

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



Endonucleasas de Restricción: Caracterización y
Purificación de una Nueva Endonucleasa obtenida
de *Streptomyces Phaeochromogenes*

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE
QUIMICO
PRESENTA
LIDIA YOLANDA FUCHS GOMEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

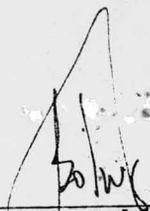
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

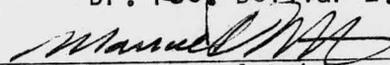
LAB TESIS 1979
ABO M. T. 1979
FECHA 122
PROC _____
S _____



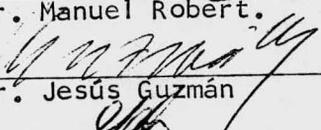
PRESIDENTE


Dr. Edo. Bolívar Z.

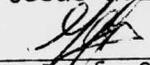
VOCAL


Dr. Manuel Robert.

SECRETARIO


Dr. Jesús Guzmán

1er. SUPLENTE


Prof. Gerardo Kono

2do. SUPLENTE


Profa. Marisol López

Sitio donde se desarrolló el tema: Instituto de Investigaciones Biomédicas, Dpto. Biología Molecular.

Nombre completo y firma del sustentante: Lidia Yolanda Fuchs Gómez

Nombre completo y firma del asesor del tema: Francisco Bolívar Zapata

A mis padres, con inmenso cariño.

A mis hermanos:

Carmen Patricia,

Olga Leticia,

Jorge Esteban.

Quiero también dedicar este trabajo a dos personas que conocí en el primer semestre de la carrera y siempre me brindaron confianza, respeto y cariño. Su apoyo fue el mayor estímulo y su amistad el mayor tesoro que encontré en la Facultad de Química.

A Tere,

a Alfredo,

quienes, con su sencillez, me mostraron el verdadero valor de las relaciones humanas.

QUIERO MANIFESTAR MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO AL

DR. FRANCISCO BOLIVAR Z.

POR SU PACIENCIA, CONFIANZA Y EXCELENTE DIRECCION

Y A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO POR SU COLABORACION

INDICE

	Página
I. Introducción y objetivo	1
I.I Endonucleasas de restricción	3
I.II Propiedades	6
I.III Existencia	10
I.IV Caracterización	25
II. Materiales y métodos	
II.I Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	26
II.II Preparación de sustratos enzimáticos	28
II.III Electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida	33
II.IV Determinación de actividades para fracciones obtenidas de las columnas de cromatografía	34
II.V Purificación de endonucleasas de restricción	35
III. Resultados	
III.I Purificación de <u>HpaI</u> y <u>HpaII</u>	40
III.II Ensayos	46
III.III Optimización de la actividad de <u>SphI</u>	54
III.IV Digestión de SV40 con <u>SphI</u>	54
IV. Discusión y conclusiones	58
Referencias	67

I. INTRODUCCION Y OBJETIVO

En los últimos 10 años se ha desarrollado una serie de metodologías cuya principal contribución a la ciencia ha sido la aportación de información básica acerca de procesos biológicos fundamentales, tales como la regulación y el funcionamiento de los genes, así como su estructura y organización molecular.

Estas metodologías conocidas en conjunto por diversos nombres: "Ingeniería Genética Molecular", "Recombinación in vitro de Acidos Nucléicos", Manipulación Genética" o "Clonación Molecular de Acido Desoxirribonucleico (DNA)" (Bolívar, F. en prensa), tienen como objetivo principal colaborar en el conocimiento de la biomolécula más importante para la vida, el DNA, a través de la construcción de moléculas recombinantes, abriendo nuevos horizontes en la Biología Molecular.

Un evento de recombinación in vitro de DNA es, en esencia, la unión de dos o más fragmentos de DNA, para dar lugar a una molécula "híbrida" o recombinante capaz de replicarse por sí misma cuando uno de los fragmentos es un replicón (Collins, 1977).

Esta nueva molécula híbrida puede ser introducida en células bacterianas por "transformación" (Cohen, S. et al 1973) tratando las células con CaCl_2 y, posteriormente,

puede ser multiplicada por división celular. Esta metodología se ha denominado Clonación Molecular de DNA, por la analogía que existe con el concepto de clona celular.

Ahora bien, el elemento que le da a la molécula recombinante la capacidad de replicarse es el vehículo o vector molecular, el cual puede estar constituido por una molécula circular de DNA, como por ejemplo un plásmido, que debe reunir las siguientes características:

- a) Ser lo más pequeño posible.
- b) Tener un mínimo de dos marcadores genéticos. Esto es, genes que, entre una gran población de células, permitan la selección de la bacteria que los lleva. Como ejemplo, los genes que confieren resistencia a antibióticos.
- c) Tener un sitio único, de preferencia en uno de los genes marcadores, para la enzima de restricción con la que se va a recombinar in vitro. Las enzimas de restricción son proteínas capaces de cortar internamente al DNA en sitios específicos. (Ver más adelante).

Cuando se realiza un experimento de recombinación in vitro y clonación molecular, se digiere con una enzima de restricción tanto al vehículo molecular como al DNA que se desea insertar. Posteriormente se unen estos DNA en forma covalente mediante la enzima ligasa de DNA. Después con estas moléculas recombinantes se transforma la célula receptora

(normalmente E.coli), es decir, se introduce el vehículo a la célula huésped, en donde se replica manteniéndose por generaciones (Fig. 1).

Por medio de estas metodologías se pueden clonar fragmentos de DNA de cualquier origen. Estos fragmentos pueden ser generados de cuatro formas:

1) Por síntesis química de DNA. Esto se ha hecho para genes que codifican para las hormonas insulina (Goeddel, en prensa) y somatostatina (Itakura et al, 1977).

2) Otra forma consiste en romper al DNA por medios mecánicos (Hogness et al, 1964).

3) Un tercer método consiste en formar DNA complementario (cDNA) a partir de RNA mensajero (mRNA), por medio de la enzima transcriptasa reversa. (Ulrich et al, 1977).

4) El último método es el uso de las enzimas de restricción, de las cuales se hablará ampliamente en los siguientes capítulos.

1.1 ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.

Hacia 1943, Luria y Delbruck observaron que al infectar E.coli con un exceso de bacteriófago virulento T1 la mayoría de las bacterias morían y se lisaban, pero un número muy pequeño de ellas sobrevivían dando lugar a colonias resistentes al fago, transmitiendo esta propiedad a sus descendientes. (Luria et al, 1943). A esta adaptación de las

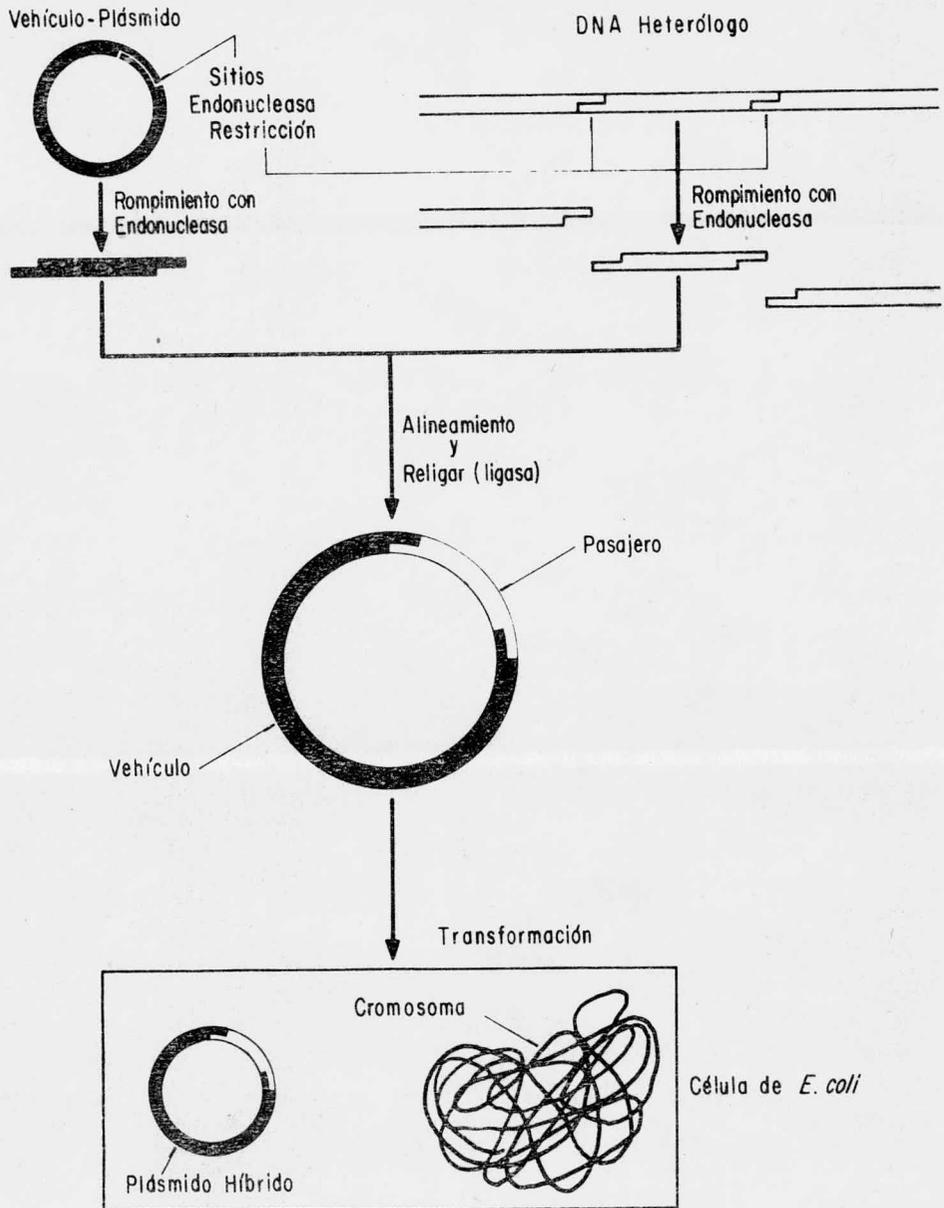


Fig. 1. Pasos involucrados en un experimento de clonación molecular.

bacterias al medio se le denominó fenómeno de variación (Luria et al, 1952; Bertani et al, 1953; Luria, 1953).

Para explicar estas observaciones, Arber (1962), y Dussoix (1962), propusieron un modelo basado en un sistema enzimático de "restricción-modificación" de las células bacterianas, en donde principalmente actúan dos enzimas: a) una endonucleasa que reconoce una secuencia específica de bases dentro de cualquier DNA, portando sus dos cadenas y b) una enzima de modificación que reconoce y modifica la misma secuencia en el DNA, dejando de ser un sustrato para la enzima de restricción. De aquí se les llamó a estas enzimas "endonucleasas de restricción", que estrictamente son "endodesoxirribonucleasas de restricción" ya que utilizan como sustrato único al DNA rompiendo uniones fosfodiester internas en sitios específicos.

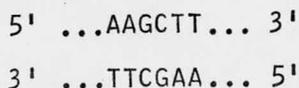
El estudio bioquímico de sistemas de modificación-restricción comenzó en 1968, cuando se aisló la primera enzima de restricción, la cual no fue útil analíticamente porque no era específica en los sitios que cortaba. Fue hasta 1970 cuando Smith y colaboradores (Smith et al, 1970 ; Kelly et al, 1970) descubrieron la primera enzima de restricción específica a la que denominaron Hind I por haber sido aislada de la bacteria Haemophilus influenzae serotipo d, la cual fue utilizada por Danna y Nathans (Danna et al, 1971) para fragmentar DNA del virus SV40.

1. 11. PROPIEDADES.

Las endonucleasas de restricción, de acuerdo a su especificidad en cuanto al sitio de DNA que reconocen y cortan, están divididas en dos grupos: clase I y clase II.

a) Endonucleasas de restricción de clase I. Estas enzimas requieren adenosín-trifosfato (ATP), S-adenosil-metionina (SAM) y Mg^{2+} . Aparentemente reconocen sitios específicos dentro del DNA, pero lo cortan inespecíficamente originando fragmentos totalmente heterogéneos, por lo cual, es difícil detectarlas y son poco útiles en la práctica.

b) Endonucleasas de restricción de clase II. En contraposición a las antes mencionadas, estas enzimas reconocen y cortan secuencias específicas de DNA, sólo requieren Mg^{2+} y generan fragmentos bien definidos. Las secuencias que reconocen son de 4, 5 ó 6 pares de bases y generalmente son secuencias palindrómicas, es decir, en las dos cadenas de DNA existe un centro de simetría, a partir del cual, las bases hacia ambos lados son simétricamente complementarias. Por ejemplo:



donde el centro de simetría se encuentra entre G y C, y ambas cadenas presentan la misma secuencia en sentido 5' a 3'.



corte	moléculas resultantes	denominación de los extremos
①	$\begin{array}{l} \text{--- A-OH} \\ \text{--- TTTAA}_5\text{---O (P)} \end{array} \quad \begin{array}{l} \text{(P) O---AATTT}^3\text{---} \\ \text{HO---A} \end{array}$	5' salientes
②	$\begin{array}{l} \text{--- AAA}^3\text{---OH} \\ \text{--- TTT}_5\text{---O (P)} \end{array} \quad \begin{array}{l} \text{(P) O---TTT ---} \\ \text{HO}_3\text{---AAA ---} \end{array}$	rasos
③	$\begin{array}{l} \text{--- AAATT}^3\text{---OH} \\ \text{--- T ---O---(P)} \end{array} \quad \begin{array}{l} \text{(P) ---O---T ---} \\ \text{HO}_3\text{---TTAAA ---} \end{array}$	3' salientes

Fig. 2. Tipos de extremos generados por cortes con endonucleasas de restricción.

Dentro de las endonucleasas de restricción de clase II existen los isozquisómeros (Roberts, 1976) o enzimas específicas de diferentes fuentes que reconocen la misma secuencia nucleotídica; estas pueden romper en el mismo sitio dentro de la secuencia reconocida, como Hap II, Hpa II y Mno I (Sugisaki et al, 1973; Garfin et al, 1974), que cortan la secuencia C'CGG en el sitio indicado por la flecha, o pueden cortar la misma secuencia en sitios diferentes, como Xma I: C'CCGGG y Sma I: CCC'GGG. El nombre de las enzimas de restricción se deriva del organismo del cual provienen. (Ver tabla 1).

Tipos de extremos generados.

Cuando el DNA es digerido con una endonucleasa de restricción se pueden generar fragmentos con extremos salientes o "cohesivos" y fragmentos con extremos "rasurados", dependiendo de cual enzima se trate. (Fig. 2).

En algunos casos el sitio que reconoce una endonucleasa específica no es el mismo que hidroliza. Puede reconocer una secuencia determinada y cortar ocho o diez pares de bases después. Este es el caso de Hqa I, Hph I, Mbo II y Mnl I. Además, las secuencias que reconocen estas cuatro enzimas no son palíndromes.

Una endonucleasa de restricción reconoce una secuencia específica, que se repite en promedio, cada determinado nú

mero de pares de bases. Por ejemplo, probabilísticamente una secuencia específica de cuatro pares de bases se repetiría cada 256 pares de bases, una de cinco cada 512 y una de seis cada 4096. Por lo tanto, conociendo el tamaño del DNA a tratarse, puede tenerse una idea del número de fragmentos que generaría una enzima de restricción determinada.

Es importante hacer notar que una enzima de restricción no destruye el DNA del organismo que la produce, y las especulaciones al respecto son:

a) Que la secuencia específica que reconoce la endonucleasa no esté contenida en el genoma de la cepa que la produce.

b) Que la célula contenga algún inhibidor de la enzima.

c) Que el sitio que reconoce haya sido modificado de alguna forma como la metilación de alguna de sus bases. Sin embargo, a la fecha se han encontrado dos endonucleasas clase II capaces de hidrolizar al DNA metilado en la secuencia que reconocen: Dpn I (Lacks et al, 1975) y Msp I (Waalwijk et al, 1978).

Las endonucleasas de restricción clase I pueden hidrolizar al DNA metilado en una sola cadena cuando la modificación se encuentra en el sitio de reconocimiento, mientras que las de clase II no pueden utilizar como sustrato al DNA modificado en una sola cadena; pero éste sí sería un

sustrato para el sistema de modificación. Una enzima de modificación actúa metilando a la base complementaria a aquélla ya metilada.

I. III. EXISTENCIA

La mayoría de estas enzimas se ha detectado principalmente en el reino bacteriano, aunque hay evidencia de que endonucleasas de clase I existen en organismos eucariotes, como CaeI (Brown, F.L. et al, 1978).

La cantidad de enzima presente en las bacterias varía considerablemente, en algunos casos, por ejemplo, de 10g de células de Haemophilus aegyptius se ha aislado suficiente enzima HaeIII como para digerir completamente 10g de DNA de bacteriofago lambda, mientras que en otros casos resulta casi imposible aislar suficiente enzima para poder caracterizarla.

La tabla I presenta las enzimas de restricción y modificación que hasta ahora se conocen.

En esta tabla, la primera columna indica la fuente de obtención de la enzima. La segunda es el nombre de la enzima, se nombra con 3 letras abreviando el género y la especie del microorganismo del cual fueron extraídas, (en algunos casos se agrega una cuarta letra para designar la cepa), el número romano se usa para diferenciar las enzimas obtenidas de la misma fuente. La tercera columna es la secuencia que reconoce la enzima, indicando con una flecha el sitio que corta.

TABLA 1. ENZIMAS DE RESTRICCION ^(a) Y MODIFICACION Y SUS SECUENCIAS DE RECONOCIMIENTO.

<u>MICROORGANISMO</u>	<u>ENZIMA</u> ^(b)	<u>SECUENCIA</u> ^(c)	<u>REFERENCIAS</u> ^(d)
<u>Achromobacter immobilis</u>	<u>AimI</u>	?	Endow et al, ONP ^(e)
<u>Acinetobacter calcoaceticus</u>	<u>AccI</u>	GT↓(A)(G) (C)(T)AC	Zabeau et al, ONP ^(e)
	<u>AccII (FnuDII)</u>	CGCG	Zabeau et al, ONP ^(e)
<u>Agrobacterium tumefaciens</u>	<u>AtuAI</u>	?	Sciaky et al, ONP ^(e)
<u>Agrobacterium tumefaciens</u> B6806	<u>AtuBI (EcoRII)</u>	CC(A) (T)GG	Roizes, 1977 +; Sciaky, ONP ^(e)
<u>Agrobacterium tumefaciens</u> ID 135	<u>AtuII (EcoRII)</u>	CC(A) (T)GG	LeBon, en impreña ^(e)
<u>Agrobacterium tumefaciens</u> C58	<u>AtuCI (BclI)</u>	TGATCA	Sciaky et al, ONP ^(e)
<u>Anabaena catanula</u>	<u>AcaI</u>	?	Hughes et al, ONP ^(e)
<u>Anabaena subcylindrica</u>	<u>AsuI</u>	G↓GNCC	Hughes et al, ONP ^(e)
<u>Anabaena variabilis</u>	<u>AvaI</u>	C↓PICGPuG	Murray et al, 1976
	<u>AvaII</u>	G↓C(A) (T)CC	Murray et al, 1976 +; Sutcliffe et al, ONP ^(e)
	<u>AvaIII</u>	ATGCAT	Roizes, ONP ^(e) +
<u>Arthrobacter luteus</u>	<u>AluI</u>	AG↓CT	Roberts et al, 1976 +; Yang et al, 1976.

<u>MICROORGANISMO</u>	<u>ENZIMA</u> (b)	<u>SECUENCIA</u> (c)	<u>REFERENCIA</u> (d)
<u>Arthrobacter pyridinolis</u>	<u>ApyI</u>	CC(A)GG	DiLauro, ONP (e)
<u>Bacillus amiloliquefaciens</u> F	<u>BamFI</u> (<u>BamHI</u>)	GGATCC	Shibata, et al, 1976
<u>Bacillus amiloliquefaciens</u> H	<u>BamHI</u>	G↓GATCC	Haggerty et al, 1976; Perricaudet et al, 1975; Roy et al, 1973
<u>Bacillus amiloliquefaciens</u> K	<u>BamKI</u> (<u>BamHI</u>)	GGATCC	Shibata et al, 1976
<u>Bacillus amiloliquefaciens</u> N	<u>BamNI</u> (<u>BamHI</u>)	GGATCC	Shibata et al, 1976
	<u>BamN_x</u>	?	Sharp et al, 1973; Shibata et al, 1976
<u>Bacillus brevis</u> S	<u>BbrSI</u>	GC*(T)GC A	Vanyushin et al, 1975 (e)
<u>Bacillus brevis</u>	<u>BvbI</u>	GC(A)GC	Gingeras et al. ONP (e)
<u>Bacillus caldolyticus</u>	<u>BclI</u>	T↓GATCA	Binghman et al ONP Sciaky et al ONP
<u>Bacillus cereus</u>	<u>Bce</u> 14579	?	Shibata et al, 1976
<u>Bacillus cereus</u>	<u>Bce</u> 1229	?	Shibata et al, 1976
<u>Bacillus cereus</u>	<u>Bce</u> 170 (<u>PstI</u>)	CTGCAG	Shibata et al, 1976
<u>Bacillus cereus</u> Rf sm st	<u>BceR</u> (<u>FnuDII</u>)	CGCG	Shibata et al, 1976
<u>Bacillus globigii</u>	<u>BglI</u>	?	Young et al, 1976
	<u>BglII</u>	A↓GATCT	Pirrota, 1976; Young et al, 1976; Zain et al, ONP(e)

<u>MICROORGANISMO</u>	<u>ENZIMA</u> (b)	<u>SECUENCIA</u> (c)	<u>REFERENCIAS</u> (d)
<u>Bacillus megaterium</u> 899	<u>Bme</u> 899	?	Shibata et al, 1976
<u>Bacillus megaterium</u> B205-3	<u>Bme</u> 205	?	Shibata et al, 1976
<u>Bacillus megaterium</u>	<u>BmeI</u>	?	Gelinas et al, ONP (e)
<u>Bacillus pumilus</u> AHU1387	<u>BpuI</u>	?	Ikawa et al, 1976
<u>Bacillus sphaericus</u>	<u>Bsp</u> 1286	?	Shibata et al, 1976
<u>Bacillus sphaericus</u> R	<u>BspRI</u> (<u>HaeIII</u>)	GGCC	Kiss et al, 1977
<u>Bacillus stearothermophilus</u> 1503-4R	<u>BstI</u> (<u>BamHI</u>)	GGATCC	Catterall et al, 1977
<u>Bacillus stearothermophilus</u> 240	<u>BstAI</u>	?	Bingham et al, ONP (e)
<u>Bacillus stearothermophilus</u> ET	<u>BstEI</u>	?	Meagher, ONP (e)
	<u>BstEII</u>	?	Meagher, ONP (e)
	<u>BstEIII</u>	?	Meagher, ONP (e)
<u>Bacillus subtilis</u> X5	<u>BsuRI</u> (<u>Hae III</u>)	GG↓*CC	Bron et al, 1975; Bron et al, 1975 (2); Gunthert et al, 1978
<u>Bacillus subtilis</u> Marburg 168	<u>BsuM</u>	?	Shibata et al, 1976
<u>Bacillus subtilis</u>	<u>Bsu</u> 6663	?	Shibata et al, 1976
<u>Bacillus subtilis</u>	<u>Bsu</u> 1076 (<u>HaeIII</u>)	GGCC	Shibata et al, 1976

<u>MICROORGANISMO</u>	(b) <u>ENZIMA</u>	(c) <u>SECUENCIA</u>	(d) <u>REFERENCIAS</u>
<u>Bacillus subtilis</u>	<u>Bsu</u> 1114 (<u>HaeIII</u>)	GGCC	Shibata et al, 1976
<u>Bacillus subtilis</u>	<u>Bsu</u> 1247 (<u>PstI</u>)	CTGCAG	Shibata et al, 1976; Ho- shino et al, 1977
<u>Bacillus subtilis</u>	<u>Bsu</u> 1145	?	Shibata et al, 1976
<u>Bacillus subtilis</u>	<u>Bsu</u> 1192	?	Shibata et al, 1976
<u>Bacillus subtilis</u>	<u>Bsu</u> 1193	?	Shibata et al, 1976
<u>Bacillus subtilis</u>	<u>Bsu</u> 1231	?	Shibata et al, 1976
<u>Bacillus subtilis</u>	<u>Bsu</u> 1259	?	Shibata et al, 1976 (e)
<u>Bordetella bronchiseptica</u>	<u>BbrI</u> (<u>HindIII</u>)	AAGCTT	Roberts et al, ONP
<u>Brevibacterium albidum</u>	<u>BalI</u>	TGG↓CCA	Gelinas et al, 1977
<u>Brevibacterium luteum</u>	<u>BluI</u> (<u>XhoI</u>)	C↓TCGAG	Gingeras et al, 1978 (e)
	<u>BluII</u> (<u>HaeIII</u>)	GGCC	Van Montagu, ONP (e)
<u>Caryophanon latum</u> L	<u>Clal</u>	ATCGAT	Mayer, H et al, ONP (e)
<u>Chloroflexus aurantiacus</u>	<u>Caul</u>	?	Binghman et al, ONP (e)
	<u>CaulI</u>	?	Binghman et al, ONP (e)
<u>Chromobacterium violaceum</u>	<u>Cvil</u>	?	Endow et al, ONP (e)
<u>Corynebacterium humiferum</u>	<u>Chul</u> (<u>HindIII</u>)	AAGCTT	Endow et al, ONP (e)
	<u>ChuII</u> (<u>HindII</u>)	GTPiPuAC	Endow et al, ONP

<u>MICROORGANISMO</u>	(b) <u>ENZIMA</u>	(c) <u>SECUENCIA</u>	(d) <u>REFERENCIAS</u>
<u>Corynebacterium petrophilum</u>	<u>CpeI</u> (<u>BclI</u>)	TGATCA	Fisherman et al, ONP (e)
<u>Diplococcus pneumoniae</u>	<u>DpnI</u>	GATC*	Lacks et al, 1975
<u>Diplococcus pneumoniae</u>	<u>DpnII</u> (<u>MboI</u>)	GATC	Lacks et al, 1975 +; Lacks et al, 1977
<u>Enterobacter cloacae</u>	<u>EclI</u>	?	Hartmann et al, 1977 (e)
<u>Enterobacter cloacae</u>	<u>Ecal</u>	GGTNACC	Mayer et al, ONP
<u>Escherichia coli</u> RY13	<u>EcoRI</u>	G↓AATC*	Allet et al, 1973; Dugaiczky, 1974; Greene et al, 1974 +, †; Hedgpeth et al, 1972; Morrow et al, 1973; Mulder et al, 1973; Petterson et al, 1973; Polisky et al, 1975; Yoshimori, 1971 (e)
	<u>EcoRI</u> '	PuPuA↓TPiPi	Murray et al, ONP
<u>Escherichia coli</u> R245	<u>EcoRII</u>	CC*(A)GG	Bigger et al, 1973; Boyer et al, 1973; Subramanian et al, 1974; Yoshimori, 1971 +;
<u>Escherichia coli</u> B	<u>EcoB</u>	TGA(N) ₈ TGCT ^(g)	Eskin et al, 1972 +; Lautenberg et al, 1978; Lautenberg et al, 1972 †; Ravetch et al, 1978; Smith et al, 1972; Van Ormondt et al, 1973
<u>Escherichia coli</u> K	<u>EcoK</u>	?	Haberman et al, 1972 +; Meselson et al, 1968

<u>MICROORGANISMO</u>	<u>ENZIMA</u> (b)	<u>SECUENCIA</u> (c)	<u>REFERENCIAS</u> (d)
<u>Escherichia coli</u> (PI)	<u>EcoPI</u>	?	Brockes, 1973; ^f Brockes et al, 1972; Brockes et al, 1974; Haberman, 1974; (+) Meselson et al, 1978.
<u>Escherichia coli</u> P15	<u>EcoP15</u>	?	Reiser et al, 1977. (e)
<u>Fusobacterium nucleatum</u> A	<u>FnuAI</u> (<u>HinfI</u>)	G [↓] ANTC	Lui et al, ONP
	<u>FnuAII</u> (<u>MbolI</u>)	GATC	Roberts et al, ONP (e)
<u>Fusobacterium nucleatum</u> C	<u>FnuCI</u> (<u>MbolI</u>)	↓GATC	Lui et al, ONP (e)
<u>Fusobacterium nucleatum</u> D	<u>FnuDI</u> (<u>HaeIII</u>)	GG [↓] CC	Lui et al, ONP (e)
	<u>FnuDII</u>		Lui et al, ONP (e)
	<u>FnuDIII</u> (<u>HhaI</u>)	GCG [↓] C	Lui et al, ONP (e)
<u>Fusobacterium nucleatum</u> E	<u>FnuEI</u> (<u>MbolI</u>)	↓GATC	Lui et al, ONP (e)
<u>Fusobacterium nucleatum</u> 84	<u>Fnu84 I</u>	?	Lui et al, ONP (e)
<u>Haemophilus aegyptius</u>	<u>HaeI</u>	(^A)GG [↓] CC(^T) T A	Murray et al, ONP (e)
	<u>HaeII</u>	PuGCGC [↓] Pi	Barrel et al, ONP Roberts et al, 1975 + ; Tu, 1976.
	<u>HaeIII</u>	GG [↓] CC	Bron et al, 1975; Mann et al 1977; Middleton et al, 1972+; Subramanian et al, 1974; Yang et al, 1976.

<u>MICROORGANISMO</u>	(b) <u>ENZIMA</u>	(c) <u>SECUENCIA</u>	(d) <u>REFERENCIAS</u>
<u>Haemophilus aphrophilus</u>	<u>HapI</u>	?	Roberts et al, ONP ^(e)
	<u>HapII (HpaII)</u>	C↓CGG	Sugisaki et al, 1973; Takanami, 1973; Takanami, 1974 + .
<u>Haemophilus gallinarum</u>	<u>HgaI</u>	GACGC ^f	Brown et al, 1977; Sugisaki, 1978; Takanami, 1973; Tanyashin et al, 1976.
<u>Haemophilus haemoglobinophilus</u>	<u>Hhgl (HaeIII)</u>	GGCC	Roberts, ONP ^(e)
<u>Haemophilus haemolyticus</u>	<u>HhaI</u>	GCG↓C	Roberts et al, 1976 + Subramanian et al, 1977.
	<u>HhaII (Hinfl)</u>	GANTC	Mann et al, 1978 ^(e)
<u>Haemophilus influenzae</u> 1056	<u>Hin1056I (FnuDII)</u>	CGCG	Olson et al, ONP ^(e)
	<u>Hin 1056 II</u>	?	Olson et al, ONP ^(e)
<u>Haemophilus influenzae</u> serotipo b, 1076	<u>HinbIII (HindIII)</u>	AAGCTT	Olson et al, ONP ^(e)
<u>Haemophilus influenzae</u> R _b	<u>HinbIII (HindIII)</u>	AAGCTT	Middleton et al, ONP ^(e) Roberts et al, ONP + .
<u>Haemophilus influenzae</u> serotipo c, 1160	<u>HincII (HindII)</u>	GTPiPuAC	Olson et al, ONP ^(e)
<u>Haemophilus influenzae</u> serotipo c, 1161	<u>HincII (HindII)</u>	GTPiPuAC	Olson et al, ONP ^(e) .

<u>MICROORGANISMO</u>	(b) <u>ENZIMA</u>	(c) <u>SECUENCIA</u>	(d) <u>REFERENCIAS</u>
<u>Haemophilus influenzae</u> R _c	<u>HincII</u> (<u>HindII</u>)	GTPiPuAC *	Landy et al, 1974.
<u>Haemophilus influenzae</u> R _d	<u>HindI</u>	CAC	Gromkova et al, 1976; Roizes et al, 1977 + ; Roy et al, 1973.
	<u>HindII</u>	GTPi↓PuAC *	Danna et al, 1973; Yang et al, 1975; Kelly et al, 1970; Landy et al; 1974; Roy et al, 1973 + ; Roy et al, 1973 (2); Smith et al, 1970.
	<u>HindIII</u>	*↓AGCTT	Danna et al, 1973; Old et al, 1975 + ; Roy et al, 1973 + (1); Roy et al, 1973 (2); Yang et al, 1975.
	<u>HindIV</u>	*GAC	Roy et al, 1973 † ; Roy et al, 1973.
<u>Haemophilus influenzae</u> R _d 123	<u>HindGLU</u>	?	Tanyashin et al, 1976. (e)
<u>Haemophilus influenzae</u> R _f	<u>Hinfl</u>	G↓ANTC	Hutchison et al, ONP Middleton et al ONP (e) + Murray et al, ONP (e) Subramanian et al, 1977. (e)
	<u>HinfII</u> (<u>HindIII</u>)	AAGCTT	Mann et al, ONP
<u>Haemophilus influenzae</u> H-1	<u>HinHI</u> (<u>HaeII</u>)	PuGCGCPI	Takanami, 1973; Takanami, 1974 + ; Takanami et al, 1973.

<u>MICROORGANISMO</u>	<u>ENZIMA</u> (b)	<u>SECUENCIA</u> (c)	<u>REFERENCIAS</u> (d)
<u>Haemophilus parahaemolyticus</u>	<u>HphI</u>	GGTGA ^(h)	Kleid et al, 1976 + ; Middleton et al ONP (e).
<u>Haemophilus parainfluenzae</u>	<u>HpaI</u>	GTT↓AAC	Danna et al, 1973; Garfin et al, 1974; Gromkova et al, 1972; Murray et al, ONP (e); Sharp et al, 1973 + .
	<u>HpaII</u>	C↓*CGG	Allet, 1973; Danna et al, 1973; Garfin et al, 1974; Gromkova et al, 1972; Murray et al, ONP(e); Mann et al, 1977 f ; Sharp et al, 1973 + .
<u>Haemophilus suis</u>	<u>HsuI</u> (<u>HindIII</u>)	AAGCT	Roberts et al, ONP (e)
<u>Herpetosiphon giganteus</u> HP1023	<u>HqiAI</u>	G ^(T) _(A) GC ^(T) _(A) ↓C	Brown et al ONP (e)
<u>Klebsiella pneumoniae</u> OK8	<u>KpnI</u>	GGTAC↓C	Smith et al, 1976 + ; Tomassini et al, ONP (e)
<u>Microcoleus species</u>	<u>MstI</u>	TGCGCA	Comb et al, ONP (e)
<u>Moraxella bovis</u>	<u>MboI</u>	↓GATC	Gelinas et al, 1977
	<u>MboII</u>	GAAGA ⁱ	Brown et al, en imprenta Endow, 1977 Gelina et al, 1977 + ;
<u>Moraxella glueidi</u> LG1	<u>MglI</u>	?	Smith et al, 1976.

<u>MICROORGANISMO</u>	<u>ENZIMA</u> (b)	<u>SECUENCIA</u> (c)	<u>REFERENCIAS</u> (d)
<u>Moraxella glueidi</u> LG11	<u>Mq111</u>	?	Smith et al, 1976. (e)
<u>Moraxella nonliquefaciens</u>	<u>Mn11</u>	CCTC (j)	Zabeau et al, ONP (e)
<u>Moraxella nonliquefaciens</u>	<u>Mnn1</u> (<u>HindII</u>)	GTPIPuAC	Hanberg et al, ONP (e)
	<u>Mnn11</u> (<u>HaeIII</u>)	GGCC	Hanberg et al, ONP (e)
	<u>Mnn111</u>	?	Hanberg et al, ONP (e)
	<u>MnnIV</u> (<u>HhaI</u>)	GCGC	Hahberg et al, ONP
<u>Moraxella osloensis</u>	<u>Mos1</u> (<u>MboI</u>)	GATC	Gelinas et al, 1977 (e)
<u>Moraxella species</u>	<u>Mspl</u> (<u>HpaII</u>)	CCGG	Van Montagu et al ONP
<u>Myxococcus virescens</u>	<u>Mvil</u>	?	Morris et al, 1976
	<u>Mv111</u>	?	Morris et al, 1976 (e)
<u>Neisseria gonorrhoea</u>	<u>Ngol</u> (<u>HaeIII</u>)	PuGCGCPi	Wilson et al, ONP
	<u>Ngol1</u> (<u>HaeIII</u>)	GGCC	Clanton et al, 1978 (e)
<u>Proteus vulgaris</u>	<u>Pvul</u>	CGATCG	Gingeras et al, ONP (e)
	<u>Pvul1</u>	CAG↓CTG	Gingeras et al, ONP (e)
<u>Providencia alcalifaciens</u>	<u>Pal1</u> (<u>HaeIII</u>)	GGCC	Gelinas et al, ONP
<u>Providencia stuartii</u> 164	<u>Pst1</u>	CTGCA↓G	Brown et al, 1976 Smith et al, 1976 + +
<u>Pseudomonas facilis</u>	<u>Pfal</u>	?	Olson et al, ONP Van Montagu, ONP (e)

<u>MICROORGANISMO</u>	<u>ENZIMA</u> (b)	<u>SECUENCIA</u> (c)	<u>REFERENCIAS</u> (d)
<u>Rhodopseudomonas sphaeroides</u>	<u>RspI</u>	?	Bingham et al, ONP (e)
<u>Rhodopseudomonas sphaeroides</u>	<u>RshI (PvuI)</u>	CGATCG	Gardner et al, ONP (e)
<u>Serratia marcescens</u> S _b	<u>SmaI</u>	CCC↓GGG	Endow et al, 1977; Greene et al, ONP (e)
<u>Serratia species</u> SAI	<u>SspI</u>	?	Torheim, CP (k)
<u>Staphylococcus aureus</u> 3A	<u>Sau3A (MboI)</u>	GATC	Sussenbach et al, 1976
<u>Staphylococcus aureus</u> PS96	<u>Sau96 I (AsuI)</u>	G↓GNCC	Sussenbach et al, 1978 (e)
<u>Streptococcus faecalis</u> var. zymogenes	<u>SfaI (HaeIII)</u>	GGCC	Wu et al, ONP
<u>Streptococcus faecalis</u> ND547	<u>SfaNI</u>	GATGC	Sciaky et al, ONP (e)
<u>Streptomyces achromogenes</u>	<u>SacI</u>	GAGCT↓C	Arrand et al, ONP (e)
	<u>SacII</u>	CCGC↓GG	Arrand et al, ONP (e)
	<u>SacIII</u>	?	Arrand et al, ONP (e)
<u>Streptomyces albus</u>	<u>SalPI (PstI)</u>	CTGCAG	Chater, 1977 (e)
<u>Streptomyces albus</u> subspecies pathoclicus	<u>SpaI (XhoI)</u>	CTCGAG	Takahashi, ONP
<u>Streptomyces albus</u> G	<u>SaII</u>	G↓TCGAC	Arrand et al, 1978
	<u>SaIII</u>	?	Arrand et al, 1978 (e)
<u>Streptomyces bobiliae</u>	<u>SboI</u>	?	Takahashi et al, ONP

MICROORGANISMO	(b) ENZIMA	(c) SECUENCIA	(d) REFERENCIAS
<u>Streptomyces bradiae</u>	<u>SbrI</u>	?	Takahashi et al, ONP ^(e)
<u>Streptomyces exfoliatus</u>	<u>SexI (XhoI)</u>	CTCGAG	Takahashi, ONP ^(e)
<u>Streptomyces goshikiensis</u>	<u>SgoI (XhoI)</u>	CTCGAG	Takahashi, ONP ^(e)
<u>Streptomyces griseus</u>	<u>SqrI</u>	?	Arrand et al, ONP
<u>Streptomyces hygroscopicus</u>	<u>ShyI</u>	?	Walter et al, 1978 ^(e)
<u>Streptomyces lavendulae</u>	<u>Slal (XhoI)</u>	C↓TCGAG	Takahashi et al, ONP ^(e)
<u>Streptomyces luteoreticuli</u>	<u>Slul (XhoI)</u>	CTCGAG	Takahashi, ONP ^(e)
<u>Streptomyces stanford</u>	<u>SstI (SacI)</u>	GAGCT↓C	Goff et al, ONP
	<u>SstII (SacII)</u>	CCGC↓GG	Muller et al, ONP ^(e)
	<u>SstIII (SacIII)</u>	?	Goff et al, ONP ^(e)
<u>Thermoplasma acidophilum</u>	<u>Thal (FnuDII)</u>	CG↓CG	McConnell et al, 1978 ^(e)
<u>Thermopolyspora glauca</u>	<u>TqII (SacII)</u>	CCGCGG	Gingeras et al, ONP
<u>Thermus aquaticus</u> YTI	<u>TaqI</u>	T↓CGA	Sato et al, 1977 ^(e)
	<u>TaqII</u>	?	Roberts et al, ONP
<u>Xanthomonas amaranthicola</u>	<u>XamI (SalI)</u>	GTCGAC	Arrand et al, 1978
<u>Xanthomonas badrii</u>	<u>XbaI</u>	T↓CTAGA	Zain et al, 1977
<u>Xanthomonas holcicola</u>	<u>XhoI</u>	C↓TCGAG	Gingeras et al, 1978 + ; Muller et al, ONP ^(e)

<u>MICROORGANISMO</u>	<u>ENZIMA</u> ^(b)	<u>SECUENCIA</u> ^(c)	<u>REFERENCIAS</u> ^(d)
<u>Xanthomonas holcicola</u>	<u>Xho</u> II	?	Olson et al, ONP ^(e)
<u>Xanthomonas malvacearum</u>	<u>Xma</u> I	C↓CCGGG	Endow et al, 1977
	<u>Xma</u> II (<u>Pst</u> I)	CTGCAG	Endow et al, 1977
<u>Xanthomonas nigromaculans</u>	<u>Xni</u> I (<u>Pvu</u> I)	CGATCG	Hanberg et al, ONP ^(e)
<u>Xanthomonas oryzae</u>	<u>Xor</u> I (<u>Pst</u> I)	CTGCAG	Shedlarski et al, ONP ^(e)
	<u>Xor</u> II (<u>Pvu</u> II)	CGATCG	Shedlarski et al, ONP ^(e)
<u>Xanthomonas papavericola</u>	<u>Xpa</u> I (<u>Xho</u> I)	C↓TCGAG	Gingeras et al, 1978.

NOTAS AL PIE DE LA TABLA

- a. Por conveniencia, las endonucleasas que cortan al DNA en una secuencia específica se denotan enzimas de restricción; sin embargo, en la mayoría de los casos, no existe evidencia genética de la presencia de un sistema modificación-restricción.
- b. Las enzimas de modificación y restricción llevan la nomenclatura propuesta por Nathans y Smith (Smith et al, 1973). Los isozquisómeros o enzimas que reconocen la misma secuencia se indican con un paréntesis.
- c. La base modificada por la metilasa específica se indica con un asterisco. N⁶-metiladenosina se encuentra en el caso de Eco B, Eco K, Eco PI, Eco RI, HindI, HindII y HindIV; 5-metilcitosina en el caso de EcoRII, HaeIII, HpaII, BsuRI, y BbrSI. Todas las secuencias están escritas en sentido 5' ---- 3'.
- d. Cuando se da más de una referencia, la notación + indica la purificación de la endonucleasa de restricción, y / la de modificación.
- e. Las observaciones no publicadas se indican con las iniciales ONP.
- f. HgaI corta en la siguiente forma:
$$\begin{array}{l} 5' - \text{GACGCNNNNN} \downarrow - 3' \\ 3' - \text{CTGCGNNNNNNNNNN} \uparrow - 5' \end{array}$$
- g. Los siguientes oligonucleótidos metilados han sido aislados de DNA modificado de EcoB
 $\begin{array}{l} * \\ * \\ * \\ * \end{array}$ TGA, CAC, AGAC, AAT, (A,G,C,)*A. A es N⁶-metiladenosina.
- h. HphI corta de la siguiente manera:
$$\begin{array}{l} 5' - \text{GGTGANNNNNNNN} \downarrow - 3' \\ 3' - \text{CCACTNNNNNNNN} \uparrow - 5' \end{array}$$
- i. MboI corta como se indica:
$$\begin{array}{l} 5' - \text{GAAGANNNNNNNN} \downarrow - 3' \\ 3' - \text{CTTCTNNNNNNNN} \uparrow - 5' \end{array}$$
- j. MnII corta de 5 a 10 bases 3' de la secuencia reconocida.
- k. En el caso de datos obtenidos por comunicación personal se indica como CP.

I. IV. CARACTERIZACION.

Pocas endonucleasas de restricción han sido caracterizadas genética y bioquímicamente. Una excepción es EcoRI, que ha sido purificada hasta casi homogeneidad (Greene et al, 1974). Esta enzima tiene un peso molecular de 59,000 y una subunidad de 29,500. (Boyer et al, 1974; Dussoix et al, 1974). También se sabe que, tanto esta enzima como EcoRII son codificadas por plásmidos (Arber et al, 1965; Smith et al, 1976), mientras que BsuRI es codificada por el cromosoma (Trautner et al, 1974). Sin embargo el principal interés en estas enzimas se ha centrado en su gran utilidad como "herramientas" bioquímicas y no en la descripción de la proteína misma en relación a su composición de subunidades, peso molecular, composición de aminoácidos, etc. Por esta razón, la característica fundamental a determinar, es la secuencia nucleotídica que la enzima reconoce, y la optimización de algunos factores que afectan la estabilidad enzimática como son: pureza, temperatura, pH, concentración de NaCl. Para determinar la actividad enzimática es necesario conocer los requerimientos de Mg^{2+} y la unidad de enzima obtenida, esto es, la cantidad de enzima, expresada en volumen, que se requiere para digerir totalmente un microgramo de bacteriofago lambda en una hora a $37^{\circ}C$ y en un volumen final de 50 microlitros. (Roberts et al, 1976).

II. MATERIALES Y METODOS.

II.1. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

a) Haemophilus parainfluenzae.

Estas células se cultivaron en microfermentador en un medio conteniendo 37g de caldo cerebro-corazón, 0.2 ml de solución patrón de dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD 10 mg/ml) y 10 ml de solución patrón de hemina por litro (0.1% de hemina en 4% trietanolamina esterilizada a 65 °C, 15 min. y guardada a 4 °C), se esterilizó por filtración y se guardó a -20 °C. Un cultivo de 500 ml inoculado con una sola colonia y crecido durante 16 horas se utilizó para inocular 12 litros de medio en el microfermentador; esta mezcla se incubó durante 7 horas a 37 °C con agitación continua (300-500 rpm).

El incremento en la densidad celular se midió en un fotómetro Klett-Summerson usando un filtro verde. Las células se centrifugaron cuando la densidad celular dejó de aumentar (400-600 unidades Klett).

b) Streptomyces albus NRRL-5778 y Arthrobacter sp. NRRL-B3726.

Las células se crecieron en 2 litros de medio conteniendo extracto de levadura al 0.4 %, extracto de malta al 1.0 %, bacto-dextrosa al 0.4 %, pH 7.3, incubando durante 80 horas a 29 °C y 200 rpm.

c) Xanthomonas axonopodis. BM-21-302.

Estas bacterias se crecieron en dos litros de medio con teniendo extracto de levadura al 0.1 %, extracto de malta al 1.0 %, bacto-dextrosa al 0.2 % durante 48 hrs. a 29 °C con una agitación de 200 rpm.

d) Streptomyces lieskei BM-11-104 y Streptomyces phaeochromogenes NNRL B-3559.

Se prepararon dos litros de medio con extracto de levadura al 0.4 %, extracto de malta al 0.3 %, bacto-dextrosa al 2.0 % inoculando las células e incubando durante 80 hrs a 29 °C y 200 rpm.

El inóculo en cada caso se preparó creciendo el microorganismo en placas con medio completo (el mencionado para cada bacteria) durante 96 hrs hasta esporulación. Se colectaron las esporas y se agregaron a 10 ml de NaCl al 0.85 % formando una suspensión que se adicionó directamente al medio de cultivo.

e) Leuconostoc mesenteroides NRRLB-512-F.

Se prepararon dos litros de medio conteniendo, por litro 10 g de bacto-peptona, 10 g de extracto de carne, 5 g de levadura, 20 g de bacto-dextrosa, 1 ml de Twen 80 (detergente), 2 g de K_2HPO_4 , 5 g de acetato de sodio, 0.2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g de $MnSO_4$ y 2.0 g de citrato de amonio. Se tomaron esporas de las bacterias y se pusieron en 10 ml de medio

MRS, en el que se incubaron durante 12 hrs con agitación a 29°C. Después se transfirieron a dos matraces conteniendo, cada uno, un litro de medio, se incubaron a 29°C durante 80 hrs, agitando a 200 rpm.

Las especies Arthrobacter sp NRRL-B3726, Streptomyces albus NRRL-B5778 y Streptomyces phaeochromogenes NRRL-B3559 fueron donadas por el Northern Regional Research Laboratory, Peoria, E.U. a través del Dr. Sergio Sánchez, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Xanthomonas axonopodis fue un obsequio de la Dra. Martha Albores de la Facultad de Química, UNAM, y Streptomyces lieskei fue donada por el Dr. Sergio Sánchez.

f) Como huéspedes de los plásmidos pBR26, pBR322 y pMB9 se utilizaron células de E. coli K-12 RR1, las cuales se crecieron en caldo Luria (LB), que contiene bacto-triptona al 1.0%. extracto de levadura al 5.0 %, NaCl al 1.0 % y NaOH 2.5 mM, incubando a 37°C con agitación durante 12 horas.

11.11 PREPARACION DE LOS SUSTRATOS ENZIMATICOS.

Los sustratos utilizados para probar la actividad enzimática fueron los plásmidos pBR322, pBR26 y pMB9 (Bolívar et al, 1977 a y b), purificados de acuerdo al método descrito por Betlach (Betlach et al, 1976) o método del lisado claro conforme a los siguientes pasos:

1. Incubar 10 ml de cultivo en caldo Luria (LB) a 37°C toda la noche.
2. Tomar 5 ml de este cultivo y agregarlo a 1 litro de medio mínimo M9 (20 ml de glucosa al 20 %, 4g de caseína (Difco), 10 ml de $MgSO_4$ 0.1M, 10 ml de $CaCl_2$ 0.01M, 100 ml de sales 10X (por litro: 132g de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 30g de KH_2PO_4 , 5g de NaCl, 10g de NH_4Cl).
3. Incubar a 37°C con agitación y aireación hasta llegar a una densidad de 4.5×10^8 células/ml (35-40 unidades Klett, filtro rojo) y agregar antibiótico para amplificar (Clewell et al, 1972). Continuar la aireación durante 16 ± 2 hrs.
4. Centrifugar 10 min a 6,000 rpm, a 4°C en el rotor GSA (Sorvall).
5. Congelar las células.
6. Resuspender las células en 10 ml/l de sacarosa al 25 %, Tris pH 8 50 mM, EDTA pH 8 1mM y mantener en hielo.
7. A 4°C añadir: 2ml de EDTA 0.25mM pH 8, 1 ml de lisozima (5mg/ml) en Tris HCl 0.25mM pH 8, 0.1 ml de RNasa (10 mg/ml en acetato de sodio 0.1M, EDTA 3.3×10^{-5} M, pH 7, precalentada durante 10 min a 85°C para quitar la DNasa.
8. Mezclar y dejar reposar en hielo durante 15 min.
9. Agregar 3 ml de mezcla lítica Triton 3X (3 ml de Tritón X-100 al 10 %, 75 ml de EDTA 0.25M pH 8, 15 ml de Tris 1M pH 8 y 7 ml de agua). Mezclar suavemente y mantener a 4°C.

10. Centrifugar en tubos de polipropileno a 18,000 rpm por 30 min a 4°C en el rotor SS34 (Sorvall).
11. Decantar inmediatamente el sobrenadante a una probeta de plástico graduada, anotar el volumen y pasarlo a una botella de plástico de 250 ml.
12. Agregar un volumen igual de agua desionizada. Esto hace a la sacarosa menos densa que el fenol.
13. Agregar un volumen igual, respecto al total, de fenol frío saturado. (solución amortiguadora de fenol saturado: mezcla 1:1 de fenol y Tris HCl 50mM, NaCl 100mM pH7.5, equilibrar toda la noche con agitación a 4°C). Mezclar y agregar un volumen de cloroformo igual al del fenol.
14. Centrifugar 10 min a 6500 rpm y 4°C en el rotor HS-4
15. Remover la fase superior (acuosa) y pasarla a otra botella. (Evitar la película de proteína desnaturalizada de la interfase).
16. Agregar lentamente 1/30 del volumen de NaCl 5M a la fase acuosa. Añadir 2.2 volúmenes de etanol a -20°C. Dejar reposar a -20°C por 3 hrs o más.
17. Centrifugar 45 min a 7,000 rpm a -5°C en el rotor HS-4. Descartar el sobrenadante y secar el exceso de líquido de la botella con una corriente de aire suave.
18. Resuspender el precipitado en 4 ml de agua. Agregar 1 ml de glicerol 80 % y mezclar suavemente (el glicerol hace a la solución más densa, de tal manera que el DNA baja en la

en la superficie de la columna.)

19. Colocar la suspensión en una columna de 2 X 35 cm de A50 (BioRad)(partículas de gel de agarosa para la cromatografía por filtración) equilibrada con solución amortiguadora A50 (Tris 50mM, NaCl 500mM pH 8, NaN₃ 1mM, EDTA 1mM pH 8.). Colectar fracciones de 4 ml a temperatura ambiente.

20. Determinar la densidad optica a 260 nm para cada fracción (D.O. de 1.0 = 50g de DNA/ml). El DNA generalmente se encuentra entre los tubos 12 y 20.

21. Juntar las fracciones que contienen DNA. Agregar 2 volúmenes de etanol a -20°C, congelar por una hora o más. Centrifugar en el rotor HS-4 60 min a 6,500 rpm y a 5°C.

22. Secar el precipitado con aire.

23. Resuspender el precipitado en 2.1 ml de solución amortiguadora TEN (Tris HCl 10 mM pH 7.6, NaCl 10 mM, EDTA 1mM) por cada 500 g de DNA.

24. Gradiente isopícnico a equilibrio en cloruro de cesio/ yoduro de propidio (Pdl).

Preparación del gradiente:

Agregar a los tubos 5ml de nitrato de celulosa (1/2" x 2") por tubo: 2.2g de CsCl sólido y 2.1 ml de DNA en TEN (los tubos no deben contener más de 500g de DNA c/u). A partir de este momento se debe trabajar en la oscuridad porque el Pdl reacciona con la luz. Agregar 150 ul de Pdl (solución de 2mg/ml). Cubrir con 2.3 ml de aceite mineral. Todos los tubos se equilibran dentro de las camisas con aceite mineral.

25. Centrifugar durante 20 hrs a 20°C en el rotor SW50.1 (Beckman), a 38,000 rpm.
26. El DNA en el gradiente se puede ver con luz U.V. dado que el Pdl fluoresce en presencia de ésta. Se observan 2 bandas: la superior contiene al DNA bacteriano y de plásmido roto, la inferior es el plásmido superenrollado covalentemente cerrado (los intermediarios de replicación producen un barrido entre ambas bandas).
27. En la oscuridad bajo luz U.V. picar el fondo de los tubos y coleccionar lentamente el DNA de plásmido en un tubo.
28. Montar una columna pequeña (2 ó 3ml) de resina de intercambio iónico (Dowex 50W-X8 BioRad, tratada con ácido y luego base 1N c/u, neutralizada y almacenada en Tris HCl 0.1M pH 8, NaCl 0.5M), equilibrada con 10 ml de solución amortiguadora de resina Dowex (Tris HCl 50mM pH 8, NaCl 1M, EDTA 1mM), por cada ml de resina.
29. Diluir el DNA 1:1 con amortiguador de Dowex y pasarlo lentamente por la columna, lavando con un volumen de columna. Revisar con luz U.V. que todo el Pdl haya quedado en la resina, si no es así, pasar la fracción eluida por otra columna igual.
30. Dializar el DNA contra 2.4 litros de Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM pH 8, por 12 horas o más a 4°C. Cambiar la solución y seguir dializando 6 horas o más.
31. Sacar de la bolsa de diálisis y precipitar añadiendo 1/20 del volumen de NaCl, 2.2 volúmenes de etanol a -20°C por 3 hrs

32. Centrifugar: rotor HS-4, 6,500 rpm, 1 hr a -5°C .
33. Resuspender en 0.5-1 ml de TEN. Checar la D.O. A 260 nm para determinar la concentración de DNA (usualmente 0.5- 1 mg/ml). Guardar a -20°C .

11: III. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA Y POLIACRILAMIDA.

Para observar los fragmentos de DNA generados por las enzimas de restricción, se coloca la mezcla de reacción en geles de agarosa o acrilamida, en donde los fragmentos son separados en orden de tamaños por sus pesos moleculares. La técnica de preparación de estos geles se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones descritas por Bolívar et al, 1977:

a. Preparación de geles de agarosa al 1 % para fragmentos de alto peso molecular 1-13 Megadalton (Md).

Se disuelve 1.0g de agarosa en 100 ml de solución amortiguadora de Tris-boratos-EDTA (Trizma Base (Sigma) 90mM, EDTA 2.5mM., H_3BO_3 90mM, pH 8.2) calentando hasta ebullición. En caliente se vacía a los moldes para geles (formados por dos vidrios separados por espaciadores laterales y un "peine" en la parte superior interna del molde para dar forma a los carriles) y se deja gelificar. Posteriormente se quita el peine y se colocan las muestras en los carriles, conteniendo c/u de 0.2 a 1g de DNA. La electroforesis se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora, a 150V.

b. Preparación de geles de poliacrilamida al 7.5 % (para fragmentos de 0.015 a 1Md).

Se mezclan 3 ml de solución amortiguadora Tris-boratos-EDTA 10X, 7.5 ml de solución de acrilamida-bisacrilamida (BioRad) al 28 % y al 6 % respectivamente, 19.4 ml de agua y 150 ul de persulfato de amonio al 10 %. Se degasifica la mezcla al vacío y se adicionan 15 ul de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina BioRad) y se vacía en el molde dejando gelificar. En este caso la electroforesis se realiza a 200V durante 1 hr.

Terminada la electroforesis se tiñen los geles en una solución de bromuro de etidio de 4mg/ml (Clabiochem) y se observan con una lámpara de U.V. de onda corta (U.V. Prod).

Para fotografiar los geles se usó un filtro de gelatina amarillo No. 9 Kodak Wratten y película polaroid NP tipo SS con una cámara MP-5 Polaroid.

II. IV. DETERMINACION DE ACTIVIDADES PARA FRACCIONES OBTENIDAS DE LAS COLUMNAS DE CROMATOGRAFIA.

Las reacciones para determinar la actividad de las enzimas se realizaron en el siguiente medio:

Tris HCl 6mM pH 7.5

MgCl₂ 6mM

2-Mercaptoetanol 6mM

DNA pBR 26 1 ug

Fracción enzimática 2 ul

en un volumen final de 30 ul. Tomando la muestra enzimática de 2 ul cada 5 fracciones.

Esta mezcla se incubó 1 hr a 37°C. Posteriormente se corrió la electroforesis en agarosa, colocando una muestra en cada carril.

En el caso de la cromatografía en fosfocelulosa se midió la conductividad a las fracciones obtenidas y se compararon con una curva patrón de NaCl vs. conductividad. De esta manera se determinó la concentración de NaCl con la que eluyeron las fracciones activas observadas en los geles.

II. V. PURIFICACION DE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION.

La purificación de las enzimas se realizó conforme el método descrito por Greene et al, 1978.

a. Preparación del extracto celular. (Para 50g de células)
Todos los pasos realizados a 4°C.

1. Resuspender las células congeladas en 200 ml de solución amortiguadora de extracción B.E.: K_2HPO_4 pH 7.0, 2-Mercaptoetanol 7mM, EDTA 1mM pH 8, NaN_3 1mM. Más NaCl 0.4M.
2. La suspensión celular se somete a sonificación usando un aparato Branson W-350, en pulsos de 15-30" durante 8 min agitando y cuidando que la temperatura no rebase los 10°C.
3. Centrifugar el extracto 1 hr a 40,000 rpm en la centrifuga Beckman con el rotor type 60.
4. Decantar el sobrenadante y ajustar la conductividad a la

equivalente de la solución amortiguadora más NaCl 0.1M con un conductímetro.

5. Pasar el sobrenadante por una columna de fosfocelulosa de 200 ml.

b. Cromatografía en fosfocelulosa Whatman P11.

1. 125g de fosfocelulosa Whatman P11 se suspenden en una solución de 4 litros de HCl 0.2N 1:1 etanol al 95 %, y se agitan durante 30 min a T.A.

2. Dejar reposar la mezcla y aspirar el sobrenadante quitando los finos y demás materia particulada.

3. Filtrar al vacío.

4. Lavar 3 veces, cada vez con 4 litros de agua desionizada, agitando 15 min, reposando y succionando el sobrenadante.

5. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 1M.

6. Resuspender la resina en 4 litros de NaOH 0.1N y agitar 30 min a T.A.

7. Decantar el sobrenadante por succión y filtrar al vacío.

8. Lavar 3 veces con 4 litros de agua desionizada, agitando 15 min cada vez, reposando y succionando finos.

9. Ajustar el pH a 7.0 con HCl 1.0N

10. Resuspender en B.E. más NaCl 0.2M, ajustando cuidadosamente el pH a 7.0 antes de montar la columna.

11. A 4°C. Se empaca una columna de 2.5 x 35 cm (200 ml) con la fosfocelulosa ya lavada, y lavar con B.E.

12. Pasar directamente el extracto celular habiéndolo equi

libradò a la conductividad del buffer de la columna.

13. Lavar con varios volúmenes de B.E. más NaCl 0.1M

14. Eluir con un gradiente lineal de B.E. más NaCl de 0.1 a 0.8M.

15. Colectar fracciones de 5 ml y probar su actividad.

Determinar las fracciones activas, juntarlas y pasarlas por una columna de hidroxilapatita. Todo a 4°C.

c. Cromatografía en hidroxilapatita.

1. Se montaron 2 columnas de hidroxilapatita (Clarkson Chemical Co.), una de ellas de 10 ml para las fracciones de HpaI y otra de 27.5 ml para las fracciones de HpaII.

2. Ambas columnas fueron empacadas y equilibradas con B.E. más NaCl 0.2M.

3. Las fracciones activas obtenidas de la fosfocelulosa fueron aplicadas directamente a sus respectivas columnas.

4. Se lavaron las columnas con una cantidad de 3 veces su volumen con B.E. más 0.2M de NaCl.

5. Las enzimas se eluyeron con un gradiente lineal de fosfatos con un volumen equivalente a 10 veces el tamaño de cada columna, aumentando la concentración de 10 a 200mM de K_2HPO_4 - KH_2PO_4 pH 7.0 conteniendo EDTA 1mM, 2-mercaptoetanol 7mM, NaN_3 1mM y NaCl 0.2M, colectando las fracciones de 1.5 ml para la columna chica (HpaI) y de 3ml para la grande (HpaII).

6. Se determinaron las fracciones activas usando como sustratos al pBR322 y al pBR26. Se juntaron respectivamente y se dializaron.

d. Diálisis.

Las fracciones activas obtenidas se dializaron contra una solución amortiguadora de K_2HPO_4 - KH_2PO_4 pH 7.0 20mM, NaCl 0.2M, EDTA 1mM, 2 mercaptoetanol 7mM, NaN_3 1mM; diluida 1:1 glicerol grado espectrofotométrico.

La diálisis concentra 3 veces la actividad enzimática y las enzimas en esta solución son estables por muchos meses guardadas a $-20^\circ C$.

f. Titulación de las enzimas y detección de exonucleasas.

1. Titulación:

Con las enzimas obtenidas se realizaron las sig. reacciones:

Para HpaI

13 ug DNA pMB9 (0.8ug/ul)

26 ul Buffer 10X HpaI (Tris HCl 100mM pH 7.5
MgCl₂ 50mM, 2M.E. 10mM)

4 ul HpaI

260 ul totales, incubando a $37^\circ C$, tomando alícuotas en diferentes tiempos.

Para HpaII

13 ug DNA pBR322 (1.15 ug/ul)

26 ul Buffer 10X HpaII (Tris HCl pH 7.5
60mM, MgCl₂ 60mM, 2M.E. 60mM)

3 ul HpaII

en 260 ul totales, incubando a $37^\circ C$ por 90 min y tomando alícuotas en diferentes tiempos.

2. Presencia de exonucleasas.

Para detectar la presencia de alguna exonucleasa se di-

girieron 2 ug de pBR26 con un ul de HpaI y 2 ug de pBR322 con un ul de HpaII en 20 ul totales durante 3, 6 y 12 hrs de incubación a 37°C. Todas estas reacciones se sometieron a electroforesis en poliacrilamida al 7.5 % durante 1 hr a 200V y T.A.

III. RESULTADOS.

III. 1. PURIFICACION DE HpaI y HpaII.

El extracto celular para la obtención de HpaI y HpaII se preparó con 50g de células congeladas de Haemophilus parainfluenzae diluidas en 200 ml de B.E. más NaCl 0.4 M, el cual, después de sonificarlo y diluirlo, se pasó por una columna de 220 ml de fosfocelulosa y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 1200 ml en la misma solución. Se colectaron 240 fracciones de 5 ml c/u, cuya concentración de NaCl se determinó de acuerdo a la curva patrón de conductividad vs. concentración de NaCl (Tabla 2).

Las fracciones activas correspondientes a HpaI se observaron entre las fracciones # 55 y 95. Estas fracciones presentaron una conductividad de 10.3 a 11.3 miliohm⁻¹ y una concentración de NaCl de 0.21 a 0.3M, con máxima actividad en 12.5 miliohm⁻¹ y 0.25M de NaCl. (Figs. 3 y 4; tabla 3)

Las fracciones 110 a 160 mostraron contener a HpaII, con un intervalo de conductividad de 15.3 a 22.5 miliohm⁻¹ y 0.317 a 0.445 M de NaCl. Su máxima actividad se obtuvo en la fracción 130 a 16.1 miliohm⁻¹ y a 0.32 M de NaCl. (Figs 3 y 4; tabla 3).

La conductividad de las fracciones se midió en el conductímetro y , a partir de la curva patrón, se interpoló la concentración de NaCl correspondiente. Estos resultados se presentan en la tabla 3.

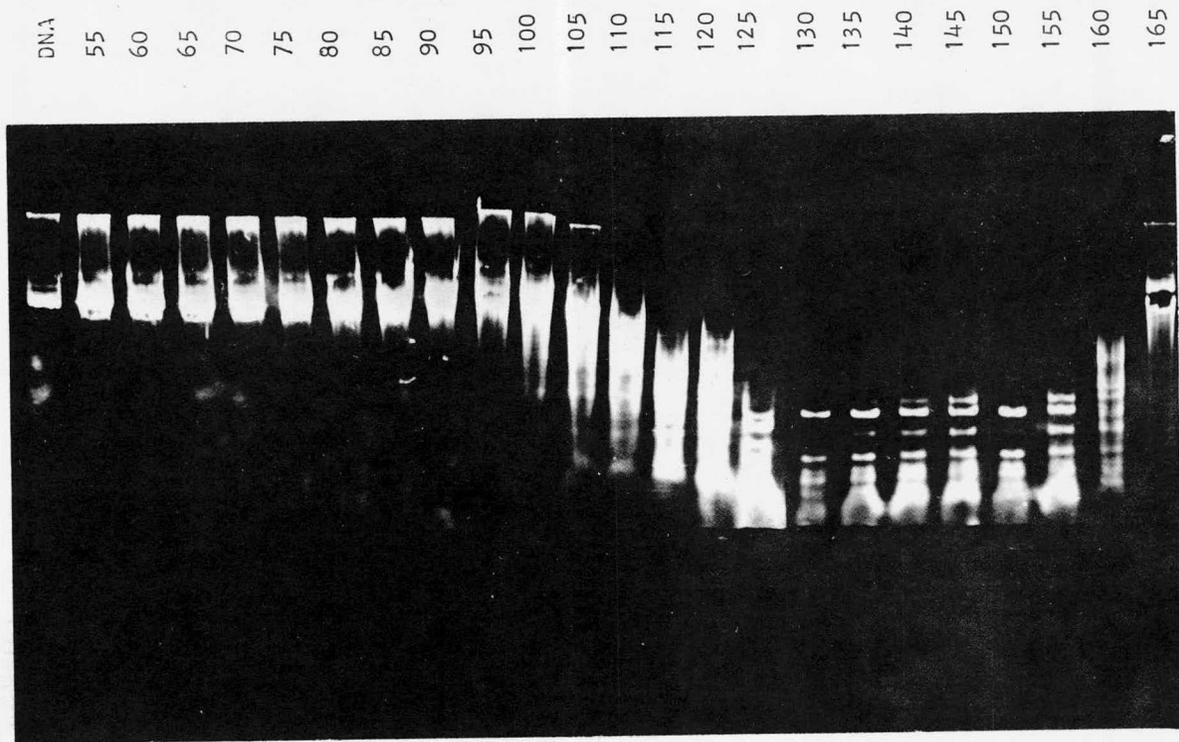


Fig. 3. Fracciones activas obtenidas de la cromatografía en fosfocelulosa durante la purificación de HpaI y HpaII.

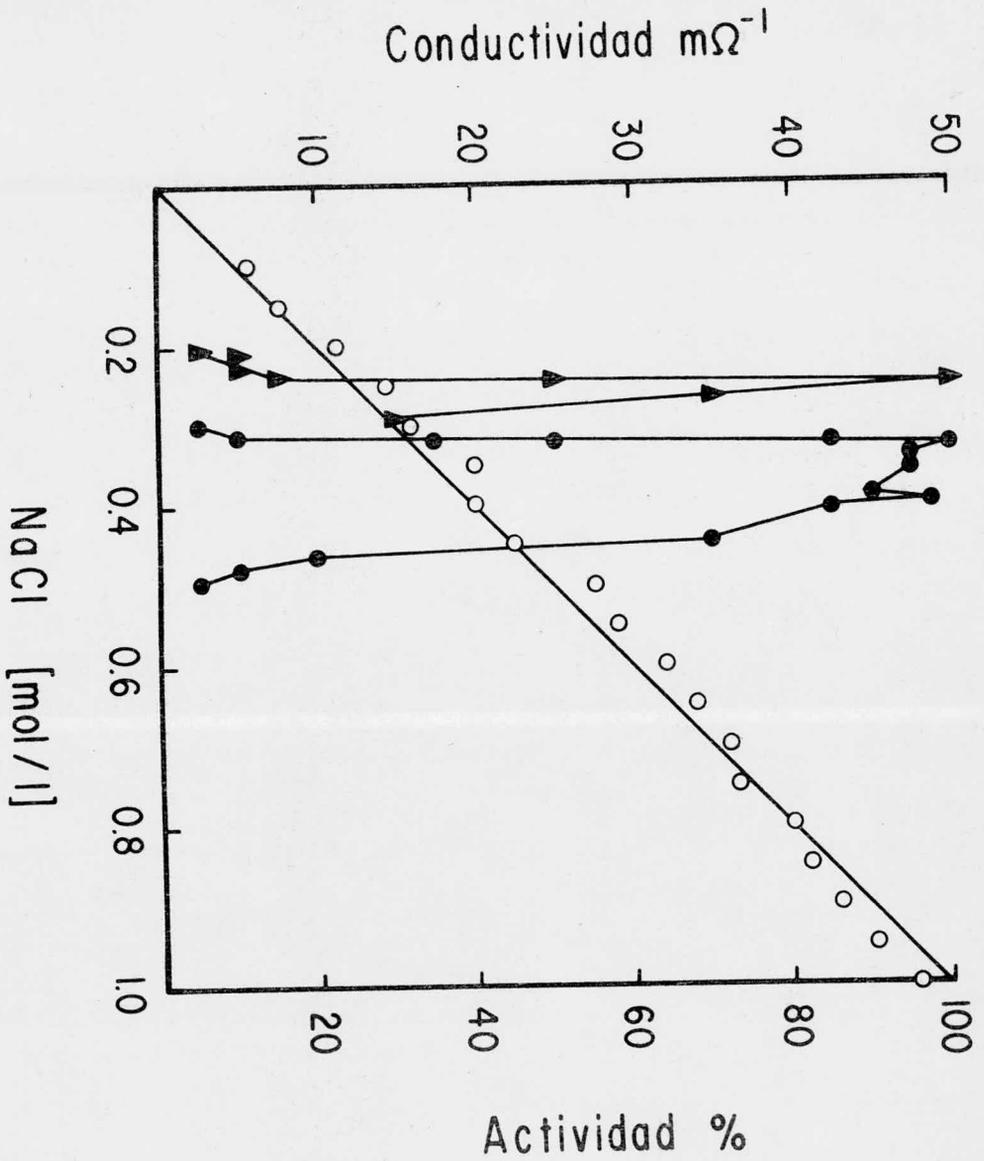


Fig. 4. Curvas de Actividad obtenidas para Hpal \blacktriangle y HpalI \bullet

TABLA 2.

CONCENTRACION NaCl mol/litro	CONDUCTIVIDAD -1 mili ohm
0.10	5.6
0.15	7.5
0.20	11.4
0.25	14.5
0.30	16.0
0.35	19.9
0.40	20.0
0.45	22.5
0.50	27.5
0.55	29.1
0.60	32.0
0.65	34.0
0.70	36.0
0.75	36.0
0.80	40.0
0.85	41.0
0.90	43.0
0.95	45.0
1.00	48.0

TABLA 3.

FRACCION No.	CONDUCTIVIDAD -1 mili ohm	NaCl mol/litro	ACTIVIDAD %
1	6.6	0.135	-
5	6.1	0.120	-
10	6.1	0.120	-
15	5.5	0.112	-
20	5.4	0.110	-
25	5.9	0.120	-
30	5.9	0.120	-
35	5.5	0.112	-
40	6.9	0.140	-
45	7.5	0.150	-
50	9.0	0.180	-
55	10.3	0.205	5
60	10.5	0.210	10
65	11.5	0.230	10
70	11.9	0.240	15
75	12.4	0.245	50
80	12.5	0.250	100
85	12.2	0.256	75
90	12.9	0.260	60
95	13.1	0.261	50
100	14.5	0.290	30
105	15.0	0.300	5
110	15.3	0.317	10
115	15.9	0.320	35

FRACCION No.	CONDUCTIVIDAD -1 mili ohm	NaCl mol/litro	ACTIVIDAD %
120	16.0	0.320	50
125	16.3	0.325	85
130	16.5	0.330	100
135	17.1	0.340	95
140	17.8	0.360	95
145	19.5	0.392	90
150	20.1	0.400	97
155	20.2	0.405	85
160	22.5	0.445	70
165	22.9	0.463	20
170	24.0	0.482	10
175	26.0	0.495	5
180	28.2	0.565	-
185	28.5	0.575	-
190	28.6	0.576	-
200	28.0	0.565	-
205	29.5	0.595	-
210	30.0	0.605	-
215	31.0	0.625	-
220	31.0	0.625	-
230	32.5	0.650	-
235	33.0	0.665	-
240	34.0	0.685	-

Las fracciones activas obtenidas de cada enzima se juntaron y se pasaron por una columna de hidroxilapatita respectivamente.

De la columna correspondiente a HpaI se obtuvieron 20 fracciones activas de 3 ml, y de la correspondiente a HpaII 60 fracciones activas del mismo volumen.

Después de juntarlas y dializarlas, se titularon las fracciones activas y se observó que HpaI digiere 1 ug de DNA con 4 ul de enzima en 70 min a 37 en un volumen total de 40 ul, mientras que 1 ul de HpaII digiere 4 ug de DNA en 50 min, a 37°C, con un volumen final de 87 ul. (Fig. 5)

Posteriormente se digirieron 2 ug de DNA con cada enzima durante 12 horas y no se observó ningún "barrido" que indicara la presencia de exonucleasas.

III. II. ENSAYOS.

En la búsqueda de actividad endonucleolítica específica se realizaron ensayos con las sig. bacterias:

- a) Streptomyces albus NRRL-5778
- b) Xanthomonas axonopodis BM-21-302
- c) Arthrobacter species NRRL-B3726
- d) Streptomyces lieskei BM11-104
- e) Leuconostoc mesenteroides NRRLB-512-F
- f) Streptomyces phaeochromogenes NRRL B-3559

Los extractos celulares, de un litro de cada uno de los cultivos originales, una vez sonicados y centrifugados (ex

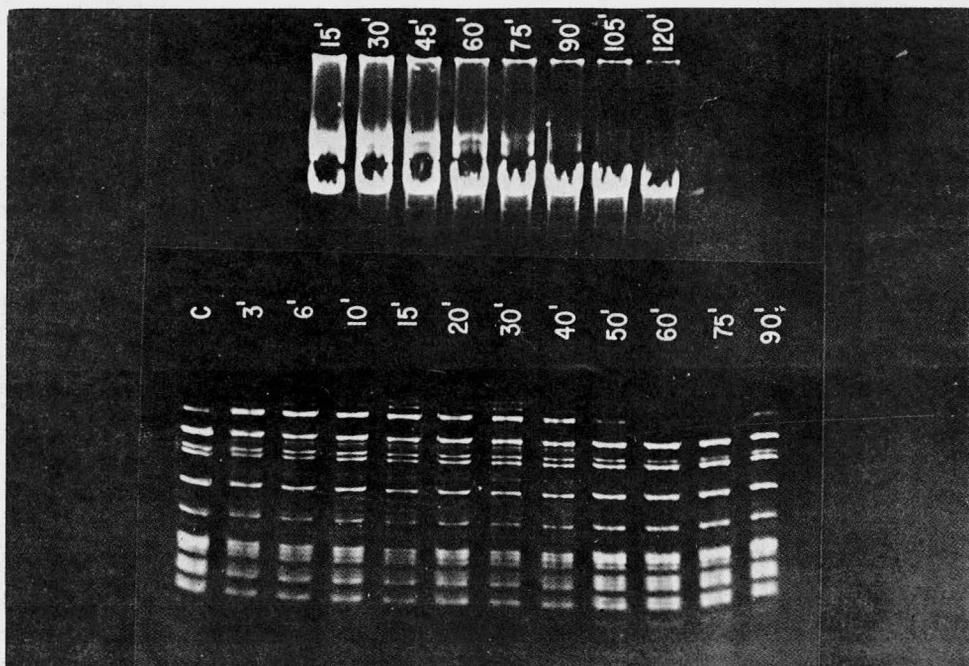
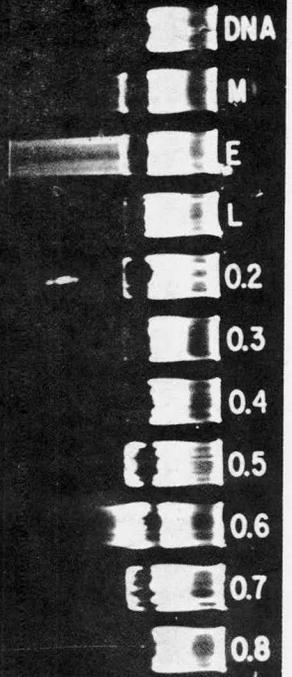
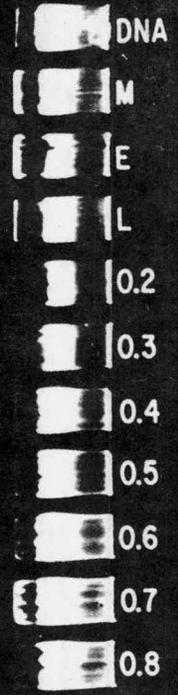
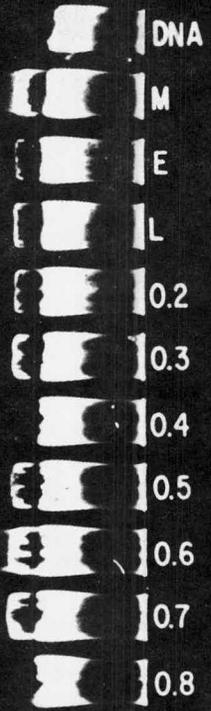
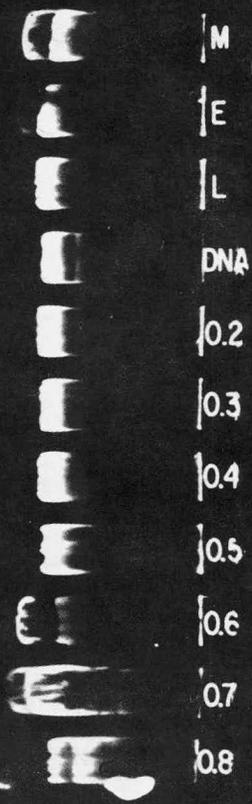


Fig. 5. Titulación de HpaI (superior) y HpaII(inferior).



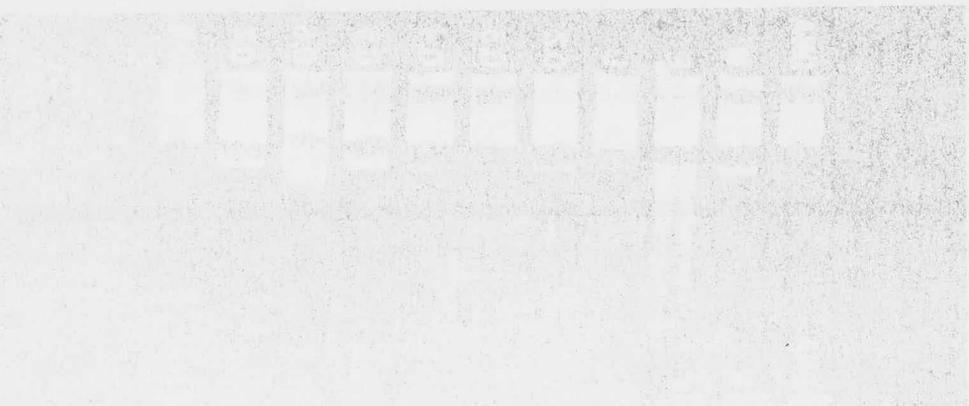


Fig. 6. Ensayos enzimáticos con diferentes bacterias.

M= extracto crudo. E=extracto eluido. L=lavado. Las fracciones decimales indican la concentración correspondiente de NaCl en moles/litro con la que eluyeron las fracciones respectivas.

La figura superior muestra los resultados obtenidos de las pruebas con Streptomyces albus NRRL-5778. La segunda corresponde a Xanthomonas axonopodis BM-21-302. La tercera a Arthrobacter sp. NRRL-B3726. y la última a Streptomyces phaeochromogenes NRRL B3559.

tractos crudos) se pasaron por columnas de fosfocelulosa de 5 ml, a 4°C y se eluyeron con fracciones sucesivas de 5 ml de B.E. más NaCl 0.1M, más 0.2M, ..., más NaCl 0.8M.

Cada fracción se hizo reaccionar con pBR26 una hora a 37°C, observándose actividad nucleolítica en algunas fracciones de los siguientes cultivos: (Fig. 6)

a) Streptomyces albus: 0.2, 0.5, 0.6 y 0.7 M de NaCl, extracto crudo y extracto eluido.

b) Xanthomonas axonopodis: 0.7 M de NaCl, extracto crudo y extracto eluido.

c) Arthrobacter sp: 0.3, 0.5, 0.6, 0.7 M de NaCl, extracto crudo y extracto eluido.

Se juntaron las fracciones activas de Streptomyces albus, Xanthomonas axonopodis y Arthrobacter sp, respectivamente.

Con estas fracciones se realizaron dobles digestiones usando como sustrato tanto al pBR26 como al pBR322 de la siguiente manera: se digirieron ambos sustratos con la fracción activa de cada especie durante 1.5 hrs a 37°C; se paró la reacción calentándola a 65°C; se tomó una alícuota de la mezcla de reacción y se digirió con EcoRI 30 min a 37°C.

Por otro lado, de la misma forma, se realizaron dobles digestiones con las fracciones activas y SalI, y, por último una doble digestión con SalI-EcoRI en ambos sustratos.

De estas reacciones sólo Streptomyces albus mantuvo su actividad; sin embargo, no mostró realmente un patrón específico. (Fig. 7)

Posteriormente las fracciones supuestamente activas de

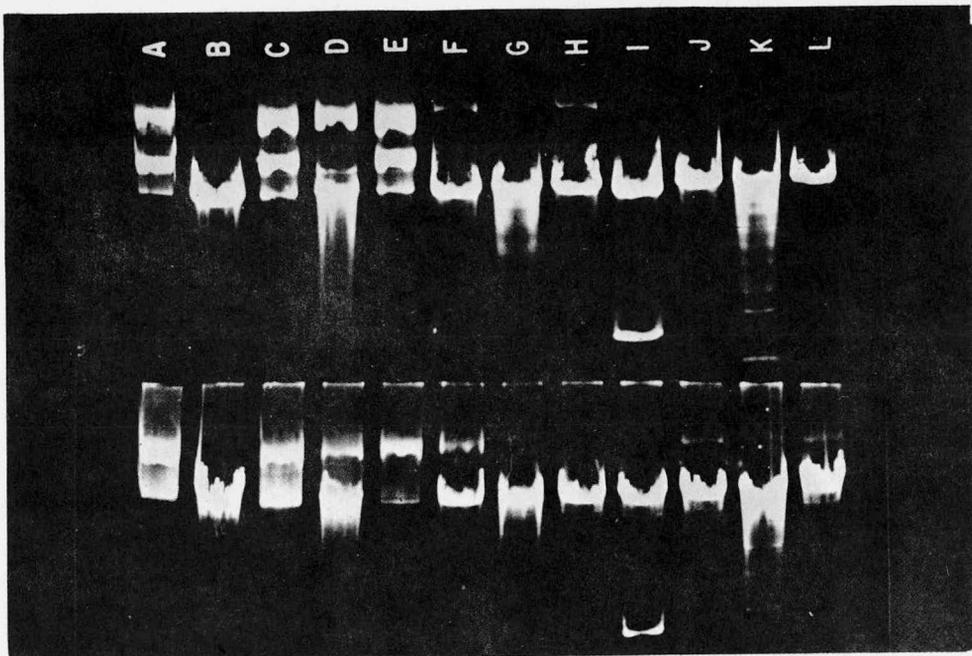


Fig. 7. Dobles digestiones con las fracciones activas de las diferentes bacterias en pBR322 (fig. superior) y en pBR26 (fig. inferior).

Carril A = DNA (control)

Carril B = DNA-SalI

Carril C = DNA-Arthrobacter sp.

Carril D = DNA-Streptomyces albus

Carril E = DNA-Xanthomonas axonopodis

Carril F = DNA-SalI-Arthrobacter sp

Carril G = DNA-SalI-Streptomyces albus

Carril H = DNA-SalI-Xanthomonas axonopodis

Carril I = DNA-SalI EcoRI

Carril J = DNA-Arthrobacter sp-EcoRI

Carril K = DNA-Streptomyces albus-EcoRI

Carril L = DNA-Xanthomonas axonopodis EcoRI

cada especie se pasaron por una columna de hidroxilapatita de 2 ml, con el objeto de concentrarlas, eluyendo con 2 ml de B.E. K_2HPO_4 - KH_2PO_4 0.1M y 2 ml de la misma solución, pero 0.2 M.

Se efectuaron las reacciones correspondientes para encontrar actividad en pBR322 y pBR26 sin éxito alguno.

Por otro lado, las fracciones activas de Streptomyces phaeochromogenes se juntaron y se pasaron por una columna de hidroxilapatita de 5 ml y se eluyeron con un gradiente lineal de 10mM a 200mM de fosfatos en 50 ml de B.E., obteniéndose 3 fracciones activas de 4 ml. Se juntaron y se dializaron vs. B.E. 1:1 glicerol. Sin embargo al realizar las pruebas con dobles digestiones, se observó la presencia de exonucleasas inespecíficas que interferían el patrón de digestión producido por la enzima.

Se repitió el ensayo con una mayor cantidad de células de Streptomyces phaeochromogenes (las obtenidas de 10 litros de cultivo) y se siguió el tratamiento anterior. La columna de fosfocelulosa utilizada en este caso fue de 40 ml y la enzima se eluyó de la columna con 400 ml de un gradiente lineal de B.E. de 0.1 a 0.8 M de NaCl, colectando 82 fracciones de 3.5 ml c/u, muestreándolas de 5 en 5 para probar su actividad. Las reacciones se ensayaron con pBR 322 y se observaron en geles de agarosa, resultando activas las fracciones 65 a la 74, con máxima actividad en la fracción 70. De esta fracción se tomó una alícuota de 75

ul y se digirieron 25 ug de pBR322 3hrs a 37°C; se realizó una extracción con fenol y cloroformo y se precipitó el DNA con etanol, se centrifugó y se resuspendió en buffer TE (Tris 10mM, EDTA 1mM pH 8). De esta reacción se tomaron muestras para realizar dobles digestiones con las siguientes enzimas: EcoRI, HindIII, BamHI, PstI, SalI, HaeIII y HpaII, de acuerdo a la tabla 4:

TABLA 4.

ENZIMA	VOL. ENZIMA	pBR322- <u>SphI</u>	TIEMPO DIGESTION A 37 C.
<u>PstI</u>	0.5 ul	0.4 ug	30 min
<u>SalI</u>	2.0 ul	0.4 ug	60 min
<u>EcoRI</u>	0.5 ul	0.4 ug	30 min
<u>HindIII</u>	0.5 ul	0.4 ug	30 min
<u>BamHI</u>	0.5 ul	0.4 ug	15 min
<u>HaeIII</u>	0.5 ul	1.0 ug	30 min
<u>HpaII</u>	0.5 ul	1.0 ug	60 min

Las reacciones se observaron en gel de poliacrilamida al 7.5 %, el cual se ilustra en la fig. 8.

Por otra parte las fracciones activas 65-74 obtenidas de la fosfocelulosa se pasaron por una columna de hidroxilapatita de 8 ml, de la cual se obtuvieron cuatro fracciones activas que se dializaron vs. B.E. 1:1 glicerol. Sin embargo la actividad de la fracción dializada fue baja y se encontró exonucleasa.

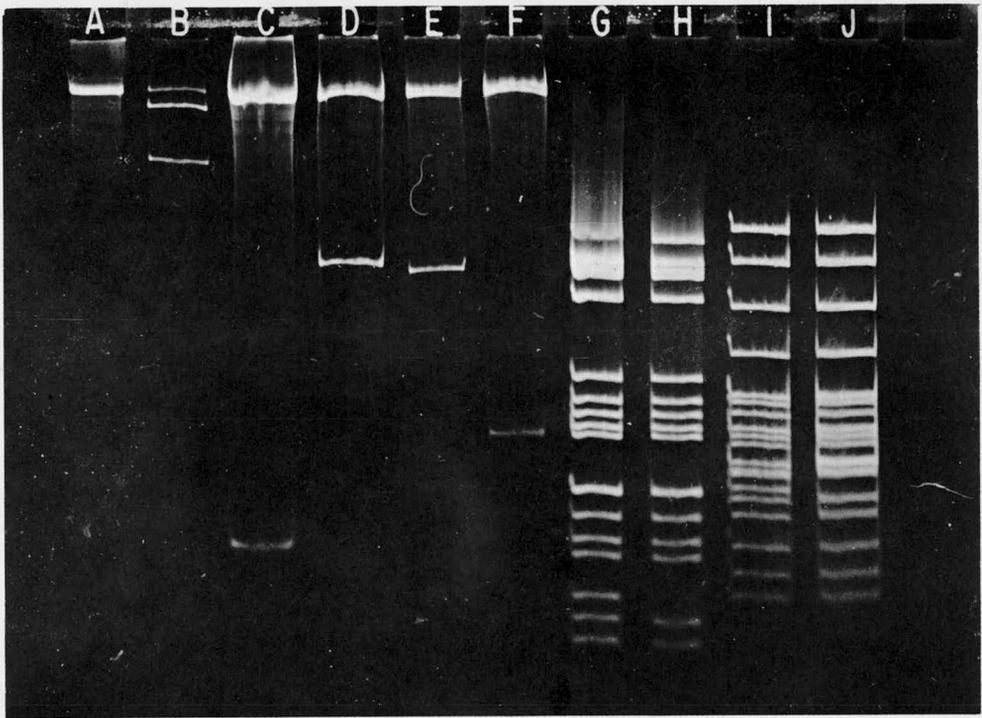


Fig. 8. Dobles digestiones en pBR322 con la fracción activa de Streptomyces phaeochromogenes (SphI) y otras endonucleasas de restricción: A= DNA-SphI; B= SphI-PstI; C= SphI-SalI; D= SphI-EcoRI; E= SphI-HindIII; F= SphI-BamI; G= DNA-HaeIII; H= SphI-HaeIII; I= SphI-HpaII; J= DNA-HpaII.

III. III. OPTIMIZACION DE LA ACTIVIDAD DE SphI

Se buscaron las mejores condiciones de reacción, variando los diferentes factores del medio conforme a las tablas 5, 6 y 7 cuyos resultados se observan en las figuras 9, 10 y 11 respectivamente.

En todas las reacciones se mantiene constante la concentración de 2ul de enzima SphI en 20 ul totales y la concentración de DNA a 20 ug/ml, dejando reaccionar la mezcla durante 1 hora a 37°C.

III. IV. DIGESTION DEL SV40 CON SphI.

Además de las reacciones de SphI con los sustratos pBR322 y pBR26, se utilizó el DNA de SV40 previamente digerido con la endonucleasa HindIII. Se observó que SphI reconoce y corta en dos sitios al tercer fragmento generado por HindIII. El medio de reacción en esta digestión fue el siguiente:

66 ug/ml DNA SV40

60 mM Tris HCl pH 7.5

50 mM NaCl

10 mM 2-mercaptoetanol

5 mM MgCl₂

0.1 ul SphI/ul de solución.

El patrón generado por esta reacción se ilustra en la figura 12, donde se compara con el patrón producido por HindIII en el SV40.

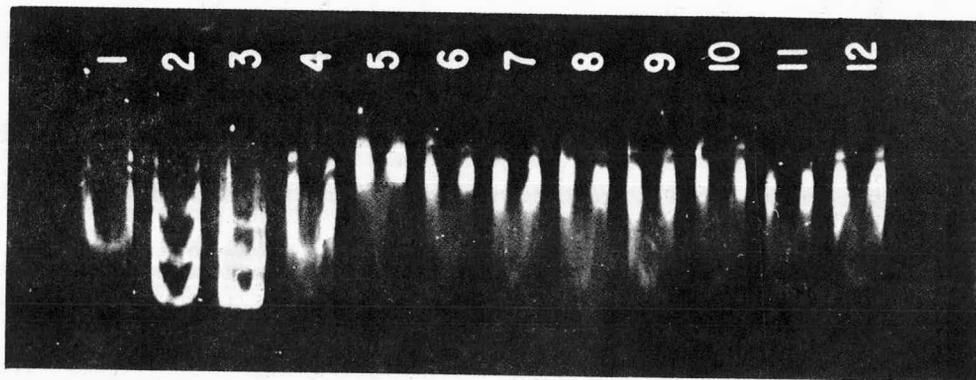


Fig. 9. Diferentes condiciones de reacción. Tabla 5.

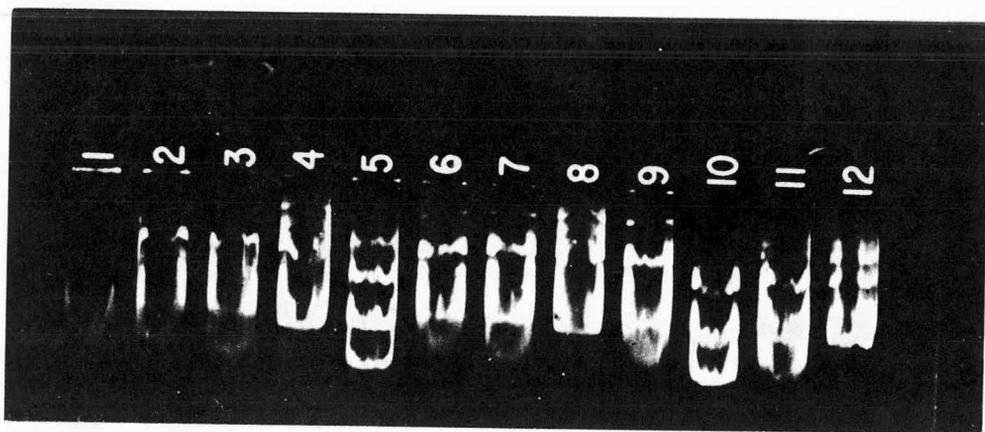


Fig. 10 Diferentes condiciones de reacción. Tabla 6.

TABLA 5. (Fig. 9)

Carril No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tris HCl pH 7.5	6mM	6mM	6mM	6mM	6mM	6mM	6mM	6mM	100mM	100mM	100mM	100mM
MgCl ₂	6mM	6mM	6mM	6mM	6mM	6mM	6mM	6mM	5mM	5mM	5mM	5mM
2-mercaptoetanol	6mM	6mM	6mM	6mM	16mM	16mM	16mM	16mM	-	-	-	-
NaCl	10mM	50mM	100mM	300mM	10mM	50mM	100mM	300mM	10mM	50mM	100mM	300mM
pBR322 (ug/ml)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

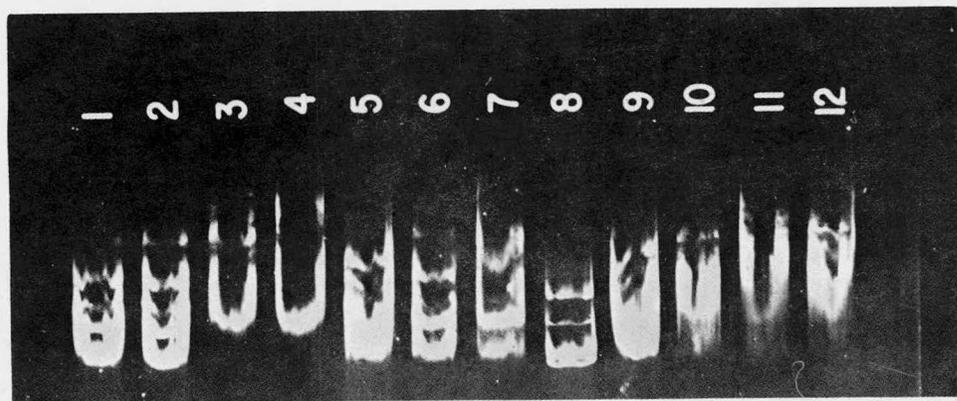
TABLA 6. (Fig. 10)

Carril No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tris HCl pH 7.0	100mM	100mM	100mM	100mM	-	-	-	-	-	-	-	-
MgCl ₂	5mM											
NaCl	50mM											
2-mercaptoetanol	-	10mM	20mM	50mM	-	10mM	20mM	50mM	-	10mM	20mM	50mM
Tris HCl pH 7.5	-	-	-	-	100mM	100mM	100mM	100mM	-	-	-	-
Tris HCl pH 8.0	-	-	-	-	-	-	-	-	100mM	100mM	100mM	100mM

TABLA 7. (Fig. 11)

Carril No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tris HCl pH 7.0	100mM	100mM	100mM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tris HCl pH 7.5	-	-	-	100mM	100mM	100mM	6mM	6mM	6mM	-	-	-
Tris HCl pH 6.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100mM	100mM	100mM
NaCl	50mM	50mM	50mM	50mM	50mM	50mM	10mM	50mM	10mM	10mM	50mM	50mM
2-mercaptoetanol	-	10mM	20mM	-	10mM	20mM	16mM	26mM	26mM	-	-	10mM
MgCl ₂	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM	6mM	6mM	6mM	5mM	5mM	5mM

Fig. 11.



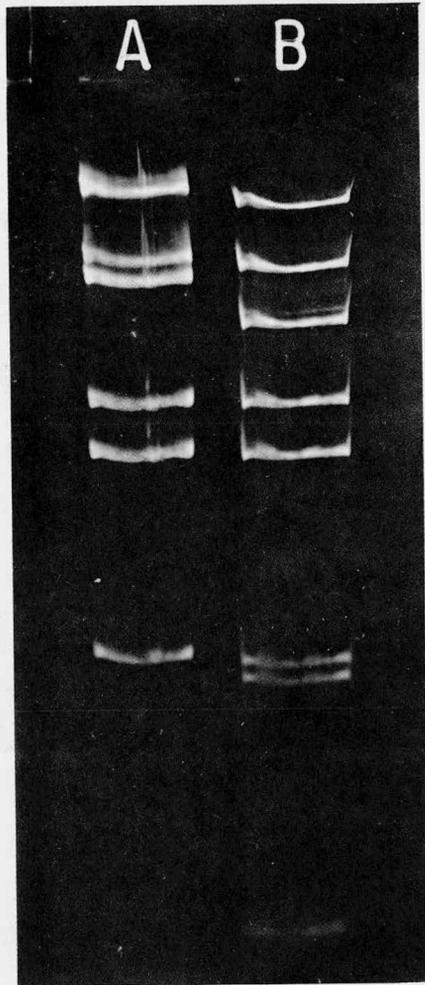


Fig. 12. A= DNA SV40 digerido con HindIII
B= DNA SV40 digerido con HindIII y SphI.

V. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

El método utilizado en la purificación de estas enzimas es una simplificación del procedimiento seguido para la purificación de la endonucleasa EcoRI (Greene et al, 1974). En comparación con otros procesos (Sume-gi et al, 1977; Bingham et al, 1977; Bicle et al, 1977) éste reduce el número de pasos involucrados en la purificación, como es la precipitación de ácidos nucleicos. En este caso, el uso de altas concentraciones de NaCl, permite la disociación de las enzimas unidas al DNA, de esta forma al pasar el extracto por la fosfocelulosa, sólo se adhieren enzimas afines a la resina, mientras que los ácidos nucleicos se eluyen durante el paso de la muestra y en el lavado. Las proteínas que se quedan adheridas a la fosfocelulosa son eluidas por fuerza iónica con un gradiente lineal de NaCl.

El siguiente paso en la purificación, es el uso de una resina de afinidad, hidroxilapatita, formada por cristales de fosfato de calcio, en la cual, las proteínas son adsorbidas por la red cristalina y posteriormente eluidas con un gradiente de fosfatos. La naturaleza precisa de estas fuerzas de unión no se conoce, sin embargo, la importancia de utilizar estas resinas radica en poder lograr la separación de la endonucleasa deseada de otras proteínas que también son afines al DNA, tales co-

mo exonucleasas inespecíficas. En muchos casos, incluyen do a HpaI y HpaII, mediante el uso de estas dos resinas, se logran rendimientos aceptables y se obtienen endonucleasas libres de otras proteínas que no permiten la utilización de estas enzimas de restricción en experimentos de recombinación in vitro.

Las enzimas de restricción así obtenidas pueden guardarse por meses en B.E. 1:1 glicerol a -20°C o congeladas a -200°C en N_2 líquido.

Entre las células ensayadas, el patrón original de digestión producido por Streptomyces albus, Xanthomonas axonopodis y Arthrobacter sp sobre el pBR26 no se repitió durante las dobles digestiones con EcoRI y SaII en las cuales no se observó actividad de las nuevas enzimas, por lo que, si se trata de endonucleasas de restricción, las condiciones del medio no fueron propicias para su estabilidad o bien, no se trata de endonucleasas específicas. Sin embargo, más adelante se buscará repetir los experimentos en condiciones diferentes. Por el momento se centró la atención en los resultados obtenidos de los ensayos con Streptomyces phaeochromogenes.

En este caso la enzima obtenida, aunque no ha sido estabilizada en buffer de fosfatos, hay indicios de que en buffer Tris se mantiene activa y estable. A pesar de este problema, el patrón de digestión que presenta se mantiene siempre constante y esto implica que se trata de u-

na endonucleasa específica.

Tratando de encontrar las mejores condiciones de reacción para esta enzima, se realizaron algunas pruebas (Figuras 9, 10 y 11) en donde se observa que, a pesar de ser digestiones incompletas, se destaca mayor claridad en las sig. condiciones:

a pH 7.0	Tris HCl--100mM	y a pH 7.5	Tris HCl--6mM
	MgCl ₂ ----- 5mM		MgCl ₂ ----6mM
	NaCl ----- 50mM		NaCl--10-50mM
	2-M.E.---10-50mM		2-M.E.16-26mM

y se descartan las reacciones a pH menores de 7.0 y mayores de 7.5.

Ahora, la especificidad de esta nueva endonucleasa de restricción denominada Sph I, de acuerdo a la nomenclatura propuesta por Danna y Nathans, puede determinarse por los patrones obtenidos en el pBR322 y en el SV40, ya que la secuencia nucleotídica completa de estos sustratos está perfectamente caracterizada (Bolívar et al, 1977; Fiers et al, 1978. resp.).

Para localizar el sitio exacto que reconoce y corta la enzima, se realizaron dobles digestiones con las endonucleasas Eco RI, Hind III, Pst I, Bam HI, Sal I que cortan en un sólo sitio al sustrato, pBR322, y con Hae III y Hpa II que lo cortan en varios. (Mapa Fig. 13).

En el patrón obtenido de estas dobles digestiones (Figura 8), se puede observar que en el carril correspondien-

te a Sph I-Sal I (carril C), se genera un pequeño fragmento aparte del plásmido lineal producido por la digestión con una sola enzima (en este caso por Sal I). Esto indica que Sph I corta muy cerca del sitio de Sal I. En el carril Hae III-Sph I (H) desaparece la banda #15 del carril Hae III (G), y en el carril Hpa II-Sph I (I) desaparece la banda 11A del carril Hpa II (J).

En el mapa de restricción del pBR322 (Fig. 13) se observa que la banda 15 generada por Hae III coincide con un fragmento de la banda 11A generada por Hpa II.

Recurriendo a la secuencia nucleotídica del pBR322 (Sutcliffe, 1978), el fragmento #15 que comprende Hae III (Fig. 13A), contiene un sólo palíndromo no reconocido por ninguna otra endonucleasa de restricción reportada a la fecha. Esta secuencia es: 5'-GCATGC.

Posteriormente se buscaron en la literatura otros posibles sustratos que contuvieran esa secuencia, encontrándola repetida en el genoma de SV40 (Fiers et al, 1978) en el fragmento C de Hind III (Figs. 12 y 15).

Ahora bien, si realmente es la secuencia reconocida por Sph I, deben generarse tres fragmentos al digerir SV40 con esta enzima. Con esta hipótesis se realizó la digestión de SV40 con Sph I previamente digerido con Hind III (Fig. 12) y se observó que efectivamente el fragmento "C" generado por la digestión simple con Hind III desaparecía en la doble digestión, originando 3 nuevos fragmentos, lo cual verificaba la existencia y localización de los sitios

SV40

A/C
5'

...AAAGCTTTTTGCAAAGCCTAGGCCTCCAAAAAGCCTCCTCACTA
CTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCGCCTCGGCCTCTGCATAA
ATAAAAAAATTAGTCAGCCATGGGGCGGAGAAATGGGCGGAACTGG
GCGGAGTTAGGGGCGGGATGGGCGGAGTTAGGGGCGGGACTATGGT
TGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGG
GAGCCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTG
CCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCTAACTGACACACAT
TCCACAGCTGGTTCCTTCCGCCTCAGAAGGTACCTAACCAAGTTCC
TCTTTCAGAGGTTATTTTCAGGCCATGGCTGCGCCGGCTGTCACGCC
AGGCCTCCGTAAAGGTTTCGTAGGTCATGGACTGAAAGTAAAAAAC
AGCTCAACGCCTTTTTGTGTTTGTTTTAGAGCTTTTGCTGCAATTT
TGTGAAGGGGAAGATACTGTTGAC... C/L

Fig. 15. Secuencia nucleotídica del fragmento C generado por HindIII en SV40.

de Sph I en el DNA de SV40. Estos sitios están localizados cerca del origen de replicación del DNA (Fig. 14) en 0.687 (Fiers et al, 1978; Subramanian et al, 1977).

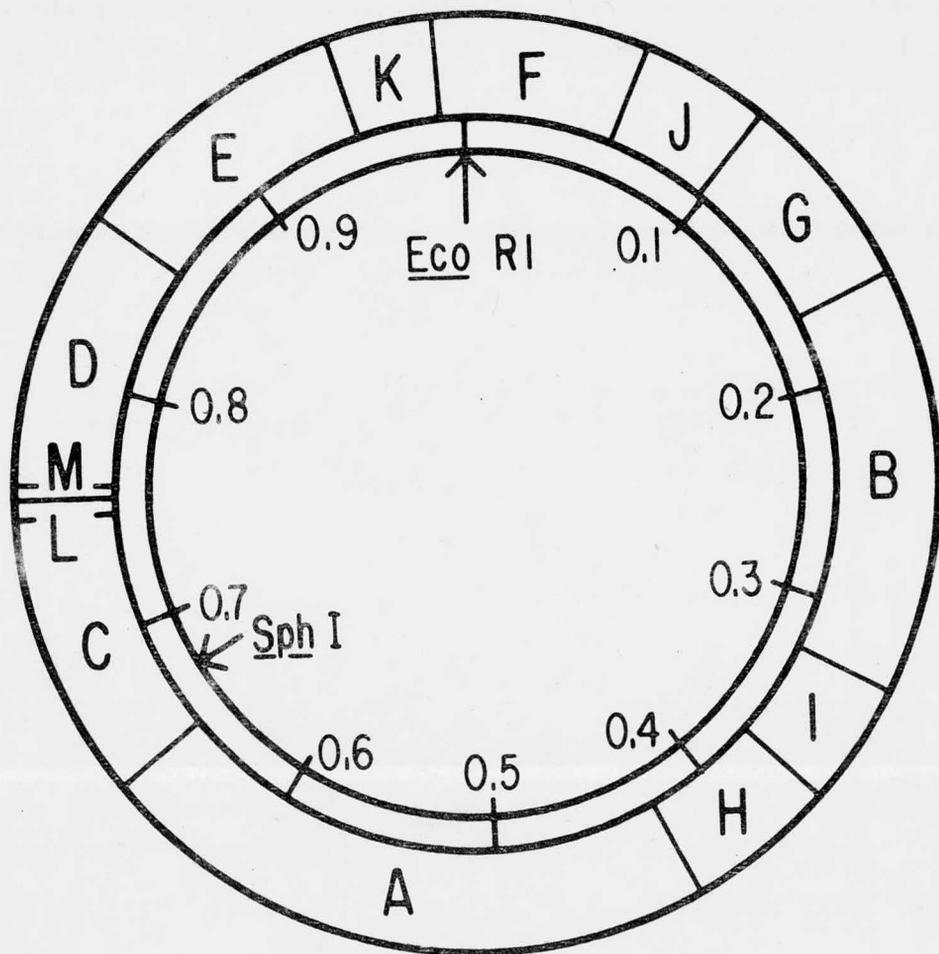
En el pBR322 el sitio está localizado en el gene que codifica para resistencia a tetraciclina (Fig. 13A).

Hasta ahora se puede concluir que se cuenta con una nueva endonucleasa de restricción clase II, Sph I, cuyo sitio de reconocimiento es muy probablemente 5'-GCATGC, lo cual se espera verificar experimentalmente de acuerdo al método propuesto por Sanger y Coulson (Sanger et al, 1975), utilizando un fragmento de DNA que contenga a esta secuencia. De estos resultados también se deducirá el tipo de extremos generados por la enzima.

Sph I presenta dos ventajas importantes sobre otras endonucleasas de restricción:

1. Corta al vehículo pBR322 en un sólo sitio en el gene de resistencia a tetraciclina, y por lo tanto, provoca su inactivación. Como se mencionó anteriormente, ésta es una característica muy útil en experimentos de clonación molecular.

2. Es la única endonucleasa de restricción que reconoce un palíndromo que incluye la secuencia 5'-CATG, y esto puede tener trascendencia en el estudio de genes específicos, ya que el triplete ATG es el codón de iniciación para la síntesis de proteínas.



DNA SV40

Fig. 14. Mapa de restricción de HindIII en SV40. El origen de replicación de este genoma se encuentra aproximadamente en 0.663.

La aportación de este trabajo constituye una herramienta más para la Ingeniería Genética Molecular, destacándose que el aspecto más importante que caracteriza a las endonucleasas de restricción en general, es, precisamente su gran utilidad. Estas enzimas han facilitado enormemente el análisis de la estructura del DNA, permitiendo el mapeo físico y la secuenciación de éste, así como la construcción de nuevos genomas y moléculas recombinantes, además del aislamiento de genes específicos.

REFERENCIAS.

- Allet, B. Biochemistry **12**, 3972 (1973).
- Allet, B., Jeppesen, P.G.N., Katagiri, K.J. and Delius, H. Nature **241**, 120-23 (1973).
- Arber, W. and Dussoix, D. J. Mol. Biol. **5**, 18 (1962).
- Arber, W. and Morse, M.L. Genetics **51**, 137 (1965).
- Arrand, J.R., Myers, P.A. and Roberts, R.J. no publicado
- Arrand, J.R., Myers, P.A. and Roberts, R.J. J. Mol. Biol. **118**, 127-135 (1978).
- Barrel, B.G., and Slocomb, P. no publicado.
- Betlach, M.C., Heerschfield, V., Chow, L., Brown, W. Goodman, H.M. and Boyer, H.W. Fed. Proc. **35**, 2037-43 (1976).
- Bicle, T.A., Pirrota, V. and Imber, R. Nucleic Acids Res. **4** **8**, 2561-72 (1977).
- Bigger, C.H., Murray, N.E. and Murray, K. Nature New Biology **244**, 7-10 (1973).
- Bingham, A.H., Sharman, A.F. and Atkinson, T. FEBS Lett. **76**, 2 (1977).
- Bingham, A.H.A., Atkinson, A., and Darbyshire, J. no pub.
- Bingham, A.H.A., and Darbyshyre, J. no publicado.
- Bolívar, F., Rodríguez, R., Betlach, M.C. and Boyer, H.W. Gene **2**, 75- 93 (1977 a).
- Bolívar, F., Rodríguez, R., Greene, P., Betlach, M., Heyneccker, H., Boyer, H., Crosa, J. and Falkow, S. Gene **2**, 95-113 (1977 b).
- Boyer, H.W. Chow, L.T., Dugaiczuk, A., Hedgpeth, J. and Goodman, H.M. Nature New Biology **244**, 40-43 (1973).
- Brockes, J.P., Biochem. J. **133**, 629-63 (1973).
- Brockes, J.P., Brown, P.R., and Murray, K. Biochem. J. **127** **1**-10 (1972).
- Brockes, J.P., Brown, P.R. and Murray, K. J. Mol. Biol. **88**, 437-443 (1974).

- Bron, S., Murray, K., and Trautner, T.A. Mol. Gen. Genet. 143, 13-23 (1975).
- Brown, N.L., Hutchison, C.A. III and Smith, M. J. Mol. Biol. en imprenta.
- Brown, N.L., and Smith, M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 3213-3216 (1977)
- Brown, N.L. and Smith, M. FEBS Letters 65, 284-87 (1976).
- Brown, N.L. McClelland, M. and Whitehead, P.R., no publicado
- Brow, F.L. Nucleic Acids Res. 5, 4, 1093 (1978)
- Boyer, H.W., Greene, P.J., Meagher, R.S., Betlach, M.C. Russell, D. and Goodman, H.M. FEBS Symp. 34, 23, (1974).
- Catterall, J. and Welker, N. J. Bact. 129, 1110-20 (1977).
- Chater, K., Nucleic Acids Res. 4, 1989-98 (1977).
- Clanton, D.J., Woodward, J.M. and Miller, R.V. J. Bact. 135, 270-73 (1978).
- Comb, D., Schildkraut, I. and Roberts, R.J. no publicado.
- Cohen, S.M., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W. and Helling, R. Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 3240 (1973).
- Collins, J. Curr. Topics in Microbiol. and Immunol. 78, 121-70 (1977).
- Danna, K. and Nathans, P. Proc. Natl. Acad. Sci. 68, 2913 (1971).
- Danna, K.J., Sack, G.H. and Nathans, P. J. Mol. Biol. 78, 363-376 (1973).
- DiLauro, R. no publicado.
- Dugaiczky, A. Hedgpeth, J., Boyer, H.W. and Goodman, H.M. Biochemistry 13, 503-12 (1974).
- Dussoix, D. and Arber, W. J. Mol. Biol. 5, 37 (1962).
- Dussoix, D., Yoshimori, R., Greene, P., Betlach, M., Goodman, H.M. and Boyer, H.W. Micobiology 187 (1974)
- Endow, S.A. J. Mol. Biol. 114, 441-50 (1977).
- Endow, S.A. and Roberts, R.J. no publicado.

- Endow, S.A. and Roberts, R.J. J. Mol. Biol. 112, 521-529 (1977).
- Eskin, B. and Linn, S. J. Biol. Chem. 247, 6183-6191 (1972).
- Fiers, W., Contreras, R., Van de Voorde, A., Van Heuverswyn, H., Rogiers, R., Van Herreweghe, J., Volckaert, G. and Ysebaert, M. Nature 273, 113-19 (1978).
- Fisherman, J., Gingeras, T.R. and Roberts, R.J. no publicado.
- Gardner, J. and Kaplan, S. no publicado.
- Garfin, D.E. and Goodman, H.M. Biochem. Biophys. Res. Comm. 59, 108-116 (1974).
- Gelinas, R.E., Myers, P.A. and Roberts, R.J. J. Mol. Biol. 114, 169-180 (1977).
- Gelinas, R.E., Myers, P.A. and Roberts, R.J. no publicado.
- Gelinas, R.E., Myers, P.A., Weiss, G.A., Roberts, R.J. and Murray, K. J. Mol. Biol. 114, 433-440 (1977).
- Gingeras, T.R. and Roberts, R.J., no publicado.
- Gingeras, T.R., Myers, P.A., Olson, J.A., Hanberg, F.A. and Roberts, R.J. J. Mol. Biol. 118, 113-122 (1978).
- Goff, S. and Rambach, A. no publicado.
- Greene, R. and Mulder, C. no publicado.
- Greene, P.J., Betlach, M.C., Goodman, H.M. and Boyer, H.W. Methods Mol. Biol. 7, 87-111 (1974).
- Gromkova, R. and Goodgal, S.H. J. Bact. 109, 987-992 (1972).
- Gromkova, R. and Goodgal, S.H. J. Bact. 127, 848-854 (1976).
- Gunthert, U., Freund, M. and Trautner, T.A. Abstracts of 12th FEBS Symposium, Dresden (1978).
- Haberman, A. J. Mol. Biol. 89, 545-563 (1974).
- Haberman, A., Heywood, J. and Meselson, M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 3138-3141 (1972).
- Haggerty, D.M. and Schleif, R.E. J. Virol. 18, 659-63 (1976).
- Hanberg, F., Myers, P.A. and Roberts, R.J. no publicado.

- Hartmann, H. and Goebel, W. FEBS Letters 80, 285-287 (1977).
- Hedgpeth, J., Goodman, H.M. and Boyer, H.W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 3448-3452 (1972).
- Hogness, O.S. and Simmons, J.R. J. Mol. Biol. 9, 411 (1974).
- Hoshino, T., Uozumi, T., Horinouchi, S., Ozaki, A., Beppu, T. and Arima, K. Biochem. Biophys. Acta 479, 367-369 (1977).
- Hughes, S.G., Bruce, T. and Murray, K. no publicado.
- Hutchison, C.A. and Barrell, B.G. no publicado.
- Ikawa, S., Shibata, T. and Ando, T. J. Biochem. 80, 1457-1460 (1976).
- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A., Heyneker, H., Bolivar, F. and Boyer, H. Science 198, 1056-62 (1977).
- Kelly, T.J. Jr. and Smith, H.O. J. Mol. Biol. 51, 393-409 (1970).
- Kiss, A., Sain, B., Csordas-Toth, E. and Venetianer, P. Gene 1, 323-329 (1977).
- Kleid, D., Humayun, Z., Jeffrey, A. and Ptashne, A. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73, 293-297 (1976).
- Lacks, S. and Greenberg, B. J. Biol. Chem. 250, 4060-4072 (1975).
- Lacks, S. and Greenberg, B. J. Mol. Biol. 114, 153-168 (1977).
- Landy, A., Ruedisueli, E., Robinson, L., Foeller, C., and Ross, W. Biochemistry 13, 2134-2142 (1974).
- Lautenberg, J.A., Kan, N.C., Lackey, D., Linn, S., Edgell, M.H. and Hutchison, C.A. III. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 2271-2275 (1978).
- Lautenberger, J.A. and Linn, S. J. Biol. Chem. 247, 6176-6182 (1972).
- Lebon, J.M., Kado, C., Rosenthal, L.J. and Chirikjian, J. no pub.
- Luria, S.E. and Delbruck, M. Genetics 28, 491, 181 (1943).
- Luria, S.E. and Human, M.L. J. Bacteriol. 64, 557 (1952).
- Luria, S.E. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 18, 237 (1953)
- Lui, A., McBride, B.C. and Smith, M. no publicado.

- Mann, M.B., Rao, R.N. and Smith, H.O. Gene 3, 97-112 (1978).
- Mann, M.B. and Smith, H.O. Nuc. Acids. Res. 4, 4211-4221 (1977).
- Mann, M.B. and Smith, H.O. no publicado.
- Mayer, H., Grosshedl, R., Schutte, H. and Hobom, G., no publicado
- Mayer, H., Schwarz, E., Melzer, M. and Hobom, G. no publicado.
- McConnell, D., Searcy, D. and Sutcliffe, G., Nuc. Acids Res. 5, 1729-1739 (1978).
- Meagher, R.B. no publicado.
- Meselson, M. and Yuan, R. Nature 217, 1110-1114 (1968).
- Middleton, J.H., Edgell, M.H. and Hutchison, C.A. III J. Virol. 10, 42-50 (1972).
- Middleton, J.H., Stankus, P.V., Edgell, M.H. and Hutchison, C.A. III no publicado.
- Muller, F., Stoffel, S. and Clarkson, S.G. no publicado.
- Morris, D.W. and Parrish, J.H. Arch. Microbiol. 108, 227-230 (1976).
- Morrow, J.F. and Berg, P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 3365-3369 (1973).
- Mulder, C. and Delius, H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 3215-3219 (1973).
- Murray, K., Brown, J.S. and Bruce, S.A. no publicado.
- Murray, K., Hughes, S.G., Brown, J.S. and Bruce, S. Biochem. J. 159, 317-322 (1976).
- Murray, K. and Morrison, A. no publicado.
- Old, R., Murray, K. and Roizes, G. J. Mol. Biol. 92, 331-339 (1975).
- Olson, J.A., Myers, P.A. and Roberts, R.J. no publicado.
- Perricaudet, M. and Tiollais, P. FEBS Letters 56, 7-11 (1975).
- Petterson, U., Mulder, C., Delius, H. and Sharp, P.A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 200-204 (1973).
- Pirotta, V. Nucleic Acids Res 3, 1747-1760 (1976).

- Polisky, B., Greene, P., Garfin, D.E., McCarthy, B.J., Goodman, H.M. and Boyer, H.W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 3310-3314 (1975)
- RajBhandary, U.L. and Baumstark, B. no publicado.
- Ravetch, J.V., Horiuchi, K., and Zinder, N.D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 2266-2270 (1978).
- Reiser, J. and Yuan, R. J. Biol. Chem. 252, 451-456 (1977).
- Roberts, R.J., Breitmeyer, J.B., Tabachnik, N.F. and Myers, P.A. J. Mol. Biol. 91, 121-123 (1975)
- Roberts, R.J. and Myers, P.A. no publicado.
- Roberts, R.J. Crit. Rev. Biochem. 4, 123-164 (1976).
- Roberts, R.J., Myers, P.A., and Murray, K. J. Mol. Biol. 102, 157-165 (1976).
- Roberts, R.J., Myers, P.A., Morrison, A. and Murray, K. J. Mol. Biol. 103, 199-208 (1976).
- Roberts, R.J., Wilson, G.A., and Young, F.E. Nature 265, 82-84 (1977).
- Roizes, G. no publicado.
- Roizes, G., Patillon, M. and Kovoov, A. FEBS Letters 82, 69-70 (1977).
- Roy, P.H. and Smith, H.O. J. Mol. Biol. 81, 427-444 (1973).
- Sanger, F. and Coulson, A.R. J. Mol. Biol. 94, 441 (1975).
- Sato, S., Hutchison, C.A. and Harris, J.I. Proc Nat. Acad. Sci. USA 74, 542-546 (1977).
- Sciaky, D. and Roberts, R.J. no publicado.
- Sharp, P.A., Sugden, B. and Sambrook, J. Biochemistry, 12, 3055-3063 (1973)
- Shedlarski, J., Farber, M. and Ehrlich, M. no publicado.
- Shibata, T. and Ando, T. Mol. Gen. Genetics 138, 269-380 (1975).
- Shibata, T. and Ando, T. Biochem. Biophys Acta 442, 184-196 (1976).
- Shibata, T., Ikawa, S., Kim, C. and Ando, T. J. Bact. 128, 473-476 (1976).

Shimatake, H. and Rosenberg, M: no publicado.

Sims, J. no publicado.

Smith, J.D., Arber, W. and Kuhnlein, V. J. Mol. Biol. 63, 1-8 (1972).

Smith, D.L., Blattner, F.R., and Davies, J. Nuc. Acid Res. 3, 343-353 (1976).

Smith, H.O. and Nathans, D. J. Mol. Biol. 81, 419-423 (1973)

Smith, H.R., Humphreys, G.O., Wilshaw, G.A. and Anderson, E.S. Mol. Gen. Genet. 143, 319 (1976)

Smith, H.O. and Wilcox, K.W. J. Mol. Biol. 51, 319-391 (1970).

Sobbering, E.E., Schiphof, R. and Sussenbach, J.S. J. Bact. 131, 645-649 (1977).

Subramanian, K.N., Pan, J., Zain, B.S. and Weissman, S.M. Nucleic Acids Res. 1, 727-752 (1974).

Subramanian, K.N., Weissman, S.M., Zain, B.S. and Roberts, R.J. J. Mol. Biol. 110, 297-317 (1977).

Subramanian, K.N., Dhar, R., Weissman, S.M. J. Biol. Chem. 252, 1, 355-367 (1977).

Sugisaki, H. Gene 3, 17-28 (1978).

Sugusaki, H. and Takanami, K. Nature New Biol. 246, 138-140 (1973)

Sumegi, J., Breedveld, Hossenlop, P. and Chambon, P. Biochem. Biophys. Res. Comm. 76, 1, (1977)

Sussenbach, J.S. Monfoort, C.H., Shiphof, R. and Stobberingh, E.E. Nucleic Acids. Res. 3, 3193-3202 (1976).

Sussenbach, J.S., Steenberg, P.H., Rost, J.A., Van Leeuwen, W.J. and Van Embden, J.D.A. Nuc. Acids. Res. 5, 1153-1163 (1978).

Sutcliffe, G. and Church, G. no publicado.

Takahashi, H. Saito and Ikeda, no publicado.

Takahashi, H. no publicado.

Takanami, M. FEBS Letters 34, 318-322 (1973).

Takanami, M. Methods in Molecular Biology 7, 113-133 (1974).

- Takanami, M. and Kojo, H. FEBS Letters 29, 267-270 (1973).
- Tanyashin, V.I., Li, L.I., Muizhnieks, I.O. and Baev, A.A. Dokl. Akad. Nauk. SSSR 231, 226-228 (1976).
- Tomassini, J., Roychoudhury, R. Wu, R. and Roberts, R.J. no publ.
- Torheim, B. comunicación personal.
- Trautner, T.A. Pawleck, B. Bron, S. and Anagnostopoulos, C. Mol. Gen. Genet. 131, 181 (1974).
- Tu, C-P. D., Roychoudhury, R. and Wu, R. Biochem. Biophys. Res. Comm. 72, 355-362 (1976).
- Ulrich, A., Shine, J. Chirwin, J., Howard, R. and Goodman, M. Science 196, 1313-1319 (1977).
- Van Montagu, M. no publicado.
- Van Montagu, M., Myers, P.A. and Roberts, R.J. no publicado.
- Van Ormondt, H., Lautenberger, J.A., Linn, S. and DeWaard, A. FEBS Letters 33, 177-180 (1973)
- Vanyushin, B.F. and Dobritsa, A.P., Biochem. Biophys. Acta 407, 61-72 (1975).
- Waalwijk, C. Flavell, R.A. Nucleic Acids Res. 5, 9, 3231 (1978).
- Walter, F., Hartman, M. and Roth, M. Abstracts of 12th FEBS Symposium, Dresden (1978).
- Wilson, G.A. and Young, F.E. J. Mol. Biol. 97, 123-126 (1975).
- Wilson, G.A. and Young, F.E. in Microbiology 1976. ed. D. Schlessinger. Amer. Soc. Microbiol., Washington 350-57 (1976).
- Wilson, G.A. and Young, F.E. no publicado.
- Wu, R., King, C. and Jay, E. no publicado.
- Wu, R. no publicado.
- Yang, R.C-A., Van de Voorde, A. and Fiers, W. Eur. J. Biochem. 61, 101-117 (1976).
- Yang, R.C-A., Van de Voorde, A. and Fiers, W. Eur. J. Biochem. 61, 119-138 (1976).

Yang, R., Danna, K. Van de Voorde, A. and Fiers, W. Virology **68**,
260 (1975).

Yoshimori, R.N. PhD Thesis (1971).

Yoshimori, R.N., Roulland-Dussoix, D., Goodman, H.M. and Boyer, H.
no publicado.

Zabeau, M. and Roberts, R.J. no publicado.

Zabeau, M. Greene, P., Myers, P.A. and Roberts, R.J. no publicado.

Zain, B.S., Myers, P.A. and Roberts, R.J. no publicado.

Zain, B.S., and Roberts, R.J. J. Mol. Biol. **115**, 249-255 (1977).