



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

INTRODUCCION DE UN SITIO DE RESTRICCIÓN ADYACENTE
AL ORIGEN DE REPLICACION DEL PLASMIDO pBR327

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

HILDA MARIA LOMELI BUYOLI

México, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE

INTRODUCCION	1
I. Ingeniería Genética	1
II. Replicación del DNA	13
JUSTIFICACION Y OBJETIVO	17
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	21
MATERIALES Y METODOS.....	24
RESULTADOS.....	37
a. Construcción del pBR-17.....	37
b. Caracterización con endonucleasas de restricción del pBR-17.....	37
c. Construcción del pBR-14	38
d. Caracterización del pBR-14	39
DISCUSION	41
CONCLUSION	46
BIBLIOGRAFIA	47

INTRODUCCION.

I. Ingeniería Genética

El DNA es la estructura fundamental de la información genética. Por tal motivo, su identificación química por Avery (1944) y la elucidación por Watson y Crick, de las bases estructurales de su invarianza replicativa, (1953) constituyen sin ninguna duda los descubrimientos más importantes que hayan sido hechos en biología molecular. A partir de estos extraordinarios hallazgos esta ciencia ha tenido un rápido y exitoso desarrollo. Descubrimientos importantes en este campo incluyen: la comprensión de como el DNA logra dictar una copia exacta de la secuencia de nucleótidos que especifica un gen; la identificación de la maquinaria química que traduce la secuencia de nucleótidos de un segmento de DNA en una secuencia de aminoácidos en una proteína; la deducción del código genético y la comprensión de la regulación de la expresión genética en ciertos operones bacterianos (Portugal et al. 1979).

Todos estos descubrimientos fueron realizados en las décadas de los 50s, 60s y principios de los 70s y para ello fueron utilizadas técnicas de investigación en genética, bioquímica y biología molecular. Sin embargo, el gran tamaño del genoma y su compleja organización molecular no permitían, en aquel entonces, disectar regiones específicas de DNA que, de este modo, pudieran ser sometidas a estudios exhaustivos.

A principios de la década de los 70s, como consecuencia de una serie de descubrimientos tales como la identificación y

caracterización de enzimas cuyo sustrato es el DNA, se empezó a desarrollar la metodología conocida como ingeniería genética o recombinación "in vitro" de ácidos nucleicos (Bolívar, 1979). Esto permitió que el genoma pudiera ser fragmentado y que fragmentos de los más diversos orígenes fueran aislados, recombinados y propagados a través de multiplicación celular, obteniendo así clones moleculares de DNA (Bolívar, 1979).

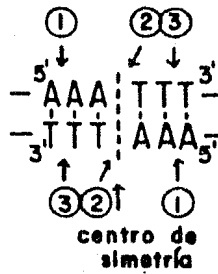
La ingeniería genética molecular puede ser descrita brevemente de la siguiente forma: dos o más fragmentos de DNA son recombinados "in vitro" mediante el uso de una serie de enzimas; uno de los fragmentos, llamado vector o vehículo molecular, es capaz de replicarse en la célula huésped y el otro, el fragmento clonado, es replicado en la célula por estar unido covalentemente al vehículo.

A continuación se detallarán los elementos que constituyen esta metodología.

1) Endonucleasas de restricción y otras enzimas cuyo sustrato es el ácido desoxirribonucleico.

Como se mencionó anteriormente, dadas las características del genoma, el estudio de secuencias específicas de DNA era una tarea que entrañaba serias dificultades y solo era realizable en algunos casos específicos y generalmente sencillos (Brown, 1973).

En 1970, el aislamiento a partir de una bacteria, de una enzima que hidroliza el DNA en sitios específicos (es decir reconociendo una cierta secuencia dentro de la molécula) por Smith et al (1970), y la utilización de esta para el estudio del DNA del virus SV40 por Danna y Nathans (1972), establecieron el primer paso en el camino para obtener



corte	moléculas resultantes	denominación de los extremos
①	$\begin{array}{l} -A-OH \\ -\underset{\text{3}'}{\text{T}}\text{T}\text{TAA}-\text{O}(\text{P}) \end{array} \quad \text{O}-\overset{\text{5}'}{\text{A}}\text{T}\text{T}\text{T}-\overset{\text{3}'}{\text{HO}-\text{A}}$	5' salientes
②	$\begin{array}{l} -\overset{\text{3}'}{\text{AAA}}-OH \\ -\underset{\text{5}'}{\text{T}}\text{T}\text{T}-\text{O}(\text{P}) \end{array} \quad \text{O}-\overset{\text{5}'}{\text{T}}\text{T}\text{T}-\overset{\text{3}'}{\text{HO}-\underset{\text{3}'}{\text{AAA}}}$	r asos
③	$\begin{array}{l} -\overset{\text{3}'}{\text{AAATT}}-OH \\ -\underset{\text{5}'}{\text{T}}-\text{O}-\text{P} \end{array} \quad \text{O}-\overset{\text{3}'}{\text{T}}-\overset{\text{5}'}{\text{HO}-\underset{\text{3}'}{\text{T}}\text{TAA}}$	3' salientes

Figura 1. Clasificación general del tipo de extremos generados por las endonucleasas de restricción según la forma de corte.

en forma reproducible y en cualquier organismo fragmentos específicos de DNA.

A partir de esa fecha la búsqueda de enzimas similares ha fructificado en el hallazgo de una gran cantidad de las ahora llamadas endonucleasas de restricción, las cuales reconocen diferentes secuencias de nucleótidos y que permiten gran versatilidad en el fraccionamiento del DNA (Roberts, 1976). De acuerdo con sus características principales, las endonucleasas de restricción han sido divididas en clases I y II; las primeras reconocen secuencias específicas, pero hidrolizan en sitios no específicos algunos nucleótidos más allá del sitio reconocido; las segundas reconocen y cortan secuencias específicas. Las enzimas que han probado ser más útiles son las de la clase II (Roberts, 1976).

Se han caracterizado endonucleasas de restricción que reconocen diversas secuencias de cuatro, cinco y seis pares de bases. Generalmente la secuencia reconocida es un palíndromo (repetición invertida), es decir una secuencia que se lee de igual manera en el sentido 5'---3' en una hebra y en el mismo sentido de la hebra contraria. En consecuencia existe un centro de simetría en cada palíndromo y los productos resultantes de la hidrólisis de un par de enlaces (uno en cada cadena) son diferentes de acuerdo a si el corte se hace a la izquierda, a la derecha o en el centro de simetría, pudiéndose obtener moléculas con extremos salientes 5' o 3', o con extremos rasos, es decir con todas sus bases apareadas. En la figura 1 se ilustra esta descripción.

Los extremos salientes generados por una endonucleasa de restricción se denominan extremos cohesivos dada su capacidad para formar estructuras de doble hélice uno con otro, por la

TABLA 1. Endonucleasas específicas y las secuencias que reconocen

Tetranucleótido		Pentanucleótido	Hexanucleótido		
<u>AluI</u>	AG↓CT	<u>EcoRII</u>	↓CC(^A _T)GG	<u>AvaI</u>	C↓PiCGPuG
<u>HaeIII</u>	GG↓CC			<u>BamI</u>	G↓GATCC
<u>HhaI</u>	GCG↓C			<u>BglII</u>	A↓GATCT
<u>HpaII</u>	C↓CGG			<u>BalI</u>	TGG↓CCA
<u>MboI</u>	↓GATC			<u>EcoRI</u>	G↓AATTC
<u>TaqI</u>	T↓CGA	<u>HphI</u>	GGTGA → 8p.b.	<u>HindIII</u>	A↓AGCTT
		<u>MboII</u>	GAAGA → 8p.b.	<u>HpaI</u>	GTT↓AAC
				<u>PstI</u>	CTGCA↓G
<u>HinfI</u>	G↓ANTC			<u>XmaI</u>	C↓CCGGG
<u>DpnI</u>	↓GATC cuando está modificado			<u>HaeI</u>	(^A _T)GG↓CC(^T _A)
				<u>HaeII</u>	PuGCGC↓Pi
				<u>HincII</u>	GTPi↓PuAC

Roberts, R. (1976).

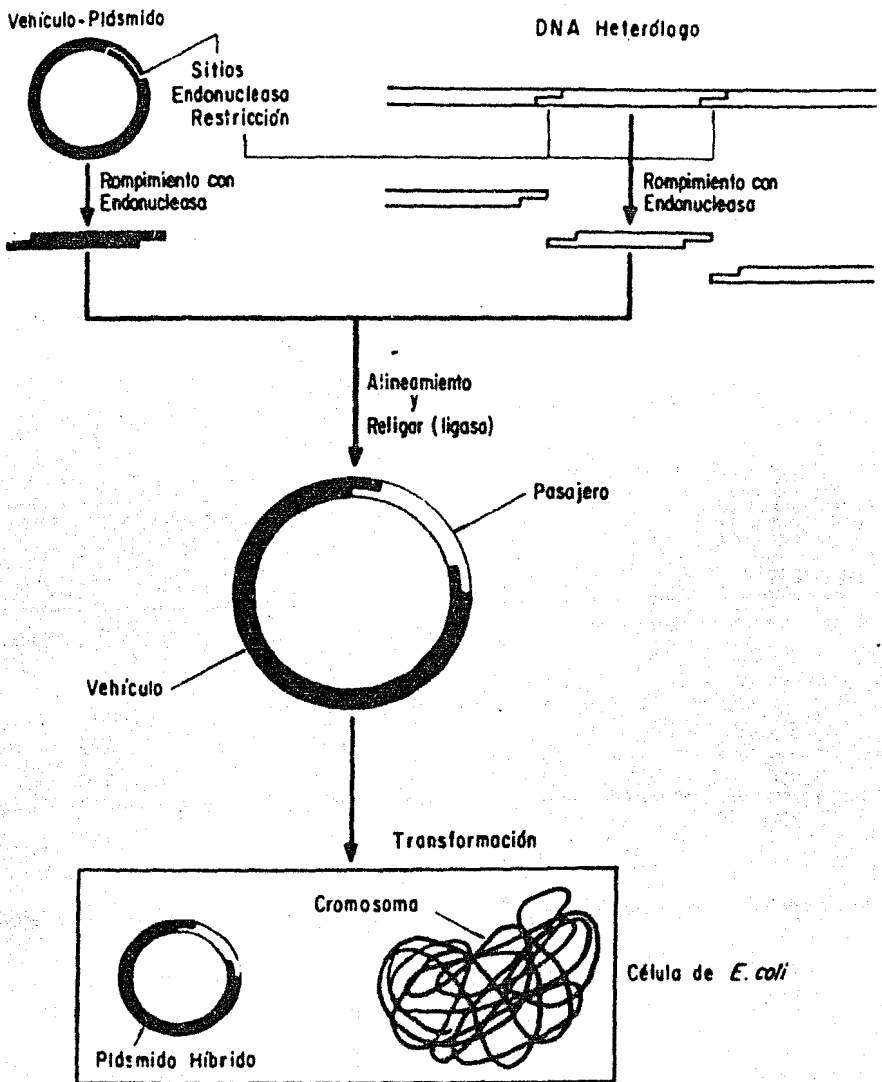


Figura 2. Esquema de la construcción y propagación de moléculas híbridas de DNA (clonación molecular).

complementaridad de su secuencia de nucleótidos.

En la tabla 1 se dan algunos ejemplos de endonucleasas de restricción con las características que se han mencionado.

El papel "in vivo" de las endonucleasas de restricción está íntimamente ligado al fenómeno de variación (Roberts et al, 1977; Davis et al, 1973). Es probable que la célula use estas enzimas para protegerse de DNAs extraños (e.g. virus) que logren entrar en ella, para lo cual, requiere protegerse contra sus propias endonucleasas ya que de otra manera su DNA sería destruido. La célula logra protegerse usando una segunda enzima, enzima de modificación, la cual reconoce la secuencia que es sustrato de la endonucleasa de restricción y la metila, impidiendo la acción de la endonucleasa (modelo de restricción-modificación) (Roberts et al, 1977).

Existen otros métodos de generación de fragmentos recombinantes además de la utilización de endonucleasas de restricción. Entre estos métodos podemos mencionar: el rompimiento mecánico controlado para generar fragmentos grandes (Hogness et al, 1974); la síntesis química de DNA (Itakura et al, 1977); la obtención de un cDNA a partir de un mRNA, utilizando la transcriptasa reversa (Nakanishi et al, 1979); etc.

Por otra parte además de las endonucleasas de restricción hay otras enzimas que juegan un papel importante en el manejo "in vivo" e "in vitro" de DNA. Así por ejemplo la enzima ligasa de DNA codificada por el bacteriofago T4, tiene la capacidad de formar la unión covalente entre un extremo 5' fosfato y un 3' oxhidrilo, hidrolizando ATP para obtener la energía que la reacción requiere. Esta enzima es capaz, entonces, de unir o "ligar" DNAs de diferentes orígenes en forma covalente, formando "moléculas híbridas". Una

Fragmento de ADN digerido con Eco RI

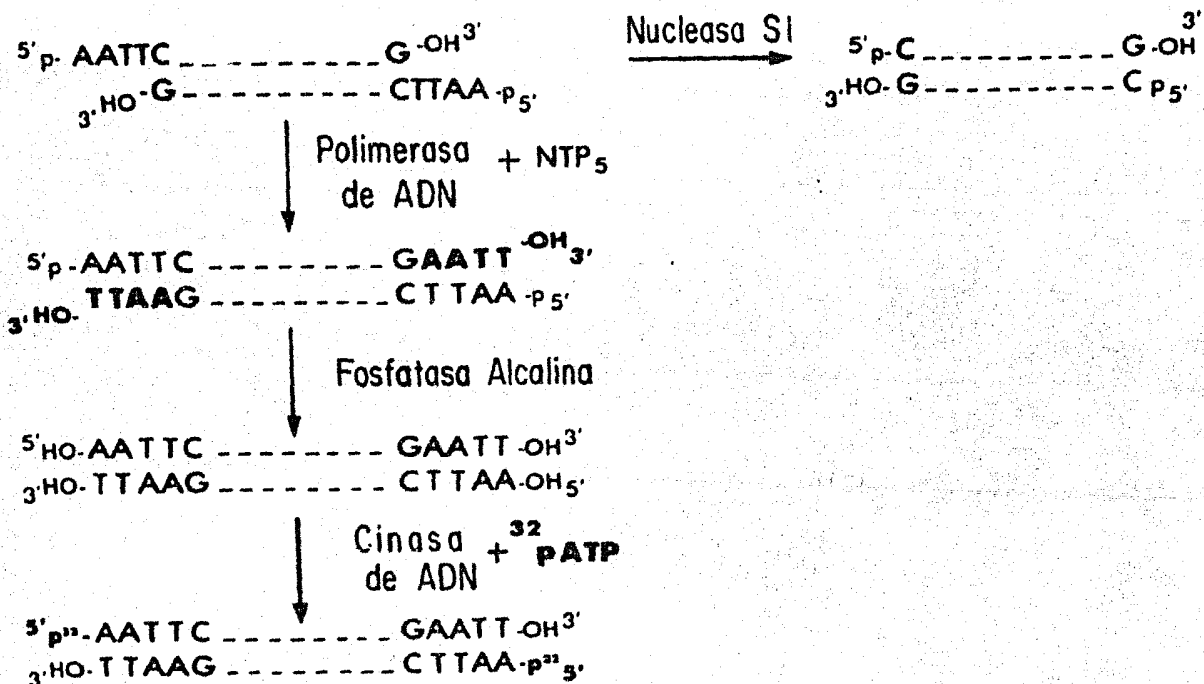


Figura 3 Representación esquemática de la acción de algunas enzimas sobre el DNA que ayudan a la construcción de moléculas híbridas de DNA.

característica importante de esta enzima es que puede unir fragmentos con extremos cohesivos, así como fragmentos con extremos rasos, es decir sin que medie el apareamiento de bases (Sgarmella et al, 1970).

Otras enzimas cuyo sustrato es el DNA, han sido usadas principalmente para modificar los extremos de esta molécula y para obtener DNA marcado con isótopos radioactivos. Podemos citar la polimerasa de DNA T4, cinasa de DNA, exonuclea

sas, nucleasa S1 y otras. En la figura 3 se ejemplifica la acción de estas enzimas.

2) Vehículos de clonación

Otro componente esencial de la ingeniería genética es el vehículo molecular, cuya principal función es estabilizar DNA exógeno. Desde 1976 a la fecha, se han diseñado una serie de vehículos moleculares que pueden ser introducidos en diferentes especies, y que presentan características particulares dependiendo del organismo en el que son capaces de replicarse. Se han construido vehículos moleculares para bacterias, hongos, células vegetales y células de vertebrado (Stein et al, 1982; Helinski, 1977). Cabe señalar que los vehículos moleculares más utilizados son los que presentan como célula receptora a Escherichia coli., dado que a nivel genético y molecular es el organismo mejor conocido y permite una selección fácil de moléculas recombinantes. Por esta razón, se mencionarán las características de los vehículos moleculares de E.coli.

Idealmente los vehículos moleculares útiles para clonar en E.coli deben satisfacer varios de los siguientes requisitos (Timmis et al,

1978):

- 1) Ser replicones autónomos bien definidos que puedan ser purificados fácilmente en grandes cantidades.
- 2) Deben codificar para una o varias propiedades que permitan la selección de la bacteria que lleva este DNA de una población de células.
- 3) El vector debe contener sitios únicos de corte para varias endonucleasas de restricción. Estos sitios no deben residir en la región de DNA que codifica para la propiedad seleccionable y cuando se inserta un fragmento de DNA en estos sitios, las funciones de replicación del vector no deben ser inactivadas.
- 4) Deben tener propiedades que permitan la detección de las moléculas recombinantes.
- 5) Deben ser pequeños.
- 6) Deben tener propiedades que minimicen la frecuencia de transferencia a otras bacterias.

En E.coli se han utilizado como vehículos moleculares plásmidos y fagos y a ellos nos referiremos a continuación.

2.1 Plásmidos como vehículos moleculares.

Los plásmidos son moléculas de DNA, extracromosomales, de replicación autónoma y generalmente dispensables, que han sido aislados de bacterias. Su naturaleza física fue determinada en gradientes de cloruro de cesio-bromuro de etidio y por fotografías al microscopio electrónico, donde se encontró que son moléculas de DNA cerradas covalentemente y de estructura superenrollada.

Los plásmidos han sido clasificados de acuerdo a una serie de

criterios. Para los fines de esta introducción, baste mencionar que el más utilizado de ellos se basa en las propiedades de compatibilidad entre los plásmidos, es decir, en la probabilidad de coexistencia de dos plásmidos diferentes en la misma célula. Este criterio es importante porque las propiedades de compatibilidad están determinadas por el modo de replicación de un plásmido (Collins et al, 1978) en donde a su vez se ven involucradas características tales como el número de copias y el tamaño del plásmido; de manera que plásmidos similares en su modo de replicación son incompatibles y entonces pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad, lo cual indica que comparten ciertas características (Helinski, 1977).

Inicialmente ciertos plásmidos naturales que cumplieran con algunos de los requisitos anteriormente citados, fueron utilizados como vehículos moleculares (pSC101, ColE1) (Cohen et al, 1977), sin embargo, la necesidad de mejores vectores condujo a su construcción. Varios vectores han sido construidos hasta la fecha, y de estos, el pBR322 ha sido el más utilizado (Bolivar et al, 1977). Algunas de las propiedades que hacen al pBR322 un buen vehículo molecular son las siguientes: (a) Es un plásmido multicopia que puede ser amplificado por las células que lo llevan en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas, (b) confiere a su huésped resistencia a ampicilina y tetraciclina, (c) tiene varios sitios únicos para endonucleasas de restricción algunos de los cuales se encuentran en el gene estructural de los marcadores genéticos, (d) es pequeño y se ha determinado totalmente su secuencia nucleotídica.

En la figura 4 se presenta un mapa detallado de este vehículo

Existen además algunos derivados del pBR322 que presentan ciertas ventajas respecto a este. De ellos los más importantes son el pBR327 y

TABLA 2. CARACTERISTICAS DE LOS PLASMIDOS DE LA SERIE pBR. COMO VEHICULOS MOLECULARES DE CLONACION

Nombre	Modo de replicación	Peso molecular $\times 10^6$	Sitios únicos de restricción	Marcadores genéticos
pBR313	pMB1	5.6	<u>EcoRI</u> <u>HindIII</u> <u>BamHI</u> <u>SalI</u> <u>HpaI</u>	Ap ^r , Tc ^r , inmunidad a colicina El
pBR322	pMB1	2.8	<u>EcoRI</u> , <u>HindIII</u> , <u>BamHI</u> , <u>SalI</u> , <u>PstI</u> , <u>AvaI</u> , <u>PvuII</u>	Tc ^r , Ap ^r
pBR325	pMB1	3.7	<u>EcoRI</u> , <u>PstI</u> , <u>SalI</u> , <u>HindIII</u> , <u>BamHI</u>	Tc ^r , Ap ^r , Cm ^r
pBR327	pMB1	2.16	<u>EcoRI</u> , <u>HindIII</u> , <u>BamHI</u> , <u>SphI</u> , <u>SalI</u> , <u>PstI</u> , <u>AvaI</u>	Tc ^r , Ap ^r
pBR329	pMB1	2.7	<u>BalI</u> , <u>EcoRI</u> , <u>PvuII</u> , <u>PvuI</u> , <u>PstI</u> , <u>HindIII</u> , <u>BamHI</u> , <u>SphI</u> , <u>SalI</u> , <u>AvaI</u>	Tc ^r , Ap ^r , Cm ^r

el pBR329. El primero reúne las mismas propiedades que el pBR322, pero posee un menor tamaño, debido a que proviene de una delección, de un fragmento presente en este último, que le es dispensable; la carencia de este fragmento, por otro lado, lo hace menos movilizable (Soberón et al, 1980). El pBR329 fué construido a partir del pBR327 y permite clonar fragmentos generados por la endonucleasa de restricción EcoRI y seleccionar las moléculas recombinantes por inactivación insercional en el gene de resistencia a cloranfenicol además de poseer sitios únicos para las endonucleasas de restricción Pvu II y Bal I localizados dentro de este mismo gene de resistencia (Covarrubias et al, 1982).

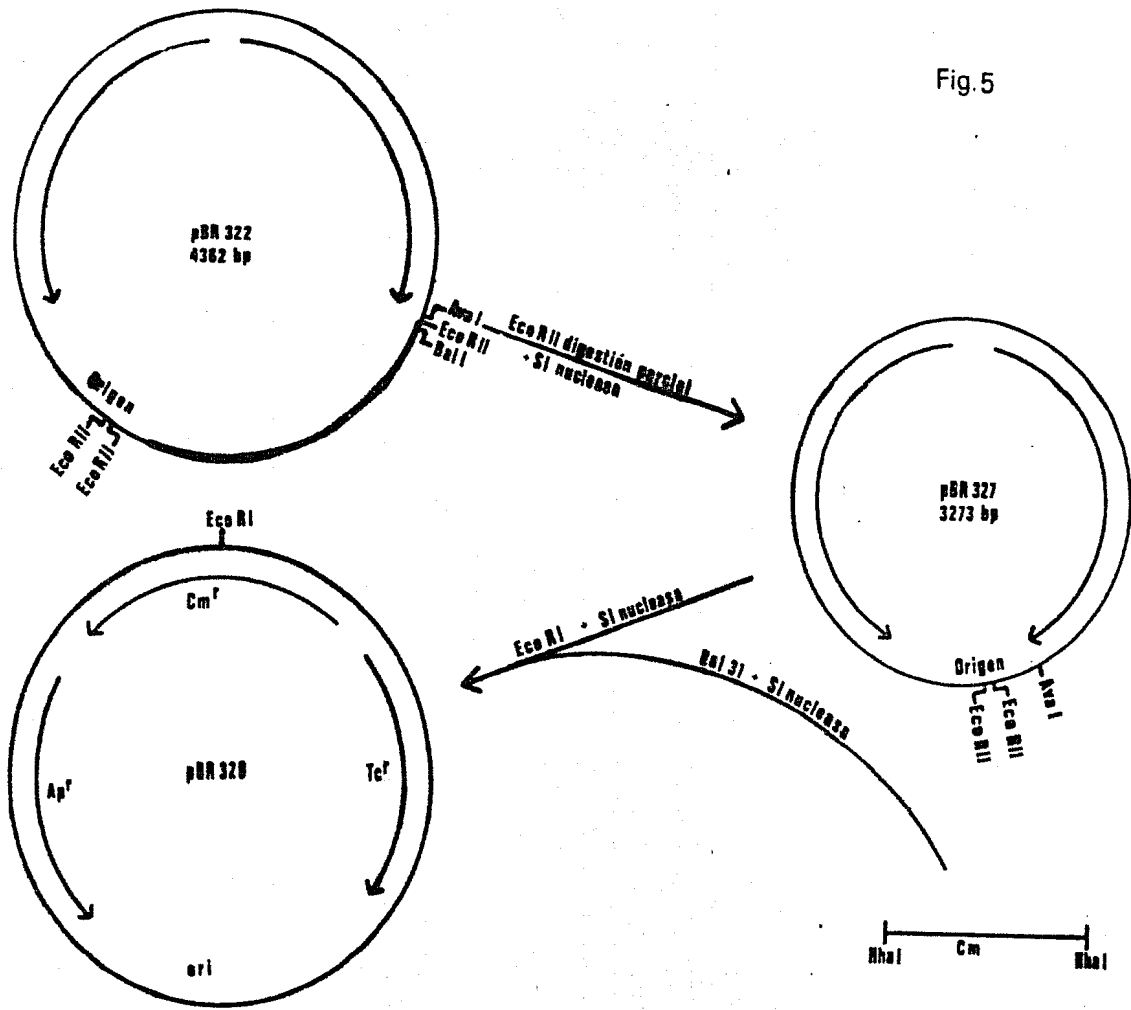
En la tabla 2 se dan las características de estos plásmidos y otros de la misma serie y en la figura 5 se esquematiza su construcción.

2.2 Fagos como vehículos moleculares.

Los vehículos moleculares fágicos más utilizados en E.coli principalmente son derivados del fago λ . Una característica de todo derivado de λ que pueda utilizarse como vector, es la ausencia de sitios de restricción usados para clonación en la región indispensable y la presencia de uno o más sitios dentro de la región no esencial. La eliminación de sitios de restricción en las regiones necesarias para λ se ha logrado por medio de la selección de mutantes o mediante la introducción por recombinación de delecciones y sustituciones que cubren estos sitios (Ramback et al, 1974).

En la mayoría de los vectores fágicos diseñados para clonación con EcoRI, uno de los fragmentos en el centro del genoma del fago ha sido escindido con EcoRI, dando origen a un fago con dos sitios para esta enzima. Cuando este vector es digerido con EcoRI se generan tres

Fig. 5



fragmentos, los dos más grandes comprenden los extremos del fago. Algunos sistemas fágicos para clonación molecular presentan la ventaja de que permiten una alta eficiencia para la obtención y búsqueda de recombinantes (Maniatis et al, 1982), de manera que constituyen una mejor opción cuando se pretenden clonar muchos fragmentos distintos a la vez, además los vehículos moleculares derivados de λ hacen posible la clonación de fragmentos grandes de DNA (hasta 20,000 p.b.), lo cual es difícil de lograr con plásmidos. Sin embargo para manipulaciones más finas (como caracterizar totalmente una región de DNA) y para clonar fragmentos específicos de menos de 10,000 pares de bases, los plásmidos son más adecuados.

Además de los plásmidos y fagos, recientemente se han desarrollado nuevos sistemas híbridos de plásmidos y fago λ denominados cósmidos y fásmidos con aplicaciones para cierto tipo de experimentos (Collins et al, 1978).

3) Clonación molecular.

El término "clona molecular" ha sido usado por extensión de "clona celular". Una clona es un conjunto de células que descienden de una sola por divisiones asexuales sucesivas. Cuando se extiende sobre medio sólido un número pequeño de células, se puede observar, después de incubar algunas horas, la aparición de colonias discretas. Cada una de estas colonias representa una clona.

Se pueden introducir a células bacterianas moléculas de DNA recombinante en donde uno de los fragmentos es un vehículo de clonación y el otro u otros son los fragmentos heterólogos covalentemente unidos a él. Las colonias resultantes de tal procedimiento son un conjunto de clonas celulares, cada una de las

cuales contiene un solo tipo de molécula de DNA híbrida. Este fenómeno es el que se llama clonación molecular.

Existen tres mecanismos por medio de los cuales una molécula de DNA puede ser introducida a la bacteria receptora: la conjugación, la transfección y la transformación. Este último es el más general y permite la introducción de DNA de cualquier origen (Stent et al, 1978). El procedimiento de transformación comúnmente empleado depende de la capacidad de cationes divalentes tales como calcio o rubidio, para interactuar con el DNA transformante y la membrana de la bacteria permitiendo así, el establecimiento de DNA circular lineal y de hélice sencilla (Hanahan, 1974).

Una vez obtenidas las clonas moleculares la selección y aislamiento de la molécula deseada puede hacerse a través de un análisis genético de las funciones codificadas por las moléculas recombinantes (pruebas de resistencia a antibióticos, pruebas de complementación en bacterias, requerimientos nutricionales, etc).

4) Técnicas auxiliares

Paralelamente al desarrollo de las técnicas de recombinación "in vitro" de ácidos nucleicos ha habido un progreso importante de otras técnicas no propiamente pertenecientes a esta metodología pero sin embargo muy útiles a ella. De éstas, describiré las más importantes muy brevemente, puesto que no son utilizadas en el presente trabajo.

1.-Síntesis química de DNA. En la actualidad esta técnica, es extensamente utilizada puesto que muchas son las posibilidades que ha abierto. De ellas las más importantes son: el estudio y manipulación de regiones regulatorias a través de la síntesis,

para clonación de oligonucleótidos que constituyen una de estas regiones (Iwawashima et al, 1977); el aislamiento de genes específicos utilizando fragmentos de DNA sintético, como rastreadores (Agarwal et al, 1981); la mutagenesis sitio específica con el uso de oligonucleótidos sintéticos como mutágenos (Gillam et al, 1979); la construcción para su expresión de genes de difícil aislamiento (Veddel et al, 1979); el estudio de conformación de ácidos nucleicos por cristalografía (Wing et al, 1980); la síntesis de secuencias de reconocimiento para endonucleasas de restricción que puedan ser posteriormente clonadas en vehículos de clonación (Itakura et al, 1978).

Hasta ahora se han desarrollado diversos métodos para la síntesis química de DNA siendo los más comúnmente utilizados el método del triéster (Itakura et al, 1973); el método del fosfito (Kabacknik et al, 1971) y el método en fase sólida (Miyashi et al, 1980).

2.-Hibridación. En muchos casos en donde la selección de moléculas recombinantes resulta difícil utilizando únicamente las características del vector, se puede utilizar la propiedad de los ácidos nucleicos de cadena sencilla de aparearse mediante la formación de puentes de hidrógeno (hibridación) con moléculas de secuencia complementaria. La hibridación puede hacerse entre dos poblaciones de DNA desnaturizadas o entre DNA desnaturizado y RNA. Usualmente una de las cadenas, denominada rastreador, se marca radioactivamente (Grunstein et al, 1975).

3.-Secuencia nucleotídica de DNA. Conocer la secuencia de un fragmento

De DNA que ha sido clonado, representa multiples ventajas para su caracterización. Así por ejemplo, a través de la secuencia, es posible determinar zonas donde pudiera iniciar la transcripción (promotores), zonas de inicio de la traducción, deducir la secuencia de aminoácidos si se codifica para una proteína, deducir la formación de estructuras secundarias, etc.

Hasta ahora se han desarrollado dos métodos para la secuenciación de DNA. El primero de ellos es esencialmente químico y fue introducido por M. Maxam y W. Gilbert de la Universidad de Harvard (1977). En este procedimiento la cadena sencilla de DNA que se desea secuenciar se marca radioactivamente en su extremo 5'. Muestras del fragmento marcado son tratadas bajo cuatro diferentes condiciones con agentes que causan rompimientos próximos a nucleótidos particulares. Las condiciones son tales que en cada reacción se produce una población de fragmentos de diferente tamaño, todos los cuales terminan en el nucleótido característico de esa reacción. Los fragmentos así obtenidos se separan por electroforesis en un gel de poliacrilamida, el cual, finalmente se autorradiografía para determinar la posición de las bandas radioactivas.

En el segundo procedimiento, desarrollado por F. Sanger y colaboradores en Cambridge, G.B. (1977), las poblaciones de fragmentos radioactivos que terminan en un nucleótido específico, son obtenidos a través de métodos enzimáticos y al igual que en el caso anterior, se hace uso de electroforesis en gel y autorradiografía.

II REPLICACION DE DNA

ra que uno de los objetivos del presente trabajo, como se verá más adelante, es obtener un plásmido que permita la construcción de un vehículo en el cual pueda regularse el número de copias, es decir, el número de réplicas del plásmido presentes por cromosoma, será necesario en esta parte de la introducción, mencionar los conceptos fundamentales sobre la replicación del DNA, así como delinear los aspectos básicos del mecanismo que regula la iniciación de la replicación de los plásmidos tipo ColE1, puesto que de la frecuencia con que ocurra ésta, dependerá el número de copias del plásmido.

1) Conceptos fundamentales.

La replicación es un evento que se inicia a partir de secuencias nucleotídicas únicas llamadas orígenes de replicación. El origen de replicación comprende por definición todo el material genético necesario para que un fragmento de DNA pueda replicarse autonomamente. Los cromosomas de procariotes, así como otros replicones circulares de tipo extracromosomal, tienen generalmente, un solo origen de replicación. Los cromosomas lineales de eucariotes, en cambio, tienen muchos orígenes de replicación, usualmente separados por 30 a 100 kilopares de bases (Watson et al, 1977).

Cada nueva cadena de DNA, es iniciada por la síntesis de un RNA llamado primero, el cual es removido en pasos subsiguientes y sustituido por DNA.

Los desoxinucleótidos son adicionados al extremo 3' del primero, de tal forma que la cadena de DNA naciente crece en dirección 5'---3'.

La replicación de cromosomas procariotes es bidireccional y es regulada por la frecuencia de su inicio. Se sabe que en procariotes esta frecuencia correlaciona bien con la velocidad de crecimiento. Sin embargo, se conoce muy poco acerca de los mecanismos moleculares que permiten tal regulación, excepto en el caso de algunos plásmidos para los cuales se han podido sugerir modelos que explican la regulación del inicio de su replicación (Tomizawa et al, 1982). Uno de estos modelos se comentará posteriormente.

La replicación del DNA ocurre con la participación de diversas enzimas tales como las primasas, las topoisomerasas y las DNA polimerasas, de ellas las más importantes son las últimas, pues son las que catalizan la adición de los desoxirribonucleósidos-5'-trifosfatos a los extremos 3' de los primeros. Hasta el momento se han encontrado tres DNA polimerasas; DNA polimerasas I, II y III. La primera de ellas fué descubierta por Kornberg, esta enzima tiene actividad de polimerasa "in vitro" en dirección 5'---3' y además actividad de exonucleasa. Actualmente, se cree que su papel principal "in vivo" es de reparadora, y que para la biosíntesis del cromosoma, es indispensable la acción de la DNA polimerasa III (pol III), cuya velocidad de polimerización es mayor, Sin embargo, algunos plásmidos tales como los tipo ColE1, de los cuales hablaremos más adelante, requieren para replicarse "in vivo" de la DNA pol I (Stent et al, 1978).

2) Plásmidos tipo ColE1 y regulación del inicio de su replicación.

El plásmido ColE1 es un plásmido bacteriocinogénico, es decir codifica para bacteriocinas. Fué aislado de células de E.coli en donde

se mantiene estable con aproximadamente 15 copias por célula. Se han aislado varios plásmidos que se replican en forma muy similar al ColE1 y por ello se les ha denominado plásmidos tipo ColE1. Debido a su estructura relativamente simple, su alto número de copias y la facilidad con que se aíslan, el ColE1 y sus similares han sido ampliamente utilizados como modelos para estudios de replicación y, en general para estudiar la biología de plásmidos (Veltkamp et al, 1981). Además, a partir de ellos se han construido plásmidos extensamente utilizados como vectores para clonación.

Hasta el momento el proceso del inicio de la replicación ha sido ampliamente estudiado en los plásmidos tipo ColE1 y el modelo actualmente propuesto es el siguiente:

La transcripción de un RNA también llamado primero o RNA II se inicia aproximadamente 550 pares de bases antes del sitio en donde se adiciona el primer nucleótido de DNA (Itoh et al, 1980). El RNA II está compuesto de transcritos que terminan en diferentes sitios más allá del origen (Itoh et al, 1980). Algunos de los transcritos nacientes forman un híbrido con el templado de DNA cerca del origen. Esto provee una estructura que puede ser procesada por la ribonucleasa H (RNAasa H) en forma tal que se obtiene un primero para la replicación del DNA que empieza en un sitio único del plásmido por la acción de la DNA polimerasa I (Itoh et al, 1980; Itoh et al, 1978).

La formación del primero esta regulada principalmente por una función especificada por el mismo plásmido. Se ha encontrado que una región localizada dentro de los 400 y 550 pares de bases antes del origen está involucrada en la regulación del número de copias

(Conrad et al, 1979; Lacatena et al, 1981a; Tomizawa et al, 1981; Tomizawa et al, 1981b). En esta región se especifica otro transcrito además del RNA II; el RNA I (Morita et al, 1979), cuya transcripción se inicia 445 pares de bases antes del origen; procede en dirección opuesta a la transcripción del RNA II (es decir se sobrelapa con él) y termina cerca del sitio donde ésta se inicia. Experimentos in vitro han demostrado que el RNA I es un inhibidor de la formación del primero (Itoh et al, 1982), ya que su interacción con el RNA II, impide la formación del híbrido RNA II/DNA templado.

Del anterior modelo se observa que la cantidad de RNA I presente en la célula influenciará la frecuencia con que se inicie la replicación y sugiere la idea de que es posible regular la replicación de un plásmido de este tipo, a través del control de la transcripción del RNA II o bien del RNA I. Actualmente el proceso de transcripción y los mecanismos que la regulan, son fenómenos relativamente bien conocidos (Barkley et al, 1980; Rosenberg et al, 1979) y la posibilidad de manipular los elementos en ellos involucrados, es ya factible (Goldberger, 1979). En el caso particular del RNA II de los pBRs, cuyo promotor está bien localizado y caracterizado, se antoja sencilla la regulación de su transcripción a través de insertar, previo al promotor, un operador que se haya aislado del cromosoma del huésped, (por ej. el operador del operón lac), de tal manera que este último se mantenga reprimido por el represor del huésped (puede ser necesario el uso de una cepa hiperproductora de represor) y pueda inducirse su transcripción utilizando un inductor gratuito del operador lac como IPTG (isopropiltiogalactósido). Ha sido demostrado que el operador lac es funcional aun cuando se localice previo al

promotor , en contraste con la posición posterior a este como se encuentra en la naturaleza (Soberón et al, 1982).

JUSTIFICACION Y OBJETIVO

Es ahora claro que la ingeniería genética es una herramienta útil para el desarrollo de ciencias básicas tales como la genética y biología molecular.

Por otro lado las posibilidades de una inmediata aplicación de sus logros a la biotecnología y en un futuro a la medicina y agricultura (Bolivar, 1979) hacen de ella una metodología muy interesante. Por esta razón resulta evidente que su desarrollo y perfeccionamiento son una necesidad actual.

Anteriormente se mencionó que el vehículo molecular es un componente esencial para la manipulación "in vitro" de ácidos nucleicos. Por otra parte en el laboratorio donde esta tesis se ha desarrollado se tiene experiencia en cuanto a las técnicas de DNA recombinante y existe cierta tradición en lo que respecta a la construcción de vehículos de clonación y de hecho algunos de los vectores más usados internacionalmente, han sido construidos aquí (pBR322, pBR327, etc).

En la introducción de esta tesis fueron descritos los vehículos para clonación más importantes; todos ellos se encuentran ahora totalmente secuenciados y caracterizados. Sin embargo, aun pueden obtenerse vectores con una mayor versatilidad y en este sentido se trabajará en la presente tesis.

Concretamente los objetivos actuales, del laboratorio en cuanto a construcción de vehículos de clonación son los siguientes:

1) El aislamiento del origen de replicación del pBR327, de tal manera que pueda obtenerse como un solo fragmento de restricción y así usarse, en combinación con fragmentos de DNA que lleven genes de resistencia, para la construcción de vehículos moleculares con propiedades muy distintas de los que existen actualmente en lo que respecta a marcadores genéticos.

2) La alteración del origen de replicación del pBR327, de tal forma que sea posible aumentar o disminuir su número de copias.

En cuanto a este último objetivo consideramos que presenta múltiples ventajas, puesto que en muchos casos, particularmente en estudios de investigación básica, un vehículo es requerido en monocopia (un solo plásmido por cromosoma), para acercarse más a las condiciones en que normalmente se expresan los genes del cromosoma y en cambio, en otras etapas del mismo experimento (como en la purificación), es necesario tener el plásmido como multicopia (más de 20 plásmidos por célula). El plásmido pBR327 es multicopia (posee aprox. 50 copias) (Covarrubias, 1980) y por lo tanto, los esfuerzos por regularlo irían en el sentido de poder reprimir su replicación a voluntad y no de aumentar su número de copias.

Con base en lo que se expresó en la introducción con respecto a orígenes de replicación, creemos que sería posible reprimir la replicación del pBR327, insertando un operador inmediatamente antes del promotor del primero de replicación. Sin embargo, en el pBR327 es imposible manipular esta región, dado que no existe una secuencia única de reconocimiento para una endonucleasa de restricción cercana al origen de replicación. La introducción de tal secuencia, entre el

gene de resistencia a ampicilina y el origen de replicación del plásmido mencionado, permitiría hacer las manipulaciones deseadas y por otra parte significaría el aislamiento del origen de replicación dado que ya existe en el pBR327 un sitio único de reconocimiento para la enzima Ava I delimitando el final del origen. Esta característica del pBR327, que lo distingue entre otras cosas del pBR322, es la principal razón de que haya sido elegido para la presente experimentación. Finalmente, la presencia de este nuevo sitio de restricción causaría también el aislamiento del gene de resistencia a ampicilina, que entonces podría obtenerse como un fragmento de EcoRI y este nuevo sitio. Debido a la amplia utilización de los marcadores genéticos en la metodología de DNA recombinante, la posibilidad de obtener el gene completo de ampicilina como un solo fragmento de restricción sería una aportación importante a esta metodología.

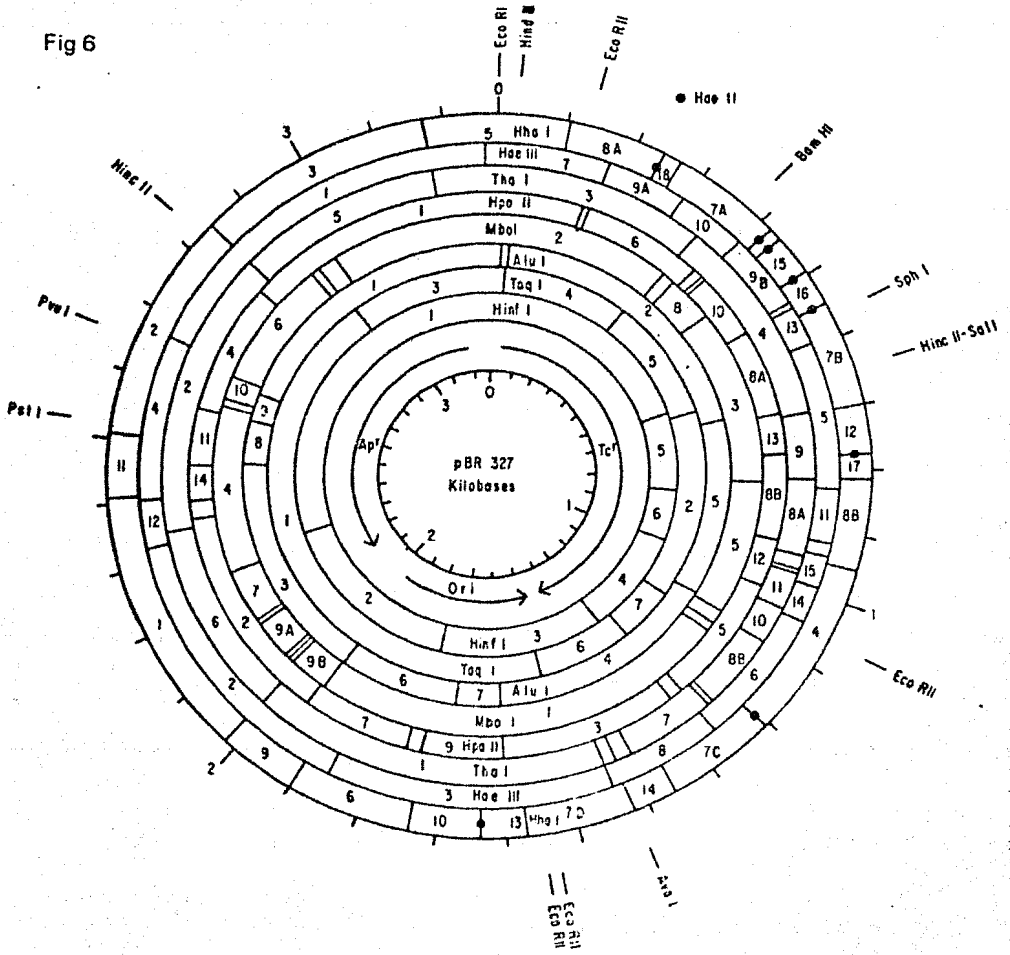
Cabe señalar que para el aislamiento del origen de replicación y el gene de ampicilina no es estrictamente necesario que el sitio generado sea único, pues bastaría con que no se repitiera dentro de la región que va desde el inicio del gene de resistencia a ampicilina hasta el sitio donde finaliza el origen de replicación. Más aún, si este sitio solo estuviera repetido una vez fuera de la zona mencionada, incluso podría ser útil para la manipulación del origen, a través del uso de digestiones parciales o tratamiento con bromuro de etidio.

En función de lo anteriormente expuesto, el objetivo central de este trabajo es el siguiente:

La generación de un sitio único de reconocimiento para una endonucleasa de restricción, situado en la región que separa el gene

que confiere resistencia a ampicilina del origen de replicación del plásmido pER327.

Fig 6



DISEÑO EXPERIMENTAL

En el pBR327 existen varios sitios reconocidos por la endonucleasa de restricción Sau3A, cuya secuencia de reconocimiento es GATC. Cinco de estos sitios se encuentran localizados entre el final del gene de resistencia a ampicilina y el inicio del origen de replicación, de manera que cortes en cualquiera de ellos no deberán afectar la funcionalidad del plásmido.

Por otro lado, a través de un análisis de la secuencia nucleotídica del pBR327 (Covarrubias, 1980) se sabe que la deleción de un pequeño fragmento, causada por dos cortes específicos de Sau3A dentro de la región arriba mencionada, generará en el plásmido extremos tales que al quedar unidos, por recircularización, darán origen a la secuencia AGATCT que es reconocida por la endonucleasa de restricción BglII, para la cual no hay ningún sitio de reconocimiento en el pBR327.

Una digestión del plásmido con la endonucleasa Sau3A, en condiciones de tiempo y cantidad de enzima tales que impidan que se complete la reacción, generaría una población de fragmentos con diferente número de cortes en distintos sitios. Dentro de la población de fragmentos producidos a través de esta digestión parcial, estarán presentes algunos que hayan sufrido los cortes referidos.

Así mismo dos cortes distintos de Sau3A, dentro de la misma región, originarían al recircularizar la secuencia GGATCC la cual, sería reconocida por la endonucleasa de restricción BamHI.

En la figura. 7 se esquematiza la estrategia descrita y en la

figura. 8 se representa graficamente la región mencionada y se señala la combinación de cortes que generarían los sitios de reconocimiento deseados.

Los fragmentos producidos por la reacción parcial antes descrita, podrán separarse por electroforesis en gel de acrilamida (ver materiales y métodos) y de esta manera se podrán seleccionar y recuperar aquellos cuyo peso molecular indiquen que han sido cortados en los sitios adecuados (la migración de las moléculas guarda relación con sus pesos moleculares). Los cortes de *Sau3A* que caigan en la región descrita causarán deleciones pequeñas, de manera que los fragmentos que resulten de estas deleciones migrarán en forma muy similar al pBR327 lineal, el cual servirá como control de peso molecular. Por otro lado dentro de la población de fragmentos de DNA que migren en forma parecida al pBR327 lineal, habrá algunos que hayan sufrido deleciones en regiones distintas del plásmido. Estos fragmentos no podrán distinguirse ni serán separados de los que nos interesan.

Posteriormente, utilizando DNA ligasa del fago T4 se recircularizarán las moléculas obtenidas y con ellas se transformará la cepa de *E. coli* K-12 RR1 (ver materiales y métodos). Las colonias transformantes se seleccionarán en placas con medio luria que contengan a la vez ampicilina y tetraciclina con lo cual, se impedirá el crecimiento de colonias que contengan plásmidos con deleciones dentro de los genes que confieren resistencia a los antibióticos mencionados o dentro del origen de replicación.

Finalmente se harán micropreparaciones de DNA de plásmido (ver materiales y métodos) de las transformantes Ap Tc y se determinará si existen secuencias de reconocimiento para las endonucleasas *BamHI* y

Fig.7

NGATCN
NCTAGN Sau 3A
▲

AG **ATCT**
TC **TAGA**

≡ Sau 3A
≡ Ligasa T4

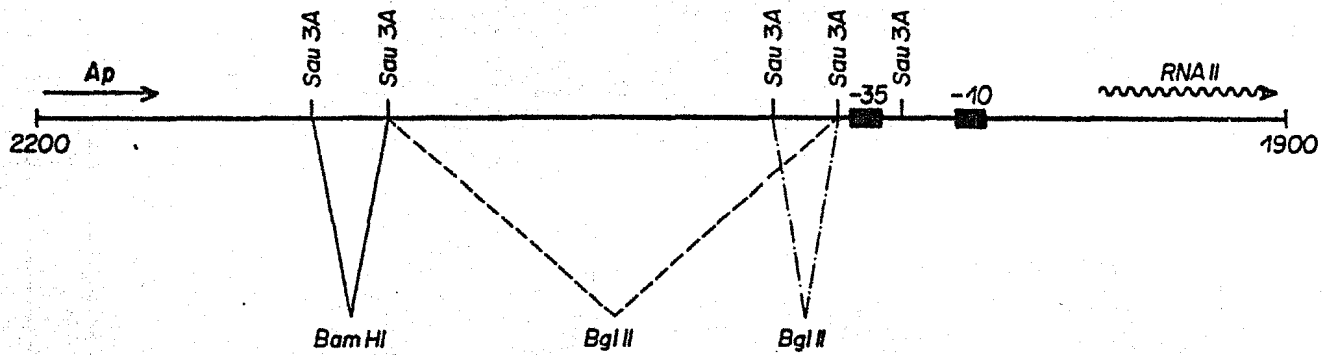
AGATCT
TCTAGA
▲ Bgl II

GGA **TCC**
CCT **AGG**

≡ Sau 3A
≡ Ligasa T4

GGATCC
CCTAGG
▲ Bam HI

Fig. 8



BgIII en la región descrita.

MATERIALES Y METODOS

a) Cepas bacterianas

Las células receptoras usadas en los experimentos de transformación son dos cepas de E. coli K-12:

RRI, que es una derivada Rec⁺ de HB101 (F pro, leu, thi, lacY, rpsL20, hsdR, hsdM, ara-14, galK-2, xyl-5, mtl-1, supE44, Str, EndoI, RecA,) (Boyer & Roulland-Dousoix, 1969) y la cepa GM31 (dcn-6, thr-1, leu-6, thi-1, his, lacY, galK-2, galT-22, ara-14, tonA31, tsx78, supE44, Str, hsdR, hsdM, mec,).

b) Medios de cultivo

Los inóculos se hicieron en caldo Luria (LB), el cual contiene: Bacto-Tryptona (Difco) al 1.0%, extracto de levadura (Difco) al 0.5%, NaCl al 1.0% y NaOH 2.5 mM. Cuando se deseó aislar alguna cepa se usó caldo Luria sólido, el cual contiene: agar (Difco) al 2.0% y ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol, cuando fue necesario, en una concentración de 30 mg/l.

El medio mínimo M9 usado para la purificación de plásmido, está constituido por: 20 ml de glucosa al 20%, 4 g de casaminoácidos (Difco), 10 ml de MgSO₄ 0.1 M, 10 ml de CaCl₂ 0.01 M, 100 ml de sales 10X (por litro: 132 g de Na₂HPO₄·7H₂O, 30 g de KH₂PO₄, 5 g de NaCl, 10 g de NH₄Cl), los requerimientos de cada cepa (4 ml de: prolina al 4%, leucina al 1%, histidina al 1%, treonina al 2%; 0.2 ml de vitamina B1 al 0.1%) y 860 ml de agua destilada. Los requerimientos fueron

esterilizados por filtración y la glucosa y las sales 10X esterilizados por separado en el autoclave.

c) Purificación de DNA de plásmido

El DNA del plásmido pBR327 fue preparado amplificando cultivos en crecimiento en fase exponencial por la adición de 170 mg/l de cloranfenicol (Cleveland et al, 1972).

La extracción y purificación de DNA de plásmido se hizo conforme al método de lisado claro, descrito por Betlach et al (1976), el cual consta de los siguientes pasos:

1. Incubar 5-10 ml de cultivo en LB toda la noche.
2. Agregar 5 ml de este cultivo a un litro de medio mínimo M9.
3. El cultivo es incubado a 37 C con aireación, a una densidad celular de $4-5 \times 10^8$ células/ml (35-50 unidades Klett, filtro rojo) tiempo en el cual se añade cloranfenicol o espectinomocina (si la cepa es resistente a cloranfenicol) y la aireación se continúa por 16 ± 2 horas. (Este paso debe usarse para plásmidos relajados. Es importante añadir el antibiótico antes de que el cultivo llegue a fase estacionaria).
4. En este punto los cultivos pueden ser almacenados en frío si es necesario.
5. Centrifugar: rotor GSA (Sorvall), 7000 r.p.m., 10 min, 4C.
6. Lavar las células con NaCl al 0.85% (sol. isotónica) y centrifugar nuevamente: rotor GSA (Sorvall), 7000 r.p.m., 10 min, 4C.
7. Congelar las pastillas de células (hielo seco/etanol se puede usar para congelamiento rápido y completo).

8. Resuspender las células en un total de 10ml/litro de cultivo de sacarosa al 25% en Tris-HCl 50mM, EDTA 1 mM, pH8. Mantener en hielo. (los agregados celulares deben ser separados mezclando, pero con precaución, para no lisar las células en este momento).
9. Añadir lo siguiente por litro en el orden dado:
 - 3ml de EDTA 0.25M pH 8.
 - 1 ml de lisozima (5 mg/ml en Tris-HCl 0.025M, pH 8)
 - 0.1 ml de RNAasa (10 mg/ml en acetato de sodio 0.1M, EDTA 3.3×10^{-5} M, precalentando durante 10 min. a 85°C para eliminar la DNAasa. (las soluciones de lisozima y RNAasa deben ser almacenadas congelándolas a -20°C en pequeñas alícuotas de 2-5 ml).
10. Mezclar suavemente y dejar en hielo 15 min. (las células se convierten en esferoplastos).
11. Añadir tres mililitros de mezcla lítica de tritón 3x (3 ml de tritón X-100 al 10%, 75 ml de EDTA 0.25 M, 15 ml de Tris-HCl 1 M, pH 8, 7 ml de H₂O), mezclar suavemente y dejar en hielo 15 min. (Los esferoplastos se lisan).
12. Centrifugar en tubos de polipropileno de 50 ml; rotor SS34 (Sorvall), 18,000 r.p.m., 40 min, 4c.
13. Decantar el sobrenadante en una probeta graduada de plástico (el DNA se pega al vidrio) inmediatamente después de sacar los tubos del rotor. Anotar el volumen y vaciar en botellas de plástico de 250 ml.
14. Añadir un volumen de agua bidestilada (esto hace la sacarosa menos densa que el fenol).
15. Añadir un volumen (respecto al total) de fenol saturado frío (fenol saturado con amortiguador: una mezcla 1:1 de fenol

- destilado sobre Zinc, y Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5. Equilibrar toda la noche con agitación), mezclar suavemente y añadir un volumen de cloroformo igual al de fenol, mezclar.
16. Centrifugar: rotor HS-4 (Sorvall), 6500 r.p.m., 10 min, 4c.
 17. Pasar la fase superior (acuosa) a otra botella de 250 ml (evitar la película de proteína en la interfase).
 18. Añadir 1/30 del volumen de NaCl 5 M a la fase acuosa. Luego añadir dos volúmenes de etanol a -20c. dejar en estas condiciones 1 hora o más. (Esto precipita el DNA).
 19. Centrifugar: rotor HS-4 (Sorvall), 6,500 r.p.m., 60 min, -5c. Decantar el sobrenadante y secar el exceso de líquido en la botella con un "kleenex" y luego con aire.
 20. Resuspender el precipitado en 5 ml de agua. Añadir 1 ml de glicerol estéril y mezclar suavemente. El glicerol hace la solución más densa, de tal manera que el DNA baja a la superficie de la columna).
 21. Colocar la suspensión en una columna de A-50 (partículas de gel de agarosa para cromatografía por filtración: (Bio-Rad) de 2 x 35 cm de corrida con amortiguador A-50 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, pH 8). Colectar fracciones de 4 ml.
 22. Determinar la densidad óptica (O.D.) a 260 nm de cada fracción. El DNA debe encontrarse en los primeros 40 tubos (4ml/tubo); generalmente entre los tubos 15-25. (Una O.D. de 1.0 equivale a 50 µg de DNA/ml).
 23. Juntar las fracciones que contienen DNA de plásmido. Añadir dos volúmenes de etanol a -20c, congelar por una hora o más. Centrifugar: rotor HS-4 (Sorvall) 6,500 r.p.m. 60 min, -5c.
 24. Secar el precipitado con aire.

25. Resuspender el precipitado en 2.1 ml de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) por cada 500 g de DNA.
26. Gradiente isopícnico a equilibrio de cloruro de cesio-yoduro de propidio

Preparación del gradiente:

- a) 2.1 g de CsCl (sólido)
 - b) 2.1 ml de DNA en TE (cada tubo no debe contener más de 500 g de DNA). Desde este punto, debe procurarse no exponer el DNA mucho tiempo a la luz (el Pdl reacciona con la luz visible).
 - c) 150 µl de una solución de 2 mg/ml de Pdl.
 - d) Cubrir con 2.3 ml de aceite mineral. Se balancean los tubos, dentro de las camisas con aceite mineral.
27. Centrifugar: rotor SW50.1 (Beckman), 38,000 r.p.m., 20 horas, 20°C.
 28. El DNA en el gradiente será visible a la luz ya que el Pdl que es colorido se intercala en el DNA y lo hace visible. Se observarán dos bandas: la superior formada por DNA cromosomal y plásmido roto; y la inferior, formada por el plásmido superenrollado (los intermediarios de replicación del plásmido producen un tenue barrido entre las dos bandas).
 29. En la obscuridad y bajo luz UV picar el fondo de los tubos y coleccionar lentamente, el DNA de plásmido en un tubo de plástico.
 30. Usar una columna de intercambio iónico (Dowex 50W-X8, Bio-Rad; tratada con ácido y luego con base, 1N cada uno, neutralizada y almacenada en Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 8) para eliminar el Pdl. Se colocan 2-3 ml de resina en una columna pequeña y se

equilibran con 10 ml de amortiguador de rewsina Dowex (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 1M) por cada ml de resina.

31. En la obscuridad, colocar la muestra diluida 1:1 con amortiguador Dowex (si no se diluye el CsCl, el complejo DNA-PdI se mueve demasiado rápido a través de la columna), eluir lentamente y añadir, por lo menos, un volumen de columna de amortiguador Dowex para lavar el DNA remanente. Revisar con luz UV si todo el PdI se ha eliminado; si algo se salió, correr el eluato a través de otra columna.
32. Dializar el DNA contra 2-4 litros de Tris-HCl 10 mM, EDTa 1 mM, pH 8, por 6-8 horas a 4c. Repetir la operación una o dos veces más.
33. Sacar el DNA de la bolsa de dialisis, y precipitar añadiendo 1/25 del volumen de NaCl 5 M y dos volúmenes de etanol a -20 C. Dejar así por una hora o más.
34. Centrifugar rotor HS-4 (Sorvall), 6500 r.p.m., 60 min, -5c.
35. Resuspender en 0.5-1 ml de amortiguador TE. Medir la densidad óptica a 260 nm para determinar la concentración de DNA (generalmente es de 0.5-1 mg/ml).
36. Almacenar a -20c.

d) Enzimas.

a. Endonucleasas de restricción.

Las enzimas usadas en este trabajo fueron adquiridas en Bethesda Research Laboratory o purificadas de acuerdo al método de Greene et al (1978). Las condiciones de reacción fueron como a continuación se describen:

Se adicionó a la mezcla de reacción 1/10 del volumen de

amortiguador 10X de la enzima usada; nunca se usó un volumen de enzima mayor que el del amortiguador 10X.

Amortiguadores 10X:

EcoRI:

Tris-HCl (pH 7.5) 1 M

MgCl₂ 0.05 M

NaCl 1.0 M

BamHI:

Tris-HCl (pH 7.5) 1 m

MgCl₂ 0.05 M

Hpa II y Hae III:

Tris-HCl (pH 7.5) 60 mM

MgCl₂ 60 mM

β-mercaptoetanol 60 mM

HhaI:

Tris-HCl (pH 7.4) 0.5 M

MgCl₂ 0.05 M

ditiotritol 0.005 M

HinfI:

Tris-HCl (pH 7.5) 60 mM

MgCl₂ 60mM

β-mercaptoetanol 60 mM

NaCl 1.0 M

EgIII

Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM

MgCl₂ 10 mM

ditiotritol 1 mM

Sau3a

Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM

MgCl₂ 10 mM

NaCl 50 mM

ditiotreitól 1 mM

Las reacciones con endonucleasas fueron incubadas a 37 C, durante el tiempo requerido de acuerdo con la actividad de cada enzima, y después detenidas mediante calentamiento a 75C durante 10 min, o adicionando 1/3 a 1/5 del volumen de "mezcla inactivadora" (urea 10M, cianol de xileno 0.05%, azul de bromofenol 0.05%, en agua).

Cuando se hizo necesario, las muestras fueron extraídas con un volumen de fenol saturado y un volumen de cloroformo (este procedimiento elimina la proteína adicionada) y precipitadas con dos volúmenes de etanol.

En el caso de la endonucleasa Sau3a, con la cual se quería realizar una digestión parcial, se incubaron 10 µg de DNA durante 20 min. en las condiciones descritas y se tomaron alícuotas conteniendo 1 µg de DNA, a intervalos de 2 min. Cada una de estas alícuotas junto con una digestión total del mismo DNA, un control sin digerir y un control linearizado con EcoRI se corrieron en un gel de acrilamida (ver electroforesis en gel) y se tomó una fotografía de dicho gel pudiéndose determinar así, de acuerdo a la intensidad de las bandas, la condición más adecuada para obtener una mayor cantidad de fragmentos del tamaño requerido (aproximadamente 3200 p.b.). Dicha condición fue: 120 µg de DNA con 10 µl de enzima incubados durante 6 min.

b. Ligasa T4

La ligasa de DNA del fago T4 (un obsequio de H. Heyneker) fue purificada de acuerdo al procedimiento descrito por Panet et al (1973).

Las reacciones de ligasa se hicieron en Tris-HCl 66mM, pH 7.6, MgCl 6.6 mM, ditioneitol 10 mM y ATP 0.5 mM a 12C por 12 horas o más. La concentración de la ligasa del T4 y las de los extremos de DNA fueron variadas para promover polimerización o recircularización (Maniatis et al, 1982). Para fragmentos de DNA de extremos cohesivos, una unidad de ligasa de DNA de T4 por ml fue suficiente y la concentración de las terminales fue ajustada de tal manera que se favorecieran las moléculas lineales (Dugaiczky et al, 1975).

e) Electroforesis en geles de agarosa y acrilamida.

La electroforesis se llevó a cabo en placas conforme a las condiciones descritas por Bolivar et al(1977). Agarosa (Bio-Rad) al 1% se disolvió mediante ebullición en amortiguador Tris-Boratos-EDTA (Trizma Base (Sigma) 90 mM, EDTA 2.5 mM, H₂BO₃ 90mM, pH 8.2), posteriormente se vació y dejó gelificando. Las muestras, con un contenido de 0.2 a 1.0 µg de DNA, se colocaron en los carriles en 15 a 30 µl cada una. La electroforesis se llevó a cabo a 150-180 volts. a temperatura ambiente durante una hora. Este tipo de gel fue usado cuando se trató de fragmentos de peso molecular alto (1-4 Md).

Los geles de poliacrilamida se prepararon mezclando 3 ml de amortiguador Tris-Boratos-EDTA 10X, 7.5 ml (para acrilamida al 7.5%) de solución de acrilamida-bisacrilamida (Bio-Rad) al 28% y 0.6% respectivamente, 150 µl de (NH₄)₂S₂O₈. Después de degasificar al

vacío, se adicionaron 15 μ l de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina) (Bio-Rad) y se vació en el molde. La electroforesis de estos geles se llevó a cabo a 200 volts. durante una hora. Se usó este tipo de gel para DNA de tamaño pequeño (0.015-1 Md).

Después de terminada la electroforesis, los geles se sumergieron en una solución (4 mg/ml) (Calbiochem) y se iluminaron con una lámpara UV de onda corta (Ultraviolet Products, San Gabriel Cal., U.S.A.).

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

Los fragmentos fueron aislados de geles de acrilamida al 5%, usando acrilamida (Bio-Rad) como describen Maniatis et al. (1982). Los pasos son los siguientes:

1. Visualizar el gel con iluminación con una lámpara ultravioleta y cortar la banda por purificar con una navaja. (Pueden cortarse varias bandas de diferentes geles que pesen de 0.05-0.1 g cada una y procesarse simultáneamente).
2. Colocar las bandas dentro de una cámara para electroelución (en fragmentos de 0.5 x 0.5 cm aprox.) y cubrir con amortiguador TE (Tris-EDTA).
3. Establecer un puente de corriente eléctrica entre los dos extremos de la cámara (cada extremo consiste en un pequeño pozo) utilizando amortiguador TEA (Tris 24.2 g/l, Acetato de sodio 8.2 g/l, EDTA 3.7 g/l, pH 8.1) y aplicando una corriente de 100 volts (el DNA migra hacia el polo positivo abandonando el gel).
4. Mantener la corriente eléctrica durante 3 horas. El DNA se

recupera en el pozo opuesto al que se colocaron las bandas disueltas en TE.

5. Para asegurarse de que todo el DNA ha sido eluido, puede teñirse uno de los fragmentos de gel colocados en la cámara con una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y observarse a la luz ultravioleta, si se observa fluorescencia, se deja que la electroelución continúe hasta que ésta desaparezca.
6. El DNA obtenido se precipita con 1/20 volumen de 5 M NaCl y 2.2 volúmenes de etanol a -20°C durante una hora.
7. Centrifugar y secar el precipitado para eliminar el etanol (con una corriente leve de aire). El precipitado se disuelve en agua o amortiguador TE.

f) Transformación de E.coli K-12

Las células de E.coli de las cepas RR1 y GM31 fueron preparadas para la transformación por el método descrito por Cohen et al (1972). El procedimiento es el siguiente:

1. Inocular 30 ml de caldo Luria con un ml. de cultivo crecido durante la noche, dejando crecer hasta una densidad celular de 5×10^8 células/ml (30 unidades Klett, filtro rojo).
2. Pasar el cultivo a un tubo estéril y centrifugar: rotor HB-4 (Sorvall), 10,000 r.p.m., 2-5 min, 4°C. Decantar.
3. resuspender las células en 15 ml de NaCl 10 mM frío y centrifugar nuevamente: rotor HB-4 (Sorvall), 10000 r.p.m., 2-5 min, 4°C. Decantar.
4. Resuspender las células en 15 ml de CaCl_2 30 mM frío y dejar en

hielo durante 20-30 min. (Esto permeabiliza la membrana).

5. Centrifugar: rotor HB-4 (Sorvall), 5000 r.p.m., 5 min, 4C.

Decantar

6. Resuspender las células cuidadosamente en 3 ml de CaCl_2 30 mM frío. Inmediatamente añadir 0.2 ml de esta suspensión a cada uno de los tubos, preparados previamente, que contienen 0.2-2 μg de DNA en 100 μl de CaCl_2 30 mM.

7. Dejar los tubos en hielo durante una hora.

8. Colocar los tubos a 42C durante 2 min. y luego dejar en hielo durante 5 min.

9. Añadir a cada tubo 3 ml de caldo Luria y luego incubar durante dos horas a 37C (Esto permite recuperar la membrana y estabilizar los plásmidos dentro de la célula).

10. Platear 0.1-0.2 ml de cada tubo en el medio adecuado y dejar creciendo toda la noche.

g) Microensayo del DNA de plásmido

Este método consiste en la semipurificación de pequeñas cantidades de DNA de plásmido con el fin de caracterizarlo parcialmente. En este caso se utilizó el método de extracción alcalina reportado por Birnboim & Doly (1979). Los pasos son los siguientes:

1. Cultivar 3 ml de células toda la noche en caldo Luria.

2. Transferir 1.5 ml del cultivo en un tubo "Eppendorf" y centrifugar 2 min en la microcentrifuga (Brinkman; 15000 r.p.m.).

3. Decantar, agregar los 1.5 ml restantes y volver a centrifugar.

4. Resuspender en 150 μl de solución I (2 mg/ml de lisozima, 50 mM

glucosa, 10 mM EDTA y 25 mM Tris-HCl pH 8) y mantener a 4C por 30 min.

5. Agregar 200 μ l de solución II (NaOH 0.2 N y dodecil-sulfato de sodio al 1%). Agitar suavemente los tubos. La solución se torna transparente y ligeramente viscosa.
6. Después de 5 min. a 4 C, agregar 300 μ l de solución III (acetato de sodio 3M pH 4.8) e invertir el tubo cuidadosamente hasta que se observe un precipitado.
7. Congelar los tubos con hielo seco durante 5 min. y centrifugar durante 5 min. Después de este paso se obtiene un sobrenadante claro del cual se toman 600 μ l y se transfieren a otro tubo.
8. Adicionar 1 ml de etanol para precipitar el DNA y mantener a -20 C durante 30 min.
9. El precipitado se obtiene por centrifugación y se resuspende en 200 μ l de solución IV (acetato de sodio 0.1 M, Tris-HCl 0.05M pH 8) precipitándose nuevamente con 400 μ l de etanol a -20 C.
10. Centrifugar de nuevo y secar el precipitado para eliminar los residuos de etanol.
11. Resuspender en 30 μ l de agua destilada y agregar 4 μ l de solución V (1 mg de RNasa A en 1 ml de Tris-HCl 5 mM pH 8 hervida durante 10 min). Incubar el tubo a 37 C durante 10 min.

El DNA así obtenido, puede tratarse con enzimas de restricción o bien utilizarse para transformar otras cepas.

RESULTADOS

A. Construcción del plásmido pBR-17

De acuerdo a la estrategia descrita en el diseño experimental, se realizó una digestión parcial con *Sau3A* del pBR327 bajo las condiciones señaladas en materiales y métodos. Los fragmentos obtenidos en esta reacción fueron separados por electroforesis en gel de acrilamida al 7.5%. El DNA cuya migración correspondía a un tamaño molecular similar al del plásmido, fue separado y eluido del gel y posteriormente precipitado y recircularizado con ligasa de DNA del fago T4. El DNA ligado se usó para transformar la cepa de *E. coli* RR1. Las transformantes $Ap^r Tc^r$ así obtenidas se ensayaron para detectar DNA de plásmido capaz de linearizarse con *BglII* que tuviera una migración ligeramente menor a la del pBR327 lineal, o bien que pudiera ser cortado con la endonucleasa *EamHI* generando bandas cuyas migraciones correspondieran a pesos moleculares de 1662 p.b. (1.1 Md) y 1608 p. b. (1.08 Md). Uno de los plásmidos resultantes que se digería con *EamHI* fue seleccionado y denominado pBR-17.

B. Caracterización con endonucleasas de restricción del pBR-17.

El pBR-17 es un plásmido resistente a *Ap* y *Tc* que al ser cortado con la endonucleasa *EamHI* genera dos bandas de aproximadamente 1700 p.b. cada una (fig 9). Al comparar el patrón de restricción que con *Sau3A* rinde el pBR327, con el de este nuevo plásmido se observa

FIGURA 9. Analisis de simples y dobles digestiones del pBR327, pBR-14 y pBR-17 usando electroforesis en gel de agarosa.

El carril a muestra una digestión simple con EcoRI del plásmido pBR327. Los carriles b y c muestran digestiones simples del pBR-14 con EcoRI y BglII respectivamente. El carril d muestra una digestión doble EcoRI-BglII del pBR-14. El pBR-14 sin digerir se puede observar en el carril e. El carril f muestra una digestión con BamHI del pBR-17. En el carril g se observa el pBR-17 digerido con EcoRI y el carril h muestra el plásmido pBR-17 sin digerir.

que no desaparecen bandas (fig. 10).

Si el pBR-17 se digiere con la endonucleasa HaeIII y se compara con el patrón del pBR327 con la misma enzima, se observa que la segunda banda de este último no aparece en el caso del pBR-17 y en cambio aparece una banda de mayor tamaño (aprox. 170 pares de bases más grande) (Fig 11). Una digestión doble del pBR-17 con HaeIII y BamHI indica que esta nueva banda es cortada por BamHI dando lugar a dos bandas de 369 y 270 p.b.

Una digestión del pBR-17 con la endonucleasa HinfI muestra la desaparición de la banda 2 correspondiente al patrón con esta enzima del pBR327 y la aparición, de una banda aprox. 170 p.b. más grande (fig 10).

Estos resultados sugieren que el nuevo sitio de restricción generado proviene de la repetición de uno de los fragmentos de Sau3A, que seguramente se origino al quedar parcial la digestión de un dímero del plásmido utilizado inicialmente.

La caracterización realizada con Hinf I y Hae III, así como con las endonucleasas Hpa II y Hha I, junto con un análisis de la secuencia nucleotídica de pBR327, permite además deducir el fragmento que se repite y hacer un esquema que muestra los sitios de Sau3A involucrados en la formación de la secuencia reconocida por BamHI. Dicho esquema se muestra en la figura. 12

C. Construcción del plásmido pBR-14

Debido a que el nuevo sitio de BamHI presente en el pBR-17, no es único (existe otro dentro del gene de resistencia a tetraciclina), en un segundo intento, se aisló una colonia resistente ampicilina y

FIGURA 10. Electroforesis en gel de acrilamida del DNA de los plásmidos pBR327, pBR-14 y pBR-17 cortados con varias endonucleasas de restricción.

Los carriles a, b y c muestran el patrón de restricción con *Sau3A* del pBR327, pBR-14 y pBR-17 respectivamente. En los carriles d, e y f se presenta un patrón de restricción de *HhaI* de estos plásmidos en el mismo orden relativo. El patrón de restricción de los plásmidos pBR327, pBR-14 y pBR-17 con *HpaII* puede observarse en los carriles g, h e i respectivamente. Finalmente en los carriles j, k y l se muestra un patrón de restricción de *Hinf I* del pBR327, el pBR-14 y el pBR-17 respectivamente.

tetraciclina que contenía un plásmido capaz de linearizarse con *EgIII*. Sin embargo, este plásmido migraba en un gel de agarosa al 1% con un tamaño molecular correspondiente a aprox. 2400 p.b. y por lo tanto debía haber perdido alguno de los genes de resistencia. Una preparación de mayor cantidad de DNA de plásmido hizo posible observar que además de este nuevo plásmido, se encontraba presente otro cuya migración correspondía a la del pBR327 y que posiblemente estaba confiriendo resistencia a uno o a los dos antibióticos utilizados para seleccionar.

Con el fin de segregar estos dos plásmidos se purificó DNA de plásmido de la colonia que los contenía y con el se transformó la cepa de *E. coli* K-12 RR1. La selección de las colonias transformantes se realizó con los antibióticos tetraciclina y ampicilina por separado, obteniéndose, entre las colonias resistentes a tetraciclina algunas sensibles a ampicilina y otras resistentes. De aquellas colonias que presentaban sensibilidad a ampicilina se aisló el plásmido que al ser digerido con *EgIII* rendía una sola banda de aprox. 2400 p.b. Este plásmido se denominó pBR-14.

Las colonias resistentes a ampicilina presentaban, en todos los casos el plásmido pBR327.

D. Caracterización del pBR-14

El pBR-14 es un plásmido resistente a tetraciclina pero sensible a ampicilina. una digestión de este plásmido con la enzima *EgIII* produce un DNA lineal que migra con un tamaño correspondiente a 2400 pares de bases (Fig 9).

Una comparación de los patrones de restricción del pBR-14 y el

FIGURA 11. Electroforesis en gel de acrilamida de los plásmidos pBR327, pBR-14 y pBR-17 con HaeIII. Los carriles a y b muestran el patrón de restricción de HaeIII de los plásmidos pBR327 y pBR-14 respectivamente. Como se observa las bandas 1, 2, 4 y 12 del pBR327 no están presentes en el patrón del pBR-14. En su lugar hay una nueva banda (1a banda). Al hacerse una digestión doble HaeIII-BglII del pBR-14 (carril c) se observa que esta nueva banda desaparece. En los carriles d y e se muestra un patrón de restricción del pBR327 y pBR-17 respectivamente. Notar que la banda 2 del pBR327 ha desaparecido en el patrón del pBR-17 y en su lugar hay una banda que corre arriba de la primera. Esta banda desaparece al hacer una digestión doble HaeIII-BamHI del pBR-17 como se observa en el carril f.

pBR327 con la enzima Sau3A indican la desaparición, en el último plásmido de las bandas 4, 6, 7 y 9 correspondientes al gene de ampicilina del pBR327 y equivalentes a aprox. 900 p.b. (Fig. 10)

Un análisis de la secuencia del pBR327 indica que una deleción del material genético contenido en las bandas mencionadas, generaría en la recircularización, un sitio de BglIII, ya que daría origen a la secuencia AGATCT.

Usando otras endonucleasas de restricción se caracterizó un poco más el pBR-14. Así por ejemplo, en la figura x se observa que los fragmentos 2, 4, 12 y 1 generados por una digestión de Hae III en el pBR327 no se encuentran en el pBR-14. Sin embargo, un nuevo fragmento de aproximadamente 473 p.b. es generado, aparentemente como resultado de la fusión entre los fragmentos de HaeIII número 1 y número 2 del pBR327. El tamaño de este fragmento corrobora que la deleción sufrida es de aproximadamente 900 p.b. Al hacer una digestión doble de HaeIII y BglIII del pBR-14 se observa que la enzima BglIII corta el nuevo fragmento dando lugar a dos bandas de 174 y 299 p.b. (Fig 11). Similarmente, los fragmentos de HpaII 2, 14, 11, 4 y 1 del pBR327, no se encuentran en el pBR-14, pero aparece un nuevo fragmento (fig 10).

Los patrones de restricción del pBR-14 producidos con las enzimas HhaI y HinfI, así como el de HpaII son concordantes con la idea de que el pBR-14 es producto de una deleción precisa de 900 pares de bases que contiene parte del gene que confiere resistencia a ampicilina. En la figura 14. se muestra un esquema del pBR-14 y ahí mismo se señala la posición del sitio de BglIII con respecto al origen de replicación.

Fig.12

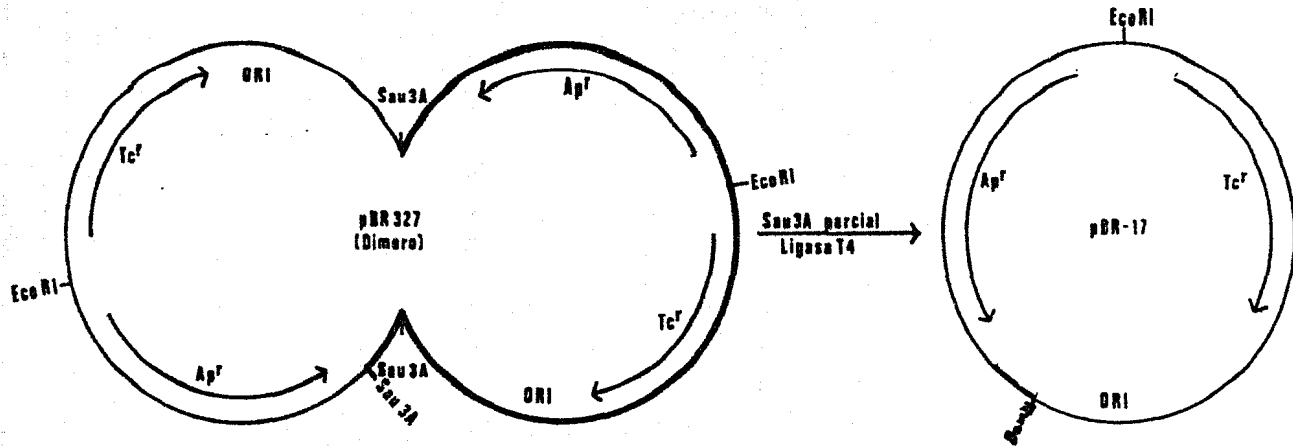
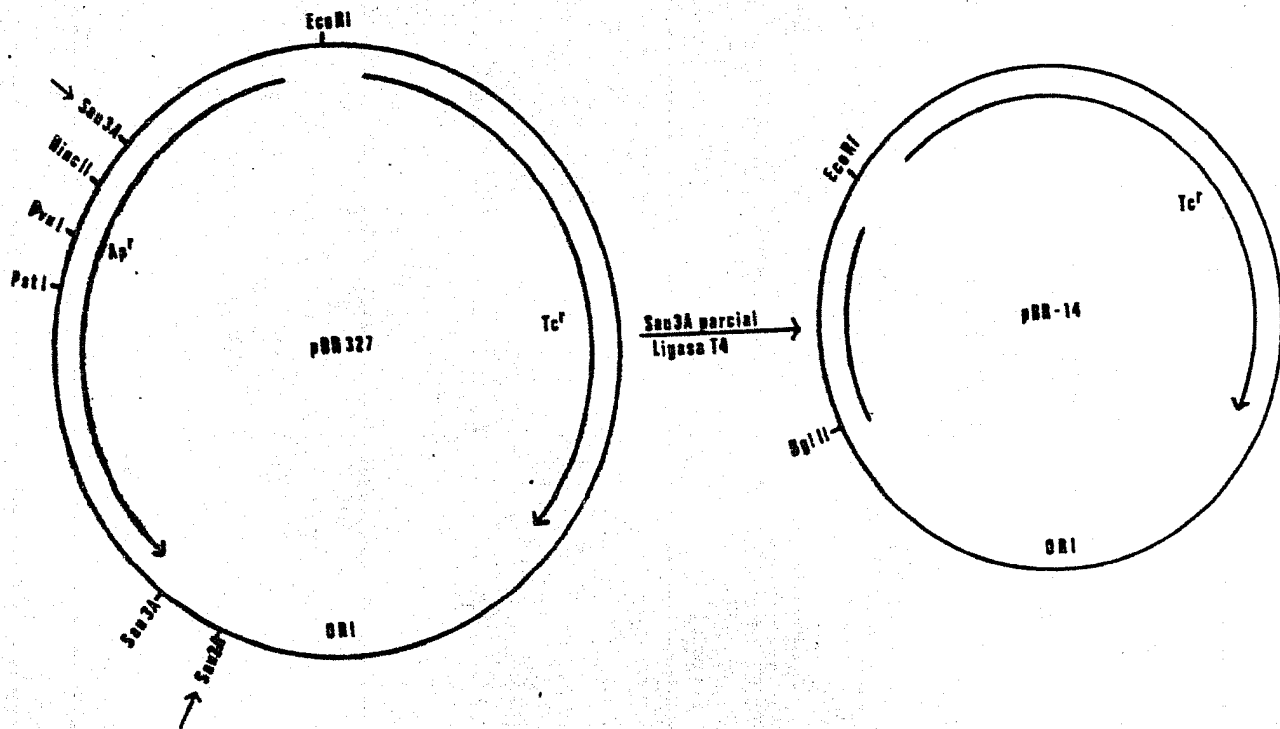


Fig.14



DISCUSION

Se construyó un plásmido; el pBR-17, que permite el aislamiento del gene de resistencia a ampicilina y el del origen de replicación.

Sin embargo consideramos que el pBR-17 no será el más idóneo para la manipulación del origen, con el fin de lograr su regulación debido principalmente a dos causas:

- El sitio de BamHI que se ha introducido en el pBR-17, no es único y por lo tanto para hacer inserciones en él, deberá procederse a través de digestiones parciales o tratamiento con bromuro de etidio.
- El sitio ha quedado situado a aprox. 85 pares de bases del promotor del primero de la replicación y, probablemente, la presencia de un operador en este sitio no será útil, ya que se requiere que este último se encuentre más cercano al promotor (suponiendo que funciona a través de estorbar la unión de la RNA polimerasa con el promotor). Ciertamente queda la posibilidad de diseñar un experimento que permita hacer inserciones más cercanas al origen, como por ejemplo, el uso de la exonucleasa Bal31, pero dado que se obtuvo un plásmido (pBR-14) cuyas características satisfacen las condiciones requeridas para manipular el origen, creemos que el pBR-17 constituirá esencialmente una fuente para la obtención del cassette de ampicilina.

Por otra parte es importante considerar que el pBR-17 tiene una secuencia repetida, ya que esto podría generar problemas en cepas

eficientes en recombinación y producir derivados distintos al plásmido original. Sin embargo no es seguro que esto ocurra y desde luego en una cepa deficiente en recombinación como es la que se usó en este experimento, no ocurriría.

En función de lo anterior se continuó con la búsqueda de un plásmido que por deleción generara un sitio para BgIII. Se aisló uno que denominamos pBR-14, el cual posee un sitio único para BgIII situado aproximadamente 5 pares de bases antes del promotor del primero. Con el pBR-14 será posible hacer las manipulaciones necesarias en el origen de replicación para regular su número de copias y aunque se ha perdido el gene que confiere resistencia a ampicilina, se podrá insertar, en forma muy sencilla, cualquier otro marcador genético (Cm, Km) o bien el mismo gene de β -lactamasa en el sitio único para EcoRI que conserva el pBR-14.

Es importante notar que, el pBR-14 fue el único plásmido aislado, (entre aprox. 500 colonias estudiadas) en el cual pudo generarse el sitio deseado por deleción, y éste sufrió una deleción mayor que la esperada, incluyendo parte del gene de resistencia a ampicilina. En este experimento, seleccionamos colonias resistentes a ampicilina y tetraciclina al mismo tiempo y, por lo tanto, el aislamiento del pBR-14 implicó que en el momento de su selección se encontrara coexistiendo (en la misma bacteria) con otro plásmido que confiriera resistencia a ampicilina. Este evento de cotransformación es mucho menos probable que el que originalmente se buscaba (simple deleción de un fragmento). Esta observación nos condujo a hacer un análisis de los otros plásmidos obtenidos (aquellos en los que no se había generado un sitio pero que habían experimentado algún cambio) y encontramos que en ninguno de ellos se perdía la secuencia que originalmente pretendíamos

deletar ya fuera porque ocurrían repeticiones o porque ocurrían deleciones en otros sitios. Todo lo anterior nos sugirió que el fragmento que quería deletarse inicialmente contiene una secuencia importante para la replicación del plásmido.

Haciendo una comparación de la secuencia contenida en el pBR327 con la que en el pBR-14 la sustituyó (la inmediata al sitio de *EgII*), encontramos que la secuencia presente en el primero es muy similar en el pBR-14 a partir de la sexta base.

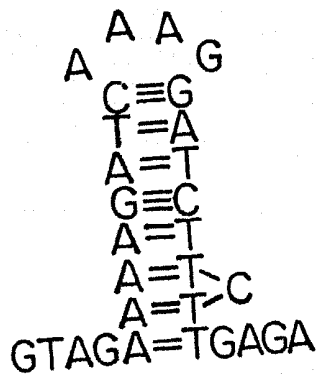
```
pBR327 5'AGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTCGCGTAATCTGCTGCT3' RNAII-
pBR-14 5'GTAAAAGATGCTGAAGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTCGCGTAATCTGCTGCT3' RNAII-
```

Tanto en el pBR327 como en el pBR-14 dicha secuencia tiene una naturaleza palindrómica característica, que se destruiría al hacer la deleción inicialmente planeada Fig. 17.

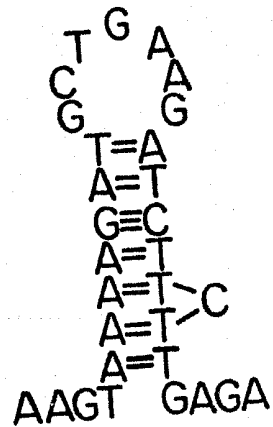
Por otro lado comparamos la secuencia contenida en el pBR327 con la de otros plásmidos tales como el *CloDF13*, *ColE1*, *pMB9*, etc y observamos que la región mencionada, es conservada en todos estos plásmidos.

Posteriormente, se intentó hacer una inserción de un pequeño fragmento de DNA en el sitio de *EgII* del pBR-14. Tal experimento no se logró. Por todos los anteriores argumentos sugerimos que la secuencia tiene alguna función en la replicación del plásmido. Esta idea resulta muy interesante puesto que ninguno de los reportes hasta

Fig. 16



pBR327



pBR-14

ahora publicados para los plásmidos tipo ColE1 han considerado la posibilidad de que una secuencia arriba del promotor del primero tenga función alguna en el inicio de la replicación del plásmido y solamente para el caso del plásmido CloDF13 (un plásmido similar a ColE1) se le había atribuido a esta misma secuencia una función de terminador de la transcripción (Stuitje et al, 1980).

Con base en el modelo anteriormente expuesto para el inicio de replicación de los pBRs se han podido sugerir algunas hipótesis para la explicación de lo observado:

En el plásmido CloDF13 hay un gene situado antes del origen de replicación cuya transcripción ocurre en el mismo sentido que la replicación, de manera que si no termina antes del origen, se sabe que incrementa la transcripción del RNAlI y consecuentemente el número de copias (Stuitje et al, 1980). Análogamente en el pBR327 el gene de ampicilina se transcribe antes del origen, podría pensarse que si dicha transcripción se siguiera sobre el origen, la transcripción del RNAlI se vería incrementada de tal forma que el número de copias aumentaría y probablemente al grado de resultar tóxico para la célula (por la acumulación de sus productos o por agotarse las polimerasas necesarias para la replicación del cromosoma) y la bacteria moriría.

La secuencia presente en el pBR327 que se ha descrito podría estar implicada en la terminación de la transcripción que viene del gene de β -lactamasa (ampicilina), sin embargo en el pBR327 el gene de β -lactamasa tiene su propio terminador y por lo tanto, si la secuencia funciona como terminador de la transcripción, esta función pudiera no ser esencial para la viabilidad de la célula que contenga el plásmido.

Por las razones que arriba se exponen considero que la secuencia

está implicada en alguna función relacionada con el inicio de la replicación. Si esto es cierto la secuencia podría ser el sitio de reconocimiento para alguna proteína cuya función fuera la de activador o la de represor de la transcripción. En este caso la proteína tendría que estar codificada por el cromosoma de la bacteria ya que las únicas proteínas para las cuales codifica el pBR327 son las que confieren resistencia a antibióticos.

Otra función que podría postularse para esta secuencia es que, dado que en el pBR327 se transcribe un RNA en dirección opuesta al RNAII, la horquilla podría ser un requerimiento para un promotor que funciona en estas condiciones.

Finalmente se sabe de algunos promotores para cuyo funcionamiento es importante la composición de las bases que se encuentran en su vecindad; esta podría ser la característica regenerada en la delección del pBR-14..

Seguramente podrán diseñarse experimentos interesantes que conduzcan a discernir entre las hipótesis propuestas y probablemente a través de ellos se conozcan aspectos importantes con respecto a los mecanismos moleculares que determinan la regulación del inicio de replicación de un plásmido.

CONCLUSION

A través de experimentos de DNA recombinante se construyeron dos plásmidos, denominados pBR-14 y pBR17 que en conjunto representan las siguientes ventajas:

- 1) El aislamiento del gene de resistencia a ampicilina.
- 2) El aislamiento del origen de replicación.
- 3) La introducción de un sitio único de reconocimiento para una endonucleasa de restricción, que permitirá hacer manipulaciones en el origen de replicación para poder regular su número de copias.
- 4) La obtención de un modelo adecuado para el estudio de los mecanismos moleculares que regulan el inicio de replicación en los plásmidos tipo ColE1.

BIBLIOGRAFIA.

- Agarwal, A., Brumstedt, J., Noyes, B.; J. Biol. Chem., 256:1023-1028 (1981).
- Avery, O., MacLead, C., McCarthy, M.J.; Experimental Medicine, 79:137 (1944).
- Barkley, M. and Bourgeois, S.; The Operon. Cold. Spring. Harbor. N.Y., 77:215 (1980).
- Betlach, M.C., Herschfield, V., Chow, L., Brown, W., Goodman, H.M. and Boyer, H.W.; Fed. Proc., 35:2037-2043 (1976).
- Birnboim, H. and Doly, J.; Nucl. Acids. Res., 7,6:1513-1523
- Bolivar, F., Rodriguez, R., Betlach, M. and Boyer, H.W.; Gene, 2:75-93 (1977 a).
- Bolivar, F., Rodriguez, R., Green, P., Betlach, M.C., Heyneker, H., Boyer, A., Crosa, J. and Falkow, S.; Gene, 3:95-113 (1977 b).
- Bolivar, F.; Rev. Lat. Amer. Microbiol., 21:37-55 (1979).

- Boyer, H.W. and Roulland-Dousoix, D.; *J. Mol. Biol.*, 41:459-472 (1969).
- Brown, D.; *Sci. Am.* 229:20-29 (1973).
- Clewell, D.; *J. Bacteriol.*, 110:667-676 (1972).
- Cohen, S., Chang, A., Hsu, C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 70:3240-3244 (1973).
- Collins, J.; *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 78:121-178 (1977).
- Collins, J. and Hohn, B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75:4242 (1978)
- Conrad, S.E. and Campbell, J.L.; *Cell*, 18:61-71 (1979).
- Covarrubias, A., Sánchez-Pescador, R., Osorio, A., Bolivar, F. and Bastarrachea, F.; *Plasmid* (por publicarse).
- Covarrubias, L.; *Tesis de Licenciatura., Construcción y Caracterización de un Nuevo Vehículo de Clonación.* (1980).
- Covarrubias, L., Bolivar, F.; *Gene*, 13:25-35. (1981).
- Covarrubias, L., Bolivar, F.; *Gene*, 17:52-59 (1982).
- Danna, K. and Nathans, D.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68:2913 (1972).

Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, I., Ginsberg, H.S. and Barry Wood, W.;
Microbiology. Second Edition., Harper International., Maryland, U.S.A.
(1973).

Gillam, S. and Smith, M.; Gene, 8:81-97 (1979).

Gozddel, D., Heyneker, H., Hozum, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura,
D., Miozzari, G., Crea, R. and Seeburg, P.H.; Nature, 282:544-548
(1979).

Goldberger, R.F.; Biological Regulation and Development. Plenus Press.
N.Y. (1979).

Græne, P., Heyneker, H., Betlach, M., Bolivar, F., Rodriguez, R.,
Covarrubias, A., Fudor, I., Backman, K. and Boyer, H.W.; Nucl. Acids.
Res., 5:2373-2380 (1978).

Grunstein, M., Hogness, D.S.; Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash), 72:3961-3965
(1975).

Hanahan, D.; J. Mol. Biol., 166:557-580 (1980).

Helinski, D. R.; Basic Life Science, 9:19-49 (1977 a).

Helinski, D., Heshfield, V., Figurski, D. and Meyer, R.; Impact on
Science and Society. Eds. R.F. Beers. and E.G. Bassett, Raven Press,
New York (1977 b).

- Hogness, D.S. and Simons, J.R.; *J. Mol. Biol.*, 9:411-438 (1974).
- Itakura, K., Bahl, C.P. and Narang, S.A.; *Can. J. Chem.*, 3649 (1973).
- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A., Heyneker, H.L., Bolivar, F., Boyer, H.W.; *Science*, 198:1056-1063 (1977).
- Itakura, K. and Riggs, A.; *Science*, 29:1401-1405 (1978).
- Itoh, T. and Tomizawa, J.; *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 43:409-418 (1978).
- Itoh, T. and Tomizawa, J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:2450-2454 (1980).
- Itoh, T. and Tomizawa, J.; *Nucl. Acids. Res.*, 10:5949-5965 (1982).
- Kabacknick, M., Potapov, V.K., Shabarova, Z.A and Prokofiev, M.A.; *Doklady Akad. Nauk SSSR*, 201:858 (1971)
- Kawashima, E.H., Gadec, T. and Carothers, M.; *Biochemistry*, 16:4209-4214 (1977)
- Lacatena, R.M. and Cesareni, G.; *Nature*, 294:623-626 (1981)
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.; *Cold Spring Harbor Laboratory, Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* (1982).

Maxam, A. and Gilbert, W.; Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash), 74:560-564 (1977).

Miyoshi, K., Arentzen, R., Huang, T.E. and Itakura, K.; Nucleic Acid. Research., 8:5507 (1980).

Morita, M. and Oka, A.; Eur. J. Biochem., 97:435-443 (1979).

Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A.C.Y., Cohen, S. N., Numa, S.; Nature, 278:423-427 (1979).

Portugal, F.H. and Cohen, J.S.; A Century of DNA. Cambridge Massachusetts, U.S.A. (1979).

Ramback, A. and Tiollais, P.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 71:3921-3927 (1974).

Roberts, R; Crit. Rev. Biochem, 4:123-164 (1976)

Rosenberg, M. and Court, D.; Am. Rev. Genetic., 13:319-353 (1979).

Sanger, F., Air, G., Barrell, B., Brown, L., Coulson, A., Fiddes, J., Hutchinson, C., Slocombe, P. and Smith, M.; Nature, 265:687-695 (1977).

Sgarmella, V., Van de Sande, J.H., Khorana, H.G.; Proc. Natl. Acad. Sci., 67:1468-1475 (1970).

Smith, H. and Wilcox, K.; J. Mol. Biol, 51:379 (1970).

Soberon, X., Covarrubias, L. and Bolivar, F.; Gene, 9:287-305 (1980).

Soberon, X., Rossi, J., Larson, G. and Itakura, K.; R.L. Rodriguez y M.J. Chamberlin (Eds). Promoters Structure and Function, Praeger Scientific, New York, 510-511 (1982).

Stein, R., Gruenbaum, Y., Pollack, J., Razin, A. and Cedar, H.; Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 79:61-65 (1982).

Stent, G.S., Calendar, R.; Molecular Genetics. An Introductory Narrative. Second Edition. W.H. Freeman and Company. San Francisco, U.S.A. (1978).

Stuitje, A.R.; Nature, 290:264-267 (1981).

Timmis, K.N., Cohen, S.N., Cabello, F.C.; Progress in Molecular and Subcellular biology, 6:1-58. Ed. Fred E Mahn. Springer Verlag, Berlin (1978).

Tomizawa, J., Itoh, T., Selzer, G. and Som, T.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1421-1425 (1981).

Tomizawa, J. and Itoh, T.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1421-1425 (1981).

Tomizawa, J., Itoh, T.; Cell, 31:575-583 (1982).

Vellkamp, E., Stuitje, A. *Plasmid*, 6:76-99 (1981).

Watson, J.D. and Crick, F.H.C.; *Nature*, 17:737-738 (1953).

Watson, J.D.; *Molecular Biology of the Gene*. Third edition., W.A. Benjamin, Inc., U.S.A (1977).

Wing, R., Drew, H., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura, K. and Dickerson, R.; *Nature*, 287:755-758 (1980).