

47
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CLONACION Y EXPRESION DE UN GEN DE LIPASA
EXTRACELULAR DE *Streptomyces albus* G
EN *Streptomyces lividans* 1326**

T E S I S
Que para obtener el Título de
B I O L O G O
p r e s e n t a

HUGO CRUZ RAMOS

México, D. F. Agosto 1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

| | |
|--|------|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCION | 2-6 |
| SEMBLANZA DEL GENERO <i>Streptomyces</i> | 2 |
| ACERCA DE LAS LIPASAS | 4 |
| OBJETIVOS | 6 |
| MATERIAL Y METODOS | 7-27 |
| OBTENCION Y ALMACENAMIENTO DE ESPORAS DE CEPAS DE <i>Streptomyces</i> | 7 |
| EXTRACCION DE DNA CROMOSOMAL | 7 |
| SEPARACION DE FRAGMENTOS DE DNA CROMOSOMAL PARCIALMENTE | |
| DIGERIDO EN GRADIENTE DE SACAROSA | 8 |
| PURIFICACION DE DNA PLASMIDICO | 9 |
| PURIFICACION DE PLASMIDOS POR ULTRACENTRIFUGACION EN GRADIENTES | |
| DE CLORURO DE CESIO/BROMURO DE ETIDIO | 11 |
| PREPARACION Y TRANSFORMACION DE PROTOPLASTOS DE <i>S. lividans</i> 1326 | 12 |
| BANCO DE GENES DE <i>S. albus</i> G en <i>S. lividans</i> 1326 | 13 |
| TRANSFERENCIA DE DNA DE GELES DE AGAROSA A MEMBRANA NYLON | 14 |
| MARCAJE RADIOACTIVO DE DNA POR "NICK-TRANSLATION" | 15 |
| HIBRIDIZACION DNA-DNA SOBRE MEMBRANA NYLON | 16 |
| ELABORACION DE "MINIPREPS" DE DNA DE PLASMIDOS Y DE M13 | 17 |
| PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA DE GELES DE AGAROSA | |
| DE BAJO PUNTO DE FUSION | 18 |
| PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA POR ELECTROELUCION | 18 |
| SUBCLONACION DE FRAGMENTOS DE DNA PURIFICADOS | 19 |
| TRANSFORMACION Y TRANSFECCION DE CELULAS COMPETENTES DE <i>E. coli</i> JM101 | 20 |
| ELABORACION DEL MAPA DE RESTRICCION | 21 |
| DELECCIONES CON ENZIMAS DE RESTRICCION | 22 |
| DELECCIONES CON EXO III | 23 |
| SUBCLONACION AL AZAR Y ANALISIS DE DNA SONICADO | 24 |
| PREPARACION DE MOLDES DE CADENA SENCILLA PARA SECUENCIAR EN M13 | 25 |
| ELABORACION DE GELES DE POLIACRILAMIDA PARA SECUENCIA DE DNA | 26 |
| SECUENCIACION DE DNA POR EL METODO ENZIMATICO | 26 |
| ANALISIS DE LA SECUENCIA DE DNA | 27 |

| | |
|--|-------|
| RESULTADOS Y DISCUSION | 28-47 |
| CLONACION DEL GEN <i>lip</i> DE <i>S. albus</i> G | 28 |
| CARACTERIZACION DEL PLÁSMIDO pBG1 Y SUBCLONACION DEL GEN <i>lip</i> | 29 |
| EXPRESION DEL GEN <i>lip</i> EN <i>S. lividans</i> 1328 | 32 |
| MAPEO DE RESTRICCION Y SECUENCIACION DEL GEN <i>lip</i> DE <i>S. albus</i> G | 34 |
| ANALISIS DE LA SECUENCIA DE DNA | 36 |
| COMPARACION DE LIPASAS BACTERIANAS | 42 |
| CONCLUSIONES | 48-49 |
| PERSPECTIVAS | 60 |
| APENDICE | 61-64 |
| I. ABREVIATURAS | 61 |
| II. SOLUCIONES AMORTIGUADORAS | 61 |
| III. MEDIOS DE CULTIVO | 63 |
| IV. OTROS REACTIVOS | 66 |
| BIBLIOGRAFIA | 67-68 |

RESUMEN

A partir de un banco genómico de *Streptomyces albus* G en *S. lividans* 1326 se aisló una clona lipolítica, la cual lleva un plásmido que tiene clonado un gen de lipasa extracelular -*lip*- de *S. albus* G. El plásmido pB21, utilizado como vector de clonación, proviene de un experimento de co-integración de dos plásmidos multicopia. La naturaleza híbrida de las funciones de replicación del plásmido pB21 parece no influir sobre la actividad lipolítica detectada, aún cuando no se pudo observar la sobreproducción de la enzima. Se obtuvo la secuencia nucleotídica de un fragmento de DNA que contiene al gen *lip* flanqueado por otros dos marcos de lectura abiertos -ORFs-. La secuencia aminoacídica codificada por el gen de lipasa de *S. albus* G es significativamente homóloga a las secuencias de la lipasa de *Streptomyces* sp. M11, y de la lipasa 1 de *Moraxella* TA144. Dentro de la estructura primaria de la enzima se localizan las características propias de una lipasa extracelular. La carencia de estructuras reguladoras de la transcripción cercanas al gen *lip* presupone una transcripción policistónica. Los resultados del análisis de las supuestas proteínas codificadas por los dos ORFs localizados sugieren su probable participación en la expresión y secreción de la lipasa. Se incluye la comparación de las tres lipasas homólogas en su composición aminoacídica.

INTRODUCCION

SEMBLANZA DEL GENERO *Streptomyces*

Las bacterias del género *Streptomyces* (Waksman & Henrici, 1943) forman parte de la familia Streptomycetaceae (Waksman & Henrici, 1943) y del orden Actinomycetales (Buchanan, 1917). De acuerdo a las secuencias de sus RNAs ribosomales, así como a la estructura de sus genomas y paredes celulares, se les ha clasificado en la subdivisión de alto contenido de G+C de la rama de eubacterias Gram-positivas (Woese, 1987).

Estos microorganismos se desarrollan generalmente en el suelo bajo condiciones aerobias, nutriéndose de materia orgánica y, por ser cosmopolitas y muy numerosos, cumplen con una importante parte del papel ecológico de reciclamiento de nutrientes. Sin duda, algo que los hace más familiares en la vida cotidiana es el hecho de que, junto con algunas algas, son responsables del olor y del sabor a "tierra-húmeda" del suelo, de algunas verduras, del agua almacenada; inclusive del pescado, de la carne, de la leche y de los huevos; esto último sólo si los peces, las aves y el ganado tuvieron que ver con una sustancia volátil llamada geosmina que es producida y liberada normalmente por estas bacterias (Goodfellow & Williams, 1983).

Su ciclo de vida es interesante e incluye dos etapas, una fase vegetativa micelial colonizadora y otra fase reproductiva de dispersión (Chater & Merrick, 1979). Primero, a partir de una spora que germina, se desarrolla una intrincada red de hifas ramificadas llamada micelio; algunas de estas células cenocíticas penetran en el sustrato y otras permanecen en la superficie incrementando el tamaño de la colonia. Mediante la secreción de enzimas hidrolíticas, la bacteria degrada y vuelve asimilables los nutrientes de su entorno. La imposibilidad que ofrece este estado para la dispersión de la especie se ve anulada por la capacidad de diferenciación morfofisiológica típica del grupo de los estreptomicetos (Chater & Merrick, 1979). A lo largo de este complejo proceso, el micelio muestra una amplia lisis (Wildermuth, 1970), quizá relacionada con el suministro de su contenido en forma de nutrientes para el desarrollo y la turgencia de las hifas aéreas que empiezan a aparecer entonces (Baña *et al.*, 1982; Méndez *et al.*, 1985). En estas últimas, eventualmente se llevará a cabo una metamorfosis que origina cadenas de esporas (Wildermuth & Hopwood, 1970); pero antes de que esto suceda, se toman blancas e hidrofóbicas, luego se enrollan sobre sí y se septan a lo largo, dando lugar a compartimentos celulares con un solo cromosoma, los cuales cambian de una forma cilíndrica a una elipsoidal, se rodean de una pared gruesa-grisácea, y acaban por conformar las esporas maduras (Chater *et al.*, 1991).

Puede decirse que las hifas aéreas tienen dos tipos de organización celular o "tejidos": El que porta múltiples nucleoides y resulta de la reutilización de los materiales provenientes del cuerpo vegetativo lisado, y las hileras de compartimentos monocromosomales localizados en la punta de las hifas (Braña *et al.*, 1986; Wildermuth, 1970). A través de sus esporas resistentes a largos periodos de desecación (Hopwood, 1988), este microorganismo llega a dispersarse por medio de la lluvia, el viento, las corrientes de agua y los artrópodos.

Respecto a lo que sucede durante la diferenciación celular, se conocen varios elementos reguladores como son: Factores sigma, tRNAs, diversos tipos de promotores y factores de diferenciación "feromonas bacterianas" (Chater, 1989), que en conjunto se encuentran implicados en la "cascada" de la expresión de genes durante el ciclo de vida de *Streptomyces*.

La importancia y el interés que científicos e industriales han puesto en los estreptomicetos, radica principalmente en dos momentos de su ciclo biológico: En el momento en que se procuran los nutrientes requeridos -esto es, cuando secretan las proteínas hidrolíticas-, y durante el periodo en que podrían ser más vulnerables y no lo son -es decir, cuando su micelio vegetativo se lisa y, de manera sincronizada, producen la más amplia gama de antibióticos de origen bacteriano que se conoce y que, en base a una presión selectiva a lo largo de su evolución, podría estar protegiéndoles de posibles invasiones de otros microorganismos (Chater, 1984)-. Así pues, durante la transición del micelio postrado al aéreo, los *Streptomyces* muestran su capacidad para producir antibióticos y otros metabolitos secundarios (Chater, 1984) muy importantes a nivel industrial. Es un hecho que hay una correlación temporal y una interrelación en el control genético entre la formación de las hifas aéreas y la producción de antibióticos (Hopwood, 1988).

Dentro del marco de la ciencia básica, la producción de antibióticos y la resistencia a ellos por parte de los estreptomicetos, está dando más información acerca del origen y la evolución de esta clase de genes y su distribución hipotética entre otros microorganismos (Baumberg *et al.*, 1991)

Por otro lado, la manera eficiente en que las especies de *Streptomyces* sintetizan y exportan numerosas proteínas hidrolíticas, aunado a los recientes avances respecto a su biología molecular, les ha convertido en buenos candidatos a ser hospederos durante la producción de productos heterólogos (Baumberg *et al.*, 1991), es decir, aquellos compuestos orgánicos que los microorganismos no sintetizan de manera natural, sino a través de la ingeniería genética.

Los requerimientos necesarios para utilizar a *Streptomyces* como hospedero se establecen en el trabajo de Okanishi *et al.*, 1983: Se deben tener implementados métodos simples para la extracción de plásmidos; para eliminar plásmidos responsables de la incompatibilidad de vectores; para la transformación y regeneración eficiente de protoplastos; el microorganismo debe carecer o tener muy baja actividad extracelular de DNasa y proteasa, así como muy poca actividad de endonucleasas de restricción; además, debe ser sensible a varios antibióticos, no ser patógeno ni sobrevivir en el tracto digestivo humano; debe esporular bien en medio sólido y, por último su viabilidad debe ser baja en el suelo bajo condiciones naturales.

Más de un estreptomiceto cumple con esta lista de requisitos, pero sin duda, *Streptomyces lividans* (Hopwood *et al.*, 1983) es el más usado de ellos en la clonación de enzimas extracelulares tanto homólogas como heterólogas de interés académico e industrial.

Se ha puesto interés en la implementación de métodos eficientes para transformar, transfectar y regenerar protoplastos de varias especies de *Streptomyces* (Bibb *et al.*, 1978; Hopwood *et al.*, 1985; Okanishi *et al.*, 1974; Shirahama *et al.*, 1981; Suarez & Chater, 1980a). Los vectores de clonación derivados de los plásmidos SLP1.2, SCP2* (Lydiate *et al.*, 1985) y plJ101 (Chater *et al.*, 1982; Kieser *et al.*, 1982) fueron utilizados en casi todos los trabajos pioneros de clonación de genes (Hopwood *et al.*, 1986). Hoy día, se cuenta con un gran número de vectores de clonación (Chater *et al.*, 1982; Hopwood & Chater, 1982; Hopwood *et al.*, 1985; Thompson *et al.*, 1982); por ejemplo, plásmidos de bajo y alto número de copias (Hironouchi *et al.*, 1987; Hopwood *et al.*, 1986; Kieser *et al.*, 1982; Lydiate *et al.*, 1985), plásmidos de estrecho o de amplio rango de hospederos, vectores funcionales en *E. coli* y en *Streptomyces* (Chambers & Hunter, 1984; Kuhstoss *et al.*, 1991; Larson & Hershberger, 1984; Rao *et al.*, 1987; Suarez & Chater, 1980b), vectores derivados de fagos atenuados (Harris *et al.*, 1983; Isogal *et al.*, 1981; Rodicio *et al.*, 1985), y, seguramente, un gran número de vectores desconocidos por la comunidad científica pero usados en la industria biotecnológica. La investigación acerca de la estabilidad estructural y segregacional de vectores plasmídicos (Kendall & Cullum, 1988; Lee *et al.*, 1986; Pigac *et al.*, 1988) ha sido de gran valor al respecto.

Un aspecto que conviene comentar es el alto contenido de G+C presente en el DNA de estas bacterias. No parece clara la forma en que llegó a evolucionar la preferencia en el uso de codones con G o con C en la primera y tercera posición, lo cual resulta en un DNA con una composición de bases sesgada, cercana al límite teórico para codificar la estructura de proteínas convencionales (Bibb *et al.*, 1984). Pero, algo que se empieza a conocer es que el hecho de tener un contenido promedio general de 73% molar de G+C en el cromosoma, podría brindarle ventajas selectivas al microorganismo.

Por ejemplo, se menciona que de esta forma se estaría seleccionando un aumento en la estabilidad termodinámica del DNA al reducirse los efectos letales y mutagénicos de la radiación UV (Singer & Ames, 1970), también se podría explicar que al generarse una mutación de comiénto en el marco de lectura, las consecuencias serían ambiguas, pero difícilmente se podrían crear nuevos codones de terminación (Wright & Bibb, 1992).

Dentro de las características genéticas de los *Streptomyces* se tienen, por un lado, numerosos elementos extracromosomales como son: Bacteriófagos virulentos (Toyama *et al.*, 1983) y atenuados (Chater & Carter, 1979; Klaus *et al.*, 1981a, 1981b, 1982; Lomovskaya *et al.*, 1980; Nakano *et al.*, 1981; Suarez *et al.*, 1984), plásmidos profagos (Chung, 1982), transposones (Chater *et al.*, 1985; Chung, 1987; Heffron *et al.*, 1979; Lydiate *et al.*, 1986; Olson & Chung, 1988), plásmidos lineales (Hirochika & Sakaguchi, 1982; Hirochika *et al.*, 1984; Kinashi *et al.*, 1987; Kinashi & Shimaji, 1987) y otros más que esperan un nombre; y junto a ellos están los diferentes mecanismos de reordenación genómica observados en algunas especies: Delecciones y/o ampliaciones de enormes cantidades de DNA que pueden ocurrir sin afectar la viabilidad de los organismos bajo condiciones de laboratorio (Altenbuchner & Cullum, 1985; Dyson & Schrempf, 1987; Schrempf, 1983).

ACERCA DE LAS LIPASAS

Una gran variedad de bacterias, levaduras y hongos producen lipasas (Sztajer *et al.*, 1988) -triacilglicerol acilhidrolasas, EC 3.1.1.3-, las cuales catalizan la hidrólisis de enlaces éster de triacilgliceroles, produciendo ácidos grasos libres, di y mono acilgliceroles, y glicerol (Macrae & Hammond, 1985). Estas enzimas actúan en la interfase aceite-agua de las micelas lipídicas, lo cual las hace diferentes de las esterases (Vergar, 1980). La especificidad de las lipasas varía grandemente de acuerdo a la estructura y composición del sustrato micelar (Jensen *et al.*, 1983), por lo que potencialmente se dispone de numerosas aplicaciones industriales como son: Enzimas modificadoras de sabores, aditivos de detergentes y catalizadores estereoespecíficos (Harwood, 1989). Las lipasas microbianas reciben en la actualidad una atención considerable debido a sus aplicaciones en biotecnología (Björkling *et al.*, 1991). Este interés radica no sólo en su capacidad para hidrolizar enlaces éster, transesterificar grasas y aceites, y resolver mezclas racémicas, sino también, en su participación en la síntesis de ésteres y enlaces peptídicos (Macrae & Hammond, 1985; Harwood, 1989).

Las enzimas lipolíticas a nivel industrial se producen a partir de *Pseudomonas fragi*, *Alcaligenes* sp., *Chromobacterium viscosum*, *Rhizopus delemar*, *Aspergillus niger* y *Candida cylindracea*. Sin embargo, Sztajer *et al.* (1988) encontraron que la actividad lipolítica de ciertas cepas de *Streptomyces* es muy alta. A pesar de esto, se tiene poca información sobre la degradación de lípidos por cepas de estreptomicetos.

Se ha propuesto un modelo que explica la actividad enzimática de las lipasas; éste señala un sitio activo de Serina y la formación de un intermediario acil-enzima, similar al que se presenta en las serin-proteasas (Burdette & Quinn, 1986; Chapus *et al.*, 1988). En apoyo al modelo, los trabajos de Brady *et al.* (1990) y de Winkler *et al.* (1990), muestran que en la estructura tridimensional de dos lipasas existe un centro catalítico compuesto por la llamada *terna serin-proteasa* -G-X₁-S-X₂-G-. Además, a través de los resultados de Davis *et al.* (1990) queda demostrado que el residuo de Serina es importante para la actividad catalítica de una lipasa hepática.

A la fecha se han clonado en plásmidos varios genes de lipasa provenientes de bacterias, de hongos filamentosos y de mamíferos. Es de esperar que las lipasas producidas por estreptomicetos aumenten la lista de enzimas con nuevas características; pero para poder manipularlas es necesario conocer los mecanismos involucrados en la regulación de la síntesis de las lipasas de estos microorganismos.

Así, por medio de esta tesis se ha querido generar información nueva sobre lipasas extracelulares de *Streptomyces*, que pueda ser analizada por medio del método de la combinatoria, es decir, mediante la comparación de los datos y de las observaciones precedentes.

Por último, considero que debemos estar preparados y preparar a nuestra sociedad para que los futuros alcances de la ingeniería genética no queden en manos de unas cuantas personas, de otra forma, podría ocurrir algo semejante a lo de la energía atómica que por estar en manos de una pequeña minoría llegó a destruir dos ciudades y más.

OBJETIVOS

Clonar y expresar un gen de lipasa extracelular de *Streptomyces albus* G en *Streptomyces lividans* 1326 para caracterizarlo.

Verificar la utilidad de un plásmido con origen de replicación híbrido que se empleó como vector de clonación.

MATERIAL Y METODOS

OBTENCION Y ALMACENAMIENTO DE ESPORAS DE CEPAS DE *Streptomyces* (Hopwood *et al.*, 1985)

El almacenamiento correcto de esporas garantiza la conservación de las cepas de *Streptomyces*; por tal motivo, es necesario propiciar la esporulación abundante del micelio de las cepas de interés.

1.- Se tomaron las esporas de una colonia aislada y bien esporulada de la cepa de interés con un asa de siembra, y se les diluyó en 0.5 ml de agua desionizada-esterilizada. Se agitó con vórtex y se colocó 0.1 ml por caja de medio R5 -el medio R5 llevaba tloestreptona 50 µg/ml cuando la cepa contenía alguno de los plásmidos con los que se trabajó, con el objeto de seleccionar a las bacterias que llevaban los replicones-. Se dispersó el inóculo con una varilla de vidrio esterilizada con el fin de tener un crecimiento en forma de confluyente. Las cajas se incubaron a 29°C hasta que el micelio esporuló.

2.- Se vertieron 10 ml de agua desionizada-esterilizada sobre el micelio esporulado y se raspó con un asa para despegar las esporas.

3.- Se sacó el líquido con una pipeta y se le filtró por algodón. Se centrifugó el filtrado 5 min a 3,500 rpm.

4.- Se descartó el sobrenadante y la pastilla de esporas se resuspendió en 1 ml de glicerol al 20%.

5.- Las esporas se guardaron en viales debidamente etiquetados a -20°C.

EXTRACCION DE DNA CROMOSOMAL

Este procedimiento involucra la lisis del micelio bacteriano crecido en medio líquido, mediante el tratamiento con lisozima, seguido por el uso de un detergente y las diversas manipulaciones sucesivas que comienzan con una desproteización con Fenol/Cloroformo. Es importante que se tenga mucho cuidado en este método, ya que es indispensable contar con un DNA cromosomal lo más puro y entero posible.

1.- Se inocularon esporas de *S. albus* G y de *Streptomyces* sp. M11 en matraces de 1000 ml que contenían medio TSB y medio TSB con Glicina al 0.5% -para hacer más sensible la pared celular a la lisozima-, respectivamente, en una relación de volumen 1:10. Los inóculos se crecieron con agitación a 30°C durante 2 días.

- 2.- Se cosechó el cultivo por centrifugación en botellas de 250 ml durante 5 min a 5,000 rpm.
- 3.- Se lavó el micelio 2 veces con una solución de sacarosa al 10.3%, centrifugando cada vez 5 min a 5,000 rpm.
- 4.- El micelio se resuspendió en 50 ml de buffer P con lisozima a una concentración de 0.2 mg/ml para el caso de *S. albus* G y de 2.0 mg/ml para el micelio de *Streptomyces* sp. M11. Se incubó a 37°C hasta que se observó la formación de protoplastos al microscopio.
- 5.- Los protoplastos se filtraron a través de algodón y se les centrifugó 10 min a 3,000 rpm.
- 6.- Se desechó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla de protoplastos y se agregaron 30 ml de buffer P. Se centrifugó nuevamente 10 min a 3,000 rpm.
- 7.- Se tiró la fase líquida y se resuspendieron los protoplastos en 10 ml de buffer P. Se añadieron 200 μ l de EDTA-Na 0.5M pH 8.
- 8.- Se adicionó 1 ml de SDS al 20% agitando suavemente con una pipeta. De inmediato se agregaron 10 ml de Fenol y 1.5 ml de NaCl 5M. Se mezcló invirtiendo las botellas con suavidad durante 20 min.
- 9.- La mezcla se transfirió a un tubo de 50 ml y se centrifugó 10 min a 5,000 rpm.
- 10.- Se pasó la fase superior a otro tubo y se agregó un volumen de Cloroformo. Se mezcló con cuidado durante 10 min y se centrifugó 10 min a 5,000 rpm.
- 11.- El sobrenadante se transfirió a un vaso esterilizado y se agregó un volumen de Isopropanol de forma tal que se tuvieran 2 fases. Con un tubo de vidrio se formó un ovillo de DNA, el cual se resuspendió en el menor volumen posible de buffer TE.
- 12.- Se agregó RNasa a una concentración final de 20 μ g/ml. Se incubó 1 h a 37°C.
- 13.- Se agregó Pronasa a una concentración final de 100 μ g/ml. Se adicionó NaCl y SDS a concentraciones finales de 100mM y 0.4%, respectivamente. Se incubó 1 h a 37°C.
- 14.- Se repitió desde el paso No. 8, a partir de la adición de Fenol hasta el paso No. 11.
- 15.- Se cuantificó el DNA extraído por absorbancia de luz UV a 260 nm.

SEPARACION DE FRAGMENTOS DE DNA CROMOSOMAL PARCIALMENTE DIGERIDO EN GRADIENTE DE SACAROSA (Hopwood *et al.*, 1985)

La intención es generar fragmentos del genoma de *S. albus* G. de una longitud un tanto mayor a la que se espera para el gen de lipasa, a través de digestiones parciales con una enzima de restricción que corta el DNA de estreptomicetos a todo lo largo y de manera azarosa. El gradiente de Sacarosa elimina los fragmentos pequeños de DNA y permite trabajar únicamente con los del tamaño deseado.

- 1.- Se cortó DNA cromosomal de *S. albus* G completamente al azar mediante digestiones parciales de diferente duración con la endonucleasa de restricción *Sau3A*. La reacción en cada tiempo considerado se inactivó calentando 15 min a 65°C.

- 2.- Muestras de las alícuotas correspondientes a los progresivos periodos de digestión se corrieron y se examinaron con luz UV de transiluminador en geles de Agarosa/buffer TBE al 0.6% teñidos con Bromuro de Etidio 3 $\mu\text{g/ml}$.
- 3.- Se escogieron las alícuotas en las que se observó mayor cantidad de fragmentos de DNA con 10 a 20 Kb de longitud.
- 4.- Se hizo un gradiente de sacarosa -del 10 al 40% en buffer TEN- con las alícuotas escogidas, centrifugando a 35,000 rpm en un rotor SW40 Ti durante 16 h a 17°C.
- 5.- Con mucho cuidado se pasaron fracciones de 400 μl a tubos Eppendorf y se corrieron lentamente muestras de 5 μl de algunas de ellas por electroforesis en geles de Agarosa/buffer TBE al 0.5%.
- 6.- Se seleccionaron las fracciones como en el paso No. 3 y a éstas se les diluyó adicionando 200 μl de buffer TE.
- 7.- Se precipitó con tRNA 20 $\mu\text{g/ml}$ y un volumen de Isopropanol, dejando 15 min a temperatura ambiente, luego se centrifugó 5 min a 14,000 rpm en una microfuga.
- 8.- Se desechó el sobrenadante y se resuspendió cada pastilla en 50 μl de buffer TE. Todas las soluciones se juntaron en un tubo.
- 9.- Se volvió a precipitar con 2 μl de NaCl 5M y 125 μl de Etanol absoluto 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 10 min a 14,000 rpm.
- 10.- Se resuspendió en el volumen adecuado de buffer TE.

PURIFICACION DE DNA PLASMIDICO

En los experimentos de clonación y subclonación de insertos de DNA siempre se utilizaron plásmidos multicopia. Pueden aislarse grandes cantidades de DNA trabajando con este tipo de replicones, por medio de lisis alcalina. Asimismo, al tener fragmentos de DNA clonados en alto número de copias es posible inducir una alta actividad específica de las enzimas que lleven codificadas, permitiéndose así el reconocimiento de las clonas y el estudio de los productos génicos de una manera más sencilla (Chater *et al.*, 1982). Para seleccionar las bacterias que llevan los plásmidos recombinantes es necesario adicionar el antibiótico correspondiente al que son resistentes las clonas transformantes.

- 1.- Se inocularon matraces de 1000 ml, cada uno con 200 ml de medio LB con 34% de sacarosa -para hacer crecer el micelio de manera dispersa- y tioestreptona 50 $\mu\text{g/ml}$, con una preparación densa de esporas. Este cultivo se creció de 2 a 3 días con agitación a 30°C, cuidando que no hubiera mucho crecimiento en las paredes de los matraces. Para purificar plásmidos de *E. coli*, se creció un pie de cultivo de las clonas -en 2 ml de medio YT2x más

carbenicilina 200 $\mu\text{g/ml}$ -. para inocular 25 ml del mismo medio + antibiótico, continuando con la incubación durante 5 h. Luego, se siguió el mismo procedimiento para hacer "minipreps".

2.- Se centrifugó el micelio en botellas de 250 ml durante 10 min a 5,000 rpm. Se lavó el cultivo con 100 ml de buffer TE 25mM, centrifugando 10 min a 5,000 rpm.

3.- A la pastilla de micelio de cada botella se le añadieron 20 ml de buffer TE 25mM con lisozima 2 mg/ml. Se resuspendió y se incubó a 37°C hasta que se observó un aumento significativo en la viscosidad, así como la disminución del tamaño de los gránulos miceliales

4.- A cada botella se le añadieron 40 ml de una solución fresca de NaOH 0.2N, SDS al 1%. Se mezcló invirtiendo las botellas rápidamente 3 ó 4 veces. Se pasaron las botellas a hielo durante 10 min.

5.- A cada botella se le adicionaron 30 ml de Acetato de Potasio 3M pH 4.8. Se mezcló igual que en el paso 4. Se dejaron las botellas 30 min en hielo y luego se centrifugó 30 min a 5,000 rpm.

6.- Se pasó el sobrenadante con cuidado a un vaso esterilizado de 400 ml y se le hizo pasar por un filtro de poro amplio.

7.- El volumen filtrado se dividió en dos botellas y a cada una se le añadió un volumen igual de PEG-8000 al 30%. Se mezcló y se incubó a 4°C durante 2 h como mínimo.

8.- Se centrifugó 30 min a 5,000 rpm. Se descartó el sobrenadante, se centrifugó nuevamente para bajar y, después extraer los restos de sobrenadante con ayuda de una micropipeta.

9.- Se resuspendió la pastilla de micelio de cada botella en 5 ml de buffer TE. Se pasaron los 10 ml a un tubo de 50 ml. Se añadieron 0.5 ml de NaCl 5M y 20 ml de Etanol absoluto. Se dejó 1 h a -20°C.

10.- Se centrifugó 10 min a 10,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante, se dio un pulso de 30 seg en la centrifuga y se sacó todo el líquido con una micropipeta.

11.- Se resuspendió en 10 ml de buffer TE y se añadieron 10 ml de RNAsa 10 $\mu\text{g/ml}$. Se incubó 45 min a 37°C.

12.- Se añadieron 10 ml de una solución de Fenol/Cloroformo 1:1, se mezcló durante 2min y se centrifugó 10 min a 10,000 rpm.

13.- Se pasó la fase acuosa a otro tubo y se precipitó con 0.5 ml de NaCl 5M y 20 ml de Etanol absoluto. Se incubó a -20°C durante 1 h.

14.- Se centrifugó 10 min a 10,000 rpm y se sacó todo el líquido como en el paso.

15.- Se secó la pastilla completamente con aire filtrado.

16.- Se resuspendió en 1 ó 2 ml de buffer TE. En un gel de Agarosa/buffer TBE se corrió una alícuota, se tñó con Bromuro de Etidio 3 $\mu\text{g/ml}$ y se observó en un transiluminador con luz UV.

17.- Se preparó la muestra para purificarla en un gradiente de Cloruro de Cesio/Bromuro de Etidio.

PURIFICACION DE PLASMIDOS POR ULTRACENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE CLORURO DE CESIO/BROMURO DE ETIDIO

En los experimentos de clonación y tratamiento de DNA con la exonucleasa ExoIII, sobretodo, es indispensable tener plásmidos superenrollados y muy puros; este método permite cumplir con tales requisitos.

- 1.- En un tubo de 50 ml se pesaron 4.500 g de CsCl, luego se le agregaron 300 μ l de una solución de Bromuro de Etidio 10 mg/ml.
- 2.- El DNA se resuspendió en 4.2 ml de buffer TE. Se pasó el volumen exacto al tubo con el CsCl y el Bromuro de Etidio.
- 3.- Con una pipeta Pasteur se transfirió la solución a un tubo de gradiente. Se equilibró y se le selló con calor.
- 4.- Se ultracentrifugó en un rotor NVT90 con un programa secuencial de 90,000 a 80,000 rpm de 3 h de duración y a 20°C.
- 5.- Se picó el tubo en la parte superior, y con jeringa se rescató la banda correspondiente al plásmido circular superenrollado.
- 6.- Se quitó la aguja y se descargó el contenido de la jeringa en un tubo Eppendorf.
- 7.- Se agregó un volumen de Isopropanol saturado con NaCl 5M, se mezcló bien y se rescató la fase inferior incolora, pasándola a otro tubo Eppendorf. Esto se repitió de 2 a 3 veces hasta que desapareció el color rosado de la solución.
- 8.- Se adicionaron 2 volúmenes de H₂O esterilizada y 6 volúmenes de Etanol absoluto frío. Se dejó precipitando por lo menos 1 h a -20°C.
- 9.- Se centrifugó 10 min a 14,000 rpm y se succionó el sobrenadante.
- 10.- Se resuspendió en 100 μ l de buffer TE.
- 11.- Se agregó un volumen de Fenol/Cloroformo 1:1, se agitó manualmente con fuerza y se centrifugó 5 min a 14,000 rpm.
- 12.- Se transfirió el sobrenadante a otro tubo, se le agregó 1/25 de volumen de NaCl y un volumen de Etanol absoluto. Se precipitó a -20°C.
- 13.- Se centrifugó 10 min a 14,000 rpm, se resuspendió la pastilla en buffer TE y se precipitó nuevamente como en el paso anterior.
- 14.- Después de formar el precipitado por centrifugación, se le resuspendió en el volumen pertinente de buffer TE.

15.- Se verificó el estado del plásmido observando su patrón de corte característico con enzimas de restricción en geles de Agarosa/buffer TBE. También se le cuantificó por absorbancia en un espectrofotómetro con luz UV a 260 nm.

PREPARACION Y TRANSFORMACION DE PROTOPLASTOS DE *S. lividans* 1326 (Hopwood *et al.*, 1985)

En este trabajo se utilizó *S. lividans* 1326 como hospedero en la clonación y expresión del gen de lipasa, porque las técnicas y los vectores de clonación de este microorganismo ya se han optimizado (Chater *et al.*, 1982). Se tiene entonces un hospedero que crece y esporula bien en medio sólido; que crece sin esporular en medio líquido; que se puede convertir fácilmente a protoplastos, los cuales se pueden regenerar de manera efectiva, una vez que han sido transformados; que no presenta algún replicón conocido que pudiera interferir con la replicación o con el análisis de plásmidos usados como vectores de clonación; y que no muestra una restricción evidente del DNA introducido, procedente de diversas cepas donadoras (Chater *et al.*, 1982). Por otro lado, una forma práctica de introducir DNA en estreptomycetos es mediante el tratamiento de protoplastos con DNA en presencia de Calcio y PEG (Chater *et al.*, 1982).

1.- Se crecieron inóculos densos de esporas de *S. lividans* 1326 en 25 ml de medio YEME + $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ 50mM + Glicina al 0.5% -para hacer más sensible la pared celular a la lisozima que se utiliza más adelante-, en matraces de 250 ml agitados durante un período de 38 a 40 h a 30°C.

2.- Se cosechó el micelio por centrifugación: 3,500 rpm durante 10 min a 4°C, en tubos de 50 ml.

3.- Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 10 ml de solución de Sacarosa al 10.3%. Se centrifugó en las mismas condiciones del paso anterior.

4.- Se resuspendió nuevamente en 10 ml de Sacarosa al 10.3%. De acuerdo al tamaño de la pastilla, el micelio lavado se dividió hasta en 4 alcuotas en "tubos para protoplastos". Los lotes de tubos con micelio se guardaron a -20°C para su uso en la transformación de protoplastos.

5.- Para transformar protoplastos se descongeló el micelio, resuspendiéndolo en 4 ml de una solución filtrada de buffer P con lisozima 1 mg/ml. Se incubó de 30 a 60 min a 30°C. A lo largo de este periodo, constantemente se hizo subir y bajar el micelio por una pipeta, además se observaron muestras al microscopio para verificar la presencia de los protoplastos.

6.- Se agregaron 5 ml de buffer P al tubo y se filtró a través de un filtro de algodón.

- 7.- El volumen filtrado se centrifugó 10 min a 3,500 rpm.
- 8.- Se tiró la fase líquida, cuidadosamente se resuspendieron los protoplastos con los residuos líquidos y se agregaron 10 ml de buffer P.
- 9.- Se centrifugó 10 min a 3,500 rpm. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió con los restos de buffer.
- 10.- Se agregó la solución de DNA y de inmediato se adicionó 0.5 ml de PEG-1000 diluido en buffer P al 25%. Se mezcló pipeteando.
- 11.- Se añadieron 5 ml de buffer P y se centrifugó 10 min a 3,500 rpm.
- 12.- Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de buffer P
- 13.- Se plateó 0.1 ml por caja de medio R2YE seco. Encima se vertieron 2.5 ml de Agar suave para protoplastos, fundido y enfriado a 37°C. Moviendo la fase líquida se dispersaron los protoplastos por toda la superficie.
- 14.- Se incubó a 29°C. A las 18 h, una vez regenerados los protoplastos, se agregó 1 ml de tioestreptona 200 µg/ml para seleccionar colonias transformantes.

Nota: Los "tubos para protoplastos" y todo el material de cristalería utilizado debe estar perfectamente bien enjuagado para evitar la presencia de cualquier tipo de detergente. Es recomendable probar el micelio de uno de los tubos del lote, usando plásmido funcional, para conocer su eficiencia de transformación antes de utilizarlo en un experimento de clonación.

BANCO DE GENES DE *S. albus* G en *S. lividans* 1326

La estrategia de clonación utilizada recibe el nombre técnico de "shotgun cloning" y requiere del uso de un plásmido multicopia como vector de clonación, para aislar algún gen que pueda ser fácilmente seleccionado de un banco genómico. En este caso, el ensayo para observar actividad lipolítica (Pérez *et al.*, 1993), simplifica la detección de las clones transformantes buscadas. Obviamente, mientras mayor sea el banco genómico, mayor será la probabilidad de tener representada toda la información genética, en fragmentos desordenados de DNA.

- 1.- Se linealizó el plásmido pB21 de 6.2 Kb, cortando en el sitio de restricción único *Bam*HI localizado en el polienlazador -Véase la Fig. 1.-
- 2.- Para prevenir una recircularización del vector e incrementar la proporción de fragmentos de DNA clonados en las subsecuentes transformantes, el vector se trató con fosfatasa alcalina de intestino de ternerá. La correcta hidrólisis de los grupos 5' fosfato se verificó al observar que el plásmido no se religaba al ser tratado con ligasa T4.

3.- Los fragmentos de DNA de 10 a 20 Kb provenientes del genoma de *S. albus* G digerido parcialmente con *Sau3A* y separados en gradiente de Sacarosa, se incluyeron junto con el plásmido pB21 defosforilado en una mezcla de ligación -los extremos cohesivos generados por la enzima *Sau3A* pueden ligarse con los extremos que deja la enzima *BamHI*-, considerando una proporción de concentraciones 5:1 insertos-vector y una concentración total de 30 µg de DNA/ml. Se tomó una alícuota antes de agregar la ligasa T4 y se le puso a -20°C. La reacción se dejó 2 días a temperatura ambiente.

4.- Se corrió una alícuota de la mezcla de reacción al lado de la que fue tomada antes de adicionar la enzima con el objeto de apreciar la cantidad de fragmentos clonados en el plásmido.

5.- Con esta mezcla de ligación se transformaron protoplastos de *S. lividans* 1328, seleccionando resistencia a tioestreptona.

6.- Con un asa de siembra se cosecharon las esporas de algunas clonas transformantes para inocularlas a manera de sectores en cajas de medio R5 + tioestreptona 50 µg/ml.

7.- Con las esporas de los sectores se hicieron "minipreps" para verificar la presencia del plásmido y, una vez digerido con las enzimas convenientes, calcular el porcentaje de insertos clonados, así como la probabilidad de tener un banco completo y representativo del genoma de *S. albus* G.

8.- Se replicaron las colonias del banco en cajas de medio mínimo + Rodamina B al 0.1% + Casaminoácidos al 0.2% + 1% de aceite de oliva emulsificado + tioestreptona 50 µg/ml, pero sin Glucosa (Pérez *et al.*, 1993).

9.- Se detectó la producción de lipasa extracelular de manera cualitativa, midiendo la formación de halos fluorescentes alrededor de las colonias replicadas (Kouker & Jaeger, 1987).

TRANSFERENCIA DE DNA DE GELES DE AGAROSA A MEMBRANA NYLON (Hopwood *et al.*, 1985)

Esta técnica se utiliza comúnmente para localizar secuencias particulares de DNA dentro de fragmentos más grandes o genomas.

1.- Se digirió DNA de *S. albus* G y de *Streptomyces* M11 utilizando varias enzimas de restricción.

2.- Los fragmentos de DNA resultantes de las digestiones enzimáticas se separaron por tamaño en geles de buffer TBE/Agarosa del 0.8 al 1.0%. Se tificaron los geles con Bromuro de Etidio 3 µg/ml y se fotografiaron colocando una regla a un lado del gel para poder hacer comparaciones posteriores con la foto.

- 3.- Se cortó el gel al tamaño mínimo requerido, marcándolo en una esquina para saber la orientación original, y se le midió.
- 4.- Para reducir el tamaño de los fragmentos más grandes se incluyó un paso de despurinación, sumergiendo dos veces el gel durante 10 min en HCl 0.25M con agitación suave.
- 5.- Se lavó con agua desionizada.
- 6.- Se desnaturizó el DNA sumergiendo el gel dos veces durante 15 min en NaOH 0.5M, NaCl 1M con agitación suave.
- 7.- Se lavó el gel 3 veces con agua desionizada.
- 8.- Se neutralizó el gel sumergiéndolo 20 min en 200 ml de NaCl 3M, Tris-Cl 0.5M pH 7.5 con agitación suave.
- 9.- Se cortó un pedazo de membrana nylon -Hybon-N 0.45 micron de Amersham- y dos piezas de papel Whatman 3MM al mismo tamaño del gel.
- 10.- Se sumergió muy bien la membrana nylon en agua desionizada antes de ponerlo en buffer SSC 2x.
- 11.- Se llenó un recipiente hasta 2-3 cm de altura con buffer SSC 20x, se colocó un pedazo de acrílico encima de un soporte central dentro del recipiente, de tal forma que la placa estuviera por arriba del nivel del líquido. Sobre el acrílico se colocó una pieza de papel Whatman 3MM que quedó tocando el buffer SSC 20x por dos de sus lados; encima se colocó una pieza de papel Whatman 3MM un poco más pequeña que el acrílico y se vertió buffer SSC 20x. Trabajando con guantes, se removieron todas las burbujas de aire y el exceso de líquido.
- 12.- Se colocó el gel invertido sobre el papel Whatman 3MM y se quitó todo exceso acuoso.
- 13.- Con mucho cuidado se extendió la membrana nylon sobre el gel, se cubrió con los pedazos de papel Whatman del paso No. 9, una vez sumergidos en buffer SSC 2x.
- 14.- Encima de todo lo anterior se colocó una pila de 2 cm de pedazos de papel-toalla cortados 2-3 mm más pequeños que el gel, y después, se puso una torre adicional de 8 cm de papel-toalla cortado con menor precisión.
- 15.- En seguida se puso una placa de vidrio, se cubrió con una película de plástico y se colocó un peso de 500 a 1,000 g.
- 16.- Se dejó toda una noche transfiriéndose el DNA de cadena sencilla a temperatura ambiente.
- 17.- Se removió el papel-toalla y los dos pedazos de papel Whatman 3MM, se despegó la membrana nylon y se le dejó secar entre dos piezas de papel Whatman 3MM.
- 18.- La membrana nylon se homeó con luz UV, aplicando 1200 μ joules durante 30 seg, con el objeto de crear enlaces covalentes entre el DNA y la membrana nylon.

MARCAJE RADIOACTIVO DE DNA POR "NICK-TRANSLATION" (Hopwood *et al.*, 1985)

El propósito planteado en el método anterior se cumple mediante el uso de una sonda radioactiva específica de lo que se pretenda localizar dentro del genoma.

1.- Utilizando los reactivos del "Nick translation kit N. 5000" de Amersham se generó una sonda radioactiva de DNA *in vitro*, marcando con [$\alpha^{32}P$] dCTP durante 2 h a 15°C. La reacción se detuvo dejando 10 min a 70°C.

2.- Al tubo Eppendorf donde se realizó la reacción de marcaje se agregaron 20 μ l de una solución concentrada de azul dextran con naranja G al 1% y NaCl 50mM.

3.- La mezcla se pasó por una columna de Sephadex G50 de 2.5 cm de altura con buffer TNE como eluyente, colectando la fracción azul que va al frente en tubos Eppendorf y desechando la porción retardada color anaranjado.

4.- Se cuantificó la cantidad de isótopo radioactivo incorporado analizando una alícuota de 1 μ l de la fracción azul colectada en un Contador de Centelleo.

HIBRIDIZACION DNA-DNA SOBRE MEMBRANA NYLON (Hopwood *et al.*, 1985)

Una de las primeras pruebas que se debe aplicar a la presunta clona seleccionada consiste en reintroducir el plásmido recombinante en la cepa hospedera, para probar que el DNA que se clonó determina el fenotipo deseado. La segunda prueba importante es verificar el origen de la clona, esto es, comprobar que se cuenta con la forma inalterada proveniente de la cepa donadora, mediante la hibridización de DNA-DNA según Southern (Chater *et al.*, 1982)

1.- La membrana nylon con el DNA transferido se metió dentro de una bolsa de plástico, se agregó solución prehibridizadora que contenía DNA de tимо de ternera desnaturalizado 10 min en agua hirviendo, pero que carecía de formamida -50 a 100 μ l por centímetro cuadrado de membrana nylon-, y se selló la bolsa con calor, sin dejar burbujas muy grandes. Se colocó todo dentro de otra bolsa, se selló esta última y se sumergió en un baño a 70°C durante 1 h.

2.- Se desnaturalizó la cantidad requerida de sonda radioactiva en un tubo Eppendorf colocado 10 min en agua hirviendo. Se pasó rápidamente a hielo para evitar la renaturalización de la molécula.

3.- La bolsa de plástico interna se sacó y se abrió por una esquina a través de la cual se hizo salir el líquido y se metió la sonda diluida en un poco de mezcla prehibridizadora.

4.- Se distribuyó la fase acuosa dentro de la bolsa, de manera que se mojara toda la membrana nylon y no quedaran burbujas inmersas. Se reselló la esquina, se metió dentro de otra bolsa sellada y se incubó toda una noche en un baño a 55°C.

- 5.- Se sacó la bolsa interior, se cortó por una esquina y se desechó la mezcla radioactiva.
- 6.- Se cortó la bolsa en dos de sus lados y se sacó la membrana nylon con unas pinzas.
- 7.-Se efectuaron 2 lavados de la membrana nylon en condiciones de baja severidad: 30 min en 500 ml de buffer SSC 2x con SDS al 0.1% a 70°C. En un experimento se aumento la severidad al disminuir la fuerza iónica, lavando 2 veces la membrana nylon 30 min en 500 ml de buffer SSC 0.2x con SDS al 0.1% a 70°C.
- 8.- Se sacaron autoradiografías de la membrana nylon.
- 9.- Utilizando como referencia la regla fotografiada junto con el gel que fue transferido a la membrana nylon, se determinó el tamaño de los fragmentos de DNA que hibridaron con la sonda radioactiva.

ELABORACION DE "MINIPREPS" DE DNA DE PLASMIDOS Y DE M13.

En una "miniprep" se tiene DNA aislado de clonas transformantes -en pequeña escala-, el cual se analiza, generalmente, con enzimas de restricción.

- 1.- Cada una de las colonias transformantes de *E. coli* JM101 se creció con agitación en 2 ml de medio YT2x con carbenicilina 200 mg/ml durante 5 h. En el caso de las clonas de *S. lividans*, se creció cada una de ellas en forma de sectores sobre medio R5 con tloestreptona 50 µg/ml, se cosecharon las esporas y se inocularon 3 ml de medio LB con antibiótico, incubando con agitación durante 2 días a 29°C. Respecto a M13, se picaron las placas claras con palillos esterilizados y se inocularon 2 ml de medio YT2x con células de *E. coli* JM101, incubando 5 h a 37°C con agitación.
- 2.- Se cosecharon las células o el micelio por centrifugación 10 min a 14,000 rpm en tubos Eppendorf. Se eliminó todo el sobrenadante por aspiración. Para M13 se guardaron los sobrenadantes a 4°C.
- 3.- Se resuspendió el paquete de células o el micelio en 100 ml de buffer TE 25mM. En el caso de *Streptomyces*, el buffer TE 25mM contenía lisozima 2 mg/ml.
- 4.- Para *E. coli* JM101 se incubó 5 min en hielo. Para *Streptomyces* se incubó al menos media hora a 37°C o hasta que el micelio estuviera visiblemente lisado, dando un aspecto translúcido y viscoso.
- 5.- Se añadieron 200 ml de una solución fresca de NaOH 0.2N, SDS al 1%. Se mezcló bien invirtiendo vigorosamente los tubos hasta que se veía transparente, homogéneo y muy viscoso. Se incubó 10 min en hielo.
- 6.- Se añadieron 150 µl de Acetato de Potasio 3M pH 4.8, se mezcló bien por inversión hasta que se perdía la viscosidad y se veía un precipitado blanco. Se incubó 15 min en hielo.

- 7.- Se añadieron 400 μ l de Fenol/Cloroformo 1:1, se agitó 30 seg en vórtex y se centrifugó 2 min en una microfuga.
- 8.- Se pasó la fase acuosa a otro tubo y se añadió 1 ml de Etanol absoluto frío. Se dejó precipitando 5 min a temperatura ambiente.
- 9.- Se centrifugó 10 min en una microfuga. Se retiró todo el sobrenadante por aspiración.
- 10.- Se resuspendió la pastilla en 50 μ l de buffer TE. Se añadieron 150 μ l de Acetato de Sodio 4M pH 6. Se mezcló bien y se incubó una hora a -20°C .
- 11.- Se centrifugó 10 min en una microfuga, se pasó el sobrenadante a un tubo limpio y se añadieron 200 μ l de isopropanol. Se precipitó 10 min en hielo.
- 12.- Se centrifugó 10 min en una microfuga. Se eliminó todo el sobrenadante. Se resuspendió en 45 μ l de buffer TE; se añadieron 5 μ l de Acetato de Sodio 3M pH 6 y 125 μ l de Etanol absoluto frío. Se precipitó 10 min en hielo.
- 13.- Se centrifugó 10 min en una microfuga. Se eliminó todo el sobrenadante. Se secó la pastilla y se resuspendió en 25 μ l de buffer TE.
- 14.- Se verificó el patrón de restricción de cada "miniprep" utilizando las enzimas adecuadas para cada caso.

PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA DE GELES DE AGAROSA DE BAJO PUNTO DE FUSION (Hopwood et al., 1985)

Como se ha dicho, es preferible tener DNA lo más puro posible para realizar experimentos de clonación. Este protocolo se efectúa en un tiempo relativamente corto.

- 1.- Después de realizar la electroforesis de las muestras y teñir el gel de Agarosa de bajo punto de fusión en Bromuro de Etidio 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se iluminó con luz UV de onda larga y se cortó la banda de interés lo más cercano al DNA.
- 2.- Se fundió la rebanada de Agarosa que contenía el DNA en un tubo Eppendorf a $65-70^{\circ}\text{C}$, durante 10 min. Se calculó el volumen de la Agarosa fundida y se añadió 1/10 de volumen de NaCl 5M. Se mezcló bien y se dejó otros 5 min en el baño.
- 3.- Se colocó la Agarosa fundida 5 min a 37°C .
- 4.- Se añadió al tubo con la Agarosa 2/3 de volumen de fenol saturado con NaCl y precalentado a 37°C . Se agitó de inmediato en vórtex durante 30 seg.
- 5.- Se centrifugó en una microfuga 5 min a 14,000 rpm, y se pasó la fase acuosa a un tubo limpio.
- 6.- Al fenol se le añadieron 45 μ l de buffer TE y 5 μ l de NaCl 5M. Se agitó en vórtex.
- 7.- Se centrifugó 2 min a 14,000 rpm y se mezcló la fase acuosa con la del paso No. 5.

- 8.- Se añadió un volumen de Fenol/Cloroformo 1:1 a la fase acuosa, se agitó 15 seg en vórtex y se centrifugó 2 min.
- 9.- Se pasó el sobrenadante a un tubo limpio y se repitió el paso No. 8, pero solamente con Cloroformo.
- 10.- Se pasó el sobrenadante a un tubo limpio y se añadió un volumen de Isopropanol. El DNA se coprecipitó con 10 μg de tRNA, excepto cuando se le necesitaba defosforilar con fosfatasa alcalina. Se mantuvo a -20°C durante al menos 2 h.
- 11.- Se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm en una microfuga. Se sacó todo el alcohol con mucho cuidado utilizando una micropipeta. Se secó la pastilla.
- 12.- Se resuspendió la muestra en un volumen adecuado de buffer TE.

PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA POR ELECTROELUCION (Hopwood *et al.*, 1985)

Este método toma un poco más de tiempo, pero, al igual que el anterior, es efectivo

- 1.- El gel de Agarosa/buffer TBE con el DNA digerido se tñó con Bromuro de Etidio 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se iluminó con una lámpara de luz UV onda larga.
- 2.- Se cortó la banda de interés y ésta se colocó en el pozo grande -Polo negativo- de una cámara de electroelución. Se electroeluyó en buffer TBE 0.1x a 150 V durante 2 h.
- 3.- Con una micropipeta se extrajo el líquido del pozo pequeño -Polo positivo- y se le pasó a un tubo Eppendorf.
- 4.- Se añadió un volumen de Fenol/Cloroformo 1:1, se agitó en vórtex y se centrifugó 4 min a 14,000 rpm. El sobrenadante se paso a otro tubo y se repitió la operación.
- 5.- Se precipitó con 10 μg tRNA, 1/25 de volumen de NaCl 5M y 1 volumen de Etanol absoluto a -20°C .
- 6.- Se centrifugó 10 min a 14,000 rpm y se resuspendió en el volumen conveniente de buffer TE.

SUBCLONACION DE FRAGMENTOS DE DNA PURIFICADOS.

Los fragmentos de DNA purificado y cortado con las enzimas de restricción convenientes se ligaron a los plásmidos adecuados -de *E. coli* y de *Streptomyces*- y a M13, Los vectores de clonación purificados fueron cortados previamente con las enzimas que dejaron los extremos cohesivos para cada caso en particular.

Para evitar al máximo la recircularización de los vectores con extremos romos, al igual que aquéllos linealizados en su sitio único de restricción, se les defosforiló con fosfatasas alcalinas de intestino de ternera. Después de extraer con Fenol/Cloroformo 1:1, de precipitar con 1/10 de volumen de Acetato de Sodio 3M + 1 volumen de Isopropanol al menos 1 h a -20°C, y de resuspender en buffer TE, se realizó la electroforesis en geles de Agarosa/buffer TBE de bajo punto de fusión con el fin de cortar la banda correspondiente al vector bien defosforilado. Esta banda se purificó como se indica anteriormente

Para ligar los insertos a los vectores se utilizó ligasa T4 poniendo, en general, 5 veces más inserto que vector.

TRANSFORMACION Y TRANSFECCION DE CELULAS COMPETENTES DE *E. coli* JM101 (Hanahan, 1986)

E. coli presenta algunas ventajas para la realización de ciertos experimentos de Biología Molecular, respecto a los estreptomicetos: Su ciclo de vida es más corto; las características estructurales de su pared celular permiten que se pueda lisar más fácilmente en las condiciones que se manejan; la cantidad de DNA que se puede aislar siempre es mayor y, por lo general, el DNA sale muy limpio; y los vectores de clonación permiten una forma de selección de clones muy sencilla. En síntesis, se ahorra tiempo al trabajar con esta bacteria. Sin embargo, los productos de secreción normalmente no son exportados por *E. coli*, y se localiza en el espacio periplásmico.

- 1.- En un matríz de 250 ml se colocaron 15 ml de medio YT2x y se añadió 0.15 ml de $MgCl_2$ 1M / $MgSO_4$ 1M, mezclando bien.
- 2.- Se pasaron 2.5 ml de medio a un tubo y se inoculó con una asada de varias colonias aisladas de *E. coli* JM101. Se agitó en vórtex y se incubó 3 h a 37°C con agitación de 220 rpm.
- 3.- Se tomaron 0.1 ml del pie de cultivo para inocularlos en el medio del matríz del paso No. 1. Se incubó 2 h a 37°C con agitación de 220 rpm.
- 4.- El matríz se pasó a hielo y se cosecharon las células en un tubo para protoplastos -perfectamente enjuagado-. Se centrifugó 10 min a 3,000 rpm en un rotor pre-enfriado a 4°C.
- 5.- Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con el residuo líquido.
- 6.- Se agregaron 3 ml de buffer TFB frío. Se dejó incubando 15 min en hielo.
- 7.- Se centrifugó 10 min a 3,000 rpm a 4°C. El hecho de observar que la pastilla es ahora más grande indica un correcto tratamiento de las células.
- 8.- Cuidadosamente se tiró el sobrenadante, se resuspendió con los restos líquidos y se agregó 1 ml de TFB frío.

9.- En algunos casos en los que se requirió tener una mayor eficiencia de transformación o de transfección, se agregaron 35 μ l de DnD, dos veces, dejando el tubo 10 min en hielo después de cada adición. Para la transfección sólo se dejaron 5 min en hielo después de cada adición.

10.- Se pasó una alícuota de 0.2 ml a un tubo para protoplastos y se agregó el DNA. Se dejó 40 min en hielo para la transformación y 30 min para la transfección.

11.- Se dió un choque térmico de 90 seg a 42°C y de inmediato se pasó a hielo. Para la transfección se continuó en el paso No. 16.

12.- Se añadieron 0.8 ml de medio YT2x con Glucosa al 0.5%.

13.- Se incubó 20 min a 37°C con agitación a 220 rpm.

14.- Se centrifugó 10 min a 3,000 rpm a 4°C.

15.- Se tiró la fase acuosa y se resuspendió en 0.5 ml de medio YT2x.

16.- Para la transformación se plaquéó 0.1 ml por caja de medio LB sólido con carbenicilina 200 μ g/ml, dispersando las células con una varilla de vidrio. Para verificar la presencia de insertos clonados en los plásmidos y fagos utilizados, se indujo la " α -complementación", agregando a las cajas IPTG 100mM y X-Gal 20 mg/ml. Únicamente para la transfección se colocaron 0.05 ml por caja de medio LB sólido y, encima, se agregaron 2.5 ml de mezcla para tapete bacteriano: 0.2 ml de células del pie de cultivo, 10 ml de medio LB blando a 45°C, 0.16 ml de X-Gal y 0.08 ml de IPTG. Se dispersaron las células con movimientos circulares de las cajas.

17.- Se incubó a 37°C durante toda la noche. Se seleccionaron las clonas y las placas incoloras, según el caso.

Nota: Cuando se transformó con plásmidos ya recircularizados y con insertos deletados no se requirió agregar IPTG ni X-Gal al medio de cultivo.

ELABORACION DEL MAPA DE RESTRICCIÓN (Maniatis *et al.*, 1982)

El mapa de restricción parcial de un fragmento de DNA ayuda en la obtención de su secuencia completa de nucleótidos; además, entre otras cosas, se le utiliza en el diseño de subclonaciones para el análisis funcional de genes.

Digiriendo con *Bam*HI el DNA de la transformante lipolítica aislada se pudo conocer si alguno de los extremos del vector de clonación pB21 pudo regenerar un sitio *Bam*HI al ser ligados con los extremos del fragmento clonado, resultantes del corte con *Sau*3A.

El inserto subclonado en los plásmido pIJ2925 y pUC18 de *E. coli* -plásmidos pBG2 y pBG3, respectivamente- se cortó con un total de 15 enzimas de restricción.

Para hacer el mapa se trabajó con las enzimas que tuvieron el menor número de bandas generadas y con las que cortaron en el polienlazador del vector, haciendo digestiones combinadas y sencillas.

Las digestiones enzimáticas se corrieron lentamente en geles grandes de Agarosa/buffer TBE, se tiñeron en Bromuro de Etilidio 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se fotografiaron con luz UV de un transiluminador.

Para cada gel se midieron las distancias recorridas por las bandas del estándar de Peso Molecular utilizado: DNA de fago λ digerido con *Pst*I, en ampliaciones de las fotografías y se establecieron las curvas-patrón para cada caso en una gráfica "Distancia vs. Logaritmo del Peso Molecular en Kb". Los Pesos Moleculares de las bandas de cada digestión se interpolaron en su gráfica respectiva.

DELECCIONES CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Con este procedimiento y con los dos que siguen más adelante, se pudo obtener la secuencia completa de nucleótidos del fragmento de DNA de 2.5 Kb.

- 1.- Con ayuda del mapa de restricción del plásmido pBG3 se planearon diversas deleciones con enzimas de restricción.
- 2.- Se verificaron las digestiones enzimáticas en geles de Agarosa/buffer TBE teñidos con Bromuro de Etilidio 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- 3.- Se corrieron las digestiones en geles de Agarosa/Agarosa de bajo punto de fusión y se purificaron las bandas de interés con el método correspondiente.
- 4.- Tratándose de extremos no cohesivos se hicieron extremos romos utilizando la subunidad Klenow de la enzima DNA polimerasa I. Primero se incubó la reacción 5 min a 37°C sin desoxinucleótidos, induciéndose la actividad de exonucleasa 3' => 5'. Luego se agregó 1 μl de una solución 1mM de dATP+dTTP+dGTP+dCTP, dejando 15 min a temperatura ambiente para inducir la actividad de polimerasa 5' => 3'. Se inactivó la reacción dejando 10 min a 70°C.
- 5.- Se religaron los plásmidos deletados con ligasa T4.
- 6.- Se transformaron células competentes de *E. coli* JM101 y se hicieron "minipreps" de algunas colonias seleccionadas.
- 7.- Se verificaron los tamaños de las deleciones al digerir con las enzimas *Eco*RI y *Hind*III.
- 8.- Se purificaron las bandas *Eco*RI/*Hind*III correspondientes a los insertos deletados.
- 9.- Se subclonaron los fragmentos en M13mp18 y/o M13mp19 -según conviniera la orientación- cortados con las enzimas *Eco*RI y *Hind*III

10.- Se verificaron las subclonaciones haciendo "minipreps" y se prepararon moldes de DNA de cadena sencilla para secuenciar.

DELECCIONES CON EXO III (Maniatis *et al.*, 1982)

A partir de DNA superenrollado se generaron deleciones progresivas con ExoIII, con lo cual se pudo entrar en el gen para secuenciar la información que aún faltaba.

1.- Se hizo una doble digestión del plásmido pBG3 purificado en gradiente de Cloruro de Cesio/Bromuro de Etido: Primero con la enzima *Bam*H-I, dejando un extremo 5' saliente que es sustrato para la enzima ExoIII. Luego el plásmido totalmente linealizado se digirió con la enzima *Sst*I, dejando el otro extremo 3' saliente, el cual protege de la actividad de exonucleasa 3'=>5' de la enzima ExoIII. Las deleciones dirigidas se hicieron hacia el extremo del inserto y no hacia el que tiene el sitio de unión de "primer -40" de secuencia del vector de clonación.

2.- Se extrajo con Fenol/Cloroformo 1:1, se precipitó con 1/10 de volumen de Acetato de Sodio 3M y 1 volumen de Isopropanol a -20°C durante 3 h. Se centrifugó 10 min a 14,000 rpm y se resuspendió en buffer TE.

3.- Se diluyó enzima S1 en buffer para S1 400 u/μl y H₂O desionizada, quedando a 80 u/200 μl.

4.- Se pusieron 7.5 ml de esta solución en 9 tubos Eppendorf y se les mantuvo en hielo.

5.- Se preparó una solución de 25 μl de volumen para hacer deleciones con ExoIII, agregando la enzima hasta que la mezcla de reacción se calentó a 37°C.

6.- A cada minuto de reacción se tomaron alícuotas de 2.5 μl, pasándolas a los tubos del paso No. 4. A los 2.5 μl del último tiempo se le agregaron directamente los 7.5 μl de la solución fría del paso No. 3.

7.- Se dejó 30 min a temperatura ambiente.

8.- Se agregó a cada tubo Eppendorf 1 μl de "Mezcla S1-stop" y se pusieron 10 min a 70°C para desactivar a las enzimas.

9.- Se corrieron alícuotas de 1 μl de cada tiempo en un gel de Agarosa/buffer TBE al 1%.

10.- Se seleccionaron las tiempos más convenientes, se precipitó como en el paso No. 2, pero dejando 1 día a -20°C.

11.- Se trató con la subunidad Klenow de la enzima DNA polimerasa I para hacer extremos romos -Véase paso N° 4 del protocolo anterior-

12.- Se hizo lo mismo que en los pasos No. 5, 6, 7, 8, 9 y 10 del método anterior.

SUBCLONACION AL AZAR Y ANALISIS DE DNA SONICADO (Deininger, 1983)

Este método produce fragmentos de DNA que se fraccionan de acuerdo a su tamaño y se clonan de manera azarosa, permitiendo que rápidamente se acumulen datos de la secuencia buscada. Aunque después los datos se empiezan a tener por duplicado, esto no es problema ya que así se verifica la secuencia más de una vez (Deininger, 1983). Los posibles huecos de información se pueden "llenar" al utilizar los dos métodos anteriores.

- 1.- Se digirió el plásmido pBG3 con *SalI/ScaI* y se purificó el inserto *SalI* de 2.5 Kb en Agarosa de bajo punto de fusión.
- 2.- El fragmento de 2.5 Kb con extremos cohesivos *SalI* se circularizó con ligasa T4 durante 1 día.
- 3.- Se sonicaron 8 mg de este material resuspendido en un volumen total de 500 μ l de TE con 4 ciclos de 5 seg espaciados por 15 seg de enfriamiento en hielo.
- 4.- En un gel de Agarosa/buffer TBE al 1% se corrió una alícuota para observar el tamaño de los fragmentos generados por sonicación.
- 5.- Se precipitó con 1/25 de volumen de NaCl 5M, 2.5 volúmenes de Etanol absoluto y tRNA 20 μ g/ml, durante 1 día a -20°C. Se centrifugó 10 min a 14,000 rpm y se resuspendió en buffer TE.
- 6.- Se purificó la banda de 300 a 800 pb del DNA sonicado en gel de Agarosa de bajo punto de fusión al 1%.
- 7.- Se repararon los extremos de los fragmentos de 300 a 800 tratando con la subunidad Klenow de la enzima DNA polimerasa I para hacer extremos romos, tal como se explica en el paso N° 4 del método de deleciones con enzimas de restricción.
- 8.- Con ligasa T4 se realizó la ligación de los fragmentos en el fago M13mp19 cortado con *SmaI* -enzima que genera extremos romos- y defosforilado con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Maniatis *et al.*, 1982). La reacción se dejó un fin de semana y se verificó en un gel de Agarosa/buffer TBE junto con una alícuota tomada antes de agregar la enzima.
- 9.- Con esta ligación se transfectaron células competentes de *E. coli* JM101, seleccionando placas claras.
- 10.- Se hicieron "minipreps" de DNA replicativo de M13
- 11.- Los sobrenadantes de las "minipreps" que mostraron insertos mayores de 400 pb se prepararon como moldes de cadena sencilla para secuenciarlos.

PREPARACION DE MOLDES DE CADENA SENCILLA PARA SECUENCIAR EN M13.

Al utilizar este fago de cadena sencilla se puede hacer el análisis de restricción de su forma replicativa y secuenciar con su forma infectiva. La posición de sus polienlazadores en ambos sentidos -mp18 y mp19, por ejemplo-, permite cambiar la orientación del inserto clonado y secuenciar, en principio, desde cada uno de sus extremos.

- 1.- En un tubo Eppendorf se colocaron 225 μ l de PEG-8000 20%/NaCl 2.5M.
- 2.- Se recentrifugó el sobrenadante del cultivo crecido para hacer "minipreps" de M13 en forma replicativa, durante 10 min a 14,000 rpm, con el objeto de eliminar cualquier resto de células.
- 3.- Se pasaron 1.2 ml del sobrenadante al tubo con PEG-8000/NaCl. Se mezcló bien y se dejó en hielo al menos 15 min.
- 4.- Se centrifugó 10 min a 14,000 rpm y se sacó todo el sobrenadante por aspiración. Se dio un pulso en la microcentrífuga para eliminar todo el sobrenadante con un capilar.
- 5.- Se resuspendió en 200 μ l de buffer TE, agitando en vórtex varias veces.
- 6.- Se añadieron 100 μ l de Fenol saturado. Se agitó durante 1 min en vórtex. Se añadieron 100 μ l de Fenol/Cloroformo 1:1 y se agitó otro minuto en vórtex.
- 7.- Se centrifugó 5 min a 14,000 rpm. Se pasó la fase acuosa a otro tubo, teniendo cuidado de no llevarse material de la interfase.
- 8.- Se extrajo la fase acuosa con 200 μ l de Fenol/Cloroformo 1:1. Se centrifugó 2 min y se pasó la fase acuosa a otro tubo. Se añadieron 20 μ l de Acetato de Sodio 3M y 200 μ l de Isopropanol.
- 9.- Se mezcló y se dejó precipitando al menos 1 h a -20°C.
- 10.- Se centrifugó durante 10 min y se sacó todo el alcohol. Se resuspendió en 45 μ l de buffer TE, se añadieron 5 μ l de Acetato de Sodio 3M, se mezcló y se precipitó con 125 μ l de Etanol absoluto. Se dejó al menos 1 h a -20°C.
- 11.- Se centrifugó 10 min a 14,000 rpm, se sacó todo el líquido y se secó la pastilla.
- 12.- Se resuspendió en 25 μ l de buffer TE que contenía Tris-Cl 10mM y EDTA-Na 0.1mM a pH 7.8
- 13.- Se corrió una alícuota de 2 μ l en un minigel de Agarosa/buffer TBE teñido con Bromuro de Etidio 3 μ g/ml, para estimar la cantidad de DNA.
- 14.- Normalmente se utilizaron de 5 a 7 μ l de DNA por reacción de secuencia.

ELABORACION DE GELES DE POLIACRILAMIDA PARA SECUENCIA DE DNA

Se requieren geles de poliacrilamida muy delgados para aumentar la definición de las bandas de oligonucleótidos marcados; se les calienta y se les agrega Urea para eliminar la formación de estructuras secundarias. Con el uso de un isótopo radioactivo del Azufre se define mejor cada banda.

1.- Se disolvieron 25.2 g de Urea ultrapura en 10 ml de H₂O desionizada, se agregaron 12 ml de buffer TBE 5x, 10 ml de una solución de acrilamida/bis-acrilamida 29:1, y se aforó a 60 ml con H₂O desionizada. Por lo tanto, los geles tuvieron Acrilamida al 5% y Urea 7M. Para resolver la formación de estructuras secundarias al máximo se incluyó 20% de Formamida desionizada en el gel.

2.- Se degasificó y se le hizo pasar a presión por un filtro con poro de 45 micras.

3.- Para polimerizar la acrilamida se agregaron 250 μ l de Persulfato de Amonio al 25% y, 20 μ l de TEMED como catalizador.

4.- Se inyectó la solución de Acrilamida/Urea entre dos vidrios -uno de ellos silicizado- separados 4 mm entre sí y sellados a los lados y abajo con cinta adhesiva.

5.- En la parte de arriba se insertaron peines invertidos tipo "diente de tiburón" y se apretaron los vidrios con pinzas.

6.- Una vez polimerizado el gel, se quitó el exceso de poliacrilamida donde se pusieron los peines, se retiró la cinta de abajo y se montó en una cámara vertical de electroforesis con buffer TBE 1x.

7.- Con cuidado se invirtieron los peines, haciendo incidir muy poco las puntas en la superficie horizontal del gel.

8.- Se precorrió durante 45 min a 50 W constantes y antes de cargar las muestras se eliminó el exceso de Urea de los carriles con buffer TBE 1x a presión.

SECUENCIACION DE DNA POR EL METODO ENZIMATICO (Sanger *et al.*, 1977)

La secuencia nucleotídica de los fragmentos de DNA se obtiene en pedazos, pero poco a poco se van llenando los huecos de información hasta que se obtiene íntegramente.

Se siguieron las indicaciones del "Sequenase 2.0 kit" de USB, usando dGTP y dITP con el objeto de resolver las compresiones que ocurren frecuentemente en el DNA de *Streptomyces* rico en G+C.

Además, los moldes de cadena sencilla que mostraron fuerte estructura secundaria se secuenciaron también con *Taq* polimerasa, de acuerdo a las instrucciones de: "TAQuence kit" y "TAQuence 2.0 kit", ambos de USB. Las reacciones se hicieron con dGTP y con deaza-dGTP.

El marcaje radioactivo se hizo con [³⁵S] dATP αS.

Se realizaron electroforesis cortas y largas para cada molde, con el objeto de leer una parte del polienlazador de M13 hasta lo más adentro posible de la secuencia.

Los geles de acrilamida se fijaron en una solución de Metanol al 10% y Acido Acético al 5% durante 30min.

Ya fijados, los geles se transfirieron a papel Whatman 3MM y se secaron con calor y con vacío.

Se tomaron autoradiografías de los geles y se leyeron en un negatoscopio.

ANALISIS DE LA SECUENCIA DE DNA

El análisis de DNA por computadora permite caracterizar ampliamente las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos.

Se utilizó el paquete de "software" PC/GENE de IntelliGenetics para analizar secuencias de DNA y de proteína. Las secuencias nucleotídicas se ensamblaron usando el programa ASSEMBL.

El programa FRAME (Bibb *et al.*, 1984) se usó para localizar marcos de lectura abiertos, junto con el programa COD_FICK. Las regiones codificadoras localizadas se analizaron en su uso de codones con el programa CDUSAGE.

La secuencia de aminoácidos se obtuvo a través del programa TRANSL. La composición de las secuencias de lipasas extracelulares se calculó con el programa AACOMP.

Los programas RAOARGOS, HELIXMEM y SOAP se utilizaron para buscar supuestos dominios transmembranales, definidos como regiones α-hélice hidrofóbicas de al menos 16 aminoácidos de longitud.

Los programas CUTPRO y PSIGNAL localizaron posibles sitios de procesamiento en las secuencias proteínicas.

Las secuencias de proteínas se compararon con los programas PCOMPARE, PALIGN y CLUSTAL. Asimismo se les comparó con el programa FSTPSCAN en el banco de datos CDPROT24.

RESULTADOS Y DISCUSION

Durante la previa selección de cepas de *Streptomyces* productoras de lipasas por el método Tributirina-Agar de Arima *et al.* (1972), y de Sztajer *et al.* (1988), se detectó lipólisis en *Streptomyces* sp. M11 -una cepa aislada hace 3 años del suelo en Cuemavaca, Mor.- y en *S. albus* G. La lipasa del primer microorganismo ya ha sido estudiada por Pérez *et al.* en 1993. En el trabajo antes mencionado, los resultados preliminares mostraron que, al menos en las condiciones manejadas en el laboratorio, *S. lividans* 1328 es una cepa no lipolítica o "lip -". De ahí que se haya escogido como hospedero para clonar y expresar la lipasa extracelular de *Streptomyces* sp. M11 y la de *S. albus* G.

CLONACIÓN DEL GEN *lip* DE *S. albus* G

El DNA cromosomal de *S. albus* G se digirió parcialmente con la enzima *Sau3A*, la cual corta el DNA rico en G+C de manera frecuente y sin preferencia por un sitio de reconocimiento sobre otro. Al separar los fragmentos de DNA cromosomal de 10 a 20 Kb en gradiente de Sacarosa se dirigió un poco más la clonación de fragmentos cuya longitud permitía perfectamente la presencia de algún gen estructural completo.

Como vector de clonación se utilizó el plásmido pB21 -Fig. 1-, una molécula antes no caracterizada que porta el gen de resistencia al antibiótico tioestreptona y que tiene un origen de replicación híbrido, resultado del rearreglo proveniente de la cointegración de los plásmidos multicopia pJV1 y pJ486 -este último derivado del plásmido pJJ101- (Servín-González, 1993). El replicón linearizado con la enzima *Bam*HI se trató con fosfatasa alcalina de intestino de temera con el objeto de maximizar la clonación de insertos, evitando su eventual recircularización.

De un banco de genes de *S. albus* G en *S. lividans* 1328 se aisló una clona lipolítica detectada por el método de Kouker & Jaeger (1987), modificado por Pérez *et al.* (1993). Esta colonia transformante mostró un plásmido de 14 Kb, al cual se le llamó pBG1. Se clonó entonces un fragmento de 7.8 Kb que confiere el nuevo fenotipo "lip +" a *S. lividans* 1328 y que lleva el gen *lip* de *S. albus* G.

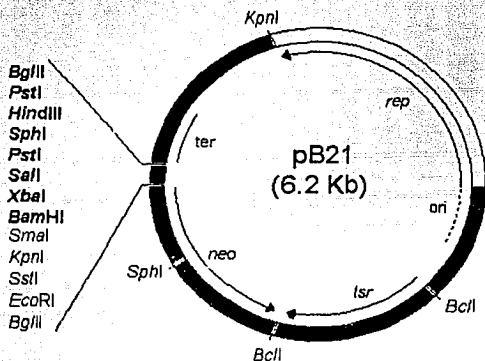


Fig. 1 Caracterización del plásmido pB21, generado por la co-integración de los plásmidos multicopia pJV1 y pJ486. Este replicón es idéntico al plásmido pJ486, excepto por la región de rearreglo correspondiente al gen *rep* del pJV1 (Servín-González, 1993). La línea punteada señala dicha región donde se encuentra el origen de replicación híbrido -ori- del plásmido. La estructura en blanco corresponde al pJV1 -1.9 Kb-, y la que se tiene en negro, a la parte del pJ486 -4.3 Kb-. Se muestra el mapa de restricción del pB21, señalándose en negrillas la parte del polienizador que se conserva durante un experimento de subclonación posteriormente realizado -Léase en el texto-. *rep* es el gen que codifica para la proteína de replicación del plásmido, *tsr* es el gen que confiere la resistencia al antibiótico tiosstreptona, *neo* es el gen responsable de la resistencia al antibiótico neomicina y *ter* es un terminador de la transcripción.

CARACTERIZACION DEL PLASMIDO pBG1 Y SUBCLONACION DEL GEN *lip*

Al digerir el plásmido pBG1 con *BamHI* pudo comprobarse que sólo uno de los extremos *BamHI* del vector de clonación se regeneró, pues se observó la linealización de la molécula, y la banda original de 14 Kb migró normalmente al realizar la electroforesis.

Con el plásmido pBG1 purificado de una "miniprep" se retransformó *S. lividans* 1326. De manera positiva se observó la actividad enzimática detectada previamente y el patrón de restricción del DNA purificado de estas transformantes coincidió con el del plásmido pBG1, verificándose así la efectiva clonación del gen *lip* en el replicón.

Con una sonda radioactiva generada por el método de "Nick-translation" se realizaron hibridaciones de DNA-DNA por el método de Southern. La sonda se construyó a partir de un fragmento *Sst*II de 676 pb del plásmido recombinante pB24 e incluye la parte interior del gen *lip* de *Streptomyces* sp. M11 (Pérez *et al.*, 1993). Esta sonda sirvió para verificar que el plásmido pBG1 cortado con las enzimas *Bam*HI, *Bgl*II, *Kpn*I, *Sal*I, *Sst*I y *Sst*II muestra un patrón de restricción totalmente diferente al del plásmido pB34 que lleva el gen de lipasa de *Streptomyces* sp. M11 cortado con *Kpn*I y con *Sal*I. Se corroboró entonces que estos genes de lipasa extracelular son distintos. Mediante esta sonda se comprobó el origen, es decir, la forma inalterada de la clona lipolítica dentro del DNA cromosomal de *S. albus* G -Ver Fig. 2-.

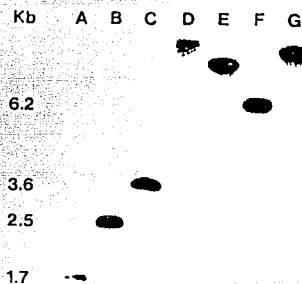


Fig. 2 Hibridación por el método de Southern del DNA cromosomal de *S. albus* G, usando como sonda un fragmento *Sst*II marcado con 32 P, que es interno y comprende la mayor parte del gen *lip* de *Streptomyces* sp. M11. Los cariles A-C son de DNA de *Streptomyces* sp. M11 cortado con *Bam*HI (A), *Kpn*I (B) y *Sal*I (C). Los cariles D-G llevan DNA de *S. albus* G cortado con *Bcl*I (D), *Bgl*II (E), *Kpn*I (F) y *Pst*I (G). El tamaño de las principales bandas se indica a la izquierda en kilobases -Kb-.

Así, estas hibridaciones positivas de la sonda radioactiva con el plásmido pBG1 y con el DNA cromosomal de *S. albus* G demostraron que, dada la persistencia de las bandas en condiciones de alta severidad, el gen de lipasa extracelular de *S. albus* G es homólogo al correspondiente a *Streptomyces* sp. M11 hasta en un 84% (Hopwood *et al.*, 1985). A su vez, con estos experimentos se pudo localizar al gen *lip* de *S. albus* G en un fragmento *Safl* de 2.5 Kb y en un fragmento *SstII* de 1.3 Kb. El primero de los fragmentos de restricción se consideró mejor candidato para continuar el trabajo ya que sus 2.5 Kb serían suficientes para contener completo al gen estructural buscado.

Por otro lado, el plásmido pBG1 mostró ciertos inconvenientes que podrían estar relacionados con su replicación. En un principio, se inocularon esporas de la clona original en medio líquido con antibiótico y se intentó crecer micelio para purificar mayores cantidades de plásmido. En ninguna de estas ocasiones el cultivo creció bien y, por consiguiente, no se pudo purificar la cantidad deseada de DNA. Ya que la concentración del inóculo de esporas de *Streptomyces* es muy importante para que los cultivos crezcan abundantemente (Hopwood *et al.*, 1985), se decidió transformar JT48 -una cepa de *S. lividans* deficiente en recombinación que esporula muy bien- con pBG1, esperando contar con inóculos de esporas más concentrados capaces de generar mayor cantidad de biomasa. Con esta estrategia tampoco se tuvieron resultados satisfactorios.

En base a estos resultados es posible pensar que la naturaleza híbrida de las funciones de replicación del vector de clonación utilizado sea responsable de la imposibilidad de purificar buenas cantidades de DNA. Aunque esta molécula se originó de la co-integración *in vitro* de 2 plásmidos multicopia (Servín-González, 1993), la cantidad de plásmido pBG1 purificada en cada ocasión, refleja una evidente disminución en el número de copias por cromosoma. Esto podría explicar parcialmente la disminución en la tasa de crecimiento cualitativo del micelio en cultivos de medio líquido con antibiótico.

Lo que se hizo a continuación fue intentar pasar el inserto original de 7.8 Kb cortado con *BglII* al plásmido pJJ2925 de *E. coli* (Janssen & Bibb, 1993). Sin embargo, la inesperada presencia de un sitio *BglII* localizado a 800 pb de uno de los extremos del inserto, hizo que sólo se clonara un fragmento de restricción *BglII* de 7 Kb, originándose el plásmido pBG2. Además, este suceso eliminó una parte del polienizador del pB21, perdiéndose los sitios de reconocimiento para las enzimas *SmaI*, *KpnI*, *SstI*, *EcoRI* y *BglII* -Véase la figura 1-. A pesar de esto, fue sólo a partir del plásmido pBG2 que se pudo contar con el DNA necesario para proseguir con los experimentos.

Por lo anterior, se podría pensar que el vector de clonación y, por lo menos no el fragmento *Bgl*II de 7 Kb subclonado, fuera el causante de la supuesta disminución en el número de copias del pBG1. Sin embargo, como se discute más adelante, quizá esto realmente no suceda. Por lo pronto, se descarta la posibilidad de que con el inserto original de 7.8 Kb se estuvieran suscitando eventos de recombinación plásmido/cromosoma, ya que no se observó cambio significativo en la cantidad de DNA plasmídico purificado de la cepa JT46 deficiente en recombinación y transformada con pBG1.

Ahora bien, para localizar al gen *lip* de *S. albus* G en el fragmento *Bgl*II de 7 Kb subclonado, se hibridizó la sonda radioactiva antes descrita con el plásmido pBG2 digerido con las enzimas *Sa*I, *Sma*I y *Sst*II. Nuevamente se detectó la banda *Sst*II de 1.3 Kb, y también el fragmento *Sa*I de 2.5 Kb. La pérdida de los 800 pb no afectó a ninguna de las bandas que hibridizaron ya que todas ellas se observaron con el mismo patrón en los plásmidos pBG1 y pBG2.

Se procedió así a subclonar el fragmento *Sa*I de 2.5 Kb en el plásmido pUC18 de *E. coli*, obteniéndose el plásmido pBG3, el cual se utilizó en los experimentos de secuenciación.

EXPRESION DEL GEN *lip* EN *S. lividans* 1326

La actividad lipolítica se estudió sólo de manera cualitativa en cajas del medio sólido señalado en la sección "Material y métodos", incubadas a 29°C. De acuerdo al tamaño del halo fluorescente observado, a las 72 h se detectó la mayor actividad de lipólisis.

A pesar de que la actividad lipolítica de la clona original fue conspicua, nunca llegó a ser tan grande como la presentada por la transformante del plásmido pB13 que lleva clonado el gen *lip* de *Streptomyces* sp. M11 (Pérez et al., 1993). Sin embargo, una diferencia no tan marcada ya se había observado durante la búsqueda de cepas productoras de lipasas y, *Streptomyces* sp. M11 mostró siempre los halos de lipólisis mayores. Al respecto cabe destacar que el gen *lip* de *Streptomyces* sp. M11 se clonó utilizando el vector pJ488 -uno de los plásmidos que conforman al pB21-, en alto número de copias y junto con un supuesto gen que regula de manera positiva la expresión de la enzima (Pérez et al., 1993).

Al tener un gen clonado en un vector multicopia, es posible producir un efecto de dosificación que puede verse reflejado en la sobreproducción de la enzima que codifique. En el presente caso, el plásmido pBG1 no se está replicando en alto número de copias, por tal motivo, no se observa la sobreproducción de la lipasa de *S. albus* G.

A partir del plásmido pBG1 cortado con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*, se obtuvo el fragmento de 7.8 Kb clonado inicialmente. Este fragmento se subclonó en el plásmido pJ488 cortado con las mismas enzimas, con lo cual se originó el plásmido pBG4. Aunque las colonias transformantes de pBG4 seleccionadas con tioestreptona mostraron halos lipolíticos, el tamaño de los mismos indicó que no se estaba dando un incremento en la producción y/o en la secreción de la lipasa extracelular.

El plásmido pBG4, a diferencia del pBG1, no tiene funciones de replicación híbridas; además, este replicón proviene del vector de clonación utilizado en el trabajo de Pérez *et al.* (1993), donde se logró sobreproducir la lipasa de *Streptomyces* sp. M11 en el mismo hospedero que se utilizó en el presente trabajo. Con tales evidencias, se puede suponer que el vector de clonación no es responsable de la posible disminución en el número de copias por cromosoma del pBG1. Como no se conoce la cantidad de pBG1 y pBG4 por cromosoma de *S. lividans* 1326, no es posible evaluar en cuál de ellos se está afectando más la eficiencia de replicación. Para poder afirmar que el fragmento clonado es responsable de la replicación anormal de los plásmidos recombinantes, se tendrían que realizar subclonaciones en otros vectores y cuantificar la cantidad de DNA plasmídico en cada caso.

Si se contempla la posibilidad de que el plásmido pBG4 esté replicándose normalmente dentro del hospedero, entonces se podría pensar que la lipasa tuviera dificultades para ser secretada, tanto por factores extrínsecos como intrínsecos a ella. Un factor extrínseco sería el funcionamiento incorrecto o deficiente de otros elementos, como son genes y proteínas, involucrados en la exportación de productos sintetizados (Silhavy *et al.*, 1983; von Heijne, 1988). El péptido señal de la enzima sería un factor intrínseco responsable de la menor actividad lipolítica extracelular detectada en las colonias transformadas con pBG1 y pBG4, respecto a las clonas que llevan el plásmido pB13.

Ya no se estudió más la producción de la enzima porque los plásmidos pBG2 y pBG3 tienen el problema de no funcionar en *Streptomyces*, debido al elevado contenido de G+C en su genoma. Por tal motivo, estos 2 plásmidos se utilizaron en *E. coli*. En esta bacteria, como en las demás Gram negativas, la mayoría o toda la cantidad de proteína extracelular sintetizada se queda en el espacio periplásmico (Hale *et al.*, 1992), en ellas el procesamiento de secreción (Silhavy *et al.*, 1983) no suele llevarse a cabo de manera exitosa. Lo más probable es que el gen *lip* ni siquiera se esté expresando en *E. coli*. Debido a estas razones fue imposible examinar la cantidad de enzima producida por las subclonas.

MAPEO DE RESTRICCIÓN Y SECUENCIACION DEL GEN *lip* DE *S. albus* G

Se obtuvo el mapa de restricción del inserto *Sal*I de 2.5 Kb y el del fragmento *Bgl*II de 7 Kb que contiene en su totalidad al primero -Fig. 3-. El plásmido pBG3 se utilizó en el método de clonación al azar de DNA sonicado, y con él se realizaron deleciones con enzimas de restricción y con la enzima *Exo*III.

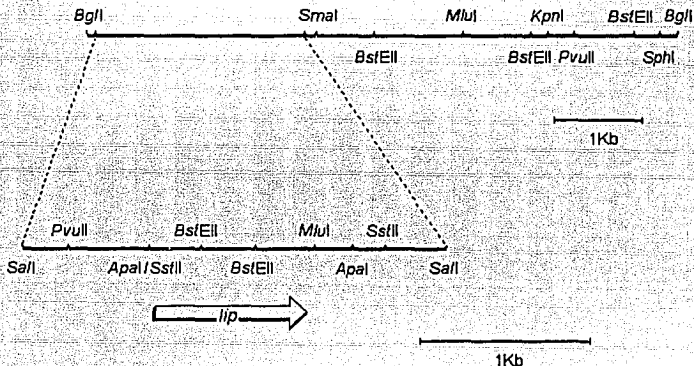


Fig. 3 Mapa de restricción del fragmento *Bgl*II de 7 Kb. No están señalados todos los sitios de reconocimiento de las endonucleasas de restricción utilizadas. Se muestra el fragmento *Sal*I de 2.5 Kb, del cual se obtuvo la secuencia de nucleótidos, y se indica la posición del gen *lip* de *S. albus* G dentro de este último fragmento de DNA.

Se obtuvo la secuencia nucleotídica del fragmento *Sal*I de 2.5 Kb -Fig. 4-, usando el programa ASSEMBLER para ensamblar cada porción leída. Las 3 técnicas para secuenciación empleadas dieron datos complementarios que sirvieron para obtener la secuencia completa. De rutina, cada molde de cadena sencilla se secuenció por lo menos dos veces, una con dGTP y la otra con ITP o con deaza-dGTP.

ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE DNA

Con el programa FRAME (Bibb *et al.*, 1984) se analizó el contenido de G+C de las posiciones de tripletes de nucleótidos, y se detectó la presencia de tres genes, evidentes por los marcos de lectura abiertos u ORFs que se observan en la figura 5. Los ORFs incompletos localizados a la izquierda y a la derecha se llamaron ORF2 y ORF3, respectivamente. El ORF intermedio está completo y consta de 912 pb con un alto contenido de G+C en la tercera posición de los codones -N3>-, dentro de la secuencia leída de izquierda a derecha. Con el análisis del programa FRAME y con los datos del programa COD_FICK -que detecta regiones codificadoras por el método de Fickett-, se determinó que este ORF comienza en el codón GTG localizado en la posición 780 y termina en el codón TGA de la posición 1691. Este ORF deducido corresponde al gen *lip* de *S. albus* G, el cual codifica para una proteína de 304 aminoácidos -Fig. 4-. Es posible que otros codones de inicio puedan utilizarse, ya que otros dos GTGs se encuentran en los nucleótidos 693 y 651. Cualquiera de ellos podría servir como un sitio de inicio de transcripción alternativo; sin embargo, como se destaca más adelante, este probablemente no es el caso.

El uso de codones -determinado con el programa CDUSAGE- para el gen *lip* fue similar al típico encontrado en otros genes de estreptomicetos descritos previamente (Bibb *et al.*, 1984). En la Tabla 1 se aprecian los contenidos de G+C para las posiciones de codones 1, 2 y 3 del gen *lip*. En este gen, como en los demás genes de *Streptomyces* que se han estudiado (Wright & Bibb, 1992), se observa un uso preferencial de los codones con C o G en la tercera posición, tal como se observa en la Tabla 2.

Un sitio potencial de unión a ribosomas, RBS -GAGAGGA-, se encontró 8 nucleótidos arriba del codón GTG de la posición 780. Este RBS es idéntico al del gen *lip* de *Streptomyces* sp. M11 (Pérez *et al.*, 1993). Sin embargo, no se encontró alguna región promotora parecida a las observadas en otros genes de *Streptomyces* (Hütter & Eckhardt, 1988).

De igual forma, ninguna región repetida inversa o repelida directa se detecta secuencia-arriba del gen *lip*, la cual pudiera ejercer una actividad terminadora de la transcripción del ORF2 que le está antecediendo. Tampoco se encontró alguna estructura semejante secuencia-abajo del gen *lip* que pudiera servir como un terminador de su propia transcripción.

La secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *lip* se dedujo con el programa TRANSL y se comparó con otras secuencias potenciales de proteínas de la base de datos CDPROT24. Solamente se encontró que esta enzima es significativamente homóloga a la lipasa extracelular 1 de *Moraxella* TA144. Al respecto se discute en la siguiente sección.

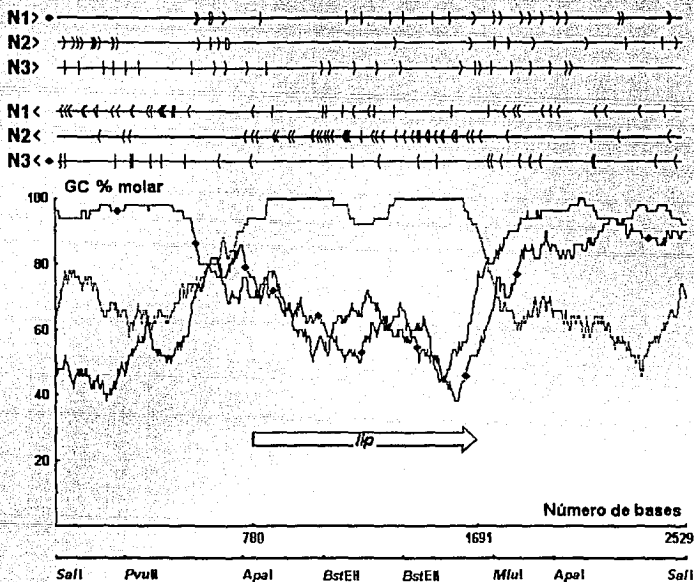


Fig. 5 Análisis de la secuencia de nucleótidos con el programa FRAME (Bibb *et al.*, 1984), que calcula el contenido de G+C de las posiciones de los nucleótidos en cada codón, y que detectó la presencia de un ORF completo correspondiente al gen *lip* de *S. albus* G, marcado con la flecha horizontal apuntando hacia la dirección en que se transcribe; y otros dos ORFs incompletos: ORF2 a la izquierda y ORF3 a la derecha del primero de ellos. En la parte inferior se incluyó el mapa de restricción del fragmento de DNA secuenciado con los sitios de reconocimiento de algunas endonucleasas de restricción. Hacia la parte superior se encuentran indicados todos los posibles codones de inicio -ATG y GTG- y los codones de paro encontrados en cada una de las 3 posiciones -N1, N2 y N3- en ambos sentidos, a lo largo de los dos hebras antiparalelas del DNA.

La lipasa extracelular de *S. albus* G posee una región hidrofóbica que enmarca al motivo consenso -G-X₁-S-X₂-G- alrededor del sitio activo de Serina (Feller et al., 1991b), el cual conforma el centro catalítico de una triacilglicerol lipasa (Brady et al., 1990). En la figura 4, dicha región está señalada con doble raya y con un marco. Este consenso se observa también en la secuencia de la lipasa extracelular de *Streptomyces* sp. M11 (Pérez et al., 1993).

Tabla 1. Porcentaje de G+C en las posiciones de codones de los marcos de lectura abierta "ORFs" localizados dentro del inserto *SaI* de 2.5 Kb secuenciado.

| ORF | Contenido de G+C (% molar) | | | Global |
|------------|----------------------------|------------|------------|--------|
| | Posición 1 | Posición 2 | Posición 3 | |
| teórico* | 63.75 | 46.54 | >90 | 73.0 |
| <i>lip</i> | 62.7 | 58.1 | 97.3 | 72.7 |
| 2 | 67.7 | 50.8 | 96.5 | 71.7 |
| 3 | 86.9 | 61.6 | 94.8 | 81.0 |

* Los valores teóricos fueron tomados de Bibb et al., 1984.

Se sometió la secuencia aminoacídica de la proteína codificada por el gen *lip* al análisis del programa SOAP que halló un segmento hidrofóbico transmembranal: LAASAAVAAVGLTTL, con el cual podría incluirse en la membrana celular de forma integral, con ayuda de las estructuras helicoidales inducidas por las abundantes Valinas y Leucinas. Además, los programas CUTPRO y PSIGNAL coincidieron en señalar el sitio más probable donde una peptidasa señal I podría realizar el corte (von Heijne, 1986; 1988) que liberaría una proteína extracelular madura y una secuencia señal de secreción. En la figura 4, una flecha que apunta hacia arriba señala el probable sitio de corte conforme a la "regla -3, -1" (von Heijne, 1986), de un péptido señal de 42 aminoácidos de longitud que cumple perfectamente con las características generales de otras secuencias señal conocidas (von Heijne, 1986; Hale et al., 1992).

Tabla 2. Uso de codones en el gen *lip* de *S. albus* G. Los codones de término de la transcripción se representan así: (—). Aa: Son los aminoácidos codificados.

| Codón | Aa | Uso | Codón | Aa | Uso | Codón | Aa | Uso | Codón | Aa | Uso |
|-------|-------|-----|-------|-------|-----|-------|-------|-----|-------|-------|-----|
| TTT | (Phe) | 0 | TCT | (Ser) | 0 | TAT | (Tyr) | 0 | TGT | (Cys) | 0 |
| TTC | (Phe) | 9 | TCC | (Ser) | 12 | TAC | (Tyr) | 10 | TGC | (Cys) | 2 |
| TTA | (Leu) | 0 | TCA | (Ser) | 1 | TAA | (—) | 0 | TGA | (—) | 1 |
| TTG | (Leu) | 0 | TCG | (Ser) | 7 | TAG | (—) | 0 | TGG | (Trp) | 4 |
| CTT | (Leu) | 0 | CCT | (Pro) | 0 | CAT | (His) | 0 | CGT | (Arg) | 2 |
| CTC | (Leu) | 11 | CCC | (Pro) | 10 | CAC | (His) | 4 | CGC | (Arg) | 12 |
| CTA | (Leu) | 0 | CCA | (Pro) | 1 | CAA | (Gln) | 0 | CGA | (Arg) | 1 |
| CTG | (Leu) | 15 | CCG | (Pro) | 14 | CAG | (Gln) | 7 | CGG | (Arg) | 4 |
| ATT | (Ile) | 0 | ACT | (Thr) | 0 | AAT | (Asn) | 0 | AGT | (Ser) | 0 |
| ATC | (Ile) | 9 | ACC | (Thr) | 28 | AAC | (Asn) | 6 | AGC | (Ser) | 7 |
| ATA | (Ile) | 0 | ACA | (Thr) | 1 | AAA | (Lys) | 0 | AGA | (Arg) | 0 |
| ATG | (MET) | 3 | ACG | (Thr) | 8 | AAG | (Lys) | 6 | AGG | (Arg) | 0 |
| GTT | (Val) | 0 | GCT | (Ala) | 0 | GAT | (Asp) | 0 | GGT | (Gly) | 1 |
| GTC | (Val) | 16 | GCC | (Ala) | 23 | GAC | (Asp) | 16 | GGC | (Gly) | 24 |
| GTA | (Val) | 0 | GCA | (Ala) | 0 | GAA | (Glu) | 0 | GGA | (Gly) | 1 |
| GTG | (Val) | 4 | GCG | (Ala) | 11 | GAG | (Glu) | 10 | GGG | (Gly) | 3 |
| GTG | (MET) | 1 | | | | | | | | | |

La secuencia de la proteína Lip de *S. albus* G se alineó con la secuencia de 310 aminoácidos de la lipasa de *Streptomyces* sp. M11, utilizando el programa PALIGN. Se encontró que entre ambas proteínas existe un 74.7% de residuos idénticos y un 6.9% de residuos similares -la identidad implica residuos de aminoácidos iguales y la similitud habla de los que son bioquímicamente parecidos- con todo y péptido señal. Ya sin la secuencia señal, la identidad entre las proteínas maduras aumenta a 82.1% y la similitud a 5.7%. Esto es, los péptidos señal de las proteínas extracelulares no tienen que ser necesariamente idénticos, sólo basta con que tengan una región N-terminal con carga positiva, una región central hidrofóbica y una región C-terminal más polar (von Heijne, 1986; 1988); tales condiciones se cumplen en las secuencias señal de las dos enzimas sin ser idénticas, según se muestra en la figura 6.

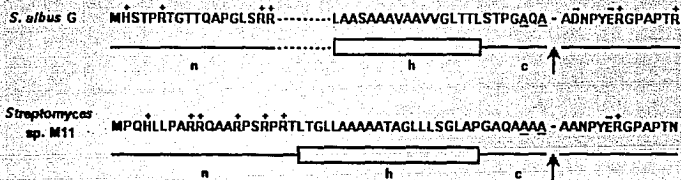


Fig. 6 Secuencias señal de las lipasas extracelulares de *S. albus* G y de *Streptomyces* sp. M11. En ambas se aprecian las tres regiones fisicoquímicas distinguibles y comunes en estas estructuras: n, la región amino-terminal con carga positiva; h, la región hidrofóbica central, y c, la región carboxi-terminal más polar (von Heijne, 1988; 1988). Las flechas apuntando hacia arriba señalan los sitios de corte para una peptidasa señal I que libera al péptido señal de la proteína madura, una vez que el transporte a través de la membrana se ha llevado a cabo. Los residuos subrayados ocupan las posiciones -1 y -3, a partir del sitio de corte, y son los residuos pequeños no cargados que se espera encontrar conforme a la "regla -3,-1" (von Heijne, 1988).

Los resultados del alineamiento entre las proteínas confirman que el sitio de inicio de la transcripción es, en efecto, el GTG de la posición 780 y no alguno de los otros dos que ni siquiera presentan un probable sitio de unión a ribosomas.

Como se recordará, la técnica de Southern ya había señalado una alta homología entre los genes de las lipasas de *Streptomyces*.

Cabe aclarar dos cosas: una es que al comparar la secuencia aminoacídica de la lipasa de *S. albus* G en la base de datos CDPROT24 únicamente se encontró una proteína homóloga -la lipasa 1 de *Moraxella* TA144-, puesto que la secuencia de la proteína Lip de *Streptomyces* sp. M11 todavía no se incluye en la base de datos citada; y la otra es que aún no se ha hecho taxonomía en la cepa *Streptomyces* sp. M11 y no se sabe con cuáles especies se pueda agrupar. Lo cierto es que, aún siendo del mismo género, no podría estar muy cercanamente emparentada con *S. albus* G, ya que esta cepa se aisló hace bastante tiempo y ahora pertenece a la colección del Instituto John Innes en Norwich, Reino Unido; mientras que *Streptomyces* sp. M11 se aisló hace aproximadamente 3 años del suelo en Cuernavaca, Morelos.

Como se mencionó anteriormente, dentro del fragmento *SalI* de 2.5 Kb se aprecian otros dos ORFs -Ver figura 5- que están incompletos. Ambos se transcriben en el mismo sentido que el gen *lip y*, por lo tanto del que se encuentra secuencia-arriba, ORF2, falta el inicio y del localizado secuencia-abajo, ORF3, falta el final. El primero de ellos está codificado en el marco dos -N2-, Fig. 5- y termina en el codón TGA de la posición 625, mostrando un contenido de G+C típico de los genes de estreptomicetos -Ver Tabla 1-. Según el análisis de la posible secuencia de aminoácidos del ORF2 -al menos de 208 residuos-, realizado con los programas SOAP, HELIXMEM y RAOARGOS, se trata de una proteína muy hidrofóbica con 5 supuestos dominios transmembranales, 4 de ellos involucrados en la formación de posibles α -hélices hidrofóbicas. Aunque en el inserto original, probablemente no se tiene entero al ORF2 que codifica para esta molécula hidrofóbica -Ver Figs 3 y 5-, la porción de proteína generada, sin duda estaría integrada a la membrana celular y, de ser funcional, podría estar colaborando en la exportación de la lipasa extracelular de *S. albus* G, tal como supuestamente ocurre con la proteína LIMA, moduladora del gen de lipasa de *Pseudomonas cepacia* (Jorgensen et al., 1991). Ahora bien, si el ORF2 se clonó completo, entonces sería mayor la probabilidad de que la proteína hidrofóbica para la cual codifica tuviera que ver con la secreción de la lipasa.

No se observó una cuenta significativa al comparar la secuencia aminoacídica del ORF2 en la base de datos CDPROT24.

En lo que concierne al ORF3, su comienzo podría involucrar al codón ATG en la posición 1771 y/o al codón GTG en el sitio 1801 en el marco 1 -N1-, Fig. 5-. Para el supuesto sitio de inicio de la transcripción ATG no se observa un típico sitio de unión a ribosomas, mientras que para el otro, GTG, una secuencia GAGGAA se localiza lamentablemente muy lejos -a 21 pb-. No es posible saber cuál de los dos es funcional, pero se optó por considerar al primero que codifica para Melionina. Se evaluó entonces su contenido de G+C y resultó ser más alto que el promedio teórico -Véase Tabla 1-. Se dedujo la secuencia de aminoácidos codificada por el ORF3 y tampoco se encontraron otras proteínas homólogas dentro de la base de datos CDPROT24; a pesar de esto, al someterla a análisis se encontró que se trata de la porción de una proteína periférica -sin duda, presente en su totalidad dentro del inserto original clonado- significativamente parecida a la que codifica el gen localizado secuencia-abajo del gen *lip* de *Streptomyces* sp. M11. En el alineamiento de las dos proteínas se obtuvo que 30.6% de sus residuos de aminoácido son idénticos y que 8.2% de éstos son similares. Esta proteína homóloga a la del ORF3 parece regular la alta expresión del gen *lip* de *Streptomyces* sp. M11, ya que la subclonación del gen estructural solo, resulta en la disminución de la actividad lipolítica de esta cepa (Pérez et al., 1993).

La disposición semejante de ambos ORFs respecto a los genes estructurales de lipasa pertenecientes a las dos especies de estreptomicetos, junto con la homología significativa de las proteínas que codifican, podrían sugerir una función reguladora similar. Sin embargo, se observan diferencias en las regiones que separan los genes estructurales y los ORFs secuencia-abajo: En *S. albus* G, la región intercistronica tiene 78 nucleótidos que no parecen estar involucrados en la formación de estructuras terminadoras de la transcripción, mientras que en *Streptomyces* sp. M11 esta región es mayor, con 401 nucleótidos, y debido a una secuencia repetida inversa de 18 pb, se puede formar una estructura tipo "tallo-asa" que probablemente pone fin a la transcripción del gen de lipasa. Si ambas lipasas extracelulares fueron clonadas con sus respectivos genes reguladores, entonces las diferencias existentes en las regiones intercistronicas, posiblemente produzcan cambios en la regulación de la expresión enzimática causantes de la actividad lipolítica desigual observada en *S. albus* G y en *Streptomyces* sp. M11.

Otras diferencias entre estas lipasas de estreptomicetos son, por parte de *Streptomyces* sp. M11, la presencia de un promotor parecido a otros promotores vegetativos del género, y la presencia de posibles estructuras terminadoras de la transcripción en las regiones intercistronicas que flanquean al gen de la lipasa -una de ellas descrita con anterioridad-, con lo cual se piensa que muy probablemente su expresión sea monocistronica, es decir, que se sintetice un mRNA exclusivo del gen estructural. Por lo que respecta a *S. albus* G, no se detecta promotor ni estructuras con función terminadora de la transcripción. Este hecho supondría una transcripción de tipo policistronica, esto es, que a partir de la misma molécula de mRNA sintetizada se traduzcan múltiples proteínas.

COMPARACION DE LIPASAS BACTERIANAS

En la tesis de maestría realizada por Cristina Pérez en este año, se presenta un alineamiento hecho entre la secuencia de 310 aminoácidos codificada por el gen *lip* de *Streptomyces* sp. M11 y la correspondiente secuencia de 319 aminoácidos del gen de la lipasa extracelular 1 de *Moraxella* TA144 (Feller *et al.*, 1990b). Esta última es una bacteria Gram negativa psicrófila halotolerante aislada en aguas del Océano Antártico (Feller *et al.*, 1990a). A estas lipasas se les reporta una identidad del 33.5% y una similitud del 18.1%, lo cual indica que están relacionadas.

La proteína presente en la base de datos CDPROT24 que resultó homóloga a la lipasa de *S. albus* G fue, precisamente, la alineada con la enzima de *Streptomyces* sp. M11. Así pues, por medio del programa CLUSTAL se realizó el alineamiento de las 3 lipasas -Fig. 7- y se obtuvo que las proteínas son 28 8% idénticas y 40.2% similares con todo y secuencia señal de secreción.

| Origen de la lipasa | Secuencia de residuos de aminoácidos | No. |
|------------------------|---|-----|
| M11 | M-----PQHLLPARQCAARPSRPRTLTGLLAAAAATAGLLL-SGLAFGA | 43 |
| <i>S. albus</i> G | M-----HSTRPTGTQAPGLSRRLAASAAVAAVVGLIT-LS-TPGA | 40 |
| <i>Moraxella</i> TA144 | MFIMIKKSELAKAIIVTGAIVFSIPIPLAEVLTSETTVSSIKSEATVSSIK * * | 50 |
| M11 | QAAAAANVYERGPAPDNASTEASR--GFIYATSQTSVSSLVASGFGGGTI | 91 |
| <i>S. albus</i> G | QAAD---NPIYERGPAPTRASAEAPR--GFIYAVSQTSVSSLVVSFGGGTI | 85 |
| <i>Moraxella</i> TA144 | KALPATP9DCIADSKITAVALSDFTRNGPFSIRTKRISRQSAKGFGGGTI * * * * | 100 |
| M11 | YYPTSTAD-GTFGAVVISPGFTAYQSSILAWLQPRLASQGFVVFTIDNIT | 140 |
| <i>S. albus</i> G | YYPTSTGD-GTFGAVVITPGFTATESSMAWLGPRLASQGFVVFTIDTILT | 134 |
| <i>Moraxella</i> TA144 | HYPTNAGCGLLGALAVVPGYVSYENSIMWNGPRLASQGFVVITINDNSI * * * * * * | 150 |
| M11 | IDQPDFSRGRQLLSALDYLTQRSSVTRVVDATRLNGVMGHSMGGGGSLAAK | 190 |
| <i>S. albus</i> G | IDQPDFSRGRQMLAALDYLTQRSARTRIDGTRNLGVIGHSMGGGGTLEAK | 184 |
| <i>Moraxella</i> TA144 | YDDPDFSRAAQINAAALDRMCADDTVGSKIDPKRLGAIQWSMGGGGALKLAT * * * * * * | 200 |
| M11 | SRTSLKAAIPLTGRNIDATWPELRTPTLVVVGADGDTVAFVATHSKPEYES | 240 |
| <i>S. albus</i> G | SRPSLKAALPLTFRNLDKTFEVTPTLVVVGADGDTVAFVATHKPEYSS | 234 |
| <i>Moraxella</i> TA144 | KRSTVRAIMPLAFYH-DKSYGEVKTPTLVVVGADGDDRLAETQCYANAEYK * * * * * * | 249 |
| M11 | LPGLDKAYLELRGASHFTFN--TSDDTLAKYSISWLKRFIDSDTRYEQF | 288 |
| <i>S. albus</i> G | LPSSIDRAYLELNATHAFYFN--LSNTTLAKYCVSWLKRFIDSDTRYEQF | 282 |
| <i>Moraxella</i> TA144 | AIGPKMK--VEVNNGSHFCFYSYRENEILLSKPGIARMQRYIINDTRFDKF * * * * * * | 297 |
| M11 | LCPIP----RPSLTIAYRGTCPHTS | 310 |
| <i>S. albus</i> G | LCPLP----VPRDIESTRGTCPLGG | 304 |
| <i>Moraxella</i> TA144 | ICANENYSKSPRISAYDYKD-CF--- * * * | 319 |

| | |
|------------------------------------|-------------|
| LONGITUD DE LA REGION CONSENSO: | 326 |
| RESIDUOS DE AMINOACIDOS IDENTICOS: | 94 (28.8%) |
| RESIDUOS DE AMINOACIDOS SIMILARES: | 131 (40.2%) |

Fig. 7 Alineamiento de las secuencias de residuos de aminoácidos de las lipasas extracelulares de *Streptomyces* sp. M11, *S. albus* G y de la lipasa 1 de *Moraxella* TA144. Los asteriscos (*) y los puntos (.) señalan la posición que está perfectamente conservada y la que está bien conservada en el alineamiento, respectivamente.

Feller *et al.* (1991b) dicen que lo que distingue a las lipasas de las serfn-proteasas, a nivel del sitio activo, es una región altamente hidrofóbica que rodea al residuo de Serina. Esta propiedad facilitaría la adsorción de la enzima y la interacción del sitio activo con el sustrato. Puede apreciarse que las tres lipasas son muy homólogas en esta zona hidrofóbica, ya que tienen muchas Glicinas. La Glicina es un aminoácido pequeño que podría ayudar en la formación de estructuras de giro β dentro de la cadena peptídica. Pues bien, se piensa que esta peculiaridad genera un sitio activo muy flexible que hace a las lipasas psicrotólicas muy sensibles al calor; pero es probable que esto sea un pre-requisito para la alta eficiencia catalítica a bajas temperaturas (Feller *et al.*, 1991c).

En base a los datos del alineamiento de las lipasas extracelulares, se elaboró un dendrograma que muestra gráficamente la relación de estas enzimas bacterianas -Fig. 8-.

De acuerdo a Pérez (1993), la lipasa extracelular de *S. albus* G, la de *Streptomyces* sp. M11 y la lipasa 1 de *Moraxella* TA144, formarían parte de uno de los dos posibles grupos o familias de lipasas en procariontes. El otro grupo estaría constituido por una gran mayoría de las lipasas encontradas en bacterias del género *Pseudomonas*.

Indudablemente, la obtención de nuevas secuencias de lipasas procarióticas, podría apoyar más ampliamente la idea de estas familias de enzimas.

Por otro lado, aún considerando que las lipasas son producidas por muchos seres vivos, los parecidos de las enzimas no dejan de ser interesantes, dadas las diferencias de hábitat y de fisiología entre los géneros bacterianos: *Streptomyces* y *Moraxella*.

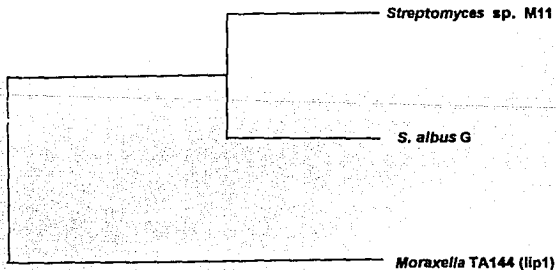


Fig. 8 Dendrograma obtenido del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las lipasas extracelulares de *Streptomyces* sp. M11, *S. albus* G y de la lipasa 1 de *Moraxella* TA144

Respecto a la relación estructura-función de las lipasas, puede decirse que, de acuerdo a las observaciones de Feller *et al.* (1990a; 1990b), la posibilidad de que haya lipólisis a baja temperatura podría estar ligada un tanto a la conformación tridimensional que una fuerte asociación con lipopolisacáridos daría a una proteína "adaptada" al frío.

En otras palabras, las lipasas encontradas en *Moraxella* TA144 que actúan a bajas temperaturas, dependen del frío para ser secretadas, forman complejos de alto peso molecular con lipopolisacáridos; con lo cual obtienen mayor flexibilidad en su conformación, requiriendo así menor energía de activación y, por supuesto, disminuyendo su estabilidad térmica (Feller *et al.*, 1990a; 1991a).

Con el propósito de evaluar la composición de aminoácidos en las tres lipasas extracelulares consideradas, se utilizó el programa AACOMP y se obtuvieron los resultados que muestra la siguiente Tabla:

Tabla 3. Composición aminoacídica de las lipasas extracelulares de *Streptomyces* sp. M11, *S. albus* G y de la lipasa 1 de *Moraxella* TA144. Se muestran los valores absolutos y porcentuales de los 20 aminoácidos que componen cada una de las lipasas.

| Amino-ácido | Origen de la lipasa | | | Amino-ácido | Origen de la lipasa | | |
|-------------|---------------------|-------------------|------------------------|-------------|---------------------|-------------------|------------------------|
| | M11 | <i>S. albus</i> G | <i>Moraxella</i> TA144 | | M11 | <i>S. albus</i> G | <i>Moraxella</i> TA144 |
| Ala | 40 | 34 | 33 | Leu | 30 | 26 | 19 |
| % | 12.9 | 11.2 | 10.3 | % | 9.7 | 8.6 | 6.0 |
| Arg | 21 | 19 | 14 | Lys | 7 | 6 | 23 |
| % | 6.8 | 6.3 | 4.4 | % | 2.3 | 2.0 | 7.2 |
| Asn | 5 | 6 | 16 | Met | 3 | 4 | 8 |
| % | 1.6 | 2.0 | 5.0 | % | 1.0 | 1.3 | 2.5 |
| Asp | 13 | 16 | 18 | Phe | 9 | 9 | 10 |
| % | 4.2 | 5.3 | 5.6 | % | 2.9 | 3.0 | 3.1 |
| Cys | 2 | 2 | 6 | Pro | 24 | 25 | 17 |
| % | 0.6 | 0.7 | 1.9 | % | 7.7 | 8.2 | 5.3 |
| Gln | 10 | 7 | 3 | Ser | 32 | 27 | 30 |
| % | 3.2 | 2.3 | 0.9 | % | 10.3 | 8.9 | 9.4 |
| Glu | 8 | 10 | 12 | Thr | 34 | 37 | 22 |
| % | 2.6 | 3.3 | 3.8 | % | 11.0 | 12.2 | 6.9 |
| Gly | 28 | 29 | 23 | Trp | 4 | 4 | 5 |
| % | 9.0 | 9.6 | 7.2 | % | 1.3 | 1.3 | 1.6 |
| His | 5 | 4 | 3 | Tyr | 11 | 10 | 13 |
| % | 1.6 | 1.3 | 0.9 | % | 3.5 | 3.3 | 4.1 |
| Ile | 11 | 9 | 27 | Val | 13 | 20 | 17 |
| % | 3.6 | 3.0 | 8.5 | % | 4.2 | 6.6 | 5.3 |

Puede observarse que la composición aminoacídica de las lipasas de *S. albus* G y de *Streptomyces* sp. M11 es muy semejante, y que en la lipasa 1 de *Moraxella* TA144 la cantidad de residuos de Asparagina, de Cisteína, de Isoleucina, de Metionina y de Lisina sobrepasa más de dos veces a la que se encontró en cualquiera de las dos lipasas de *Streptomyces*. Lo contrario sucede con los residuos de Glutamina. Las demás cantidades de residuos más o menos son semejantes en las tres enzimas.

Probablemente, la distribución y las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos más abundantes a lo largo de la secuencia de la lipasa 1 de *Moraxella* TA144 confieren a la enzima las características requeridas para adquirir la conformación adecuada al momento de interactuar con los lipopolisacáridos y durante su actividad en el frío.

Al presentar los datos de la composición aminoacídica de las tres lipasas sin procesar, de acuerdo a las características fisicoquímicas de los grupos R de sus aminoácidos -Tabla 4-, se observa que no se tienen diferencias muy significativas, y se puede afirmar que se trata de enzimas hidrofóbicas con carga neta positiva.

Tabla 4. Porcentaje global de los residuos de aminoácido de las lipasas extracelulares de *Streptomyces* sp. M11, *S. albus* G y de la lipasa 1 de *Moraxella* TA144, según las características fisicoquímicas de los grupos R de estas moléculas.

| Característica del grupo R de los aminoácidos | Composición aminoacídica de las lipasas (%) | | |
|--|---|-------------------|------------------------|
| | <i>Streptomyces</i> sp. M11 | <i>S. albus</i> G | <i>Moraxella</i> TA144 |
| No polar (hidrofóbico) | 43.2 | 43.2 | 42.6 |
| Polar sin carga | 39.2 | 38.9 | 35.4 |
| Con carga negativa | 6.8 | 8.6 | 9.4 |
| Con carga positiva | 10.7 | 9.6 | 12.5 |

El estudio de los parámetros estructurales y catalíticos de las enzimas psicrotróficas aún está incompleto y las bases moleculares de la adaptación enzimática al frío son hipotéticas (Feller *et al.*, 1991b). A partir de los resultados de este análisis sería difícil pensar que la actividad lipolítica de la enzima de *Moraxella* TA144 a temperaturas debajo de los 0°C pudiera depender solamente, o bien, de manera decisiva, de las características fisicoquímicas globales inherentes a su composición aminoacídica.

La estructura primaria no ayuda mucho para determinar la conformación tridimensional de las proteínas, sólo en el caso de presentarse homologías de secuencia entre una nueva proteína y otra cuya estructura terciaria ya se conoce por estudios de cristalografía. Esto es, el "problema de la estructuración de la proteína" -protein folding problem-, se tiene latente en este caso. Y, debido a que hay mucho que no se comprende respecto a las interacciones entre lípidos y proteínas, no es posible explicar la actividad catalítica de una enzima a partir de su sola secuencia aminoacídica, se estaría cayendo en lo que Sarkar llama reduccionismo físico.

La determinación de la estructura tridimensional de las lipasas de *Streptomyces*, mediante el análisis por rayos X, ayudaría a adquirir una visión más precisa acerca de la conformación y de la manera en que funcionan estas enzimas.

CONCLUSIONES

- 1.- El gen *lip* de *Streptomyces albus* G se clonó exitosamente en un vector de clonación con origen de replicación híbrido, siendo expresado por *Streptomyces lividans* 1328.
- 2.- La naturaleza híbrida del replicón utilizado como vector de clonación parece no ser responsable de la disminución en el número de copias de plásmido recombinante por cromosoma, ya que la clonación del gen de lipasa en un plásmido sin arreglos moleculares no muestra diferencias muy apreciables en la actividad lipolítica.
- 3.- El sitio de unión a ribosomas GAGAGGA, correspondiente al gen *lip* de *S. albus* G es idéntico al que funciona durante la expresión del gen de lipasa de *Streptomyces* sp. M11.
- 4.- En la secuencia de la proteína Lip de *S. albus* G se detecta un péptido señal de 42 aminoácidos y un motivo G-X₁-S-X₂-G enmarcado por una región muy hidrofóbica, lo cual identifica al típico sitio activo de las triacilglicerol lipasas.
- 5.- Tanto la secuencia señal de secreción como su sitio de procesamiento encajan perfectamente en las características consenso observadas para otras secuencias de este tipo en procariontes.
- 6.- Las lipasas procesadas de *S. albus* G y de *Streptomyces* sp. M11 tienen el mismo tamaño de 262 aminoácidos y son significativamente homólogas.
- 7.- El gen de lipasa de *S. albus* G probablemente es policistrónico. La transcripción de este gen sería diferente a la que se propone para el gen *lip* de *Streptomyces* sp. M11, dada su disposición cercana respecto a otros dos genes que lo flanquean, y debido a la carencia tanto de un promotor evidente, como de posibles estructuras terminadoras de la transcripción dentro de las regiones intercistricas.
- 8.- Los dos genes que acompañan al gen de la lipasa de *S. albus* G podrían estar involucrados, uno en la producción, y el otro en la secreción de la enzima; ya que las características de las proteínas que codifican son semejantes a las observadas en proteínas que posiblemente están regulando estos procesos en otras bacterias.

9.- La diferencia en la actividad lipolítica originalmente detectada sugiere una regulación distinta en la expresión y la secreción de la lipasa de *S. albus* G, respecto a la que se presenta en la lipasa de *Streptomyces* sp. M11.

10.- Debido al parecido significativo entre las respectivas lipasas de *S. albus* G, de *Streptomyces* sp. M11 y de *Moraxella* TA144, se fundamenta aún más la posible existencia de al menos dos grupos de lipasas en procariontes.

11.- Las características fisicoquímicas globales de las secuencias aminoacídicas de las tres lipasas extracelulares consideradas, les confieren la propiedad común de ser hidrofóbicas y tener una carga positiva neta.

PERSPECTIVAS

Es necesario conocer el sitio de inicio de la transcripción del gen *lip* de *S. albus* G para poder decir algo más seguro sobre la manera en que se expresa. Para lograrlo se podría hacer un experimento con la nucleasa S1 que permitiría detectar el nucleótido exacto en que se empieza a transcribir el gen.

Sería conveniente secuenciar el extremo N-terminal de la lipasa procesada para verificar si es correcto el sitio de corte indicado para el péptido señal.

Para estudiar la regulación *in vivo* del gen *lip* de *S. albus* G, se le tendría que clonar solo en un plásmido cerca de algún promotor fuerte -como es el de la agarasa extracelular de *S. coelicolor* A3(2) (Kendall & Cullum, 1984)-, y comparar las actividades lipolíticas conferidas por este nuevo replicón con las que son propiciadas por el plásmido pBG1. También se podrían provocar deleciones o mutaciones en los ORFs 2 y 3 para conocer su función en la expresión de la lipasa.

Es preciso tener un mayor número de secuencias de lipasas de *Streptomyces* para apoyar la idea de las dos familias de estas enzimas en procariontes.

Se requieren hacer estudios profundos acerca de la regulación en la expresión de lipasas extracelulares de *Streptomyces*, tanto para establecer posibles modelos de regulación genética, como para llegar a conocer la manera más fácil y rápida de sobreproducirlas, ya que en la actualidad un gran mercado espera estos nuevos descubrimientos.

APENDICE

I. ABREVIATURAS

EDTA-Na: Acido Etilen-diamin-tetra-acético alcalinizado con NaOH

IPTG: Isopropiltio- β -D-galactósido

K-MES: Acido 2-[N-Morfolino] etanosulfónico alcalinizado con KOH

PEG-1000, -8000: Polietilén Glicol con Peso Molecular aproximado de 1000 y de 8000

SDS: Dodecil-Sulfato de Sodio, "Lauril-Sulfato"

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletil-enediamina

Tris-Cl: Trizma Base acidificado con HCl

X-Gal: 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

II. SOLUCIONES AMORTIGUADORAS

Buffer P

(Okanishi *et al.*, 1974; Hopwood & Wright, 1978)

Para 800 ml:

| | |
|--|---------|
| - Sacarosa | 103.0 g |
| - MgCl ₂ ·6H ₂ O | 2.02 g |
| - K ₂ SO ₄ | 0.25 g |

Aforar con agua desionizada y esterilizar en autoclave.

A cada alícuota de 40 ml, justo antes de usar se le adiciona:

| | |
|---|-------------|
| - Trazas de elementos | 100 μ l |
| - KH ₂ PO ₄ al 0.5% | 0.5 ml |
| - CaCl ₂ ·2H ₂ O al 3.68% | 5.0 ml |
| - Tris-Cl al 3% pH 7.2 | 5.0 ml |

Nota: Todo el material de cristalería que se utilice en la elaboración de este buffer debe estar perfectamente enjuagado.

Buffer S1 10x

(Maniatis *et al.*, 1982)

| | |
|--------------------------------------|--------------|
| - NaCl 5M | 5.0 ml |
| - Acetato de Potasio 3M pH 4.5 | 1.1 ml |
| - Glicerol | 5.0 ml |
| - ZnSO ₄ 1M | 20.0 μ l |

Buffer SSC 20x
(Hopwood *et al.*, 1985)

Para 100 ml:
- NaCl 17.53 g [3M]
- Citrato trisódico 8.82 g [0.3M]
Aforar con agua desionizada y hacer las diluciones requeridas.

Buffer TBE 5x
(Hopwood *et al.*, 1985)

Para 1000 ml:
- Trizma Base 54.0 g
- Acido Bórico 27.5 g
- EDTA-Na 0.5M pH 8 20 ml
Aforar con agua desionizada y hacer las diluciones requeridas.

Buffer TE
(Hopwood *et al.*, 1985)

Para 100 ml:
- Tris-Cl 1M pH 8 1.0 ml
- EDTA-Na 0.5M pH 8 0.2 ml
Aforar con agua desionizada y esterilizar en autoclave.

Buffer TE 25mM
(Hopwood *et al.*, 1985)

Para 100 ml:
- Tris-Cl 1M pH 8 2.5 ml
- EDTA-Na 0.5M pH 8 5.0 ml
Aforar con agua desionizada y esterilizar en autoclave.

Buffer TEN
(Hopwood *et al.*, 1985)

- Tris-Cl pH 8 10mM
- EDTA-Na 1mM
- NaCl 1M

Buffer TFB
(Hanahan, 1986)

Para 100 ml:
- KCl (ultrapuro) 0.74 g [100mM]
- MnCl₄H₂O 0.89 g [45mM]
- CaCl₂·2H₂O 0.15 g [10 mM]
- HAcCoCl₃ 0.08 g [3mM]
- K-MES 0.5M pH 6.3 2 ml [10mM]
Ajustar a pH 6.20 ± 0.10, filtrar por membrana de 0.22 μ y guardar a 4°C

Buffer TNE
(Hopwood *et al.*, 1985)

Para 100 ml:

| | |
|----------------------------|--------|
| - Tris-Cl 2M pH 8 | 0.5 ml |
| - NaCl 5M | 2.0 ml |
| - EDTA-Na 0.25M pH 8 | 0.4 ml |

Aforar con agua desionizada y esterilizar en autoclave.

III. MEDIOS DE CULTIVO

Agar suave para protoplastos
(Baltz & Matsushima, 1981)

Para 100 ml:

| | |
|---|---------|
| - Sacarosa | 10.3 g |
| - MgCl ₂ ·6H ₂ O | 1.012 g |
| - Tris-Cl al 3% pH 7.2 | 10 ml |
| - CaCl ₂ ·2H ₂ O 5M | 0.4 ml |
| - Bacto-agar (Difco) | 0.65 g |

Aforar con agua desionizada y esterilizar en autoclave.

Medio LB (Luria Broth)
(Maniatis *et al.*, 1982)

Para 100 ml:

| | |
|--------------------------------------|-------|
| - Bacto-Triptona (Difco) | 1.0 g |
| - Extracto de levadura (Difco) | 0.5 g |
| - NaCl | 0.5 g |

Para el medio LB sólido, adicionar:

| | |
|----------------------------|-------|
| - Bacto-agar (Difco) | 1.5 g |
|----------------------------|-------|

Aforar con agua desionizada, ajustar a pH 7.0 y esterilizar en autoclave.

Para el medio LB sólido, vaciar en cajas de Petri y secarlas en Campana de flujo laminar durante 30 min.

Nota: El medio LB blando es semejante, pero lleva solamente 0.75 g de Bacto-agar (Difco).

Medio mínimo con Rodamina B 0.1%
(Pérez *et al.* 1993)

Para 100 ml:

| | |
|--|--------|
| - MgSO ₄ ·7H ₂ O al 6% | 1.0 ml |
| - (NH ₄) ₂ SO ₄ al 20% | 1.0 ml |
| - Elementos menores | 0.1 ml |
| - Bacto-agar (Difco) | 1.5 g |
| - Agua desionizada | 100 ml |

Fundir sin que se pierda mucho volumen, y después agregar:
 - Aceite de olivo 1.0 ml
 Homogenizar hasta hacer una emulsión de color blanco.

De inmediato, esterilizar en autoclave. Luego, agregar las siguientes sustancias esterilizadas:

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 1M pH 7.2 1.0 ml
 - Rodamina B 1 mg/ml 100 μl
 - Casaminoácidos al 20% 1.0 ml
 - Tioestrep-tona 50 mg/ml 100 μl

Vaciar en cajas de Petri y secarlas 15 min en Campana de flujo laminar.

Medio R2YE seco
 (Thompson *et al.*, 1980)

Para 800 ml:

- Sacarosa 103.0 g
 - K_2SO_4 0.25 g
 - $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10.12 g
 - Glucosa 10.0 g
 - Casaminoácidos 0.1 g

Aforar con agua desionizada.

Para cada alícuota de 80 ml, agregar:

- Bacto-agar (Difco) 2.2 g

Esterilizar en autoclave.

Después de esterilizar, añadir las siguientes sustancias esterilizadas:

- KH_2PO_4 al 0.5% 1.0 ml
 - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 3.68% 8.0 ml
 - L-Prolina al 20% 1.5 ml
 - Tris-Cl al 3% pH 7.2 10.0 ml
 - Trazas de elementos 0.2 ml
 - CuSO_4 2mM 0.2 ml
 - NaOH 1N 0.2 ml
 - Extracto de levadura al 10% (Difco) 5.0 ml

Vaciar en cajas de Petri y secar en Campana de flujo laminar de 3 a 4 h.

Medio R5
 (Modificado de Hopwood *et al.*, 1985)

Para 1000 ml:

- K_2SO_4 0.25 g
 - $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10.12 g
 - Glucosa 10.0 g
 - Casaminoácidos 0.1 g
 - Trazas de elementos 2 ml
 - Extracto de levadura (Difco) 5 g
 - Trizma Base 3 g

Aforar con agua desionizada y ajustar a pH 7.2

Para cada alícuota de 100 ml, agregar:
- Bacto-agar (Difco) 1.5 g

Antes de usarlo añadir las siguientes sustancias esterilizadas:
- KH_2PO_4 al 0.5% 1.0 ml
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5M 0.4 ml
- L-Prolina al 20% 1.5 ml
- NaOH 1N 0.2 ml
- CuSO_4 0.2 ml

Llenar cajas de Petri con el medio y dejar secando 15 min en Campana de flujo laminar.

Medio TSB (Tryptone Soy Broth) (Hopwood *et al.*, 1985)

Para 100 ml:
- Extracto tréptico de soja en polvo (Oxoid) 3 g

Medio YEME (Yeast Extract-Malt Extract Medium) (Hopwood *et al.*, 1985)

Para 100 ml:
- Extracto de levadura (Difco) 0.3 g
- Bacto-peptona (Difco) 0.5 g
- Extracto de Malta (Difco) 0.3 g
- Glucosa 1.0 g
- Sacarosa 34.0 g

Aforar con agua desionizada, ajustar a pH 7.4 y esterilizar en autoclave.

Cuando se quiera obtener protoplastos, adicionar:
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1M 5 ml/l
- Glicina al 20% 25 ml/l

Medio YT2x (Maniatis *et al.*, 1982)

Para 100 ml:
- Bacto-triptona (Difco) 1.6 g
- Extracto de levadura (Difco) 1.0 g
- NaCl 0.5 g

IV. OTROS REACTIVOS

DnD (Hanahan, 1988)

Para 1.5 ml:

| | | |
|---------------------------------|------------|----------|
| - DTT (Ditiotreitol)..... | 0.23 g | [1M] |
| - DMSO (Dimetilsulfóxido) | 1.35 ml | [9% v/v] |
| - K-MES pH 6.3 | 30 μ l | [10mM] |

Elementos menores

| | |
|--|------|
| - ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0.1% |
| - FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0.1% |
| - MnCl ₂ ·4H ₂ O | 0.1% |
| - CaCl ₂ (anhídrico) | 0.1% |

"Mezcla S1-stop"

| | |
|----------------------|------|
| - Trizma Base | 0.3M |
| - EDTA-Na pH 8 | 50mM |

Trazas de elementos

Para 100 ml:

| | |
|--|-------|
| - ZnCl ₂ | 4 mg |
| - FeCl ₃ ·6H ₂ O | 20 mg |
| - CuCl ₂ ·2H ₂ O | 1 mg |
| - MnCl ₂ ·4H ₂ O | 1 mg |
| - Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O | 1 mg |
| - (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O | 1 mg |

BIBLIOGRAFIA

- Altenbuchner, J. y J. Cullum. 1985. Structure of a amplifiable DNA sequence in *Streptomyces lividans* 68. *Mol. Gen. Genet.* **201**, 192-197.
- Arima, K., W.-H. Liu, y T. Beppu. 1972. Isolation and identification of the lipolytic and thermophilic fungus. *Agric. Biol. Chem.* **36**, 1913-1917.
- Baltz, R.H. y P. Matsushima. 1981. Protoplast fusion in *Streptomyces*: Conditions for efficient genetic recombinations and cell regeneration. *J. Gen. Microbiol.* **127**, 137-146.
- Baumberg, S., H. Krüger y D. Noack. 1991. Preface, p. VII-VIII. En: Baumberg, S., H. Krüger y D. Noack (ed.), *Genetics and product formation in Streptomyces*. Plenum Press, N.Y.
- Bibb, M. J., J. M. Ward y D. A. Hopwood. 1978. Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. *Nature* **274**, 398-400.
- Bibb, M.J., P.R. Findlay y M.W. Johnson. 1984. The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. *Gene* **30**, 157-166.
- Björkling, F., S.E. Godtfredsen y O. Kirk. 1991. The future impact of industrial lipases. *Trends Biotechnol.* **9**, 360-363
- Brady, L., A.M. Brzozowski, Z.S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J.P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Huge-Jensen, L. Norskov, L. Thim y U. Menge. 1990. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **343**, 767-770.
- Braña, A.F., C. Méndez, L.A. Díaz, M.-B. Manzanal y C. Hardisson. 1986. Glycogen and trehalose accumulation during colony development in *Streptomyces antibioticus*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 1319-1326.
- Braña, A.F., M.-B. Manzanal y C. Hardisson. 1982. Mode of cell wall growth of *Streptomyces antibioticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **13**, 231-235.
- Buchanan, R.E. 1917. Studies on the nomenclature and classification of the bacteria. II. The primary subdivisions of the *Schizomycetes*. *J. Bacteriol.* **2**, 155-164.

- Burdette, R.A. y D.M. Quinn. 1986. Interfacial reaction dynamics and acyl-enzyme mechanism for lipoprotein lipase-catalyzed hydrolysis of lipid *p*-nitrophenyl esters. *J. Biol. Chem.* **261**, 12016-12021.
- Chambers, A. e I.S. Hunter. 1984. Construction and use of a bifunctional streptomycete cosmid. *Trans. Biochem. Soc.* **12**, 644-645.
- Chapus, C., M. Rovey, L. Sarda y R. Verger. 1988. Minireview on pancreatic lipase and colipase. *Biochimie* **70**, 1223-1234.
- Chater, K. F. 1984. Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*, p. 89-115. En: R. Losick y L. Shapiro (ed.), *Microbial Development*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Chater, K.F. 1989. Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. *TIG* **11** (5), 372-377.
- Chater, K.F. y A.T. Carter. 1979. A new wide host-range temperate bacteriophage, R4, of *Streptomyces* and its interaction with some restriction-modifications systems. *J. Gen. Microbiol.* **115**, 431-442.
- Chater, K.F., C.J. Bruton, N.K. Davis, K.A. Plaskitt, J. Soliveri y H. Tan. 1991. Gene expression during sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2), p. 3-9. En: Baumberg, S., H. Krügel y D. Noack (ed.), *Genetics and product formation in Streptomyces*. Plenum Press, N.Y.
- Chater, K.F., C.J. Bruton, S.G. Foster y I. Tobek. 1985. Physical and genetic analysis of IS110, a transposable element of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Gen. Genet.* **200**, 235-239.
- Chater, K.F., D.A. Hopwood, T. Kieser y C.J. Thompson. 1982. Gene cloning in *Streptomyces*. *Curr. Topics. Microbiol. Immunol.* **97**, 69-95.
- Chater, K.F. y M.J. Merrick. 1979. Streptomycetes, p. 93-114. En: J.H. Parish (ed.), *Developmental biology of prokaryotes*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Chung, S.-T. 1982. Isolation and characterization of *Streptomyces fradiae* plasmids which are prophage of actinophage ϕ SF1. *Gene* **17**, 239-246.
- Chung, S.-T. 1987. Tn4556, a 6.8-kilobase-pair transposable element of *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.* **169**, 4436-4441.

Davis, R.C., G. Stahnke, H. Wong, M.H. Doolittle, D. Amels, H. Will y M.C. Scholtz. 1990.

Hepatic lipase: Site directed mutagenesis of a serine residue important for catalytic activity.
J. Biol. Chem. **265**, 6291-6295.

Deininger, P.L. 1983. Random subcloning of sonicated DNA: Application to shotgun DNA sequence analysis. *Anal. Biochem.* **129**, 216-223.

Dyson, P. y H. Schrempf. 1987. Genetic instability and DNA amplification in *Streptomyces lividans* 68. *J. Bacteriol.* **169**, 4796-4803.

Feller, G., M. Thiry, J.L., Arpigny, M. Mergeay y C. Gerday. 1990a. Lipases from psychrotrophic antarctic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **66**, 239-244.

Feller, G., M. Thiry y C. Gerday. 1990b. Sequence of a lipase gene from the antarctic psychrotroph *Moraxella* TA144. *Nuc. Acids. Res.* **18** (21), 6431.

Feller, G., M. Thiry, J.L., Arpigny y C. Gerday. 1991a. Cloning and expression in *Escherichia coli* of three lipase-encoding genes from the psychrotrophic antarctic strain *Moraxella* TA144. *Gene* **102**, 111-115.

Feller, G., M. Thiry, J.L., Arpigny y C. Gerday. 1991b. Nucleotide sequence of the lipase gene *lip2* from the antarctic psychrotroph *Moraxella* TA144 and site-specific mutagenesis of the conserved serine and histidine residues. *DNA Cell Biol.* **10** (5), 381-388.

Feller, G., M. Thiry, J.L., Arpigny y C. Gerday. 1991c. Nucleotide sequence of the lipase gene *lip3* from the antarctic psychrotroph *Moraxella* TA144. *Biochim. Biophys. Acta* **1080**, 323-324.

Goodfellow, M. y S.T. Williams. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**, 189-216.

Hale, V., M. McGrew, B. Carlson y J.L. Schottel. 1992. Heterologous expression and secretion of a *Streptomyces scabies* esterase in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174** (8), 2431-2439.

Hanahan, D. 1986. Techniques for transformation of *E. coli*. En: Glover, D.M. (ed.), *DNA cloning*, vol. 1. IRL Press, Oxford.

Harris, J.E., K.F. Chater, C.J. Bruton y J.M. Piret. 1983. The restriction mapping of *c* gene deletions in *Streptomyces* bacteriophage Φ C31 and their use in cloning vector development. *Gene* **22**, 167-174.

- Harwood, J. 1989. The versatility of lipases for industrial uses. *Trends in Biochemical Sciences* **14**, 125-126.
- Heffron, F., B.J. McCarthy, H. Ohtsuba y E. Ohtsubo. 1979. DNA sequence analysis of the transposon Tn3: Three genes and three sites involved in transposition of Tn3. *Cell* **18**, 1153-1163.
- Hirochika, H. y K. Sakaguchi. 1982. Analysis of linear plasmids isolated from *Streptomyces*: Association of protein with the ends of the plasmid DNA. *Plasmid* **7**, 59-65.
- Hirochika, H., K. Nakamura y K. Sakaguchi. 1984. A linear DNA plasmid from *Streptomyces rochei* with an inverted terminal repetition of 614 base pairs. *EMBO J.* **3**, 761-766.
- Hironouchi, S., M. Nishiyama, A. Nakamura y T. Beppu. 1987. Construction and characterization of multicopy expression-vectors in *Streptomyces* spp. *Mol. Gen. Genet.* **210**, 468-475.
- Hopwood, D.A. 1988. The Leeuwenhoek Lecture, 1987. Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. *Proc. R. Soc. Lond. B* **235**, 121-138.
- Hopwood, D.A. y H.M. Wright. 1979. Factors affecting recombinant frequency in protoplast fusions of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* **11**, 137-143.
- Hopwood, D.A. y K.F. Chater. 1982. DNA cloning in *Streptomyces*: Systems and strategies. *Genet. Eng.* **4**, 119-145.
- Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward y H. Schrempf. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
- Hopwood, D.A., T. Kieser, D.J. Lydiate y M.J. Bibb. 1986. *Streptomyces* plasmids: Their biology and use as cloning vectors, p. 159-229. *En: Gunsalus, I.C., J.R. Sokatch, L.N. Ornston, S.W. Queener y L.E. Day (ed.), The Bacteria. A treatise on structure and function. Vol IX Antibiotic-producing Streptomyces.* Academic Press, N.Y.
- Hopwood, D.A., T. Kieser, H.M. Wright y M.J. Bibb. 1983. Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 2257-2269.

- Hütter, R. y T. Eckhardt. 1988. Genetic manipulation, p. 468-478. En: Goodfellow, M., S.T. Williams y M. Mordarski (ed.), *Actinomycetes in Biotechnology*. Academic Press, San Diego, CA.
- Isogai, T., H. Takahashi y H. Saito. 1981. Actinophage R4 as a DNA cloning vector in *Streptomyces*. *J. Gen Appl. Microbiol.* 27, 373-379.
- Janssen, G.R. y M.J. Blbb. 1993. Derivatives of pUC18 that have *Bgl*I sites flanking a modified multiple cloning site and that retain the ability to identify recombinant clones by visual screening of *Escherichia coli* colonies. *Gene* 124, 133-134.
- Jorgensen, S., K.W. Skov y B. Diderichsen. 1991. Cloning, sequence, and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: Lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes. *J. Bacteriol.* 173 (2), 559-567.
- Kendall, K. y J. Cullum. 1984. Cloning and expression of an extracellular agarase gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2) in *Streptomyces lividans* 86. *Gene* 29, 315-321.
- Kendall, K. y J. Cullum. 1988. A vector for studying plasmid stability functions in *Streptomyces*. *Genet. Res. Camb.* 51, 71.
- Kleser, T., D.A. Hopwood, H.M. Wright y J.T. Chater. 1982. pIJ101, a multi-copy broad host-range *Streptomyces* plasmid: Functional analysis and development of DNA cloning vectors. *Mol. Gen. Genet.* 185, 223-238.
- Kinashi, H. y M. Shimaji. 1987. Detection of giant linear plasmids in antibiotic producing strains of *Streptomyces* by the OFAGE technique. *J. Antibiot.* 40, 913-916.
- Kinashi, H., M. Shimaji y A. Sakai. 1987. Giant linear plasmids in *Streptomyces* which code for antibiotic biosynthesis genes. *Nature* (London) 328, 454-456.
- Klaus, S., H. Krügel, F. Süß, M. Neigenfind, I. Zimmermann y U. Taubeneck. 1981a. Properties of the actinophage SH10. *J. Gen. Microbiol.* 123, 269-279.
- Klaus, S., M. Hartmann, F. Walter y U. Taubeneck. 1982. Inverted duplication in the genome of the temperate *Streptomyces* phage SH3. *Mol. Gen. Genet.* 188, 322-324.
- Klaus, S., M. Hartmann, H. Krügel, M. Roth, F. Walter, Y.I. Rautenstein y N. Solovyeva. 1981b. Restriction of *Streptomyces* phage SH5 by endonuclease *Shy*I from *Streptomyces hygroscopicus* 0477. *Mol. Gen. Genet.* 184, 288-288.

- Kouker, G. y K.-E. Jaeger. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 211-213.
- Kuhstoss, S. M.A. Richardson y R.N. Rao. 1991. Plasmid cloning vectors that integrate site-specifically in *Streptomyces* spp. *Gene* **97**, 143-146.
- Larson, J.L. y C.L. Hershberger. 1984. Shuttle vectors for cloning recombinant DNA in *Escherichia coli* and *Streptomyces griseofuscus* C581. *J. Bacteriol.* **157**, 314-317.
- Lee, Y.-H. W., Z.-Y. Tzecheng, S.-C. Wang, W.-L. Cheng y C.W. Chen. 1986. Structural stability of heterologous genes cloned in *Streptomyces* plasmid pIJ702. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **140**, 372-378.
- Lomovskaya, N.D., K.F. Chater y N.M. Mkrumian. 1980. Genetics and molecular biology of *Streptomyces* bacteriophages. *Microbiol. Rev.* **44**, 206-229.
- Lydiate, D.J., F. Malpartida y D.A. Hopwood. 1985. The *Streptomyces* plasmid SCP2⁺: Its functional analysis and development into useful cloning vectors. *Gene* **35**, 223-235.
- Lydiate, D.J., H. Ikeda y D.A. Hopwood. 1986. A 2.6 Kb DNA sequence of *Streptomyces coelicolor* A2(3) which functions as a transposable element. *Mol. Gen. Genet.* **203**, 79-88.
- Macrae, A.R. y R.C. Hammond. 1985. Present and future applications of lipases. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **3**, 193-217.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch y J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Méndez, C., A.F. Braña, M.B. Manzanal y C. Hardisson. 1985. Role of substrate mycellum in colony development in *Streptomyces*. *Can. J. Microbiol.* **31**, 448-450
- Nakano, N.M., H. Ishihara y H. Ogawara. 1981. Characterization of temperate bacteriophage B α isolated from *Streptomyces lavendulae*. *J. Gen. Microbiol.* **122**, 289-293.
- Okanishi, M., K. Katagiri, T. Fumurai, K. Takeda, K. Kawaguchi, M. Saitoh y S. Nabeshima. 1983. Basic techniques for DNA cloning and conditions required for streptomycetes as a host. *J. Antibiotics.* **36** (2), 99-108.
- Okanishi, M., K. Suzuki y H. Umezawa. 1974. Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: Cultural condition and morphological study. *J. Gen. Microbiol.* **80**, 389-400.

- Olson, E.R. y S.T. Chung. 1988. Transposon Tn4556 of *Streptomyces fradiae*: Nucleotide sequence of the ends and the target sites. *J. Bacteriol.* **170**, 1955-1957.
- Pigac, J., D. Vujaklija, Z. Toman, V. Gamulin y H. Schrempf. 1988. Structural instability of a bifunctional plasmid pZG1 and single-stranded DNA formation in *Streptomyces*. *Plasmid* **19**, 222-230.
- Pérez, C. 1993. Clonación y caracterización de un gen de lipasa extracelular de *Streptomyces* sp. M11. Tesis de Maestría. UNAM, México.
- Pérez, C., K. Juárez, E. García-Castells, G. Soberón y L. Servín-González. 1993. Cloning, characterization, and expression in *Streptomyces lividans* 66 of an extracellular lipase-encoding gene from *Streptomyces* sp. M11. *Gene* **123**, 109-114.
- Rao, R.N., M.A. Richardson y S.A. Kuhstoss. 1987. Cosmid shuttle vectors for cloning and analysis of *Streptomyces* DNA. *Methods Enzymol.* **153**, 166-198.
- Rodicio, M.R., C.J. Bruton y K.F. Chater. 1985. New derivatives of the *Streptomyces* temperate phage Φ C31 useful for cloning and functional analysis of *Streptomyces* DNA. *Gene* **34**, 283-292.
- Sanger, F., S. Nicklen y R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. **74** **12**, 5483-5487.
- Schrempf, H. 1983. Deletion and amplification of DNA sequences in melanin-negative variants of *Streptomyces reticuli*. *Mol. Gen. Genet.* **189**, 501-505.
- Servín-González, L. 1993. Relationship between the replication functions of *Streptomyces* plasmids pJV1 and pJJ101. *Plasmid* **30**, (en prensa).
- Shirahama, T., T. Furumai y M. Okanishi. 1981. A modified regeneration method for *Streptomyces* protoplasts. *Agric. Biol. Chem.* **45** (5), 1271-1273.
- Silhavy, T.J., S.A. Benson y S.D. Emr. 1983. Mechanisms of protein localization. *Microbiol. Rev.* **47**, 313-344.
- Singer, C.E. y B.N. Ames. 1970. Sunlight ultraviolet and bacterial DNA base ratios. *Science* **170**, 822-826.

- Suarez, J.E., J.L. Caso, A. Rodríguez y C. Hardisson. 1984. Structural characteristics of the *Streptomyces* bacteriophage Φ C31. *FEMS Microbiol. Lett.* **22**, 113-117.
- Suarez, J.E. y K.F. Chater. 1980a. Polyethylene Glycol-assisted transfection of *Streptomyces* protoplasts. *J. Bacteriol.* **142** (1), 8-14.
- Suarez, J.E. y K.F. Chater, 1980b. DNA cloning in *Streptomyces*: A bifunctional replicon comprising pBR322 inserted into a *Streptomyces* phage. *Nature* (London) **286**, 527-529.
- Sztajer, H., I. Wallszewska y J. Wieczorek. 1988. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes. *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 492-497.
- Thompson, C.J., J.M. Ward y D.A. Hopwood. 1980. DNA cloning in *Streptomyces*: Resistance genes from antibiotic-producing spores. *Nature* **286**, 525-527.
- Thompson, C.J., T. Kieser, J.M. Ward y D.A. Hopwood. 1982. Physical analysis of antibiotic resistance genes from *Streptomyces* and their use in vector construction. *Gene* **20**, 51-62.
- Toyama, H., E. Hayashi, K. Hoshiko, K. Nagaoka e Y. Yamada. 1983. Isolation and characterization of new virulent actinophage Φ r5. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 1853-1858.
- Vergar, R. 1980. Enzyme kinetics of lipolysis. *Methods Enzymol.* **64**, 340-392.
- von Heijne, G. 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nuc. Acids Res.* **14** (11), 4683-4690.
- von Heijne, G. 1988. Transcending the impenetrable: How proteins come to terms with membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **947**, 307-333.
- Waksman, S.A. y A.T. Henrici. 1943. The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J. Bacteriol.* **46**, 337-341.
- Wildermuth, H. 1970. Development and organisation of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* **60**, 43-50.
- Wildermuth, H. y D.A. Hopwood. 1970. Septation during sporulation in *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* **60**, 51-59.

Winkler, F.K., A. D'Arcy y W. Hunziker. 1990. Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343**, 771-774.

Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Micobiol. Rev.* **51**, 221-271.

Wright, F y M.J. Bibb. 1992. Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* **113**, 55-65.