

137
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"CONSTRUCCION DE UNA LIBRERIA GENOMICA DE
Lactobacillus amylovorus"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

NORMA ANGELICA OVIEDO DE ANDA

MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ CONSTRUCCION DE UNA LIBRERIA GENOMICA DE
Lactobacillus amylovorus ”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

NORMA ANGELICA OVIEDO DE ANDA

MEXICO, D. F.

1994

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de
Génética de Bacterias Lácticas, del Departamento de
Biotecnología en el Instituto de Investigaciones Biomedicas,
U.N.A.M., bajo la dirección de la Dra. Juliette Morlon Guyot.

JURADO ASIGNADO:

Dra. Juliette Morlon Guyot
Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez
M. en C. Juan Carlos Gaytan Oyarzun
Biol. Saul Cano Colin
Biol. Carlos Alberto Castillo Pompeyo

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, por su comprensión y gran ayuda en los momentos en que les necesitaba. Gracias por inculcarme la responsabilidad por el trabajo, para ellos con cariño, respeto y admiración.

A mi pequeña hija, que a pesar de las circunstancias adversas ha sabido apoyarme y quererme. Gracias por tu comprensión y conformidad por el poco tiempo que podía compartir contigo.

A mi acesora, magnífica persona y buena amiga que ha demostrado ser durante todo el tiempo que trabaje en su laboratorio. Gracias por tus consejos y preocupación no sólo para este trabajo sino también en los momentos difíciles.

A mis compañeros de laboratorio, por su valiosa ayuda y por hacer alegre mi estancia en el laboratorio. Especialmente a Romina por aceptarme como amiga y a Rafael que siempre fueron atentos para escuchar mis problemas.

Al jurado, por la revisión crítica de este trabajo , así como por sus consejos.

INDICE

RESUMEN	pag.
I.-INTRODUCCION.	
1.1.-BACTERIAS LACTICAS.....	3
1.1.1.-FERMENTACIONES LACTEAS.....	4
1.1.2.-FERMENTACIONES DE VEGETALES.....	5
1.1.3.-FERMENTACIONES DE LA CARNE.....	5
1.1.4.-PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS.....	5
1.1.5.-OTRAS ACCIONES ANTIMICROBINAS.....	7
1.1.6.-BENEFICIOS A LA SALUD.....	7
1.2.- <u>Lactobacillus</u>	8
1.3.- <u>Lactobacillus amylovorus</u>	9
1.4.-BIBLIOTECAS GENOMICAS:.....	12
1.4.1.-REPRESENTACION DE UNA BIBLIOTECA GENOMICA.....	14
1.4.2.-ELECCION DEL VECTOR DE CLONACION.....	19
1.5.-CICLO DE VIDA Y GENETICA DE LAMBDA.....	21
1.6.-EL BACTERIOFAGO LAMBDA COMO VECTOR DE CLONACION:....	24
1.6.1.-EL BACTERIOFAGO LAMBDA GT11.....	28
1.6.2.-EL BACTERIOFAGO LAMBDA GT10.....	31
II.- OBJETIVOS.....	33
III.-METODOLOGIA:	
3.1.- MICROORGANISMOS.....	34
3.2.-EXTRACCION DEL DNA CROMOSOMAL.....	34
3.3.-DIGESTIONES.....	37

	pag.
3.4.-ELECTROFORESIS.....	37
3.5.-ELECTROELUCION.....	38
3.6.-VECTORES.....	38
3.7.-LIGACION.....	39
3.8.-EMPAQUETAMIENTO.....	40
3.9.-SIEMBRA.....	40
3.10.-TITULACION.....	41
3.11.-AMPLIFICACION.....	42
3.12.-ALMACENAMIENTO DE FAGOS.....	43
3.13.-PURIFICACION DE FAGOS.....	43
3.14.-EXTRACCION DEL DNA DE FAGOS.....	44
3.15.-DETECCION DE BETA-GALACTOSIDASA EN FAGOS.....	45
IV.- RESULTADOS.....	47
V.-DISCUSION.....	56
VI.-CONCLUSIONES.....	62
VII.- APENDICE.....	63
VII.-BIBLIOGRAFIA CITADA.....	67

RESUMEN.

A partir de las bacterias lácticas, la producción de proteínas por ingeniería genética de interés biotecnológico es factible, ya que se consideran microorganismos "GRAS" (Generally Regarded As Safe), es decir, que pueden ser consumidos por el hombre sin riesgo para su salud. A pesar de que las bacterias lácticas son utilizadas ampliamente en diversas fermentaciones, apenas inician los estudios genéticos del género Lactobacillus.

Lactobacillus amylovorus es utilizado en procesos de ensilaje para la conservación de granos. Esta cepa produce alfa-amilasa, la cual le permite utilizar el almidón de los residuos vegetales como fuente de carbono durante su crecimiento.

Una biblioteca genómica consta de la construcción de vectores que contienen fragmentos del DNA genómico de un organismo en particular. Estas construcciones son mantenidas en una población de organismos adecuados, como bacterias y bacteriofagos.

La construcción de una librería genómica de este microorganismo es importante, en primera instancia para la preservación de su material genético en una forma accesible y posteriormente, para la clonación de genes que puedan tener importancia industrial o en la investigación básica. La construcción del banco se realizó en los vectores lambda gt10 y lambda gt11, ambos vectores pueden contener fragmentos de 7Kb. El número de fagos

recombinantes necesarios para tener representado el genoma de L. amylovorus se estimó en 5.74×10^3 pfu con fragmentos insertados de 6Kb. Se obtuvieron bancos primarios en lambda gt11 con títulos del orden de 10 pfu /ml pero con una eficiencia del 60% al 80% .

Sin embargo, al amplificarse los fagos recombinantes se observó inestabilidad en la conservación del fragmento del genoma de L. amylovorus. Los bancos primarios construidos en lambda gt10 presentan también títulos del orden de $1-2 \times 10^5$ pfu /ml pero la eficiencia del número de recombinantes fue hasta del 94%, además de presentar gran estabilidad. En cuanto a la representación real del banco se obtuvieron 14 placas de lambda gt10 recombinantes, entre 40 000 que fueron probadas, estas 14 placas expresan actividad de Beta-galactosidasa.

I.-INTRODUCCION

1.1.-BACTERIAS LACTICAS

Ciertos tipos de microorganismos se han utilizado en la preparación y procesamiento de alimentos para los humanos. Muchas de estas fermentaciones representan las técnicas antiguas para la conservación de alimentos, ya que se han llevado a cabo desde hace 8000 años (Steele, 1992).

Los alimentos fermentados son productos aceptables para ser ingeridos sin necesidad de cocción, los cuales se preparan a partir de materiales crudos o semitratados. Estos adquieren propiedades características de textura, aroma, sabor, consistencia y color, debido a la actividad biológica de microorganismos que se encuentran presentes durante la fermentación (Hammes, 1990). Las bacterias acidolácticas participan en numerosas fermentaciones de alimentos provenientes de fuentes agrícolas y ganaderas tales como: vegetales, cereales, carne y diferentes productos lácteos (Venema and Kok, 1987). Las bacterias lácticas usadas en la preparación de alimentos fermentados y bebidas pertenecen a los géneros Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus y Streptococcus.

Las bacterias lácticas provocan por su producción de ácido láctico, la acidificación de la fermentación, y de esta manera puede restringir el crecimiento de otros microorganismos que pueden resultar patógenos para el hombre. Generalmente, las bacterias lácticas se consideran como organismos GRAS

("Generally Regarded As Safe") o de grado alimenticio para el hombre. Esto las hace interesantes para la explotación comercial en la producción de proteínas heterologas (Venema and Kok, 1987).

1.1.1.- FERMENTACIONES LACTEAS

Las propiedades metabólicas de las bacterias lácticas les da gran importancia en la producción de quesos debido a que disminuyen el potencial de oxido-reducción, por su sistema de enzimas proteolíticas, autólisis, calidad nutricional del autolisado y la presencia de enzimas lipolíticas (Olson, 1990: Steele, 1992).

Actualmente, se conocen aproximadamente 4000 variedades de quesos provenientes de la leche de nueve especies de mamíferos domesticados (vaca, búfalo, oveja, cabra, yeguas, camellos, y cebú entre otras), y cada año se incrementa, el consumo de productos lácteos fermentados (Kroeger, 1982), como el yogurt, kefir, kaumiss y yakult.

1.1.2.-FERMENTACIONES DE VEGETALES

Otras fermentaciones donde participan las bacterias lácticas son las que se realizan con vegetales, la acidificación, el cambio de textura, y de color les preserva. Gracias a estas fermentaciones se remueven componentes indeseables en la materia cruda como los azúcares, hemoaglutininas, glucosinulatos, e inhibidores de proteasa (Hammes, 1990), que provocan la flatulencia en el ganado.

1.1.3.-FERMENTACIONES DE LA CARNE

Las bacterias lacticas tienen importancia durante la fermentación de cárnicos, por ejemplo en la producción de embutidos, ya que la carne requiere de especiales medidas de almacenamiento por su facilidad de contaminarse por microorganismos (Hammes et al, 1990). Las bacterias lácticas evitan la contaminación debido a su acción antimicrobiana.

1.1.4.-PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS

Existen antibióticos producidos por muchas cepas de bacterias lácticas. Estas tienen la capacidad de producir sustancias

antagonistas de naturaleza proteica (bacteriocinas) que presentan actividad antimicrobiana, lo que ayuda en la preservación de alimentos, sin tener que utilizar conservadores químicos. Se han reportado algunos géneros que producen sustancias inhibitoras del crecimiento de hongos (Batish et al, 1989). Por ejemplo, la nisina y Pediococcina A pueden ser utilizados como conservadores de alimentos, ya que presentan actividad contra gram-positivos, en particular los formadores de esporas.

Se han caracterizado solo en el género Lactobacillus acidophilus antibióticos como lactobacillina, lactocidina o acidolina, lactocina F. (Sabine, 1963) y acidofilina (Shahani et al, 1976). En otros géneros también se producen antibióticos; el bulgaricano producido por Lactobacillus bulgaricus (Reddy and Shahani, 1971), las lactocinas del tipo A, B, M de Lactococcus lactis y leucocina A, de Leuconostoc gelidium, pediocina PA-1 de Pediococcus acidalactis, (Gasson, 1993). La reducción de pH, y la remoción de grandes cantidades de azúcares requeridos para el crecimiento de bacterias lácticas, estas son acciones primarias para la inhibición del crecimiento de otros microorganismos.

1.1.5. OTRAS ACCIONES ANTIMICROBIANAS

Las bacterias lácticas producen también otras sustancias en pequeñas cantidades que son inhibidoras de la proliferación de otros microorganismos. Entre ellos el peróxido de hidrogeno, diacetilo, hipotiocianito, Microgard (preparado comercial) y reuterina (Daeschel, 1989).

1.1.6. BENEFICIOS A LA SALUD

A las bacterias lácticas se les atribuye ciertos beneficios para la salud . El ácido láctico es importante para facilitar la digestión de las proteínas de la leche, al incrementar la asimilación por el hombre del calcio, fósforo y hierro. La fermentación láctica aumenta la secreción de jugos gástricos, reduciendo el tiempo de digestión, y es una fuente de calorías para procesos de la respiración celular (Amer and Lammerding, 1983). Entre los beneficios a la salud otorgados por el consumo de alimentos fermentados por bacterias lácticas, se han reportado: actividad anticancerosa (Bogdanov and Daley, 1975; Esser et al, 1983), efecto anticolesterolemico (Mann, 1977 a y b), degradación de nitrosaminas (Rowland and Grasso, 1975), para el tratamiento de desordenes gastrointestinales (Hill et al, 1970), inmunocompe-

tancia (Simone et al, 1986) y entre otros: la curación de escoriaciones en cáncer de piel, infecciones orales, eczema y reducción de las caries dentales.

1.2.-Lactobacillus

En los productos fermentados antes mencionados, el género Lactobacillus juega un papel importante. Los lactobacilos se identifican como gram positivos, no formadores de esporas, catalasa negativos, usualmente no móviles y no realizan reducción de nitrato (Kandler and Weiss, 1986). Los lactobacilos en muchas especies son redondos, forman cadenas y usualmente alargados. Ellos son microaerofílicos (algunos anaerobios estrictos), fermentan azúcares para producir ácido láctico (Frazier and Westhoff, 1989). Los lactobacilos se dividen en dos grupos: homofermentativos, si producen al menos el 85% de ácido láctico desde glucosa; o heterofermentativos si producen además de ácido láctico, óxido de carbono, etanol, diacetilo, acetoina, 2,3 butanediol, acetaldehído y/o ácido acético (Starr et al, 1981). La presencia o ausencia de fructosa 1,6 bifosfato aldolasa es responsable de la diferencia entre homo- y heterofermentativos; los heterofermentativos no tienen esta enzima, pero tienen una fosfoctolasa para romper hexosas y pentosas (Kandler,

1983). Aunque se ha visto que la regulación del catabolismo de carbohidratos es sensible a cambios del pH, modificandose así los productos finales; los lactobacilos homofermentativos, pueden ser heterofermentativos en condiciones de alcalinidad (Tseng and Montville, 1993). Los lactobacilos tienen eficientes rutas de fermentación, acopladas eficientemente a fosforilación por sustrato. Aunque no tienen superoxidodismutasa, catalasa o sistema de citocromos para realizar la fosforilación oxidativa poseen en cambio flavin oxidasa, peroxidasa y una catalisis primitiva para la remoción del radical superóxido (Kandler, 1983).

Algunos lactobacilos requieren manganeso como cofactor para sistemas enzimáticos como el de la lactato deshidrogenasa, RNA polimerasa y manganicatalasa, también para remover radicales superóxido y degradación de peróxido de hidrogeno (Archibald, 1986).

1.3.-Lactobacillus amylovorus

Lactobacillus amylovorus fue aislado de desperdicios de cereales (Nakamura, 1981). Estas bacterias crecen en cadenas cortas, produce ácido láctico y pequeñas cantidades de ácido acético, no forma gas (CO_2) al metabolizar la glucosa y son negativas las actividades de oxidasa, catalasa y de reducción de nitratos.

Su crecimiento se lleva a cabo a 45°C pero no a 15°C, produce al metabolizar la glucosa una mezcla racémica de ácido láctico D y L en iguales proporciones. El promedio de contenido de guanina y citosina es de 40.4 %, las colonias crecidas en agar presentan un aspecto blanco, opaco y convexo. Esta cepa es susceptible a la presencia de SDS al 0.4% y NaCl al 8%, y crece bajo condiciones anaerobicas en un pH inicial de 4.5 a 8. L. amylovorus tienen requerimientos de ácido pantoténico, ácido fólico, ácido nicotínico y riboflavina para crecimiento (Nakamura, 1981).

Aunque muchos lactobacilos presentan buen crecimiento en leche descremada, esta especie, así como otros lactobacilos amilolíticos (L. amylophilus (Nakamura and Crowell, 1979) y L. cellobiosus (Sribir and Chakrabarty, 1984; 1987)) no acidifican la leche.

Se ha reportado que esta cepa secreta una alfa-amilasa de alto peso molecular (Imam et al, 1991), que presenta un pH óptimo entre 5 y 5.5, temperatura óptima de 60-65°C y un peso molecular de aproximadamente 140 KDa. (Burgess-Cassler and Imam, 1991; Castillo et al, 1993).

La bacteria presenta adhesión a los gránulos de almidón

insoluble (Imam and Harry-Onkuru, 1991). Una aplicación de estas propiedades, sería la degradación de plásticos manufacturados con almidón (Imam and Gould, 1990). Esta cepa tiene también una importante producción de ácido láctico a partir de la degradación de almidón, eliminando el paso de prefermentación sacarificada, y es similar a la obtenida por Lactobacillus delbrueckii B-445 que utiliza glucosa (Cheng et al, 1991).

Se ha determinado que la alfa-amilasa se encuentra codificada en el cromosoma, la cepa no presenta plásmidos pequeños, aunque sí se ha reportado la presencia de un plásmido criptico de aprox. 3 megapares de bases (Bohanon, 1985).

Se ha clonado el gen de alfa-amilasa en un vector transbordador para E. coli y Lactobacillus (pLPCR2) en un fragmento de 6 kb. El gen se expresa y su producto se secreta en E. coli y Lactobacillus casei 102S (Jorey and De Parais, 1993).

La presencia de alfa-amilasa en esta cepa la hace importante, ya que son pocas las especies de bacterias lácticas con propiedades amilolíticas. En procesos de ensilaje, resulta una ventaja la conversión directa del almidón a azúcares de bajo peso molecular y ácido láctico, con la subsecuente caída de pH y preservación de los productos ensilados. Además, dichos productos tienen un alto nivel nutritivo para el ganado (Scheirlink et al,

1989). Sin embargo, la adición de una fuente carbonada adecuada para bacterias lácticas o de enzimas hidrolíticas, hace incoosteable el proceso. De las cepas con estas ventajas, la clonación de genes de alfa-amilasa es de utilidad para el mejoramiento de su actividad y producción de tales enzimas. En este mismo sentido actualmente ya se han realizado trabajos para la expresión de genes heterologos en cepas de bacterias lácticas (Scheirlinck et al, 1989; 1990).

Ultimamente la búsqueda de bacterias lácticas con estas ventajas ha aumentado. Se han reportado *Lactobacillus* con actividad amilolítica (Nakamura and Crowell, 1979, 1981; Sribir and Chakrabarty 1984; Giraud et al, 1991). Las cuales pueden tener varias aplicaciones en distintas fermentaciones amiláceas (Giraud et al, 1991; Koch, 1989; Adler-Nissen, 1987) además de procesos de ensilaje como el de alfalfa, maíz (Lin et al, 1992) o en fermentaciones combinadas con pescado y cereal (Lindgren and Refai, 1984).

1.4.-BIBLIOTECAS GENOMICAS.

El aislamiento de genes de copia única, se ha resuelto utilizando técnicas de DNA recombinante. En principio si son clonados fragmentos de DNA genómico y si el número de clones es tan grande como para representar la secuencia completa, algún

gen puede aislarse por hibridación con una sonda específica (Young and Davis, 1983). Se ha demostrado la factibilidad de construir bibliotecas desde el DNA de organismos con genomas pequeños como Drosophila o levaduras (Maniatis et al, 1978).

Una biblioteca genómica debe contener secuencias de DNA que representen al genoma completo, y que puedan mantenerse estable. Esta biblioteca genómica debe también contener un número manejable de clonas superpuestas, es decir, clonas que contengan fragmentos de una misma secuencia. Esta superposición de clonas facilita el seguimiento del genoma en regiones adyacentes, e incluso pueden utilizarse directamente para el seguimiento del DNA genómico de genes completos, para evitar el mapeo de restricción (Sandford and Elgar, 1992). Esto es posible por la excisión de secuencias libres del vector que pueden utilizarse como sondas radioactivas.

Uno de los mayores problemas en la construcción de una biblioteca genómica, es la generación de un gran número de clonas recombinantes. Las estrategias básicas para resolver este problema, son el minimizar el número de clonas necesarias incorporando largos fragmentos de DNA genómico, y maximizar la eficiencia de clonación usando vectores basados en bacteriófagos lambda (Ausubel et al, 1991). Las características deseables en una biblioteca genómica se presentan en la tabla I.

tabla I. CARACTERISTICAS DE UNA LIBRERIA GENOMICA.

- Que contenga secuencias representativas de DNA genómico.
- Que tenga un número manejable de clones traslapados.
- Que los fragmentos sean clonados con genes completos, así como sus secuencias flanqueadoras.
- Que los fragmentos sean de tamaño adecuado para su análisis por restricción.
- Que sea fácil de construir a partir de pequeñas cantidades de material.
- Que las secuencias de interés sean fáciles de analizar, por hibridación, PCR, expresión, etc.
- Que sea estable para almacenarse por tiempo prolongado sin gran pérdida de título.
- Que sea fácil de amplificar sin pérdida de material o una representación inadecuada.
- Que sea adecuado para el aislamiento de genes de copia única.

(Jendrisak *et al*, 1987)

1.4.1.-REPRESENTACION DE UNA BIBLIOTECA GENOMICA.

Casi siempre el fragmento de interés representa solamente una pequeña fracción del total del DNA genómico. El tamaño de una biblioteca genómica completa a partir de DNA genómico, debe asegurar que la representación de una secuencia en particular esta determinada por el tamaño de los fragmentos clonados y el tamaño del genoma del organismo.

El DNA de organismos superiores es muy complejo, un genoma haploide de un mamífero contiene aproximadamente 3×10^9 p.b. Si el fragmento de interés es de 3000 p.b., este fragmento comprende solo una parte en 10^6 de una preparación de DNA (Ausubel *et al*, 1991).

Aún así, debe tomarse en cuenta que si todos los sitios de restricción del DNA genómico pueden digerirse al mismo tiempo. La incorporación óptima de secuencias, se observa cuando el tamaño promedio de los fragmentos es aproximado al tamaño promedio de los insertos presentes en una muestra de clonas.

La heterogeneidad en la digestión por parte de las enzimas de restricción reduce la fracción incorporada, y una subdigestión provee mayor representación de las secuencias con distintos sitios de corte en una misma preparación. En este caso, la representación en bibliotecas construidas a partir de digestiones parciales, no solo depende del tamaño del inserto, sino también del grado de digestión parcial (Seed *et al.*, 1982). De esta manera se favorece la formación de clonas con insertos que se traslapan entre sí.

Clarke y Carbon (1979) han publicado una fórmula para calcular el tamaño necesario de una biblioteca genómica, para tener posibilidad de obtener un gen en específico. En esta fórmula, el número de clonas independientes, N , que necesitan probarse para aislar una secuencia en particular con probabilidad P , es obtenido por:

$$N = \ln(1-P) / \ln[1 - (I/G)] \quad \text{Ec. 1}$$

Cuando I es el tamaño promedio de los fragmentos clonados expresados en pares de bases (pb.) y G es el tamaño del genoma del organismo. En general, para tener un 99% de probabilidad de aislar una secuencia deseada, el número de clonas probadas debe ser tal que el total de pares de bases presentes en las clonas probadas ($I \times N$) represente aproximadamente 4.6 veces el número total de pares de bases en el genoma (G) (Seed *et al*, 1982).

Cuando, se conoce su mapa de restricción del fragmento deseado, se puede purificar, y así reducir considerablemente el tamaño de la biblioteca. También se ha presentado una fórmula que puede usarse para calcular el número de clonas recombinantes necesarios para asegurar una alta probabilidad de obtener bibliotecas genómicas completas (Zinsel and Beatty, 1992). En esta se toma en cuenta la complejidad del genoma.

$$n = \ln(1 - P^T) / \ln(1 - T) \quad \text{Ec. 2}$$

Esta fórmula se deriva de las siguientes consideraciones, de estas se define el factor T :

$$T = \text{tamaño del fragmento (Kb)} / \text{Tamaño del genoma (Kb)}$$

Este valor significa la probabilidad de encontrar un fragmento en particular entre toda la población de clonas de una

biblioteca genómica. Cuando se requiere la expresión de un gen, el fragmento de DNA que contiene el gen de interés debe ligarse en un vector de expresión en la orientación correcta.

Cuando un fragmento puede ser insertado en dos orientaciones, y si la transcripción de dicho gen requiere del promotor del vector, el valor de T de expresión debe dividirse en 2. Además, el marco de lectura durante la ligación debe restaurarse, por lo que existen tres diferentes modos de reacomodo dentro de un codón, de las cuales una corresponde al marco de lectura correcto. Entonces el valor de T tiene que dividirse en 3, para contemplar estas distintas situaciones. Es importante señalar que la ecuación de Clarke y Carbon, no asegura una probabilidad específica de tener una biblioteca completa del genoma. Si se desea crear una biblioteca completa que pueda preservarse y probarla en repetidas ocasiones para la selección de algún gen. Se requiere una alta probabilidad, P, para que todos los fragmentos genómicos se presenten en la colección de vectores recombinantes. Esto se obtiene por la aproximación:

$$P = [1 - (1 - T)^n]^{1/T}$$

Donde n es el número de clonas recombinantes requeridas. Técnicamente si esta aproximación asume la independencia de los

vectores que pueden contener diferentes fragmentos, entonces el rearrreglo de la ecuación queda:

$$n = \ln(1 - P^T) / \ln(1 - T) \quad \text{Ec. 2}$$

Para simplificar, $\ln(1 - T) = -T$, se puede utilizar también:

$$n = \ln(1 - P^T) / -T$$

Con esta fórmula se obtienen valores 2-4 veces mayores a los obtenidos con la ecuación de Clarke y Carbon (1979), estos valores se elevan dependiendo del tamaño del genoma (tabla II).

tabla. II DETERMINACION DEL NUMERO DE FAGOS RECOMBINANTES PARA LA CLONACION DE UNA SECUENCIA PARTICULAR

ORGANISMO	DNA HAPLOIDE GENOMICO (pb)	# DE CLONAS INSERT. 20Kb	# DE CLONAS INSERT. 8Kb	# DE CLONAS SEGUN EC. 2	# EQUIVALEN- TES GENOMA.
<i>E. coli</i>	4.2×10^6	9.2×10^2	4.3×10^3	1.1×10^4	11.7
<i>L. lactis</i>	2.85×10^6	5.9×10^2	2.3×10^3	3.7×10^3	9.8
<i>S. cerevisiae</i>	1.4×10^7	3.2×10^3	2.8×10^4	8.0×10^4	13.3
<i>Homo sapiens</i>	3.3×10^9	7.6×10^5	5.5×10^6	2.2×10^7	18.3

(pb) pares de bases, (insert.) inserto o fragmento ligado (ec.) ecuación, (equivalente genoma) número de fagos recombinantes necesarios para cubrir el tamaño del genoma. (Kaiser and Murray, 1985)

1.4.2.-ELECCION DEL VECTOR DE CLONACION.

Se han desarrollado varias estrategias de clonación para satisfacer los distintos requerimientos específicos (tabla III).

Aunque los protocolos de clonación se han diseñado para una variedad de sistemas hospederos, *E. coli* sigue siendo el más común, por las ventajas de que es un microorganismo bien estudiado en los niveles de genética, fisiología y biología molecular.

Muchos vectores de clonación se han diseñado para tener a *E. coli* como célula hospedera (Maniatis *et al*, 1978).

Los vectores plasmídicos son convenientes para la clonación de pequeños fragmentos de DNA para su mapeo de restricción y el estudio de regiones reguladoras. Sin embargo estos vectores tienen una capacidad de insertos relativamente pequeña. Por lo que se requeriría de una cantidad muy alta de clonas para la clonación de un gen específico.

tabla III.VECTORES DE CLONACION.

VECTOR	TIPO	EJEMP.
PLASMIDOS	CLONACION GENERAL	pBR322
	EXPRESION	pUC18
	PARA PROMOTORES Y	
	TERMINADORES	pJAC4
COSMIDOS		pWE15, pWE16
FASMIDOS		pUC118, pBS
BACTERIOFAGOS	FILAMENTOSOS	M13
	DOCATENARIOS	LAMBDA, P1, CHARON

(Old and Primrose, 1985)

En segunda instancia, el manejo y preservación de estas clonas requiere de mucho tiempo. Los subcultivos repetidos de recombinantes pueden resultar en la pérdida de los insertos.

Los cósmidos son plásmidos que contienen el extremo cos de Lambda, que le sirve para ser reconocido por las proteínas de empaquetamiento. Tienen un tamaño de 4-6 Kb , y se han diseñado para la clonación de fragmentos muy grandes de DNA (40 a 50 Kb). Después del empaquetamiento *in vitro*, al infectar a la bacteria, se recirculariza el DNA, pero se duplica como un plásmido normal, sin expresar ninguna de las funciones del fago. Las células transformadas se seleccionan por marcadores de resistencia a antibióticos presentes en el cósmido (Old and Primrose, 1985).

Los fásmidos combinan propiedades deseables de plásmidos y fagos filamentosos, llevan el origen de duplicación del plásmido pCol. El., y el sitio de integración de lambda (att), éste le permite al plásmido integrarse dentro del genoma del fago lambda, pudiéndose integrar más de 1 plásmido. Estos pueden comportarse ya sea como plásmido o como fago dependiendo de la cepa hospedera. Los insertos purificados a partir de estas partículas, se usan como molde para la determinación de la secuencia nucleotídica, mutagénesis dirigida o como sonda específica (Old and Primrose, 1985).

Los bacteriófagos de ambos tipos (filamentosos y de doble

cadena) se utilizan como vectores de clonación. Los fagos filamentosos no son líticos, estos coexisten con las células infectadas por algunas generaciones y son convenientes para la clonación de genes que codifican para productos tóxicos. También se usan comunmente para la secuenciación y mutagénesis dirigida.

Los bacteriófagos de doble cadena, principalmente los derivados de lambda, son herramientas muy útiles por las siguientes razones:

- Aceptan grandes fragmentos de DNA heterólogo, incrementándose las posibilidades de que contenga la secuencia de DNA correspondiente a un gen completo.
- El desarrollo y viabilidad de técnicas que ayudan a minimizar los problemas de fondo provocados por los vectores no recombinantes.
- La posibilidad de probar al mismo tiempo, cientos de clones en una caja de petri.
- La facilidad de preservación de la biblioteca durante meses sin pérdida significativa en la formación de placas.

1.5.-CICLO DE VIDA Y GENETICA DE LAMBDA.

El extenso estudio que se ha realizado sobre la biología del bacteriófago lambda , ha permitido que se lleven a cabo modifi-

caciones en su genoma para hacerle un vector adecuado de clonación. El cromosoma del bacteriófago lambda es una molécula lineal de DNA de doble cadena, y un tamaño de 48,502 p.b. (Kaiser and Murray, 1985), del cual sólo el 40 % es necesario para la propagación del fago.

Este DNA se presenta extensiones de cadena sencilla de 12 bases en ambos extremos, éstas son complementarias entre sí y son los llamados extremos cohesivos o cos. Durante la infección, la extensión 5'derecha (cos R), seguida por el genoma entero, entra en la célula hospedera. Ambos extremos cos se ligan por la propia ligasa de *E. coli*, formando DNA circular encadenado covalentemente, convirtiéndose en una estructura enrollada por la acción de la DNA girasa de la célula hospedera. Después de infectar, comienza su duplicación dentro del hospedero para la formación de múltiples copias de su genoma. Por la expresión coordinada de los genes del fago, se sintetizan los componentes proteicos necesarios para el ensamblaje de partículas maduras. El DNA del fago se empaqueta en la cápside y los fagos maduros son liberados durante la lisis de la célula hospedera (Fig. 1).

Alternativamente, el genoma del fago puede entrar en un estado latente (profago), mediante su integración al genoma bacteriano por recombinación en sitio específico (att). Cambios ambientales y ciertas condiciones fisiológicas, pueden inactivar

el estado lisogénico y comenzar los eventos líticos. En los eventos líticos, el DNA circular del fago es duplicado bidireccionalmente del modo de duplicación Teta, después continúa con la

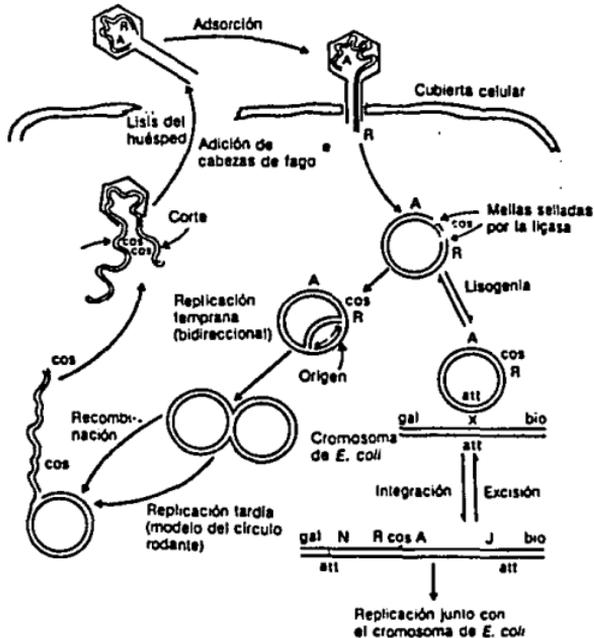


Fig. 1 Ciclo de vida del bacteriofago lambda (Old and Primrose, 1985).

duplicación del círculo rodante para la síntesis de DNA lineal y multimérico, unidos por las extensiones *cos*. La molécula lineal se empaqueta en la cápside y después se corta en cada sitio *cos* por la acción de una terminasa, producto del gen *A* de lambda (Becker and Murialdo, 1990).

1.6.-EL BACTERIOFAGO LAMBDA COMO VECTOR DE CLONACION.

El gran tamaño del genoma del fago lambda y su compleja organización genética, fueron los problemas iniciales que se encontraron en la utilización de lambda como un vector de clonación. El mayor obstáculo fue la presencia en su genoma de múltiples sitios de reconocimiento por parte de numerosas enzimas de restricción (Maniatis *et al*, 1982).

Inicialmente se minimizó el número de sitios Eco R1 (Murray and Murray, 1974) y finalmente la clonación de oligonucleótidos con secuencias específicas, para proveerle de sitios de restricción únicos.

El segundo problema fue el requerimiento de un tamaño mínimo y máximo del genoma (38 y 53 Kb. respectivamente) para tener una buena eficiencia de empaquetamiento y para la producción de fagos viables (Thomas *et al* ,1974). La viabilidad del bacteriófago decrece cuando el genoma excede el 105% o cuando no alcanza el 78% del genomas de lambda silvestre.

La transferencia del vector a la cepa hospedera fue inicialmente por medio de transfección, en donde se tenían eficiencias bajas, en comparación a los protocolos de transformación de plásmidos. Por lo que se planteó realizar el empaquetamiento *in vitro* (Hohn and Murray, 1977). El empaquetamiento por las mezclas de 2 extractos de diferentes cepas, se basa en la complementación

de distintas mutaciones ámbar de estas cepas en su sistema de empaquetamiento. Cada una lleva la mutación en un gen distinto, convirtiéndose en cepas lisogénicas. Estas se inducen y crecen por separado, para la síntesis de proteínas necesarias para el empaquetamiento. Las proteínas de empaquetamiento se han estudiado en detalle, la proteína E es el componente de la cabeza, la proteína D, se encarga del acoplamiento del DNA del fago en el precursor de la cabeza, y la subsecuente maduración de ésta. La proteína A se requiere para el corte del DNA encadenado en los sitios cos. Las cepas lisogénicas llevan los genes A y E o D y E, el mayor problema presentado por este sistema in vitro es la competencia del DNA nativo con las moléculas recombinantes, ya que el primero se empaqueta con mayor eficiencia (Hohn and Murray, 1977). Así el DNA lineal, multimérico lineal (concatámeros) y multimérico circular, son todos empaquetados in vivo así como in vitro (Perbal, 1988). El empaquetamiento in vitro rinde 100 veces más que el método de transfección cuando se utiliza DNA de lambda nativo, y de 10 a 100 veces más cuando se utilizan moléculas recombinantes.

El establecimiento de los sistemas de empaquetamiento in vitro ha sido la etapa decisiva para hacer de lambda un vector de clonación adecuado (Fig.2). Si la eficiencia de empaquetamiento de 1×10^6 pfu/ μ g DNA se obtiene, al menos 1 en 20 moléculas del DNA de lambda, podra formar una placa viable. Un factor impor-

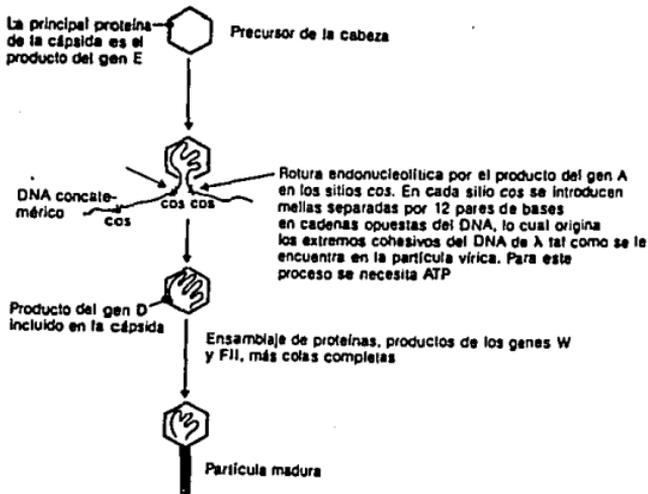


Fig. 2 Esquema simplificado del empaquetamiento del DNA del bacteriofago lambda en partículas víricas. (Old and Primrose, 1983)

tante para un eficiente proceso de empaquetamiento es la calidad de los extractos (tabla IV), que son lábiles a temperaturas mayores de -70°C . Por otra parte, el empaquetamiento *in vitro* de una reacción de ligación representa una población de fagos que no han sido expuestos a ninguna de las presiones selectivas que acompañan a la duplicación y crecimiento del fago dentro de la cepa hospedera.

tabla IV. EFICIENCIA DE LOS EXTRACTOS DE EMPAQUETAMIENTO COMERCIALES.

PROVEEDOR		EFICIENCIA EN pfu/ μ g DE DNA DE LAMBDA	SIN DNA (pfu).	DNA DE LAMBDA CON INSERTO
STRATEGENE	GIGAPACK PLUS	1.06×10^5	-----	3.9×10^4
	GIGAPACK GOLD	2.1×10^5	-----	2.0×10^4
AMERSHAM		7.58×10^5	25	9.0×10^3
BOEHRINGER *		1×10^6	0	1.3×10^4
PROMEGA		3.8×10^5	100	5.8×10^3

* extracto de empaquetamiento utilizado durante este trabajo. (Perbal, 1988)

Otro aspecto importante, es el de seguridad biológica, recientemente existe gran preocupación en torno a los efectos de microorganismos recombinantes en el ambiente. La utilización de marcadores con resistencia a antibióticos hace creer que estos vectores en condiciones naturales pueden ser transferidos promiscuamente a cepas patógenas. Es deseable que el vector de clonación contenga algún tipo de marcador inofensivo en el ambiente (por ejemplo genes de amilasa, xilanasas etc.), o que las cepas recombinantes tengan poca sobrevivencia en condiciones naturales, es decir, fuera de las condiciones del laboratorio. Eso es en

el caso de lambda, a donde se requiere de cepas hospederas específicas (tabla V) y de condiciones especiales para su duplicación y sobrevivencia. Muchos de los vectores requieren de una mutación ámbar en su genoma que hace que solo puedan propagarse en una determinada cepa supresora de la mutación específica (Blattner *et al* , 1977).

También al utilizarse las técnicas de recombinación *in vitro*, se evitan etapas en la cual los fagos viables puedan sobrevivir fuera de las condiciones experimentales (Chauthaiwale, *et al*, 1992).

1.6.1.-BACTERIOFAGO LAMBDA GT11.

Es un vector de inserción, construido a partir de lambda gt-7-lac-5 (que contiene el gen de Beta-galactosidasa) con lambda gt-4 con mutaciones *ci857*, *S100* y *nin 5* (Young and Davis, 1983). La mutación *ci857* le confiere crecimiento lisogénico en temperatura de 32' a 34' C o lítico a 42' C. El supresor *S100* provoca una lisis defectiva en hospederos que han perdido la supresión ámbar sup F (Hugnh *et al* , 1985).

El sitio único de restricción para EcoRI (Rambach and Toillois, 1974), se localiza en el extremo 3' del gen *lac 2*, 53 pb. antes del codón de terminación de la transcripción de la

En lambda gt11 pueden clonarse fragmentos de tamaño hasta 9.2 Kb (Chauthaiwale *et al*, 1992). Las secuencias de DNA insertadas en este vector tienen la potencialidad de expresarse como proteínas fusionadas con la Beta-galactosidasa, cuando el marco de lectura coincide con el de lac Z (Stoker *et al* , 1989).

Por esto, las bibliotecas genómicas construidas en Lambda gt11, son adecuadas para probarse con anticuerpos contra antígenos producidos por clonas específicas (Young and Davis, 1983).

Las células hospederas que llevan múltiples copias del gen represor lac I , son usadas para regular condicionalmente la expresión de los genes controlados por el promotor del operon lac. La cepa de *E. coli* Y1080 que tiene las características siguientes:

- mutación ambar en el gen B (sup F), además de mutaciones que previenen la modificación restricción del DNA exógeno .
- tiene deleteado parte del operon lac que reduce la recombinación entre fago y hospedero.
- presenta el plásmido pMC9 que lleva la secuencia de lac I, y reprime la expresión de genes que disminuyen el crecimiento del hospedero y del fago.

Para la búsqueda de genes de interés, por medio de su expresión en el fago, se utiliza la cepa de *E. coli* Y1090, esta cepa es deficiente en proteasa (Lon A), para reducir la proteólisis de los productos de estos genes (Young and Davis, 1983).

La lisogenia se presenta en la cepa Y1989, ya que no presenta la mutación sup F, y en cambio presenta la mutación hflA 150 (alta frecuencia de lisogenia). Para el crecimiento lisogénico, presenta la mutación en el represor de la fase lítica, cI857, que es sensible a temperatura, inactivo a 42°C y activo a 32°C (Jendrisak et al, 1987).

1.6.2.-BACTERIOFAGO LAMBDA GT10.

Es un vector capaz de aceptar fragmentos de hasta 7.6 kb, y que contiene un sitio EcoRI dentro del gen represor (cI) del fago. La inserción de un fragmento en este sitio genera fagos cI negativos (Fig. 4). Estos recombinantes forman placas con centro claro, a diferencia de los fagos no recombinantes cuyas placas de lisis son turbias (Kaiser and Murray, 1985).

Se le puede considerar como un vector de inserción que le confiere inmunidad (Hugnh et al, 1985). La inserción de DNA exógeno en un punto contenido en la región de inmunidad de una de sus moléculas del vector, destruye la capacidad del fago para producir un represor funcional. La transcripción ésta sometida a represión por el producto del gen cI y en un ciclo lisogénico; esta represión es la base de la inmunidad a la superinfección por lambda (Old and Primrose, 1985).

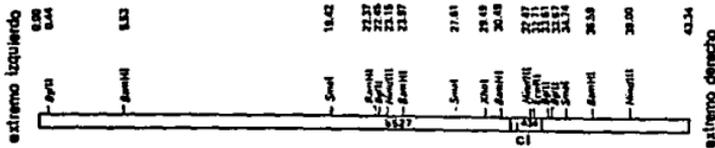


Fig. 4 Esquema del genoma del bacteriofago lambda gt10 que muestra los sitios de restricción para distintas endonucleasas (Nugent *et al.*, 1983)

Lambda gt10 se selecciona también por los marcadores ci^+ $imm\ 434$ y $ci^- imm434$ en cepas portadoras de la mutación $hflA150$, donde los fagos ci^- forman placas con la eficiencia normal, mientras que los ci^+ son reprimidos para que no se formen placas de lisis (Karn *et al.*, 1983). Lambda gt10 fue construido para proveer de crecimiento vigoroso al vector, optimizado para aceptar fragmentos de DNA un poco más cortos que otros vectores de inmunidad. Eso es importante porque durante el empaquetamiento, se empaquetan mejor las moléculas del tamaño de lambda silvestre (Maniatis *et al.*, 1978).

II.- OBJETIVOS.

Considerando la importancia de Lactobacillus amylovorus, como un organismo amilolítico, utilizado en procesos de ensilaje y por sus características de ser una bacteria láctica capaz de crecer fuera de un ambiente lácteo, se plantea la construcción de un banco para:

La preservación del material genético de L. amylovorus en vectores de clonación accesibles y estables.

La búsqueda ulterior eventual de genes de interés dentro del banco.

Objetivos particulares:

- Realizar la construcción de bancos genómicos en los vectores de clonación lambda gt10 y gt11.
- Deducir el grado de representatividad teórica, del genoma de L. amylovorus en los bancos construidos.
- Buscar la expresión de Beta-galactosidasa en los fagos recombinantes, como un parámetro de representación real en los bancos genómicos.
- Comparar los valores teóricos y reales en la representación de estos bancos en particular.

III.-METODOLOGIA

3.1.-MICROORGANISMOS.

Se utilizó la cepa de Lactobacillus amylovorus NRRL-B-4540 (ATCC), se cultivó en medio L.C.M. con glicina a 37°C sin agitación. Los derivados de lambda gt10 y gt11 fueron los vectores utilizados para la clonación de fragmentos de DNA (hasta 7Kpb.). Las cepas de E.coli utilizadas como hospederas de lambda gt10 y gt11 se muestran en la tabla IV con su respectivo genotipo.

3.2.-EXTRACCION DE DNA CROMOSOMAL

Se realizó la extracción del DNA de L. amylovorus que estaba creciendo en un medio L.C.M. con glicina y se controlaron las características de interés de la cepa para la preparación del inóculo, que se observó en cajas con almidón. Se observó la producción de amilasa por la presencia de halos de hidrólisis, y la acidificación del medio el cual se evidenció con púrpura de bromocresol como indicador. El procedimiento de extracción de DNA de bacterias lácticas (Chassy, 1990) que se siguió es el siguiente:

1) Sembrar un medio de L.C.M. de 500 ml. inoculado con un pre-cultivo en una dilución de 4/100. Medir la densidad óptica,

tomando 1 ml. en 9ml. de H₂O y leyéndose en una longitud de onda de 600 nm.

2) Cosechar las células por centrifugación a 6000 rpm durante 5 minutos y lavar con amortiguador "T". Se pueden continuar varios lavados con el mismo amortiguador. Finalmente se resuspenden en 15 ml del amortiguador "T".

3) Agregar 12.5 ml. de PEG (Polietileneglicol) y agitar con vortex.

4) Agregar lisozima en una concentración 100 ug por unidad de absorbancia del cultivo original.

5) Incubar a 37°C durante una hora.

6) Centrifugar para recuperar las células a 5000 r.p.m. durante 5 minutos.

7) Resuspender en amortiguador "TE" en 1/10 de volumen del cultivo original y mezclar bien.

8) Agregar 1/9 de SDS (5.5ml) e incubar a 37°grados centígrados durante 15 minutos.

9) Tratar con fenol (1 volumen), se agita por inversión en forma suave para no fragmentar el cromosoma, centrifugar a 10 000 r.p.m. por 5 min. y se recupera la fase acuosa.

10) Tratar con fenol-cloroformo (1/2 volumen de c/u) y agitar por inversión y centrifugar para recuperar la fase acuosa.

11) Agregar Acetato de amonio 7.5 M y mezclar.

- 12) Agregar al menos 2 1/2 volúmenes de etanol absoluto y dejar precipitar en hielo a -20°C.
- 13) Centrifugar 15 minutos a 10 000 rpm. y secar el botón al vacío. Disolverlo en amortiguador "TE" 12.5 ml.
- 14) agregar la RNAsa en una concentración final de 100 ug./ml. e incubar a 55°C durante una hora.
- 15) Ajustar la solución a 0.1 % SDS y agregar la proteinasa K en una concentración de 100 ug./ml. y se incuba a 55°C por una hora.
- 16) Limpiar la muestra con fenol, fenol-cloroformo, agitando sólo por inversión .
- 17) Centrifugar y recuperar la fase acuosa.
- 18) Agregar NaCl en 1/20 del volumen y agregar 2 1/2 volúmenes de Etanol absoluto para la precipitación del DNA, se puede dejar precipitar en hielo seco por 30 minutos o a -20°C toda la noche.

El DNA cromosomal obtenido puede guardarse a -20°C precipitado en etanol absoluto y los tubos a utilizar son centrifugados, el botón obtenido se lava (hasta 3 veces) con etanol al 70% para la eliminación de sales, finalmente se centrifuga y se retira el etanol y el botón se seca al vacío y se resuspende en amortiguador TE. Se realiza entonces la estimación del DNA por espectrofotometría (Maniatis et al, 1982).

3.3.-DIGESTIONES DE DNA CROMOSOMAL

Se realizaron digestiones totales y parciales del DNA cromosomal con la enzima de restricción EcoRI según técnicas descritas por el proveedor, de las cuales se seleccionaron ventanas de diferente tamaño molecular que comprenden tamaños de 4 kpb. a 6kpb. y de 6 kpb. a 10 kpb., separadas mediante una electrofóresis con agarosa al 1%. También se realizaron digestiones totales con BamHI y EcoRI para la separación de ventanas de 2 a 4 kpb., este material se recupera por electroelución, y se limpia con fenol cloroformo y después se precipita con etanol absoluto.

3.4.-ELECTROFORESIS

Se preparan los geles con agarosa del 0.7 a 1.2 %, disuelta en amortiguador TAE, para geles analíticos (35-45ml) y para geles preparativos (120 ml). Se deja gelificar y se sumerge en la cámara de electrofóresis con amortiguador TAE 0.5 X. Los pozos de carga se encuentren hacia el lado del cátodo, las muestras de DNA se mezclan con el amortiguador de carga (3-5 μ l) y se ponen en los distintos pozos. Las condiciones de migración se realizan con corriente variable y voltaje constante de 50 a 80 voltios dependiendo de las muestras. Al finalizar la migración,

se saca el gel de la cámara y se sumerge en la solución de bromuro de etidio durante 15 minutos y se observa en un transiluminador de U.V.

3.5.-ELECTROELUCION.

Se seleccionan las bandas o ventanas de DNA a electroeluir, se cortan del gel, y se ponen en las cámaras Nanotrap en amortiguador TAE 0.01X, se pone en cada extremo de la cámara un círculo de membrana de diálisis pretratada. La cámara de electroelución contiene en el lado del cátodo amortiguador TAE 2X, y en el ánodo contiene TAE 1X, acetato de sodio 3M. Los parámetros utilizados durante la electroelución fueron de corriente constante, limitada a 2.5 mA por cada cámara Nanotrap, el voltaje es variable, con voltaje inicial de 500 voltios, el cual al final de 60 min. puede descender hasta 100 voltios. El tiempo de elución fue de 90-120 minutos.

3.6.-VECTORES.

Los vectores utilizados para la construcción de las bibliotecas genómicas fueron los fagos lambda gt10 y lambda gt11. Los brazos de DNA de los vectores, se obtuvieron digiriendo con EcoRI y se desfosforilaron para tenerlos a una concentración de 0.25ug/ul. (Boehringer Mannheim Biochemica). En el caso de lambda

gt11, el gen lac-Z está interrumpido por el sitio EcoRI; y utilizando la bacteria hospedera adecuada pueden identificarse placas azules en las que se han religado los brazos de lambda, y placas claras que tienen interrumpido el gen lacZ por la inserción de un fragmento.

En lambda gt10 el sistema de selección de fagos que contienen un inserto requieren de una cepa bacteriana con una mutación hflA (alta frecuencia de lisogenia), donde se forman placas de lisis con fagos recombinantes unicamente .

3.7.-LIGACION

Se procede a la ligación de los fragmentos de cromosoma con los vectores, en una mezcla que contiene 0.5ug de DNA de lambda en una proporción de 0.3:0.5, 0.6:0.5, 0.9:0.5 µg con respecto a la concentración de los fragmentos cromosomales, la temperatura de incubación para la ligación con ligasa T4 fue llevada a cabo a 4° C durante 24 horas. Después se adicionó más ligasa T4 y la mezcla de ligación se dejó incubar durante otras 24 horas.

Después las ligaciones se valoraron por electroforesis en agarosa al 0.8%.

3.8.-EMPAQUETAMIENTO.

Algunas de las ligaciones se empaquetan con reacciones específicas de empaquetamiento para DNA del fago (Boehringer) que consiste en dos extractos: un extracto de sonificado y otro de lisado, que se complementan para una reacción de empaquetamiento de 0.5 µg de DNA (tabla VII). Ambos extractos se mantienen a -70°C, se manipulan en hielo, en el momento en que se va utilizar, y al descongelarse se adiciona el DNA y se mezcla evitando la formación de burbujas. La reacción se lleva a temperatura ambiente durante 2 horas y despues se diluye la mezcla de empaquetamiento con 500 µl de amortiguador SM. Enseguida, se adiciona glicerol al 30% para tener una concentración final de 15% . Esta mezcla se puede guardar a -70°C, y se deja una alicuota para titularse (Honh and Murray, 1977).

3.9.-SIEMBRA.

La preparación de las bacterias a infectar consiste en la siembra de un inóculo de medio LB con la adición de Sulfato de Magnesio (MgSO₄) 10 mmol y maltosa al 0.2%. Al crecer a *E. coli* en maltosa se induce la producción del receptor de lambda (Proteína Lam B), el cual es necesario para el transporte de maltosa, en tanto que los iones de magnesio ayudan en la adsorción del fago.

Las bacterias se incuban durante toda la noche y del cultivo resultante se obtiene en una dilución de 1:100 para inocularse en un matraz de 50ml. de LB (para E. coli C600 hflA se debe utilizar medio NZ) con sulfato de magnesio ($MgSO_4$) 10mmol y 0.2% de malto-sa. Se incuba a 37°C hasta alcanzar la fase estacionaria del crecimiento. Se pone en hielo y se centrifuga a 6000 r.p.m. durante 10 minutos y se resuspende el botón en 15 ml de sulfato de magnesio ($MgSO_4$) 10mmol/l. Las bacterias pueden servir para sembrar durante 3 días si se les conserva a 4°C o en baño de hielo (Maniatis et al, 1982).

3.10.-TITULACION.

Se prepara una serie de diluciones de la alícuota de la reacción de empaquetamiento en los órdenes de 10^2 , 10^4 , 10^6 y 10^8 . Se diluye con amortiguador SM y se mezcla 100 μ l de la dilución con 100 μ l de las bacterias preparadas para la infección. Se mezclan por "vortex" y se incuban durante 20 minutos a 37°C para la preabsorción de los fagos. En condiciones estériles se mezcla con 3 ml de agar suave Lb o Nz precalentado a 47°C, se asegura que el agar suave se equilibre a esta temperatura en un baño de 45 a 50°C (las células mueren si se exponen al agar suave a más de 65°C).

Se pone la mezcla sobre una caja con el medio respectivo (las cajas también deben estar precalentadas para evitar una gelificación prematura al vertir el agar suave) y se extiende por toda la superficie en una sobrecapa homogénea. Al agar suave para lambda gt11, al agarsuave se le adiciona 40 μ l de IPTG 100 mmol/l y X-Gal al 8.2% diluido en dimetilformamida. Al gelificar la sobrecapa de agar suave se incuba a 43' C toda la noche. Se preparan blancos al sembrar, donde se mezclan las células (de cada cepa que se este utilizando para infectar) y el agar suave, sin añadir la mezcla de empaquetamiento o la resuspensión de fagos. La aparición de placas, tarda de 6 a 8 horas de incubación, pero hasta después de 12 a 14 horas se pueden apreciar mejor los distintos tamaños de placas (Frischauf, 1987).

3.11.-AMPLIFICACION.

El principio de amplificación, es que cada fago empaquetado produce miles de clonas idénticas por una infección limitada del hospedero. La amplificación permite almacenar el banco en varias copias, que pueden utilizarse tantas veces como sea necesario (Vogeli and Kaytes, 1987).

Se siembra parte de la muestra de empaquetamiento, se agregan 5 ml de SM a las cajas con las placas obtenidas, y se dejan 2 hrs a temperatura ambiente o toda la noche a -4' C.

Se recupera la suspensión de fagos, y se centrifuga para retirar los restos celulares. Se agrega cloroformo y se guarda a 4°C en alicuotas de 1 ml.

3.12.-ALMACENAMIENTO DE FAGOS.

Las soluciones base de fagos son estables por algunos meses almacenados a 4°C en SM y conteniendo una pequeña cantidad de cloroformo

al 0.3% (Kaiser and Murray, 1985). También pueden almacenarse congeladas a -70°C con amortiguador SM y glicerol al 15% (Maniatis et al, 1982).

3.13.-PURIFICACION DE FAGOS.

Para cajas de 90mm., mezclar 1×10^6 pfu (unidades formadoras de placas) de bacteriófagos o 60-100 μ l de una placa de fago ya anteriormente diluida con SM, con 0.1 ml de bacteria hospedera de un cultivo fresco. Incubar a 37°C por 20 minutos.

Se siembra con LB agarosa suave al 0.6%, y se incuba a 42°C. Al ser remplazado el agar por agarosa, el DNA extraído es un sustrato adecuado para enzimas de restricción y ligasas. Al formarse las placas, agregar 5ml de SM, se raspa la capa de agarosa suave y se pone todo en un tubo de centrifuga. Mantener en agitación durante 1 h, y centrifugar a 10 000 rpm durante 10

minutos. Al recuperar el sobrenadante tratarlo con DNasa y RNasa, cada una en una concentración de $1\mu\text{g/ml}$ y $100\mu\text{g/ml}$ e incubar 30 minutos a 37°C . Este tratamiento degrada el DNA y el RNA bacteriano liberado durante la lisis. la viscosidad de la mezcla decrece. Después se agrega un volúmen de PEG-NaCl, para la precipitación de los fagos (Yamamoto and Alberts, 1970), se incuban en hielo durante 1 hora. Las partículas de fagos se recuperan por centrifugación a 12 000 r.p.m. durante 25-30 minutos, el botón formado corresponde a los fagos purificados.

3.14.-EXTRACCION DE DNA DE FAGOS

Minipreparación I.

Los fagos se resuspendieron en 1 ml de SM por cada 10 ml iniciales y se agitaron las partículas de fagos en vortex, se agregó SDS al 10% ($20\mu\text{l/ml}$), 0.2M Na EDTA, se calentó a 70°C por 5 minutos en un baño. Después se procede a un tratamiento con fenol, fenol-cloroformo y cloroformo. El fenol desnaturaliza las cápsides del fago y libera el DNA. Esta cápside proteica aparece como un precipitado blanco en la interfase. Se requiere agitación fuerte, y si en la segunda extracción, se nota que casi no se formó el precipitado, se continuo, si no, se realizó una tercera extracción con fenol. Se precipitó el DNA con isopropanol a -70°C por 20 minutos. Se centrifugó y se decanta el sobrena-

dante. El botón es lavado con Et-OH al 70%, se seca y después se vuelve a limpiar con fenol-cloroformo , pero esta vez se precipita con Et-OH absoluto.

Minipreparación II.

Los bacteriófagos se resuspendieron en amortiguador GTE (200 μ l) y se mezclaron con el amortiguador de lisis en un tubo de microcentrífuga, se mantuvo durante 5-10 minutos , y después se centrifugó durante 10 minutos en microcentrífuga, el sobrenadante se colectó y se trató con fenol, fenol-cloroformo. El DNA se precipitó con un volumen de isopropanol y posteriormente se lavó con Et-OH 70%, se secó y resuspendió en 20 μ l de TE (Bansal and Das, 1989).

3.15.-DETECCION DE ACTIVIDAD DE BETA-GALACTOSIDASA EN FAGOS.

Las cepas de *E. coli* Y1090 y Y1089 son Beta-Gal negativos (LacZ⁻), usualmente se utilizan para infectarse con lambda gt11. Para realizar la detección , primero se probaron las cepas que se infectarian con lambda gt10 bajo las mismas condiciones de siembra. Después, estas cepas se infectaron con muestras de los fagos recombinantes de los bancos construidos en lambda gt10,

Los bacteriófagos lambda gt-10 en su material genético no contienen secuencias que codifiquen para Beta-galactosidasa, por

tanto solo se expresaran placas azules en aquellos fagos recombinantes que lleven secuencias de Beta-galactosidasa de L. amylovo-
rug.

Para cada caja se utilizó un título de aproximadamente 1000 pfu, y se sembraron en cajas de NZ amine con X-Gal e IPTG, así mismo el agar suave contiene X-Gal e IPTG.

IV.-RESULTADOS.

Se obtuvieron preparaciones de DNA cromosomal de Lactobacillus amylovorus en una concentración de $3.6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se realizaron digestiones con diferentes enzimas de restricción como EcoRI, PstI, NcoI, BamHI, y HindIII (Fig. 5) en las cuales se observó que al digerir con EcoRI, NcoI y BamHI apareció una banda con un peso molecular del orden de megapares, copurificada con el DNA cromosomal (Fig. 5), la cual corresponde al megaplásmido reportado para esta cepa (Bohanon, 1985). Al realizarse, las digestiones parciales con EcoRI fue necesario reducir los tiempos de incubación hasta intervalos de 5 minutos durante la primera media hora (Fig. 6). El grado de parcialidad de la digestión se siguió en geles analíticos de agarosa, para la separación de los fragmentos; además se realizaron geles preparativos que contenían de 15 a 30 μg . de DNA en cada muestra (Fig. 7).

Las distintas ventanas de estas muestras se electroeluyeron, y se obtuvieron a una concentración de aproximadamente 3 μg de DNA (Fig. 8). Estas se utilizaron en ligaciones con los brazos de los vectores de lambda en distintas proporciones 0.3:0.5, 0.6:0.5, 0.9:0.5 (μg). En el gel de electroforesis no se aprecia un resultado claro de las ligaciones, dado el tamaño de la contrucción y la baja resolución del gel. Se procedió a elegir aquellas ligaciones en donde la ventana de DNA

RESULTADOS



Fig. 3 Digestión de DNA cromosomal de *L. AXELSSONII* con las endonucleasas Hind III (H), Pst I (P), Sma I (S), Eco RI (E), y Eco RV (V). (A) DNA cromosomal, (B) marcador de peso molecular en 1pb. (C) Banda correspondiente al amplificado en E, S y V.



Fig. 4 Digestión del DNA cromosomal de *L. AXELSSONII* con Sma I a intervalos de tiempo de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 60, minutos.



Fig. 7 Gel de electroforesis preparativo con digestiones paralelas de Sma I del DNA cromosomal de *L. AXELSSONII* a los tiempos de 15, 30, 45, y 60 minutos.



Fig. 8 Gel análisis con muestras de las distintas ventanas eluidas. Digestión DNA de *L. AXELSSONII* con Sma I, ventanal de 0-10 pb. (A), 0-5 pb. (B), 0-5 pb. (C) y D), 0-5 pb. (E), 0-10 pb. (F), y digestión del DNA cromosomal total (G).

cromosomal digerido desaparecía, aumentando claramente la intensidad de la banda que corresponde al brazo mayor del vector (Fig. 9)

CONSTRUCCIONES DE LOS DIFERENTES BANCOS.

Se obtuvieron bancos en lambda gt11 que tenían un título alto de fagos recombinantes (tabla VI), pero que presentaban gran inestabilidad de las construcciones. En estas construcciones, se reducía la eficiencia, es decir , que disminuía la proporción de fagos recombinantes respecto al total de placas.

tabla VI. TITULO DE LOS BANCOS DE *L. amylovorus*.

BANCO	TAM. INSERTO	TITULO (pfu)	EFICIENCIA
gt11-1	4-6 kpb.	3.8×10^4	78%
gt11-1'	4-6 kpb.	2.3×10^6	80%
gt11-2	4-6 kpb.	1.2×10^5	60%
gt11-3	4-10kpb.	9.6×10^4	89%
gt10-1	6-10kpb.	1×10^5	85%
gt10-2	6-10kpb.	1.9×10^5	79%
gt10-3	6-10kpb.	2.3×10^5	94%

(tam.) tamaño, (eficiencia) proporción de fagos recombinantes en la población total, gt-1', banco amplificado. Datos obtenidos en este trabajo.

Por eso se utilizó otro vector más estable, lambda gt10, con el cual se obtuvieron bancos con un título menor al de lambda gt11, pero que tenían una obtención más alta de recombinantes (tabla VI). Por sus características de ser un vector estable genéticamente lambda gt-10 se utilizó para la determinación de insertos. Además de eso, este vector fue muy útil para la detección de la expresión en cepas Lac Z positivas del gen de Beta-galactosidasa de *L. amylovorus*.

Para la determinación del tamaño de los insertos se tuvo que extraer DNA de placas aisladas. Aunque se utilizaron diferentes técnicas de extracción, con una de ellas, basada en la lisis con detergentes y calor, además de la precipitación de las proteínas del fago con acetato de Potasio, se logró el mejor rendimiento en la obtención de DNA (Fig.10). En estas preparaciones se observó la presencia de multímeros. Sin embargo, estas preparaciones fueron indigeribles por enzimas de restricción, por lo cual se adaptó una técnica que combina la precipitación selectiva del fago (Yamamoto and Alberts, 1970) con PEG-NaCl, lisis por calor en combinación con el buffer de lisis y extracción (Bansal and Das, 1982). En estas preparaciones aunque se obtuvo menos rendimiento en la cantidad de DNA, este si era digerible parcialmente por enzimas de restricción (Fig. 11).

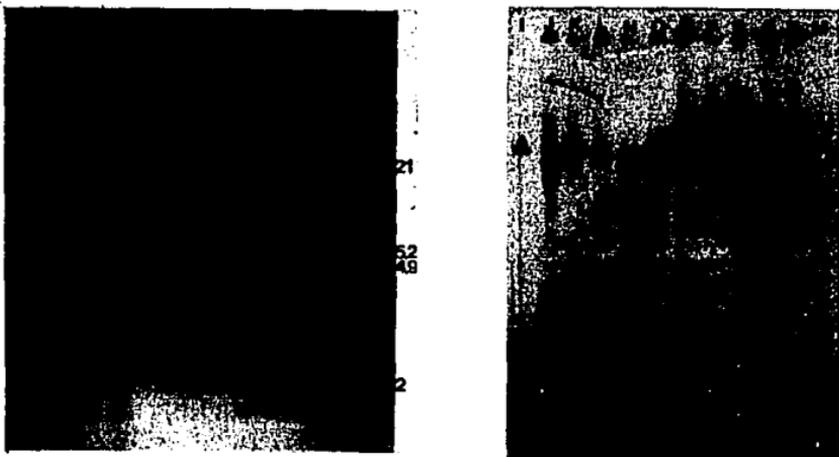


Fig. 9 Electrochromo de ligaciones en lambda, y circuitos de las ventanas cúbicas utilizadas en las ligaciones. El Sarcóides P.H. en 2^{da} Ed. A) Ventana de 4-10 2^{da} Ed., B) Ventana de 4-10 2^{da} Ed., C y D) Ventana de 4-10 2^{da} Ed., E) Ventana de 4-10 2^{da} Ed. F, G) Ligaciones en lambda 411 y fragmentos de 4-10 y 4-10 2^{da} Ed. H) Branca de lambda 411 cortada con Diodo.

Ligaciones en lambda 411: H) con luz estructural cortada con luz H. I y J) con ventana de 4-10 2^{da} Ed. con una relación de 2.5:10:100 del ventar. U) con una ventana de 4-10 2^{da} Ed.; V) Ventana de 4-10 2^{da} Ed. con fragmentos de 4-10 2^{da} Ed. Ligaciones en lambda 411: A) Ventana de 4-10 2^{da} Ed., B y C) Fragmentos de 4-10 2^{da} Ed.



Fig. 10 Micrográfico del DNA de fagos recombinantes de las líneas cuadradas en lambda 411; obtención de multicópias (C).

Además al permitir a las preparaciones mayor tiempo de hidratación se observó mejor digestión por parte de las enzimas de restricción.

REPRESENTATIVIDAD DEL BANCO.

Cálculo Teórico.

Los bancos obtenidos contienen en su número de fagos recombinantes (eficiencia) la representación de 64 a 392 veces el genoma total de Lactobacillus amylovorus (tabla VII), si se toma como un tamaño intermedio (3525 Kpb.) entre el cromosoma de Lactococcus lactis (Tanskanen *et al.*, 1990) y E. coli (tabla II y VII), además de tomar en cuenta que el tamaño promedio de los fragmentos clonados lo cual es de aproximadamente de 6200 pb.

tabla VII. EQUIVALENCIA DE LOS TITULOS DE LOS BANCOS CON OTROS PARAMETROS

BANCO	TITULO	#EQUIVALENTES GENOMA	"N° DE EC. 2 CONTENIDAS
gt11-1	3.8×10^4	64	6.62
gt11-2	1.2×10^5	204	20.9
gt11-3	9.6×10^4	163	16.7
gt10-1	1×10^5	170	17.42
gt10-2	1.9×10^5	324	33.1
gt10-3	2.3×10^5	392	40

(equivalente genoma) título X 6200 inserto promedio/3.5 X 10 tam. genoma (ec. 2) $n = \ln(1-P^T) / \ln(1-T)$. Datos obtenidos en este trabajo.

En el caso de Lactobacillus amylovorus se calcula con la probabilidad de clonación máxima de un fragmento específico y se estima en un número de 5.74×10^3 pfu recombinantes (según ecuación 2). Dicha población se encuentra contenida de 6.6 a 40 veces en los distintos bancos generados en Lambda gt-10 y gt-11.

REPRESENTACION DE LA ACTIVIDAD DE BETA-GALACTOSIDASA.

Se realizaron pruebas para actividad de Beta-galactosidasa en la cepa original (L. amylovorus) y se observó que las colonias adquirirían un color azul pálido después de 48 horas de incubación en medio mínimo para bacterias lácticas con X-Gal e IPTG.

Luego se realizó la búsqueda de la expresión del gen para Beta-Galactosidasa en las cepas LacZ negativas con fagos recombinantes de bancos generados con Lambda gt10 como vector.

Dentro de las placas aparecidas después de 12-24 horas, se detectó actividad de Beta-galactosidasa (placas azules) solamente después de 4 semanas. Se aislaron alrededor de 14 placas azules de un total aproximativo de 40,000 placas (40 cajas).

Esto corresponde a la clonación del fragmento que codifica para Beta-galactosidasa en una población de aproximadamente 2857 fagos recombinantes. De estos 14 clones solo cinco mantienen actividad de Beta-galactosidasa en la resiembra, después 2 a 4

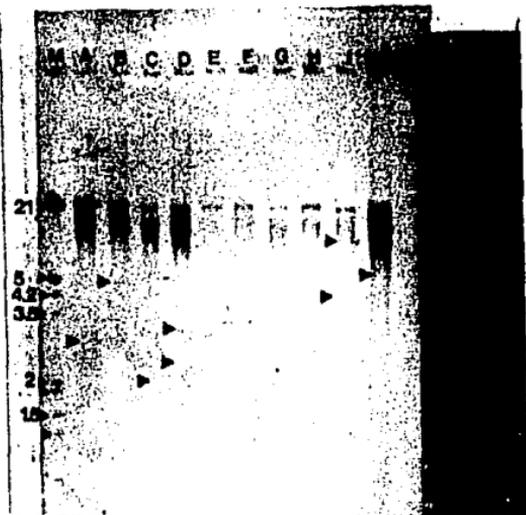


Fig. 11 Digestión de miniprep del DNA de *Saccharomyces cerevisiae* con la enzima *HindIII* en forma parcial. (I) fragmentos que corresponden a inserciones en las construcciones. (M) peso molecular en kpb.



Fig. 12 Digestión con *HindIII* de minipreparaciones del DNA de *Saccharomyces cerevisiae* con las construcciones de los clones obtenidos en la lambda gt10. (M) marcador de peso molecular en kpb., (I) lambda gt10-*cat* dig. con *HindIII*, (W) lambda gt10-*cat* dig. *HindIII*, (C) lambda gt10-*cat* y (P) lambda gt10-*cat* cortados con *HindIII*.



Fig. 13 Digestión con *HindIII* del DNA recombinante (M) con actividad de *Saccharomyces cerevisiae*, fragmentos del inserto (I). (W) lambda gt10 cortado con *HindIII*.

semanas . Por otra parte se observó mejor expresión de la Beta-galactosidasa durante la fase lisogénica del fago, que en la fase lítica. Esto se ha comprobado mediante la infección en cepas altamente lisogénicas (hflA150) y LacZ negativas. Estas cepas crecen como lisógenos a temperaturas de 37°C, tanto en medio mínimo como en medio LB con XGal e IPTG donde desarrollan colonias de un color azul pálido debido a la actividad de la enzima sobre el sustrato cromogénico. En estado lisogénico la actividad se manifiesta después de 24 horas de incubación.

Se aislaron las placas con actividad, de estas se recuperaron 5 que continuaban presentando actividad después de haber sido sembradas. También fueron crecidos como lisógenos y fueron inducidos a la fase lítica, momento en el cual se cosechó para la extracción del DNA, el cual fue después se digirieron con HindIII (Fig. 12), por este método se copurifica el plásmido de la cepa hospedadora. Uno de estos fagos que formaba placas de lisis fue amplificado en cajas con agarosa, y a partir de estas cajas fue purificado el fago y se realizó la extracción de DNA del fago, libre de DNA de la bacteria hospedadora, al ser digerido con EcoRI muestras 3 bandas correspondientes al inserto, que en su conjunto corresponden a 5314 pb (Fig. 13).

V.-DISCUSION

Dado el interés actual en el conocimiento de la biología molecular de bacterias lácticas, se requiere de técnicas que permitan un rápido avance en este campo.

En particular este trabajo muestra que es posible la utilización de fagos para la construcción de bibliotecas genómicas de bacterias lácticas, teniendo a E. coli como cepa hospedera.

La eficiencia de construcción de dichos bancos depende de varias condiciones como:

- La pureza del DNA, además de las propiedades específicas del genoma que pueden afectar la eficiencia de clonación (Maniatis et al, 1978).
- La obtención de ligaciones que permitan la formación de multímeros apropiados para el empaquetamiento.
- La calidad del extracto de empaquetamiento utilizado (tabla IV).
- La preparación adecuada de las células a infectar, además de las condiciones de siembra para cada cepa.

Este método de aislamiento de genes tiene muchas ventajas sobre otras técnicas. Toda una familia de genes evolutivamente relacionados puede aislarse con una mezcla de sondas en un solo paso de búsqueda en la biblioteca. Por otra parte el aislamiento

de un conjunto de clonas superpuestos que contienen parte del mismo gen, permite el estudio de secuencias alejadas de los extremos 5' y 3' por varias kilobases. En algunos casos las extensiones del DNA clonado permiten encontrar genes ligados al gen inicial. Una biblioteca permanente con clonas superpuestas facilita el aislamiento de otros genes que pudieran constituir parte de un operón. En este caso, los fragmentos de DNA genómico de L. amylovorus pueden ser utilizados para el estudio de la estructura fina de algunos genes. Conociendo el tamaño aproximado de los fragmentos de DNA de L. amylovorus clonados, se ha calculado que el número necesario de fagos recombinantes resulta ser de 5.74×10^3 (ecuación 2). Este es el número mínimo de recombinantes para la clonación de una secuencia en particular dentro de la biblioteca, con una probabilidad del 99%, y asumiendo que existe una sola copia de dicha secuencia.

En cuanto a la representación del banco, se puede decir que los bancos construidos en lambda gt 10 y gt 11 sobrepasan los requerimientos teóricos para la obtención de una biblioteca "completa". Sin embargo, en una mezcla de ligación existen otros factores que pueden intervenir en la probabilidad de ligación de diferentes fragmentos:

- El tamaño de los fragmentos a clonar.
- La existencia de secuencias que puedan resultar tóxicas o inestables en la cepa hospedera.

-La presión de selección de los fagos empaquetados in vitro dentro de la cepa hospedera.

Tomando en cuenta estos factores, no se garantiza totalmente que todos los genes se obtengan en la biblioteca. Sin embargo, las probabilidades son mayores si se sobrepasa varias veces el número de clonas requeridos.

Uno de los problemas observados, es la baja estabilidad que presentan fragmentos del DNA de L. amylovorus al ser clonados en lambda gt11, esto puede deberse por que los fragmentos grandes mantienen menor estabilidad en la construcción. Si se toma en cuenta, que la célula hospedera establece condiciones selectivas durante la duplicación del fago, es posible la delección de los insertos favoreciendo el predominio de los fagos con mayor estabilidad en cada resiembra. Para este caso, lambda gt-11 no fue un vector adecuado para la clonación de los fragmentos del DNA de L. amylovorus. Los fragmentos que se utilizaron resultan ser de tamaños grandes, que sobrepasan la capacidad del vector, y esto se manifiesta en la inestabilidad de estas construcciones.

En cambio, lambda gt-10 tiene relativamente una capacidad mayor para aceptar fragmentos ajenos a su genoma. También se encuentra documentado como un vector estable durante los procesos de duplicación.

Con la obtención de clonas para Beta-galactosidasa la tasa es de una clona en cada 2857 fagos recombinantes muestreados, y resulta ser menor a la estimada teóricamente. Esto puede ser debido a que el tamaño del genoma sea menor al estimado y a la complejidad de este genoma en particular. En eso se debe de también en cuenta que los genes de Beta-galactosidasa clonados en bacterias lácticas, y de localización cromosomal, se encuentran en fragmentos de 3000-3850 pb. (De Vos and Simons, 1988; Schmidt *et al.*, 1989), lo cual reduce aproximadamente a la mitad la estimación (2.87×10^3) originalmente realizada para fragmentos de 6000pb.

En lo que concierne a la determinación de insertos en el DNA de fagos, fue necesaria la adaptación de un método de extracción para pequeñas muestras. Aunque se encuentren varios métodos de extracción para minipreparaciones, aún se siguen reportando nuevos métodos para minipreparaciones que tienen por objetivo el obtener buenos rendimientos y/o tener preparaciones aptas para reacciones de digestión, y ligación. Se debe tomar en cuenta que un factor muy importante para la extracción de DNA de fagos es el de utilizar agarosa en lugar de agar en los medios de cultivo, ya que posiblemente existen sustancias inhibidoras de la actividad de endonucleasas, que pueden ser copurificadas con el DNA.

En cuanto al aislamiento de genes de Beta-galactosidasa, la continuación de la caracterización de estos genes resulta de gran importancia. Se han realizado pocas clonaciones de Beta-galactosidasa en bacterias lácticas. Estas clonaciones se han realizado en las especies de Streptococcus thermophilus, Leuconostoc lactis, y Lactobacillus bulgaricus (Herman and McKay, 1986; Schmidt *et al*, 1989; Silke *et al*, 1992). Los genes clonados de Beta-galactosidasa comprenden tamaños de 3850, 5800 y 3024 pb., dos de estos genes son de origen cromosomal, y sólo el de Leuconostoc lactis es de origen plasmídico. Existe un reporte de la clonación de Beta-galactosidasa de L. bulgaricus, perteneciente al mismo género que L. amylovorus, de este gen se conoce que comparte poca similitud en relación a genes de Beta-galactosidasa de otras bacterias (Schmidt *et al*, 1989).

La clonación de genes de Beta-galactosidasa puede servir para la construcción de vectores de clonación para bacterias lácticas. Como estas bacterias se encuentran frecuentemente en alimentos se requiere de vectores que contengan como marcadores genes de enzimas fácilmente detectables. Evitando así los riesgos de conjugación con bacterias patógenas al utilizar vectores que contengan resistencia a antibióticos. Al provenir este gen del género Lactobacillus es interesante para el estudio de la expresión de genes.

Uno de los problemas encontrados en los fagos recombinantes con actividad de Beta-galactosidasa, fue la baja expresión durante la fase lítica. Eso se puede deber a que el sitio de clonación se halla en el CI (gen represor de la transcripción de genes tardíos), el cual se expresa inmediatamente después de la infección, pero que está regulado a nivel transcripcional por acumulación de Cro, dejándose de transcribir los genes tempranos y medios, para la transcripción de los genes tardíos (fase lítica).

Una posibilidad es que la expresión del inserto está limitada debido a la corta vida lisogénica que tiene cuando se incuba a 42' C. También lambda gt10 tiene regiones de autoinmunidad, lo cual permite sólo la infección de un fago por bacteria, por lo tanto una sola copia del gen de Beta-galactosidasa por bacteria.

Se han reportado trabajos para la expresión de Beta-galactosidasa en sistemas de expresión de lambda, donde los vectores utilizados permiten la superinfección de 15 a 20 fagos por bacteria (Padukone et al, 1992). No se ha determinado si los genes de Beta-galactosidasa en bacterias lácticas se encuentran organizados en operones, pero parece ser que un circuito regulador actúa sobre estos, dado la respuesta a la inducción con lactosa, galactosa y en algunas bacterias lácticas con el IPTG (De Vos and Simons, 1988).

VI.- CONCLUSIONES

- Los bancos generados en lambda gt11 resultaron ser inestables al amplificarse. En cambio los bancos construidos en lambda gt10 fueron estables.
- La representación de dichos bancos sobrepasa con 142 veces los requerimientos teóricos propuestos para este trabajo.
- La representación en cuanto al número de clonas de Beta-galactosidasa hallados en los bancos, es aproximada a la tasa teórica establecida, considerando un tamaño del gen de 3000 a 3850 pb.
- La clonación del gen de Beta-galactosidasa de Lactobacillus amylovorus demostró que puede expresarse en E. coli.
- La clonación del gen de Beta-Galactosidasa sienta las bases para posteriores estudios a nivel molecular de Lactobacillus amylovorus con el banco obtenido.
- El gen de Beta-galactosidasa de Lactobacillus amylovorus se expresa en cepas de E. coli cuando se infecta con fagos que portan dicho gen.

VII.-APENDICE.

MEDIOS UTILIZADOS

MEDIO DE LURIA (LB)
Para 1 litro.

Bactotripton.10grs.
Extracto de levadura....5grs.
Cloruro de sodio.....5grs.

MEDIO NZ-AMINE
Para 1 litro.

NZ-amine.....10grs.
Cloruro de sodio.....5grs.
Extracto de levadura...5grs.
Casaaminoacidos.....1grs.
Sulfato de magnesio....2grs.

MEDIO L.C.M.
Para 1 litro

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$3.98grs.
Tripton.10grs.
Extracto de levadura...5grs.
Tripton.3grs.
 KH_2PO_43grs.
Acetato de Sodio.....1grs.
Citrato de Amonio.....1grs.
Solución salina.....5ml.
Tween 80.....1ml.
Glucosa 40%.....20ml.

Solución salina (100 ml.):

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$4grs
 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$0.68grs.
 $MnSO_4 \cdot H_2O$2.06grs.
Acido ascorbico....0.1grs.
Opcional: al añadir treonina al medio,
se hace en una concentración de 40mM.

Medio M.R.S.
Para un litro

Bactoproteosa peptona..10grs
Extracto de carne.....10grs.
extracto de levadura....5grs.
Tween 80.....1 ml.
Citrato de Amonio.....2grs.
Acetato de sodio.....5 grs.
Sulfato de magnesio....0.1grs.
Sulfato de manganeso..0.05grs.
Fosfato dipotásico.....2grs.

Para realizar cajas de estos medios se agregan 15 gramos de agar para un litro de medio, para top-agar se agrega solo 7.5grs. por litro de medio.

MEDIOS MINIMOS

MEDIO M-9
Para 1 litro

Na₂HPO₄.....6grs.
KH₂PO₄.....3grs.
NaCl.....0.5grs.
NH₄Cl₂.....1grs.

Se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza por autoclave, al enfriarse se agrega las siguientes soluciones previamente esterilizadas por filtración (glucosa) o autoclave:

MgSO₄1M.....2ml.
Glucosa 20%.....10ml.
CaCl₂ 1M.....0.1ml.

MEDIO M-17
Para 1 litro

Polipeptona o proteosa
peptona.....5grs.
Peptona de soya.....5grs.
Extracto de Levadura.....2.5grs.
Extracto de carne.....5grs.
Lactosa.....5grs.
Acido ascórbico.....0.5grs.
B-disodio glicerofosfato...19grs.
MgSO 7H₂O 1M.....1 ml.

AMORTIGUADORES.

TE	pH 7.4	10 mM Tris-Cl	pH 7.4
		1 mM EDTA	pH 8
	pH 7.6	10 mM Tris-Cl	pH 7.6
		1 mM EDTA	pH 8
	pH 8	10 mM Tris-Cl	pH 8
		1 mM EDTA	pH 8

TAE 50x para 1 lt:
 242 g Tris Base
 57.1 ml ácido acético glacial
 37.2 g Na EDTA·2H₂O pH 8.5

SM para 1 lt:
 50 mM Tris-HCl pH 7.5
 100 mM Na Cl
 8 mM Mg SO₄
 0.01 % gelatina (5 ml de una solución al 2%)

GTE 20 mM Tris-HCl pH 8
 50 mM glucosa
 10 mM EDTA

Amortiguador de Lisis
 10 mM Tris-HCl, pH 7.6
 0.8 M guanidina isotiocianato
 40 mM NaCl
 2 mM EDTA
 0.4 % Laurilsarcosine
 28 mM β mercaptoetanol
 4 M Acetato de amonio

* Se esterilizan en autoclave.

Amortiguador para DNasa I (2000 u/mg) 5-15mg/ml en:
 20 mM Acetato de sodio pH 6.5
 5 mM CaCl₂
 0.1 mM PMSF
 50 % v/v glicerol.
 Se almacena en alicuotas a -20 °C.

Amortiguador de carga para electrofóresis de DNA.
 10 % Ficoll
 0.05 % Azul de bromofenol
 0.25 % Naranja G
 0.5 % SDS

Se hace una solución de 100 ml y se alicuota en 20 ml.

SOLUCIONES.

- PEG/NaCl 20 % w/v Polietilenglicol (MW 8,000)
 2 M Na Cl
 Se lleva al volumen total con amortiguador SM y se guarda a 4°C.
- EDTA 0.5 M
 Se disuelve 186.1 g Na EDTA · 2H₂O en 700 ml de H₂O, se ajusta a pH 8 con 10 M NaOH (aprox. 50 ml) y se agrega H₂O hasta aforar el volumen total.
- Bromuro de Etidio.
 Se disuelve 3mg/ml de bromuro de etidio en buffer TE y se mezcla. Se guarda a 4°C en la obscuridad.
- RNasa Disolver RNasa pancreática en una concentración de 10mg/ml en 10mM Tris-Cl pH 7.5 y 15 mM NaCl. Hervir durante 15 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente, se almacena en alícuotas a -20°C.
- Proteinasa K. Solución Base. 20 mg/ml en H₂O, se almacena a -20°C. La concentración en la solución de trabajo es de 50 µg/ml.

VIII.-BIBLIOGRAFIA CITADA.

- Adler-Nissen, J. 1987. Newer uses for microbial enzymes in food processing. Tib. Tech. 5: 170-174.
- Amer, M.A. and A. M. Lammerding. 1983. Health maintenance benefits of cultured dairy products. Cult. Dairy Prod. J. 18:2,6-10.
- Archibald, F.S. 1986. Manganese; its acquisition by an function in the lactic acid bacteria. CRC Crit. Rev. Microbiol. 13:63-109.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Sedman, J.G., Smith, J.A. and K. Struhl. 1991. Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. N.Y.
- Bansal, O.B. and R.H., Das. 1989. A simple and rapid method for the isolation of plasmid and lambda phage DNAs. Nucl. Acid. Res. 17:23,10129.
- Batish, V.K., Grover, S. and R., Lal. 1989. Screening lactic starter cultures for antifungal activity. Cult. Dairy Prod. J. 24: 21-25.
- Becker, A. and H. Murialdo. 1990. Bacteriophage Lambda DNA: The beginning of the end. J. Bacteriol 172: 2819-2824.
- Blattner, F.R., Williams, B.G., Blechl, A.E., Denniston-Thompson, K., Faber, H.E., Furlong, L.E., Gruwald, D.J.,

- Keifer, D.O., Moore, D.D., Schum, J.W. and D. Smithies. 1977. Charon phages; safer derivatives of bacteriophage lambda for DNA cloning. *Science*. 196: 161-169 .
- Bogdanov, I.G. and P.G. Dalev. 1975. Antitumor glycopeptides from Lactobacillus bulgaricus cell wall. *FEBS Lett.* 57: 259-261.
- Bohanon, M.J. 1985. Application of biotechnology to lactobacilli involved in starch fermentations. University of Minnesota, St. Paul. M.S. thesis, 1-91.
- Burgess-Cassler, A. and S. Imam. 1991. Partial Purification and Comparative characterization of alfa-amylase secreted by Lactobacillus amylovorus. *Curr. Microbiol.* 23: 207-213.
- Castillo, C.A., Gómez, M.S., Gasparian, S. and J. Morlon-Guyot. 1993. Comparison of amylolytic properties of Lactobacillus amylovorus and of Lactobacillus amylophilus. *Applied Microbiol. and Biotechnol.* 40: 23, 266-269.
- Chassy, B.M. 1990. Comunicación personal.
- Clarke, L. and J. Carbon. 1979. Selection of specific clones from colony banks by supressions or complementation test. *Methods. Enzymol.* 68: 396-408.

BIBLIOGRAFIA

- Chauthaiwale, V. M., Therwath, A. and V.V. Deshpande. 1992. Bacteriophage lambda as a cloning vector. Microbiol. Rev. 56:4, 577-591.
- Cheng, P., Mueller, R.E., Jaeger, S., Bajpai, R., and E.L. Ianotti. 1991. Lactic acid production from enzyme thinned corn starch using Lactobacillus amylovorus. J. Ind. Microbiol. 7: 27-34.
- Daeschel, H.A. 1989. Bacteria for use as food preservatives. Food Technol. 43: 1, 164-166.
- De Vos, W.M. and G. Simons. 1988. Molecular cloning of lactose genes in dairy lactic streptococci: the phospho-B-galactosidase genes and their expression products Biochimie. 70: 461-473.
- Esser, P.C., Lund, C. and J. Clemmensen. 1983. Antileukemic effect in mice from fermentation products of Lactobacillus bulgaricus. Milchwissenschaft. 38: 257-260.
- Fraxier, W.C. and D.C. Westhoff. 1989. Food Microbiology. Mc Graw Hill. New York. 45-50.
- Frischauf, A.M. 1987. Construction and characterization of a genomic library in lambda. Methods. Enzymol. 152: 17, 190-199.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Gasson, M.J. 1993. Progress and potencial in the biotechnology of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12: 3-20.
- Giraud, E., Brauman, A., Keleke, S., Leong, B. and M. Raimbault. 1991. Isolation and physiological study of an amylolytic strain of Lactobacillus plantarum. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 379-383.
- Hammes, W.P. 1990. Bacterial starter cultures in food production. Food Technol. 4:1, 383-397.
- Hammes, W.P., Bantleon, A. and S. Min. 1990. Lactic acid bacteria in meat fermentation. FEMS Microbiol. Rev. 87: 165-174.
- Herman, E.R. and L.L. McKay. 1986. Cloning and expression of the Beta-D-Galactosidase gene from Streptococcus thermophilus in Escherichia coli. App. Environ. Microbiol. 52: 1, 45-50.
- Hill, I.R., Kenworthy, R. and P. Porter. 1970. Studies on the effect of dietary lactobacilli on the intestinal and urinary amines in pigs in relation to weaning and post-weaning diarrhea. Res. Vet. Sci. 11: 320-326.

- Hohn, B. and K. Murray. 1977. Packaging recombinant DNA molecules in to bacteriophage particles in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 8, 3259-3263.
- Hughh, T.V., Young, R.A. and R.W. Davis. 1985. Constructing and screening cDNA libraries in lambda gt10 and lambda gt11. 49-69. In Kaiser, K. and N.E. Murray. DNA cloning: a practical approach. Glover D.M. Ed. IRL Press. N.Y.
- Imam, H.S., Burgess-Cassler, A., Cote, G.L., Gordon, S.H. and F.L. Baker. 1991. A study of corn starch granule digestion by an unusually high molecular weight alfa-amylase secreted by Lactobacillus amylovorus. Curr. Microbiol. 22: 365-370.
- Imam, S.H. and J.M. Gould. 1990. Adhesion of an amylolytic Arthrobacter sp. to starch-containing plastic films. Appl. Environ. Microbiol. 56: 872-876.
- Imam, H.S. and R.E. Harry-Onkuru. 1991. Adhesion of Lactobacillus amylovorus to insoluble and derivatized corn starch granules. Appl. Environ. Microbiol. 57:4, 1128-1123.
- Jendrisak, J., Young, A.R. and J.D. Engel. 1987. Cloning cDNA in to lambda gt10 and lambda gt11. Methods in Enzymol. 152: 359-371.

- Jore, J. P. and J. De Parais. 1993. Studies on the alfa-amylase of Lactobacillus amylovorus as model for heterologous protein secretion by lactobacilli. FEMS Microbiol. Rev. 12: 26-38.
- Kaiser, D. 1971. Lambda DNA replication. 195-210 p. In Hershey, A.D. Bacteriophage lambda. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Kaiser, K. and N.E. Murray. 1985. DNA cloning: a practical approach. Glover, D.M. ed. IRL Press. N.Y. 1-47 p.
- Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol. 49: 209-224.
- Kandler, O. and N. Weiss. 1986. Genus Lactobacillus. in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. P.H.A. Sneath Williams and Wilkins Co. Baltimore. Vol.2 p. 1209
- Karn, J., Brammer, S. and L. Bennett. 1983. New Bacteriophage Lambda vector with positive selection for cloned insert. Methods. Enzymol. 101: 3-9.
- Kroger, M., Kurmann, J.A. and J.L. Rasic. 1982. Fermented milks: past, present, and future. Food Technol. 43:1, 93-99.
- Koch, H. and H. Röper. 1988. New industrial products from starch. Starch/Stärke. 40: 121-130.

- Lin, C. Bolse, K.K. Brent, B.F. and D.Y. Fung. 1992. Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 375-387.
- Lindgren, S. and O. Refai. 1984. Amylolytic lactic acid bacteria in fish silage. *J. Appl. Bacteriol.* 57: 221-228.
- Maniatis, T., Hardison, R.S., Lacy, E., Laver, J., O'Connell, C. and D. Quon. 1978. The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. *Cell.* 15: 687-701.
- Maniatis, T. Fritsch, E.F. and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor, New York.
- Mann, G.V. 1977(a). Hypocholesterolemic effect of milk. *Lancet.* 2: 556 (letter to the editor).
- Mann, G.V. 1977(b). A factor in yogurt which lowers serum cholesterol in man. *Atherosclerosis.* 26: 335-340.
- Murray, N.E. and K. Murray. 1974. Manipulations of restriction targets in phage lambda to form receptor chromosomes for DNA fragments. *Nature* 251: 476-481.
- Nakamura, L.K. and C.D. Crowell. 1979. Lactobacillus amylophilus, a new starch-hydrolyzing species from swine waste corn fermentation. *Dev. Ind. Microbiol.* 20: 531-540.

- Nakamura, L.K. 1981. Lactobacillus amylovorus a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31: 56-63.
- Olson, N.P. 1990. The impact of lactic acid bacteria on chesse flavor. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 131-148.
- Old, R.W. and S.B. Primrose. 1985. Principios de manipulación genética. Acribia. España. 375 pp.
- Padukone, N., Peretti, S.W. and D.F. Ollis. 1992. Analisis of productivity in lysis deficient lambda expression systems. *Biotechnol. and Bioeng.* 40: 6, 697-704.
- Perbal. 1988. A practical guide to Molecular cloning. Wiley-Interscience. New York.
- Rambach, A. and O. Toillais. 1974. Bacteriophage lambda having EcoRI endonuclease site only in the non essential region of the genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71: 3927-3939.
- Reddy, S.G. and K.M. Shahani. 1971. Isolation of an antibiotic from Lactobacillus bulgaricus. *Journal of Dairy Science.* 54: 748.
- Rowland, I.R. and P. Grasso. 1975. Degradation of N-nitrosaminas by intestinal bacteria. *Appl. Microbiol.* 29: 7-12.
- Sabine, D.B. 1963. An antibiotic-like effect to Lactobacillus acidophilus. *Nature* 199: 811.

- Sandfor, R.N. and G.S. Elgar. 1992. A novel method for rapid genomic walking using lambda vectors. *Nucleic Acids. Research.* 20: 17, 4665-4666.
- Scheirlinck, T., Mahillon, J., Joos, H., Dhaese, P. and F. Michiels. 1989. Integration and expression of alpha-amylase and endoglucanase genes in the Lactobacillus plantarum chromosome. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 9, 2130- 2137.
- Scheirlinck, T., De Meutter, J., Arnaut, G., Joos, H., Claessens, M. and F. Michiels. 1990. Cloning and expression of cellulase and xylanase genes in Lactobacillus plantarum. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 534-541.
- Schmidt, B.F., Adams, R.M., Requadt, C., Power, S., and S.E. Mainzer. 1989. Expression and nucleotide sequence of the Lactobacillus bulgaricus Beta-galactosidase gene cloned in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 171: 2, 625-635.
- Seed, B., Parker, R. and N. Davidson. 1982. Representation of DNA sequences in recombinant DNA libraries prepared by restriction enzyme partial digestion. *Gene.* 19: 201-209.
- Shahani, K.M., Vakil, J.R., and A. Kilara. 1976. Natural anti-biotic activity of Lactobacillus acidophilus and L. bulgaricus. *Cult. dairy Prod. J.* 11: 14-17.

- Schmidt, B.F., Adams, R.M., Requadt, C., Power, S. and S.E. Mainzer. 1989. Expression and nucleotide sequence of the Lactobacillus bulgaricus Beta-galactosidase gene cloned in Escherichia coli. J. Bacteriol. 171:2, 625-635.
- Silke, D., Stevens H., Van Riel, M., Simons, G. and W. H. De Vos. 1992. Leuconostoc lactis Beta-galactosidase is encoded by two overlapping genes. J. Bacteriol. 174: 13, 4475-4481.
- Simone, C., De Bianchi, S.B., Negri, R., Ferrasi, M., Baldinelli, L. and R. Vesely. 1986. The adjuvant effect of yogurt on production of gamma interferon by Con A-stimulated human peripheral blood lymphocytes. Nutr. Rep. Int. 33: 419-433.
- Sribir, S. and S.L. Chakrabarty. 1984. Amylase from Lactobacillus cellobiosus isolated from vegetable wastes. J. Ferment. Technol. 62: 5, 407-413.
- Sribir, S. and S.L. Chakrabarty. 1987. Amylase from Lactobacillus cellobiosus D-39 isolated from vegetable wastes: characteristics of immobilized enzyme and whole cell. Enzyme Microb. Technol. 9: 112-116.
- Starr, M.P., et al. 1981. The Prokaryotes. Springer Verlag Berlin Heiderlberg. New York. Vol. 2 : 1653-1679.

- Steele ,I.L., and G. Ünlü. 1992. Impact of lactic acid bacteria on chesse flavor development. Food Technol. 46:11, 128-135.
- Stoker, N.G., Grant, K. A., Dockrell, H.M., Howard, C.R., Jovy, N.F. and K.P.W.J. McAdam. 1989. High level expression of genes cloned in phage lambda gt-11. Gene. 78: 93-99.
- Tanskanen, E.L., Tulloch, D.L., Hillier, A.J. and B.E. Davidson. 1990. Pulsed field electrophoresis of SmaI digest of lactococcal genomic DNA, a novel method of strain identification. Appl. Environ. Microbiol. 56: 10, 3105-3111.
- Thomas, M., Cameron, J.R. and R.W. Davis. 1974. Viable molecular hybrids of bacteriophage lambda and eukaryotic DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 71: p.4579-4583.
- Tseng, C. and Montville. 1993. Metabolic regulation of end product distribution in lactobacilli: causes and consequences. Biotechnol. Prog. 9: 113-121.
- Venema, G. and J. Kok. 1987. Improving dairy starter cultures. Trends Biotechnol. 5: 144-149.
- Vogeli, G. and P.S. Kaytes. 1987. Amplification, Storage y Replication of libraries. Method. Enzymol. 152: 44, 407-415.

- Yamamoto, K.R. and B.M. Alberts. 1970. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large scale virus purification. *Virology*. 40: 734-744.
- Young, R.A. and R.W. Davis. 1983. Yeast RNA polymerase II genes: isolation with antibody probes. *Science*. 222: 778-782 .
- Zinsel, J., Ma, P.H. and J.T. Beatty. 1992. Derivation of a mathematical expression useful for the construction of complete genomic libraries. *Gene*. 120: 89-92.