tipo XI	Sigma
Ribonucleasa A (RNAasa A) tipo IIA	Sigma
Sarkosyl NR-97	Cyba Geigy
Sepharosa 4B	Pharmacia
Sulfato de magnesio MgSO ₄ .7H ₂ O	Baker
Trizma base	Sigma

COLORANTES

Azul de bromofenol	Sigma
Bromocresol púrpura	Merck
Bromuro de etidio	Sigma
Xileno de Cianol	Sigma

2. Equipo

Agitadora (NBS-G-25)

Balanza analítica (Mettler H20)

Cámaras de electroforesis (horizontal 4.7 x 7.5 cm).

Cámara fotográfica mod. MP-4 (Polaroid)

Centrífuga automática (Sorvall 55-33); rotores GSA, SS-34

Columna de separación de 18 x 1 cm

Espectrofotómetro (Perkin-Elmer 35)

Estufa de vacío (Lab-Line Instruments)

Estufa de incubación (DU-5)

Fuente de poder (CINVESTAV)

Lámpara de luz ultravioleta de onda corta

Microcentrífuga (Eppendorf 5415)

Película fotográfica 55,57 (Polaroid)

Potenciómetro digital (Fisher 525)

Refractómetro

Termoblock (Lab-Line Instruments) Mod. 2099

Transiluminador, luz UV (Ultravioleta Products Inc.)

Ultracentrífuga (Beckman); rotores 50 Ti y 50 vTi

3. Enzimas de Restricción.

NOMBRE	SECUENCIA	SOLUCIÓN AMORTIGUADORA	LAB.
	QUE RECONOCE	DE REACCIÓN	

Eco RI	G↓AATTC	NaCl 50mM Tris HCl 100mM MgCl2 5mM BSA 100 ug/ml	BioLabs
Pst I	CTGCA↓G	NaCl 100mM Tris HCl 10mM pH 7.5 MgCl2 10mM BSA 100 ug/ml	BioLabs
Hind III	A↓TAGCTT	NaCl 50mM Tris HCl 50mM pH 8 MgCl2 10mM BSA 100 ug/ml	BioLabs
Msp I	C↓TCGG	KCl 6mM Tris HCl 10mM pH 7.4 MgCl2 10mM DTT 1mM BSA 100 ug/ml	BioLabs
Hpa II	C↓TCGG	KCl 6mM Tris HCl 10mM pH 7.4 MgCl2 10mM DTT 1mM BSA 100 ug/ml	BioLabs

Bam HI G†GATCC NaCl 150mM CIIGB
Tris HCl 6mM pH 7.9
MgCl2 6mM
BSA 100 ug/ml

Bcl II A†GATCT Tris HCl 100mM pH 8 BRL
MgCl2 5mM
NaCl 60mM

4. MEDIOS.

a) Medio Mineral: NaCl 5.5g, (NH4)2SO4 2.5g, PO4 3.5g, CaCl2 0.1g, MgSO4 0.1g, Carboximetil-celulosa 1%, aforar a un litro con agua de la llave.

b) Medio Luria: Bactotripton 10g, extracto de levadura 2g, NaCl 10g, NaOH al 2% 4.8 ml, aforar a un litro con agua destilada.

c) Medio Infusión Cerebro-Corazón (BHI): 37g de medio por litro de agua destilada.

5. CEPAS BACTERIANAS

Xanthomonas sp. clave ATCC-31920

Cellulomonas flavigena clave CDBB-b-532

Escherichia coli Cepa C600.

Escherichia coli Cepa HB101.

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
a) <u>Xanthomonas</u> sp	Met-, Glu-, Ac. Nicotínico-	(14)
b) <u>C. flavigena</u>	Thy-, Bio-.	(14)
c) <u>E. coli</u> C600	F-, thi-, leuB6-, lacY1, ton A21, sup E44, -	(1)
d) <u>E. coli</u> HB101	F-, rec A13, lac Y1, gal K2, Sm r, sup E44	(7)

c) Esta cepa es también conocida como CR34 y es proveniente de la cepa K12 de E. coli.

alcohol isopropílico 15ml.

TÉCNICA VII: Extracción de DNA para bacterias Gram (-).

(2)

Sol.1. TES: Tris HCl 50mM, NaCl 50mM, EDTA 5mM.

Sol.2. Mezcla lítica: lisozima 1mg, RNAasa A 0.5mg, sacarosa 100mg/ml TES.

TÉCNICA VIII: Extracción de DNA para células bacterianas.

(43)

Sol.1. De lisozima: 10mg/ml de lisozima en 1ml de tris HCl pH 8.

Sol.2. STEP: SDS 0.5%, Tris HCl pH 7.5 50mM, EDTA 0.1M, proteinasa K 1mg/ml; estas concentraciones son calculadas para el volumen total de la muestra.

Sol.3. Fenol. Se utiliza fenol bidestilado. Se funde a temperatura ambiente y luego a 68° C. Se adiciona 8-Hidroxiquinoleina a una concentración final de 0.1%, se agrega un volumen igual de solución amortiguadora de Tris-HCl (pH 8) 1.0 M, se agita y se extrae la fase acuosa. Se adiciona un volumen igual de solución amortiguadora de Tris-HCl (pH 8) 0.1 M; se agita y se vuelve a extraer la fase acuosa; esto se repite tantas veces como sea necesario hasta que el pH de la fase acuosa sea de 7.5. El fenol extraído se guarda con un poco de solución amortiguadora a 4° C.

Sol.4. Cloroformo: se utiliza cloroformo en proporción

d) Esta cepa es un híbrido de E. coli K-12 y E. coli B, es usada comunmente como receptor en transformaciones, es un buen hospedero para plásmidos recombinantes, y es útil para purificación de plásmidos a gran escala.

6. SOLUCIONES PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA.

Las soluciones para la extracción de DNA se esterilizan en autoclave a 15 libras durante 15 minutos, esto es para destruir la actividad de las nucleasas.

Las soluciones que a continuación se presentan corresponden a las técnicas descritas, en la sección de métodos, para la extracción de DNA.

TÉCNICA VI: Extracción de plásmidos: Lisado claro. (6)

Sol.1. Glucosa 50mM, EDTA 10mM, Tris HCl 25mM.

Sol.2. NaOH 0.2N, SDS 1%; debe prepararse al momento de usarse.

Sol.3. Acetato de sodio 3.H2O 40.9g, ácido acético 6.89ml, se afora a 100 ml con agua destilada.

Sol.4. Amortiguador TE (Tris-EDTA): Tris HCl pH 7.5 10mM, EDTA 1mM.

Sol.5. Isopropanol saturado: CsCl 10.65g, TE 12.3ml,

24:1 con alcohol isoamílico.

Sol.5. Acetato de sodio 40.0g, ácido acético 6.89ml; el pH se ajusta a 5.2 con ácido acético y después se afora a 100 ml.

TÉCNICA IX: Lisis "in situ". (18)

Sol.1. De lisozima: lisozima 2mg/ml, RNAasa A 500ug/ml, azul de bromofenol 0.05%, Ficoll 20% (400,000 u.).

Sol.2. SDS 0.2%, Ficoll 10%.

Sol.3. SDS 0.2%, Ficoll 5%.

TÉCNICA X: Detección de plásmidos pequeños y grandes. (25)

Sol.1. Amortiguador E: Tris acetato 40mM, EDTA 2mM.

Sol.2. De lisis: SDS 3%, Tris HCl pH 12.6 50mM; se ajusta el pH a 12.6 con 1.6ml de NaOH 2N y se afora a 100ml con agua destilada.

TÉCNICA XI: Extracción de plásmidos por columna. (31)

Sol.1. Tris HCl pH 7.5 25mM, EDTA 50mM, Glucosa 50mM.

Sol.2. (fresca) NaOH 0.2N, SDS 1%.

Sol.3. Acetato de Sodio 3M.

Sol.4. Amortiguador de columna: NaCl 0.5M, tris HCl pH 8 50mM, EDTA 10mM.

Se utiliza una columna de vidrio de 18 x 1 cm empacada con sepharosa 4B.

TÉCNICA XII: Extracciones rápidas de plásmidos. (3,24)

- a) NaOH 50mM, SDS 5%, EDTA 5mM, Bromocresol púrpura 4ml.
- b) Glucosa 50mM, EDTA 50mM, Tris HCl 25mM, SDS al 5% 35ul.

SOLUCIONES AMORTIGUADORAS:

a) Acetatos: Tris acetato (tris base y ácido acético glacial) 0.04M, EDTA 0.002M.
Concentrada 50X: 242g de tris base, 57.1ml de ácido acético y 100ml de EDTA 0.5M.

b) Boratos: Tris boratos 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 0.002M.
Concentrada 50X: 54g de tris base, 27.5g de ácido bórico y 20ml de EDTA 0.5M.

7. Bolsas de diálisis:

Se cortan de 15 a 20cm., se hierven en solución de bicarbonato de sodio y EDTA (2:1); se lavan perfectamente con agua destilada y se vuelven a hervir con EDTA 10⁻³-3 M (0.0840g en 250 ml). Se guardan a 4° C; antes de utilizarlas se lavan con agua destilada interna y externamente.

b) MÉTODOS

I. Conservación del cultivo mixto bacteriano (Cellulomonas flavigena y Xanthomonas sp.).

El cultivo mixto se conserva en tubos de ensayo con medio mineral, carboximetil-celulosa y agar. Después de sembrar con una asada del cultivo mixto, los tubos se incuban a 37°C por un período de 48 a 72 h y se conservan a 4°C. La resiembra se hace cada mes.

II. Aislamiento de la cepa de Xanthomonas sp. pura a partir del cultivo mixto.

Se toma una asada del cultivo mixto y se siembra por estría en placa con BHI-agar, se deja incubar por 48 hrs. a 37°C. Una vez crecidas las colonias se toma una colonia de Xanthomonas sp. (color amarillo) y se resiembra en placa con BHI-agar, incubándose por 48 h a 37° C. Se conserva a 4°C. Se resiembra la cepa cada semana en placa con BHI-agar.

III. Obtención de la curva de crecimiento de Xanthomonas sp. en Infusión Cerebro-Corazón.

Se toma una colonia de Xanthomonas sp. crecida en placa de BHI y se inocula un matraz que contiene medio

líquido de BHI (a una quinta parte de su capacidad) se agita a 150 rpm a 37°C por 16 horas. El medio crecido (inóculo) se diluye al 5% en medio líquido de BHI; se incuba a 37°C en agitación a 150 rpm. Se toman lecturas, cada hora, en el espectrofotómetro a 530 nm.

IV. Obtención de la relación entre la densidad óptica y el crecimiento del cultivo, de Xanthomonas sp.

Con una colonia de Xanthomonas sp. se inocula un matraz que contiene medio líquido de BHI a una quinta parte de su capacidad y se incuba a 37°C con agitación de 150 rpm durante 16 horas. Se centrifuga a 6000 rpm y el botón celular se resuspende en agua destilada; se realizan diluciones del cultivo para obtener lecturas de densidad óptica a 530 nm entre 0.05 y 0.6, en el espectrofotómetro. Estas diluciones se hacen por triplicado y una alícuota de cada una de ellas es secada en charolas de papel aluminio a 60°C en una estufa con vacío durante 24 h. Se pesan, y con la diferencia en peso se realiza la curva graficando la densidad óptica contra los gramos de célula por litro.

V. Obtención de las células para la extracción de DNA.

Se toma una colonia de Xanthomonas sp. crecida en placa de BHI y con ella se inocula medio líquido de BHI, se incuba por 16 horas a 37°C en agitación a 150 rpm. El inóculo obtenido se diluye en medio líquido de BHI y se

incuba a 37°C con agitación de 150 rpm hasta que alcance una densidad óptica de 0.6 (530 nm). Las células se recuperan por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos en rotor GSA.

VI. Extracción de plásmidos: lisado claro. [Birnboim y Doly 1979 (6), modificado por Horbicz].

Se obtienen las células como se indica en el punto V.

La pastilla celular se resuspende en 10ml de la sol.1 más 5mg/ml de lisozima y se incuba por 30 minutos en hielo. Se agregan 20ml de la sol.2 y se mezcla suavemente; se incuba en hielo por una hora; se agregan 15ml de la sol.3, mezclando suavemente y se incuba durante una hora a 4°C; se centrifuga media hora a 13000 rpm para descartar restos celulares; el sobrenadante se distribuye en diferentes tubos y se agregan 2 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C), se incuba toda la noche a -20°C o 30min. a -70°C en baño de hielo seco con etanol o acetona. Se centrifugan 30min. a 10000 rpm. La pastilla se seca en desecador al vacío y se resuspende en 12ml de acetato de sodio 0.1M (pH 5.2); se precipita como se mencionó anteriormente. Se centrifuga media hora a 10000 rpm.; la pastilla se seca y se resuspende en 6ml de tris-EDTA con 50ug/ml de RNAasa A; se incuba 30 minutos a 37°C. Se agregan 4ml de Tris-EDTA y 7g de CsCl, se mezcla suavemente y se agregan 50ul de bromuro de etidio

(10mg/ml). Se centrifuga a 45000 rpm. en rotor 50Ti durante 36 h a 20° C. Las bandas obtenidas por la formación del gradiente se colectan por separado y se extrae el bromuro de etidio con 2-propanol saturado, se somete a diálisis a 4°C durante 24 h con varios cambios de la solución de Tris-EDTA. El DNA se conserva a 4°C.

VII. Extracción de DNA total para bacterias Gram (-). [Babykin, M. y colaboradores; 1984 (2)].

Las células se obtienen como se indica en el punto V; se lavan con 3ml de TES, después son resuspendidas en 1ml de mezcla lítica y se incuban a 37° C 10 min. y posteriormente en hielo por 5 min. Se agregan 0.5ml de sarkosyl al 2% y se homogeniza por repipeteo agregando 1ml de TES, nuevamente se adiciona sarkosyl a una concentración final de 1.5% (disuelto en 0.25M de EDTA). El lisado es pasado 4 veces por una aguja de 1.0mm de diámetro. Se agrega CsCl a una densidad de 1.61 g/cm³ y bromuro de etidio con una concentración final de 0.5mg/ml.

El gradiente isopícnico preformado de CsCl se elabora utilizando tres mililitros de soluciones de cloruro de cesio con diferentes densidades: 1.772 g/cm³, 1.610 g/cm³ (incluyendo la muestra) y 1.446 g/cm³. Las soluciones son colocadas de mayor a menor densidad en el tubo de centrifuga cuidando de no mezclarlas. Se somete a centrifugación a 45000 rpm en rotor 50Ti por 18 h. Las

bandas obtenidas en el gradiente se colectan por separado y se extrae el bromuro de etidio con un volumen igual de isopropanol saturado con CsCl seguido de una diálisis para retirar la sal. El DNA se guarda a 4°C.

Para determinar la densidad del DNA; la muestra (sin bromuro de etidio) se somete a un gradiente de densidad de cloruro de cesio. La colecta se realiza por picadura del tubo en fracciones de 500ul cada una. A cada fracción se le determina el índice de refracción (a partir del cual se puede calcular la densidad de cada fracción) y la absorbencia a 260 nm; con estos datos se construye una gráfica en donde se determina la densidad de la muestra.

VIII. Extracción de DNA total de células bacterianas. [Silhavy, T.J. y colaboradores; 1984 (43)].

Las células se obtienen como se indica en el punto V y el botón celular se resuspende en 10ml de Tris HCl (pH 8) y EDTA 50mM; esta solución se congela a -20° C (hielo seco); ya congelada se adiciona 0.5ml de la solución de lisozima para romper las células y se funde mezclando en un baño de agua a temperatura ambiente. Ya fundido se enfría a 4°C. por 45 min. Se adiciona 1ml de la solución STEP (*) mezclando bien y se calienta a 65° C por 180 minutos con mezclas suaves ocasionales. Se adicionan 6ml de fenol y se mezcla suavemente durante 5 min. para emulsificar. Se centrifuga 10 min. a 10000 rpm para

separar la fase acuosa, en la cual está contenido el DNA, se transfiere a un tubo limpio tratando de no incluir material de la interfase, si la fase acuosa está con el material de la interfase se repite la extracción con fenol.

Después se adiciona una décima parte del volumen total de la muestra de acetato de sodio 3M (pH 5.2) mezclando suavemente y 2 volúmenes de etanol absoluto; se invierte el tubo para mezclar, los ácidos nucleicos se agrupan como en una esférula y se recuperan con una micropipeta de vidrio; el exceso de alcohol se remueve por rotación suave en las paredes del tubo; se transfiere a un tubo limpio que contiene 5ml de Tris HCl 50mM y EDTA 1mM con 200ug/ml de RNAasa A. Se incuba 20 minutos a 37°C y se disuelve el precipitado moviendo el tubo suavemente a 4°C toda la noche. El DNA debe estar completamente disuelto, si es necesario se agrega 1ml de Tris-EDTA. Se adiciona un volumen igual de cloroformo. y se invierte para mezclar, se centrifuga a 5000 rpm por 15 minutos y la fase acuosa (superior) se transfiere a un tubo limpio; se precipita como se mencionó anteriormente y el DNA se observa como hilos largos, se recupera el DNA con una micropipeta de vidrio y se disuelve en 2ml de Tris-EDTA. El DNA se guarda a 4°C.

(*) Con esta técnica se hicieron pruebas utilizando la enzima proteinasa K inmovilizada en un soporte de nylon (bajo la asesoría del Dr. Ignacio Magaña Plaza). La

variación que se hizo fue de incubar la muestra con el nylon que tiene la proteinasa K, en un baño de agua al igual que con la enzima sin inmovilizar; después de incubar se centrifuga a 10000 rpm por 15 minutos, para separar el nylon de la muestra, y se continua con los pasos normalmente. Esta enzima inmovilizada se reutilizó 3 veces.

IX. Lisis " in situ ". [Eckhardt T. 1978 (18)]

Una o dos colonias de Xanthomonas sp. crecidas en placa de BHI se resuspenden en 15ul de solución de lisozima que ha sido colocada, previamente, en los carriles del gel. La suspensión se vuelve ligeramente turbia, se incuba 5min a temperatura ambiente. Se agregan 30ul de la solución 2 en la parte superior de la mezcla bacteria-lisozima, las dos capas se mezclan moviendo de lado a lado con un palillo, las dos capas deben diferenciarse. Se colocan 100 ul de la mezcla más ligera en la parte superior de las otras dos soluciones, sin dañar el lisado.

Se sellan los carriles con agarosa fundida y se aforan los carriles con solución amortiguadora. El plásmido se somete a electroforesis por una hora a 2mA (5V) y después por dos horas a 40mV (46V). El gel se tiñe con bromuro de etidio (0.4ug/ml) en solución amortiguadora de boratos por 15 minutos. La cámara de electroforesis que se utiliza es vertical.

X. Detección de plásmidos. [Kado C.I. y Liu S.T. 1981 (25)].

Se toman 3ml de un cultivo de Xanthomonas crecido durante 16 horas en medio líquido de BHI y se centrifuga a 5000 rpm durante 7 minutos a 4°C, la pastilla se resuspende en 1 ml de solución amortiguadora E y se agregan 2ml de solución de lisis. Se incuba a 50 - 65°C por 20 minutos en baño de agua a 37° C. y se adicionan dos volúmenes de fenol-cloroformo (1:1) para separar proteínas. Se centrifuga por 15 minutos a 6000 rpm a 4°C. y la fase acuosa se transfiere a un tubo limpio con una pipeta pasteur. Se toman 35 ul de esta muestra y con 10 ul de bromocresol purpura se somete a electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% ; se deja por dos horas a 12 volts. El gel se tiñe con bromuro de etidio en amortiguador de acetatos (0.5ug/ml).

XI. Extracción de plásmidos por columna. [Maniatis 1982 (31)].

Las células se obtienen como se indica en el punto V y la pastilla se lava con 35ml de solución 1; se centrifuga por 20 min. a 6000 rpm en frío y la pastilla se resuspende en 5ml de solución 1 con 10mg/ml de lisozima, se incuba 15 min. en hielo. Se añaden 20ml de solución 2 y se mezcla por inversión, se incuba 5 min. a temperatura ambiente. Se adicionan 15ml de acetato de

sodio frío y se invierte varias veces, se incuba una hora en hielo y se centrifuga por 40 min. a 10000 rpm; el sobrenadante se transfiere a dos tubos y se precipita con dos volúmenes de etanol absoluto frío, se deja por 30 min. en baño de hielo seco con etanol y se centrifuga a 10000 rpm por 15 min., el botón se resuspende en 5ml de la solución amortiguadora de columna. Se realizan extracciones con fenol-cloroformo (1:1) y después con cloroformo; se centrifuga 5 min. a 10000 rpm. A la fase acuosa (parte superior) se le adicionan 25ul de RNAasa A (10mg/ml) y se incuba durante 20 min. a 37° C. Se extrae nuevamente con fenol-cloroformo y después con cloroformo, se centrifuga por 5 min. a 10000 rpm. La fase acuosa se precipita con etanol como se indica anteriormente; la pastilla se seca y se resuspende en 0.5ml de solución amortiguadora de columna. La muestra es fraccionada en columna de sepharosa 4B (que ha sido previamente lavada con 50ml de amortiguador de columna). Se colectan 48 fracciones de 500 ul cada una y con 5 ul de cada fracción se detectan los ácidos nucleicos en placa de agarosa con bromuro de etidio; después las fracciones que contengan ácidos nucleicos se someten a electroforesis en un gel de agarosa al 0.7%. Las fracciones que contengan la misma especie de DNA se mezclan y son precipitadas con etanol como se menciona anteriormente. La pastilla se resuspende en 100 ul de Tris-EDTA y se visualiza por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7%; el cual es teñido con

bromuro de etidio en amortiguador de acetatos.

XII. Extracciones rápidas de plásmidos.

a) Barnes, 1974 (3). Se toma una colonia de Xanthomonas sp. crecida en placa de BHI y se coloca en un tubo con 25 ul de solución 1, se agita con un palillo, se tapa el tubo y se incuba a 68°C por un hora. Se adicionan 2.5 ul de ficoll al 25% y toda la mezcla se coloca en el carril de un gel de agarosa al 0.7%. Se tiñe el gel 45 minutos con bromuro de etidio en amortiguador de acetatos (0.5ug/ml).

b) Holmes D.S. y Quigley, 1981 (24). Se toma 1.5ml de cultivo de Xanthomonas sp crecido 16 horas en medio líquido de BHI y se centrifuga 1 min. en microcentrífuga; el botón se seca y se resuspende en 0.35 ul de la solución 1, se adicionan 25 ul de solución de lisozima fresca (10mg/ml) y se mezcla en agitadora por 3 segundos; se pone el tubo en baño de agua hirviendo durante 40 segundos y se centrifuga inmediatamente después por 10 min. a temperatura ambiente en microcentrífuga. El botón se remueve con un palillo y al sobrenadante se le adicionan 40 ul de acetato de sodio 3M y 420 ul de isopropanol, se mezcla con agitador y se incuba en baño de hielo seco con etanol por 15 min.; se centrifuga 15 minutos en microcentrífuga a 4°C, el botón se seca y se resuspende en 50 ul de Tris-EDTA con 50 ug/ml de RNAasa

A, se incuba 10 min. a 37° C. y se observa en gel de agarosa.

XIII. Digestión con enzimas de restricción.

Cada enzima tiene sus condiciones óptimas de reacción. Para llevar a cabo la digestión se necesita 1 ug de DNA para dos unidades de enzima (una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima necesaria para digerir un microgramo de DNA en una hora a la temperatura adecuada y con la solución amortiguadora de reacción correspondiente), y la solución amortiguadora de reacción adecuada concentrada diez veces (10X); el volumen total se completa a 20 ul con agua destilada estéril.

Se hacen los cálculos para tener 1 ug de DNA, las cantidades necesarias de enzima y solución amortiguadora de reacción. Primero se pone el agua seguida del DNA, la solución amortiguadora y por último la enzima. Se pone a incubar a 37°C durante una hora; después de este tiempo se adicionan 3 ul de azul de bromofenol y se para la reacción con un choque térmico a 65°C durante 5 minutos.

XIV. Electroforesis en gel de agarosa.

Para llevar a cabo la electroforesis se utilizan cámaras electroforéticas horizontales de 7.5 X 5.0 cm y verticales de 17.5 X 18.0 cm.

La agarosa que se utiliza es al 0.6 o 0.7% en solución amortiguadora de acetatos o boratos.

En los geles horizontales el voltaje que se utiliza es de 50 V. durante dos horas.

El colorante que se utiliza como referencia es el azul de bromofenol y el gel se tiñe con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 ug/ml en solución amortiguadora de acetatos o boratos durante 30 - 45 minutos.

V. RESULTADOS

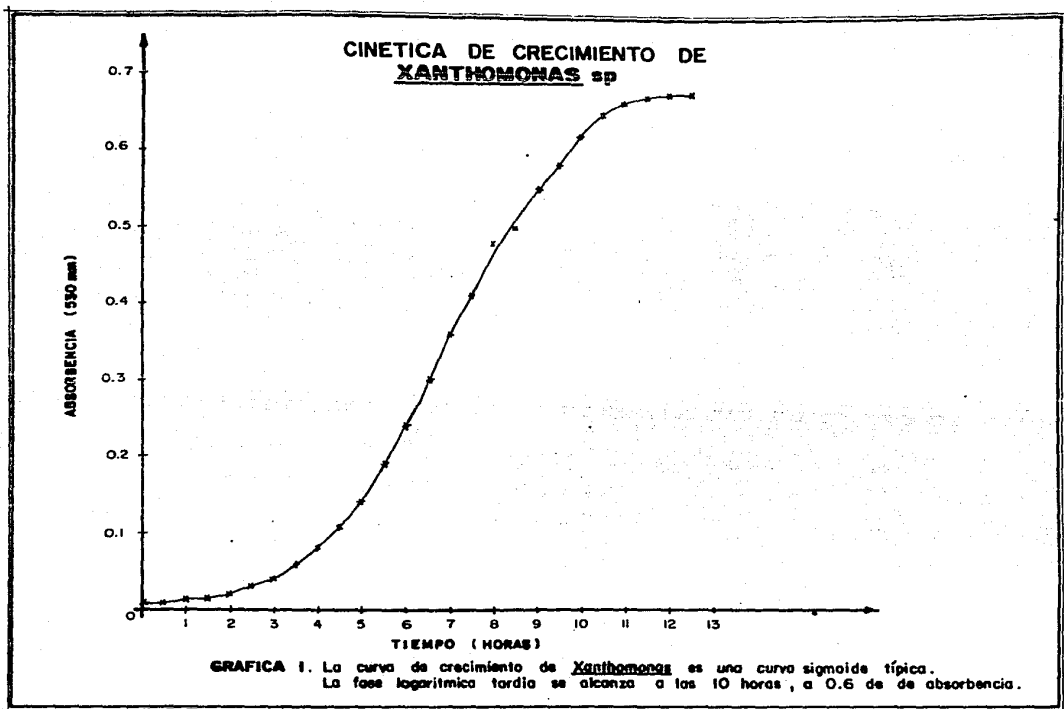
1. Curva de crecimiento de Xanthomonas sp. en medio infusión cerebro-corazón.

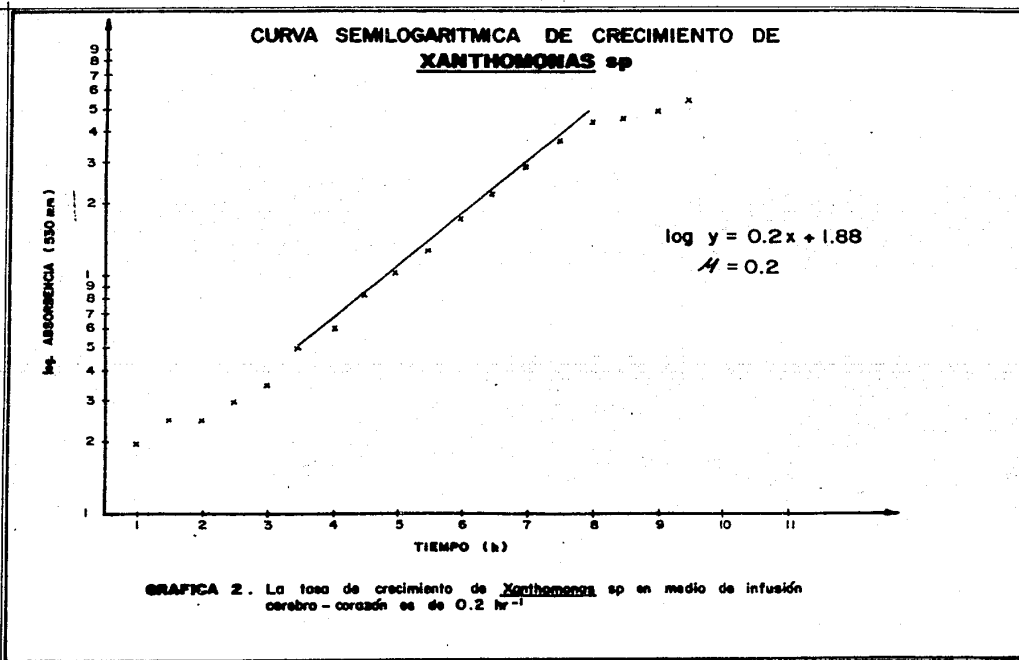
La curva de crecimiento de Xanthomonas sp. es una curva típica sigmoideal (gráfica 1) que comprende las fases lag o de adaptación al medio de cultivo, con una duración de tres horas después de la inoculación; la fase log o de duplicación con una duración de 8 horas y la fase estacionaria que se alcanzó a las 11 horas después de inocular el medio de cultivo.

Para determinar la tasa específica de crecimiento (μ) de Xanthomonas sp. en este medio, se graficó el logaritmo de la absorbencia contra el tiempo, obteniendo un valor de 0.2/hr. (gráfica 2) y el tiempo de duplicación del cultivo fue de 3.46 horas.

2. Relación entre la densidad óptica y el crecimiento del cultivo de Xanthomonas sp.

La relación obtenida entre la densidad óptica (530 nm) y los gramos de célula por litro de cultivo fue de 1:1 (gráfica 3), resultando la ecuación:





D.O. (530 nm) = 1.0 (qcél/l) + 0.006, en donde:

y = Densidad Óptica

m = 1.0

b = 0.006

La correlación entre los puntos fue de 0.99 y la ecuación se obtuvo utilizando el método de mínimos cuadrados.

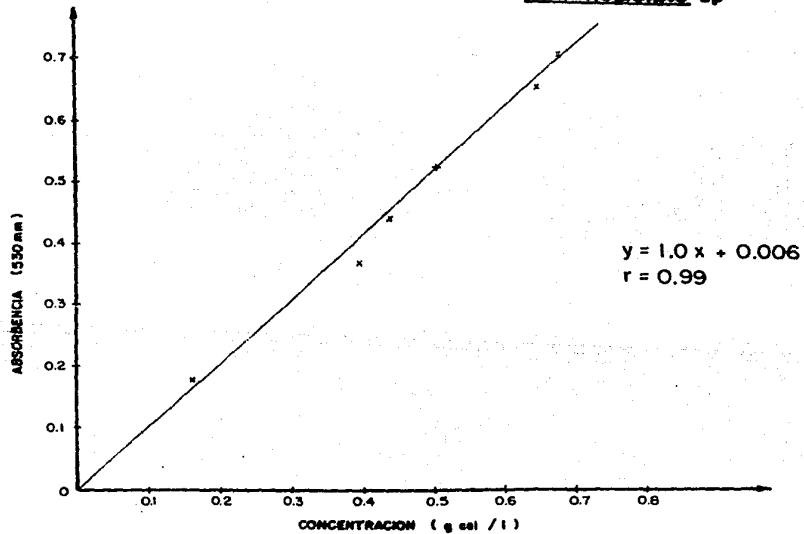
Para la extracción del DNA las células se cosecharon en la fase logarítmica tardía, a una densidad óptica de 0.6 (530 nm), teniendo aproximadamente 0.6006 qcél/l.

Para la extracción de DNA de Xanthomonas sp. se emplearon varias técnicas que se modificaron según las necesidades de la bacteria. Los resultados obtenidos para estas distintas técnicas se muestran a continuación.

3. Se obtuvo DNA de Xanthomonas sp utilizando la técnica de Birnboim y Doly (6), (técnica VI métodos).

El DNA se purificó utilizando un gradiente de densidad de cloruro de cesio. Se obtuvieron dos bandas con un mínimo de separación entre ellas; la segunda banda más pequeña que la primera. Se colectaron por separado y se dializaron durante 24 horas en solución amortiguadora

RELACION ENTRE LA ABSORBENCIA Y EL CRECIMIENTO
DEL CULTIVO DE XANTHOMONAS sp



GRAFICA 3. La relación entre los gramos de célula producidos por litro de medio de cultivo y la absorbancia (530 nm) es de 1:1. Las células se cosecharon del medio de cultivo a una absorbancia de 0.6 por lo que se obtiene 0.6006 g cél / l.

de Tris-EDTA a 4°C. Las muestras obtenidas se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0.7%, resultando moléculas de alto peso molecular en ambos casos.

Con el propósito de caracterizar estas especies de DNA se comparó el patrón de restricción de ambas bandas. Cada banda se restringió con las enzimas Eco RI, Pst I, Hind III, Bgl II y Bam HI; y para cada una de estas enzimas utilizadas no se observaron bandas definidas al someterse a electroforesis en un gel de agarosa al 0.7%.

La técnica de Birnboim y Doly para la obtención de plásmidos fue empleada para extraer el plásmido pBR322 de la cepa HB101 de Escherichia coli; el cual se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0.7%, resultando un patrón típico de plásmido con tres bandas: I correspondiente a DNA circular covalentemente cerrado; II DNA circular abierto y III DNA lineal (figura 2).

Este plásmido fue empleado para comprobar la eficacia de las enzimas de restricción Eco RI y Pst I, obteniendo una sola banda de 4.2 Kb después de la restricción, en ambos casos. Estas enzimas reconocen un sitio único dentro del plásmido produciendo la linealización de éste.

Con el fin de establecer si las condiciones utilizadas para la restricción del DNA de Xanthomonas sp. eran las adecuadas se hicieron incubaciones mezclando DNA de Xanthomonas sp. y de pBR322.

Restricción del DNA de
Xanthomonas sp y pBR322.

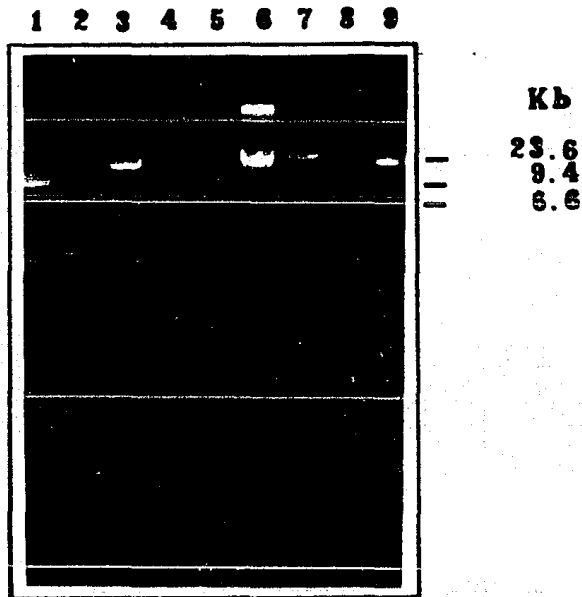


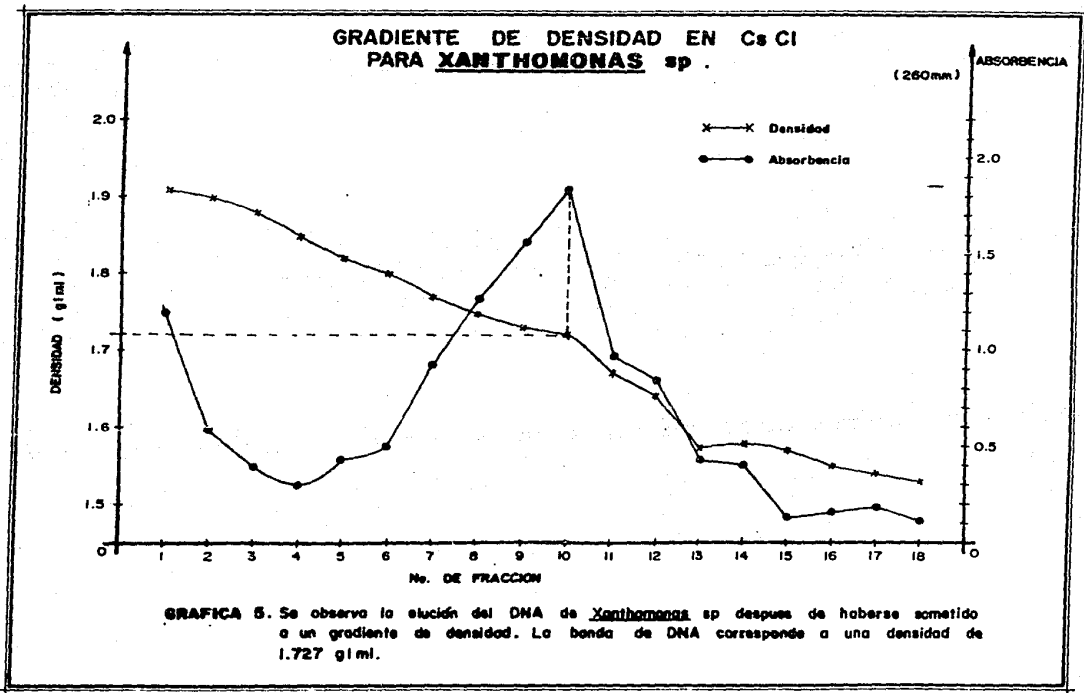
Figura 2. El DNA de Xanthomonas sp y pBR322 fue aislado por el método de lisado claro (6) y restringido según métodos. Carril 1. pBR322; carril 2. pBR322 digerido con Eco RI; carril 3. Xanthomonas sp; carril 4. Xanthomonas sp digerido con Eco RI; carril 5. Xanthomonas sp y pBR322 digeridos con Eco RI; carril 6. Xanthomonas sp; carril 7. Xanthomonas sp digerido con Pst I; - carril 8. Xanthomonas sp y pBR322 digeridos con Pst I; carril 9. Marcador de peso molecular, lambda digerido con Hind III.

En la figura 2 se observa la digestión del DNA de Xanthomonas sp. v de pBR32. Para pBR322 se tiene una banda de 4.2 Kb y para el DNA de Xanthomonas sp se observan fragmentos de más de 23 Kb hasta de menos de 2 Kb.

4. Se utilizó la técnica de Babykin para la extracción de DNA de Xanthomonas sp. para detectar la presencia de plásmidos (técnica VII métodos).

Con esta técnica los lisados celulares obtenidos son muy viscosos lo que dificulta su manejo y en varias ocasiones la lisis celular no fue satisfactoria. Al someter el DNA a un gradiente de densidad de cloruro de cesio se obtuvo una banda de DNA con una densidad de 1.727 g/ml (gráfica 5); la cual fue colectada y dializada a 4° C en solución amortiguadora de Tris-EDTA. Esta muestra se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% detectando una sólo banda no definida de alto peso molecular.

Con el fin de caracterizar el DNA de Xanthomonas sp. obtenido con esta técnica se restringió con las enzimas Eco RI, Pst I, Hind III v Bgl II v se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0.7%, resultando



un patrón de bandas no definido, para cada una de las enzimas empleadas, con fragmentos de más de 23 Kb y menores de 2 Kb. (datos no mostrados).

La obtención de una sola banda del complejo DNA-bromuro de etidio y el patrón de restricción observado indican la ausencia de DNA extracromosómico en la cepa de Xanthomonas sp.

5. Con el propósito de verificar lo anterior se empleó la técnica de Silhavy (43) para la detección de plásmidos a partir del DNA total de Xanthomonas sp. (técnica VIII métodos).

Después de extraer el DNA de Xanthomonas sp. la muestra se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0.6%, se obtuvo una sola banda de alto peso molecular.

Con el fin de determinar el patrón de restricción del DNA se utilizaron las enzimas de restricción Eco RI, Pst I, Hind III, Bam HI y Bgl II y se observó que las enzimas cortaron al DNA en diferentes sitios dando lugar a un patrón de corte con bandas no definidas. (figura 3)

Se realizó una cinética de digestión con Pst I y Eco RI. Los tiempos de incubación fueron aumentados en 30 minutos hasta tres horas. Se observa en un gel de agarosa al 0.6% que a mayor tiempo de incubación los fragmentos obtenidos son más pequeños sin observarse un patrón de

Restricción del DNA de Xanthomonas sp

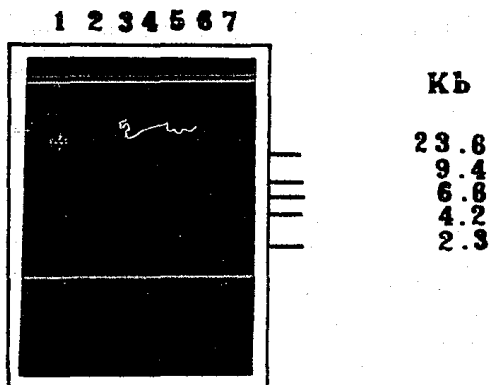


Figura 3 . El DNA de Xanthomonas sp (carril 1) obtenido con la técnica de Silhavy fue restringido con las enzimas: carril 2. Eco RI; carril 3. Pst I; carril 4.- Hind III; carril 5. Bgl II; carril 6. Bam HI; carril 7 Marcador de peso molecular, lambda digerido con Hind - III.

bandas definido. La figura 4 muestra los resultados obtenidos con Pst I, los cuales fueron semejantes a los obtenidos con Eco RI, que no son mostrados.

El DNA obtenido con la misma técnica VIII se restringió con un par de isoesquizómeros: Hpa II y Msp I con el fin de conocer si la secuencia que reconocen estas enzimas en el DNA de Xanthomonas sp. se encontraba o no modificado (metilado). Estas enzimas reconocen la misma secuencia, y la diferencia es que Msp I la restringe aún cuando esté metilada y Hpa II no la corta si existe modificación. La digestión se realizó con ambas enzimas a 37° C. durante una hora y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0.6%. En la figura 5 se presenta el patrón de corte obtenido que es de fragmentos de menos de 2 Kb. para ambas digestiones, lo que indica que la secuencia que reconoce este par de isoesquizómeros no está modificado.

6. Se utilizó la técnica de Eckhard (18) para la detección de plásmidos en Xanthomonas sp. (técnica IX métodos).

La lisis celular se llevó a cabo en el pozo del gel para evitar la ruptura del DNA durante la manipulación. La concentración de agarosa utilizada fue de 0.7% y

Cinética de digestión del DNA
de Xanthomonas sp.

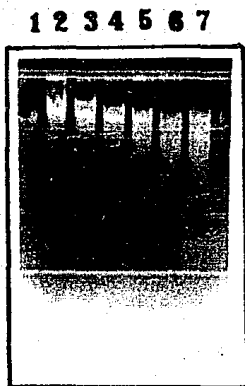


Figura 4 . Se realizó una cinética de digestión con -
Pst I del DNA de Xanthomonas sp obtenido con la técnica de Silhavy. Se utilizaron diferentes tiempos de incubación. Carril 1. DNA de Xanthomonas sp; carril 2. - 30 min.; carril 3. 60 min.; carril 4. 90 min.; carril 5. 120 min.; carril 6. 150 min.; carril 7. 180 min.

Digestión de Xanthomonas sp con
Msp I y Hpa II

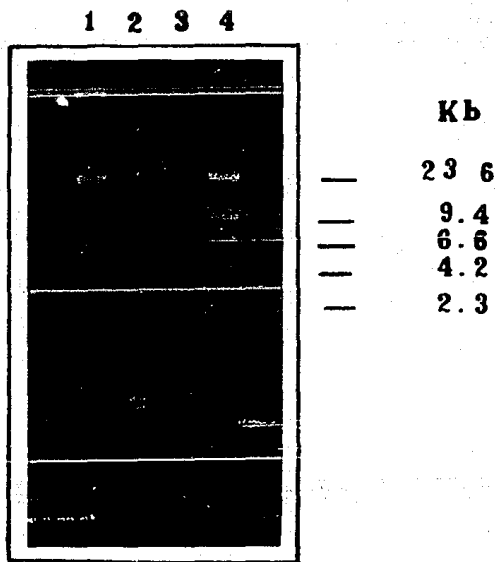


Figura 5 . El DNA de Xanthomonas sp obtenido con la técnica de Silhavy fue restringido con los isoesquizómeros Msp I y Hpa II. Carril 1. Xanthomonas sp; carril 2. Xanthomonas sp digerido con Msp I; carril 3. Xanthomonas sp digerido con Hpa II; carril 4. Marcador de peso molecular, lambda digerido con Hind III.

después de realizada la electroforesis se observa una banda poco definida de alto peso molecular, que correspondería al cromosoma de Xanthomonas sp. (figura 6).

Esta técnica de lisis " in situ " se aplicó en la cepa C600 de Escherichia coli y se obtuvo una banda que migra a la misma altura que el DNA de Xanthomonas sp., también de un peso molecular elevado, y que corresponde al cromosoma de E. coli ya que esta cepa no posee plásmidos. (figura 7).

7. Otra técnica utilizada para la detección de plásmidos en Xanthomonas sp. fue la de Kado y Liu (25). [técnica X métodos].

El DNA de Xanthomonas sp obtenido con esta técnica se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% observándose una banda definida de alto peso molecular, lo cual indica que no hay ningún elemento extracromosómico en Xanthomonas sp (figura 8).

8. Se utilizó la técnica de Maniatis (31) para la identificación de plásmidos en Xanthomonas sp. (técnica XI métodos).

Con esta técnica se descarta la mayor parte del DNA cromosómico y la purificación de los ácidos nucléico

Lisis "in situ" de Xanthomonas sp.

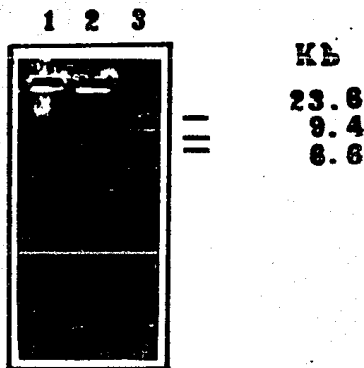


Figura 6 . La lisis celular se lleva a cabo directamente en el pozo del gel con el fin de detectar la presencia de plásmidos. Se observa la ausencia de plásmidos en Xanthomonas sp en el carril 1 y 2. En el carril 3.- Marcador de peso molecular, lambda digerido con Hind - III.

Lisis "in situ" de Xanthomonas sp
y E. coli (C600)

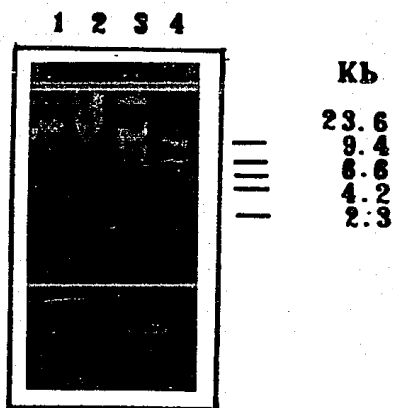


Figura 7 . La técnica de "lisis in situ" se llevó a -
cabo para la cepa C600 de Escherichia coli sin plásmi-
dos al igual que para Xanthomonas sp. Carril 1 y 2. --
Xanthomonas sp; carril 3. E. coli cepa C600; carril 4.
Marcador de peso molecular, lambda digerido con Hind -
III.

Lisis alcalina en Xanthomonas sp.

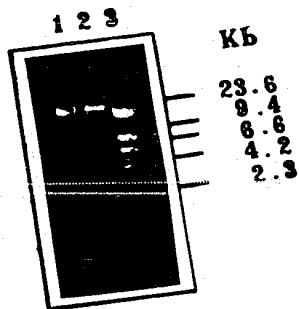


Figura 8 . Se utilizó la técnica de Kado y Liu para de-
terminar la presencia de plásmidos en Xanthomonas sp.-
La banda de DNA corresponde al cromosoma de la bacte-
ria. Carril 1. y 2. DNA de Xanthomonas sp; carril 3. -
Marcador de peso molecular, lambda digerido con Hind -
III.

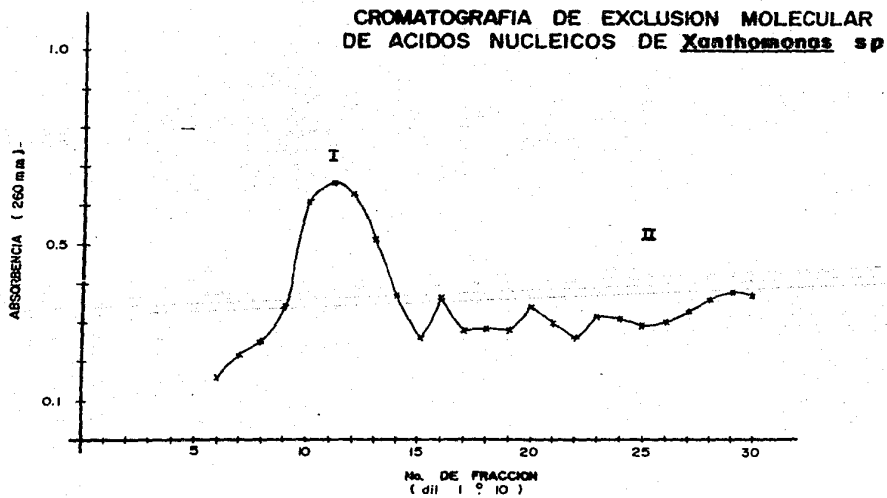
obtenidos se realiza utilizando una columna de sepharosa 4B.

Se colectaron 48 fracciones de 500 ul cada una después de eluir la muestra por la columna; estas fracciones se diluyeron tomando una alícuota de 250ul, de cada una, para determinar su absorbencia a 260 nm, los resultados se observan en la gráfica 4.

Por otra parte en placas de agarosa con bromuro de etidio las fracciones 7 a la 13 y 15 a 22 presentaron fluorescencia. Las fracciones 7 a la 13 se concentraron y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0.7%, observándose una banda de alto peso molecular similar a la de otros geles. En la figura 9 sólo se muestran las fracciones 11 a la 13, sin embargo en las fracciones 7 a 10 se observó la misma banda sólo que más tenue.

Esta muestra de DNA se restringió con las enzimas Eco RI, Pst I y Hind III. El patrón observado (datos no mostrados) fue de bandas no definidas, lo que indicó que el DNA pertenece al cromosoma de Xanthomonas sp.

Al someter a electroforesis las fracciones 15 a 22 se detectaron moléculas de bajo peso molecular que correspondieron a RNA de Xanthomonas sp (figura 10), esto es porque la muestra se trató previamente, con RNAasa A que hidroliza el RNA produciendo fragmentos pequeños de la molécula.



GRAFICA 4. Se muestra el perfil de elución de ácidos nucleicos de Xanthomonas sp, obtenidos con la técnica de Marletta. La región I corresponde a DNA cromosómico y la región II al RNA.

Patrón electroforético de ácidos nucleicos de Xanthomonas sp aislados por cromatografía en Sepharosa 4B.

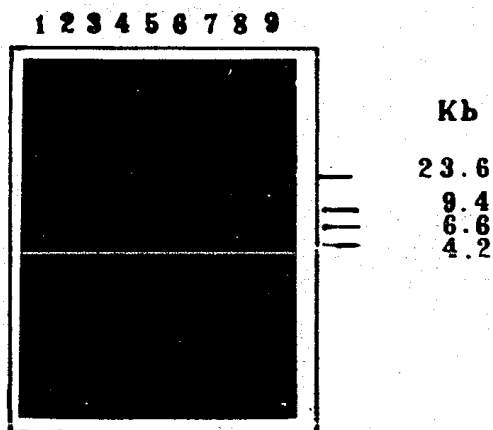


Figura 9. La muestra obtenida de Xanthomonas sp con la técnica de Maniatis es filtrada en una columna de Sepharosa 4B; se observa en el carril 1. Fracción 11, DNA; carril 2. Fracción 12, DNA; carril 3. Fracción 13 DNA; carriles 5 al 8. RNA de Xanthomonas sp; carril 9. Marcador de peso molecular, lambda digerido con Hind III.

9. Se emplearon extracciones rápidas de plásmidos (técnica XIII métodos) para detectarlos en Xanthomonas sp.

Con las dos técnicas utilizadas se observó en gel de agarosa al 0.7% una banda de alto peso molecular lo que indica la ausencia de plásmidos.

Todas las técnicas empleadas fueron desarrolladas por primera vez en el laboratorio y se adaptaron para trabajar con la bacteria Xanthomonas sp.

VI. DISCUSIÓN

La curva de crecimiento de Xanthomonas sp. fue determinada con el objeto de conocer el tiempo apropiado para la cosecha de células para la extracción de DNA.

Esta curva de crecimiento se realizó en medio de infusión cerebro-corazón y se obtuvo una curva típica sigmoide con las fases características de este tipo de curvas (gráfica 1). La fase logarítmica tardía es la apropiada para la cosecha de las células, ya que las paredes celulares de la bacteria aún no son muy rígidas, lo que permite una lisis celular adecuada. En Xanthomonas sp se presenta a una densidad óptica de 0.6 a 530 nm.

A esta densidad óptica de 0.6 se tienen aproximadamente 0.6006 gramos de células de Xanthomonas sp. por litro de medio de cultivo y esto se determinó en base a la curva patrón de Xanthomonas sp. (gráfica 3).

La tasa de crecimiento de Xanthomonas sp. es de 0.2/horas y su tiempo de duplicación es de 3.46 horas. (gráfica 2).

Considerando las características de los plásmidos se ensayaron distintas técnicas para su extracción. Estas técnicas utilizadas han sido descritas para una gran variedad de cepas bacterianas que poseen plásmidos tan

pequeños como el pBR322 de 2.6 Kb y plásmidos cuyo peso molecular fue estimado en un rango de 90 a 200 x 10⁶ daltons (18).

Con la técnica de lisado claro (6) y después de someter la muestra a un gradiente de densidad se obtuvieron dos bandas del complejo DNA-bromuro de etidio. Al restringir con diferentes enzimas de restricción y someter las muestras de DNA a electroforesis en un gel de agarosa, se determinó que era DNA cromosómico porque el patrón de restricción es característico del DNA cromosómico, es decir producción de fragmentos heterogéneos en peso molecular.

Se realizaron extracciones de DNA total de Xanthomonas sp con el fin de detectar la presencia de plásmidos.

Al utilizar la técnica de Babykin (2) para la extracción de DNA de Xanthomonas sp. se encontró una sola banda en el gradiente lo que indicó la ausencia de elementos extracromosómicos.

Esta muestra de DNA también fue restringida para conocer su patrón de corte y se observó en un gel de agarosa un patrón de bandas no definido, lo que indicó que correspondía al DNA cromosómico.

Con la técnica de Babykin (2) las muestras que se obtienen son muy viscosas; esta viscosidad es, quizá, debida a la producción de goma xanthana (polisacárido)

por el género Xanthomonas, y como por la técnica no se descarta material las muestras son difíciles de manejar. En algunas extracciones la lisis celular no se llevó a cabo satisfactoriamente, ya que después de someter a un gradiente de densidad de cloruro de cesio, no se observaron bandas de DNA o fueron bandas muy tenues. De todos los experimentos llevados a cabo sólo en dos ocasiones pudo obtenerse una lisis celular adecuada para la extracción de DNA. Por lo tanto esta técnica no es recomendable para purificar DNA de Xanthomonas sp.

La técnica de lisado claro (6) también fue utilizada para aislar el plásmido pBR322 de la cepa HB101 de Escherichia coli. Los resultados obtenidos fueron positivos encontrándose una banda correspondiente al plásmido pBR322 en el gradiente de densidad con cloruro de cesio y bromuro de etidio. Al someter esta muestra a electroforesis en un gel de agarosa se observó el DNA de pBR322 y al ser restringido con las enzimas Eco RI y Pst I se obtuvo el patrón de restricción esperado, una banda de 4.2 Kb; estas enzimas reconocen en un sitio único al plásmido pBR322 linealizando.

El DNA de Xanthomonas sp. obtenido con la técnica de lisado claro (6) fue cromosómico y las bandas observadas en el gradiente pudieron deberse a diferentes configuraciones del cromosoma de Xanthomonas sp.

Se usó la técnica de Silhavy (43) para la extracción de DNA total en Xanthomonas sp. realizando distintas modificaciones principalmente en el tiempo de incubación con proteinasa K, ya que al parecer esta bacteria posee una gran cantidad de proteínas. Se usó también proteinasa K inmovilizada en un soporte de nylon obteniendo buenos resultados lo que representa un ahorro, ya que puede ser reutilizada varias veces. Para este trabajo se usó 3 veces en diferentes experimentos y su actividad no disminuyó.

En esta técnica la muestra de DNA obtenida se sometió directamente a electroforesis en un gel de agarosa. Se obtuvo una banda de DNA, sin encontrarse alguna otra correspondiente a DNA extracromosómico. Las muestras de DNA obtenidas de esta manera fueron adecuadas para llevar a cabo digestiones con distintas enzimas de restricción por lo que se caracterizó parcialmente, al DNA de Xanthomonas sp.

Se realizó un ensayo de restricción con un par de isoesquizómeros, resultando una digestión similar con ambas enzimas lo que indicó que para este par de enzimas isoesquizoméricas el DNA de Xanthomonas sp no se encontraba modificado en la secuencia C↑CGG.

Con las cinéticas de digestión utilizando Pst I y Eco RI se obtuvieron digestiones del DNA cromosómico; a mayor tiempo de incubación se originaron fragmentos de DNA de menor peso molecular.

Con el método de Silhavy el DNA de Xanthomonas sp. pudo aislarse más fácilmente, se recomienda que para trabajar con el DNA cromosómico de Xanthomonas sp. se utilice esta técnica ya que las condiciones de lisis son las más apropiadas para obtener su DNA.

Para la extracción de plásmidos se utilizaron otras técnicas:

Empleando la técnica de Eckhard (18) se obtuvo una sola banda de DNA de alto peso molecular en un gel de agarosa. Si la cepa de Xanthomonas sp. tuviera plásmidos se esperaba encontrar al menos dos bandas en el gel de agarosa.

Se usó la cepa C600 de Escherichia coli y al someter el lisado bacteriano a electroforesis en un gel de agarosa se obtuvo una sola banda que migra a la misma altura que la banda de Xanthomonas sp. y que pertenece al DNA cromosómico de Escherichia coli. Esto sugiere fuertemente que la banda de DNA de Xanthomonas sp corresponde al cromosoma y no se detectó la presencia de plásmidos.

La técnica de Kado y Liu (25) nos permite eliminar la mayor parte del DNA cromosómico por lo que en un gel de agarosa se observa como un banda tenue de alto peso molecular. Con el DNA de Xanthomonas sp. se encontró una sola banda a diferentes tiempos de incubación que

corresponde a DNA cromosómico; si fuera DNA extracromosómico se observaría otra banda adicional y además, por sus características en cuanto a migración en electroforesis en un gel de agarosa es comparable con la banda de cromosoma reportada para esta técnica.

Dentro de las técnicas desarrolladas se utilizaron extracciones rápidas de plásmidos, [Barnes (3) y Holmes (24)], para detectar su presencia. Con estas técnicas se obtuvieron resultados negativos ya que se encontró, una sola banda de alto peso molecular correspondiente al DNA cromosómico de Xanthomonas sp. Estas técnicas se utilizaron para extraer el plásmido pBR322 de Escherichia coli y se logró aislar, obteniéndose el patrón de bandas esperado.

La cromatografía de exclusión molecular, utilizando un soporte de Sepharosa 4B, es otra técnica empleada para separar distintas especies de DNA (31).

Para la extracción del plásmido se usan condiciones que disminuyen la concentración del cromosoma de la bacteria y permiten identificar al plásmido.

La muestra es filtrada en una columna de sepharosa 4B en donde las moléculas más grandes eluyen más rápido. Así, se tiene que, el DNA cromosómico eluye en las primeras fracciones seguido del plásmido y por último el RNA.

Se obtuvieron solo dos picos en el patrón de elución, una región que corresponde al DNA cromosómico y otra región de RNA (gráfica 4).

La región de DNA se restringió con diferentes enzimas y se obtuvo una digestión parcial del DNA sin presentarse un patrón de restricción definido.

En todos los métodos utilizados las muestras obtenidas se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa, se detectó una sola banda para cada una de ellas indicando la ausencia de plásmidos en Xanthomonas sp; ya que Meyer (32) reporta que la electroforesis en un gel de agarosa es un buen método para la detección de plásmidos de diferentes tamaños en distintas bacterias.

Se esperaría, para una cepa con plásmidos, encontrar al menos dos bandas, correspondientes a DNA circular cerrado covalentemente, DNA lineal o DNA circular abierto.

Por otra parte las muestras de DNA de Xanthomonas sp. fueron restringidas con diferentes enzimas resultando una digestión de DNA sin un patrón de bandas definido que es el esperado para el DNA de plásmido; esto también es una prueba para descartar la presencia de plásmidos en Xanthomonas sp.

El objetivo particular de este trabajo fue la

detección de plásmidos en Xanthomonas sp con el fin de construir un vehículo de clonación para los genes que codifican las celulasas de Cellulomonas flavigena.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que, con las técnicas anteriormente descritas no se detectó la presencia de plásmidos en Xanthomonas sp.

Este resultado es importante, ya que si Xanthomonas sp no posee plásmidos, su transformación genética con un plásmido ya caracterizado, podría llevarse a cabo descartando la incompatibilidad de plásmidos.

Por otra parte el trabajo realizado en Xanthomonas sp forma parte del proyecto: "Mejoramiento genético del cultivo mixto bacteriano (Cellulomonas flavigena y Xanthomonas sp) para el aumento de la productividad y rendimiento en la obtención de proteína unicelular"; y es complementario a otros estudios que se efectúan sobre el cultivo mixto en el departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV.

Además, es importante estudiar cada uno de los géneros que constituyen este cultivo con el fin de tener la información necesaria para poder mejorarlo genéticamente.

Para la continuación de este trabajo se sugiere, transformar genéticamente a Xanthomonas sp con plásmidos

que se utilicen como vectores de clonación para bacterias gram negativas (RSF1010, pHV33, pHV1431) y, de estos plásmidos encontrar el más adecuado a Xanthomonas sp, es decir, que sea estable.

CONCLUSIONES

La curva de crecimiento de Xanthomonas sp. en infusión cerebro-corazón (BHI), es una curva de tipo sigmoide.

A una densidad óptica de 0.6 a 530 nm se alcanza la fase logarítmica tardía, que es la adecuada para recuperar a las células. A esta densidad óptica se tienen 0.6006 gramos de célula por litro de medio de cultivo.

Se montaron por primera vez, en el laboratorio, técnicas para la extracción de DNA de Xanthomonas sp y, se encontró que la técnica más adecuada es la de Silhavy y colaboradores de 1984, ya que con ella se obtiene la mayor cantidad de DNA en comparación con los demás métodos empleados.

Al utilizar las técnicas descritas no se obtuvo evidencia experimental de la presencia de plásmidos en Xanthomonas sp.

BIBLIOGRAFÍA

1. Appleyard R.K. (1954). Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from Escherichia coli K12. *Genetics* 39: 448.
2. Babykin M.M.; Zinchenkov V. (1984). Rapid separation of DNAs by buoyant density in three layer CsCl gradients. *Analytical Biochemistry* 97: 196-291.
3. Barnes W.M. (1977). Plasmid detection and sizing in single colony lysates. *Science* 195: 393.
4. Beguin P.; Eisen H. (1978). Purification and partial characterization of three extracellular cellulases from Cellulomonas sp. *Eur. J. Biochem.* 87: 525-531.
5. Bergoy D.H. (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Robert Earle & Norman Edwin Gibbons eds. 8th. ed. Baltimore, USA.
6. Birnboim H.C. and Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
7. Bolivar F.; Backman K. (1979). Plasmids of Escherichia

coli as cloning vectors. Method Enzymol. 68: 245.

8. Bover H.W. (1971). DNA restriction and modification mechanisms in bacteria. Ann. Rev. Microbiol 25: 153.

9. Broda P. (1979). Plasmids. W.H. Freeman and Company Oxford and San Francisco, E.U.A.

10. Casse (1979). Identification and characterization of large plasmids in Rhizobium meliloti using agarose gel. J. Gen. Microbiol. 113: 229-242.

11. Collins J.; Hohn B. (1978). Cosmids: A type of plasmid gene cloning vector that is packageable "in vitro" in bacteriophage lambda head. Proc. Natn. Acad. Sci. 25: 4242-4246.

12. Cuskey S.M.; Montenecourt B.S. v. Eveleigh D.E. (1983). Screening for cellulolytic mutants. Liquid fuel developments. Ed. by Donald L Wise CRC press.

13. David J.; Smith D.I. (1978). Plasmid determined resistance to antimicrobial agents. Ann. Rev. Micro. 32: 469-518.

14. De la Torre M. (1981). Producción de proteínas alimenticias de origen unicelular en residuos

lignocelulósicos. Tesis doctoral IPN.

15. De la Torre M. (1982). SCP production from cellulosic wastes. Conservation & Recycling. 5 (1):41-46.

16. De la Torre M.; Casas Campillo C. (1984). Isolation and characteritacion of a symbiotic cellulolytic mixed bacterial culture. Applied Microbiology and Biochtechnologie 19:430-434.

17. Dobritsa (1985). Physical and Genetic structure of the Inc N plasmid R15. Plasmid 14: 99-105.

18. Eckardt Thomas (1978). A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid 1: 584-588.

19. Gilkes N.R.; Langsford M.L.; Kilburn D.G. (1984). Mode of action and substrate specificities of cellulases from cloned bacterial genes. Journal of Biological Chemistry 259 (16): 10455-10459.

20. Gilkes N.R.; Kilburn D.G. (1984). Isolation and characterization of E. coli clones expressing cellulase genes from Cellulomonas fimi. Journal of Gen Microbiology 13: 1377-1384.

21. Glover D.M. (1984). Gene Cloning: The mechanics of DNA manipulation. Chapman and Hall Ed.; London.
22. Gunsalus I.C.; Hermann M.; Toscano Jr.; Katz D.; Garg G.K. (1975). Plasmid and metabolic diversity. In Microbiology.
23. Guerra S. (1979). Microorganismos termófilos en la producción de proteína unicelular utilizando bagazo de caña. Tesis IBQ; IPN.
24. Holmes D.S.; Guigley (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal Biochem. 114: 193-197.
25. Kado, C.I. y Liu S.T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. Journal of bacteriology 155 (3): 1365-1373.
26. Kornberg A. (1978). Síntesis del DNA. H. Blume ediciones, España.
27. Langsford M.L.; Gilkes N.R. (1984). The cellulase system of Cellulomonas fimi. Journal of Gen Microbiol 130: 1367-1376.
28. Lehninger, A. (1982). Bioquímica, 2a. ed. Omega,

Barcelona España.

29. Loenen W.A.; Brammar W.J. (1980). A bacteriophage lambda vector for cloning large DNA segments made with several restriction enzymes. *Gene* 10: 249-257.

30. Lorencez G.J. (1979). Estudios sobre la degradación de celulosa por un cultivo mixto de bacterias. Tesis IBQ; IPN.

31. Maniatis T.; Fritsch E.F.; Sambrook J. (1982). Molecular cloning. A laboratory manual Cold Spring Harbor laboratory. E.U.A.

32. Meyers J.A. (1977). Simple agarose gel electrophoretic method for identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology* 127: 1529-1537.

33. Mohammad I, Kauser A. (1984). Cellulase and hemicellulase production by *Cellulomonas flavigena* NIAB 441. *Biotechnology Letters* 6 (9): 597-600.

34. Molina O.E.; Perotti N.I.; Frigerio C.I.; Cordoba P.R. (1984). Single cell protein production from bagasse pith pretreated with sodium hydroxide at room temperature. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 20: 335-339.

35. Nagahari K.; Sakauchi K. (1978). RSF1010 Plasmid as a potentially useful vector. *Journal of Bacteriology* 132 (3): 1527-1529.
36. Nisizawa T.; Suzuki H.; Nakayama M.; Nisizawa K. (1971). Inductive formation of cellulase by sophorose in Trichoderma viride. *J. Biochem.* 70: 375-385.
37. Nisizawa T.; Suzuki H.; Nisizawa K. (1972). Catabolite repression of cellulase formation in Trichoderma viride. *J. Biochem.* 71: 999-1007.
38. Novick R.; Hoppensteadt C. (1978). On plasmid incompatibility. *Plasmid* 1: 421-425.
39. Novick R. (1981). Plasmids. *Investigación y Ciencia*. 53: 47-59
40. Old R.W. y Primrose S.B. (1981). Principles of gene manipulation. *Studies in microbiology*. Vol 2; 2a ed. University of California Press.
41. Ponce Noyola T. (1982). Estudio de la dinámica de un cultivo mixto (Cellulomonas flaviginea y Xanthomonas sp.) propagado en bagazo de café. Tesis BQ, IPN.

42. B...; Mandels M. (1980). Cellulases: Biosynthesis and applications. Review. Enzyme Microb. Technol. 2, April.

43. Sihavy T.J.; Berman M.L. (1984). Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor University.

44. Tadahiyo Oshida (1986). Isolation and characterization of plasmids from Micromonospora ziomensis and M. rosaria. Plasmids 16: 74-76.

45. Tanaka M.; Matsuno R. (1985). Conversion of lignocellulosic materials to single cell protein (SCP). Recent Developments and problems. Review. Enzyme and Microbiol. technol. 7 (5): 197-207.

46. Wakerchuk W.W.; Kilburn D.G.; Miller R.C. (1984). The preliminary characterization of the B-glucosidases of Cellulomonas fimi. Journal of General Microbiology 130: 1385-1389.

47. Walter G. v Villa K. (1989). Useful proteins from recombinant bacteria. Scientific American; April.

48. Whittle D.J.; Kilburn D.G. (1982). Molecular cloning of a Cellulomonas fimi, cellulase gene in Escherichia coli. Gene 17: 137-145.