



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

LOCALIZACION DEL SITIO SS ori Y sti DEL PLASMIDO pJV1 DE Streptomyces phaeochromogenes.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: BI O L O G O PRESENTA: ARISTIDES III SAMPIERI HERNANDEZ



DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS SERVIN GONZALEZ



288514

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Localización del sitio ss ori y sti del plásmido pJVI
de *Streptomyces phaeochromogenes*.

realizado por Aristides III Sampieri Hernández

con número de cuenta 08955272-2 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Luis Servín González *Luis Servín González*

Propietario M. en C. Gabriela González Cerón *Gabriela González Cerón*

Propietario M. en C. Benito Estrada Mena *Benito Estrada Mena*

Suplente Dr. Guillermo Gosset Lagarda *Guillermo Gosset Lagarda*

Suplente Dr. Enrique Merino Pérez *Enrique Merino Pérez*

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Edna María Suárez Díaz
Consejo Departamental de Biología

Dra. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

DEDICATORIA

Dedico esta tesis y agradezco muy profundamente la labor que especialmente tres personas se tomaron hacia conmigo.

A mi madre Irma Hernández Guillen.

A mi madre Ma. Sonia Sampieri Lacayo.

A mi amigo D. D.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los honorables miembros del Jurado, Dr. Luis Servín González, M. en C. Gabriela González Cerón, M. en C. Benito Estrada Mena, Dr. Guillermo Gosset Lagarda y Dr. Enrique Merino Pérez, quienes revisaron esta tesis, por sus valiosos comentarios y sugerencias para el mejoramiento de la misma.

Agradezco el apoyo que me han ofrecido de manera incondicional mis abuelos, tíos, primos y mi hermano Emmanuel Sampieri Hernández.

Agradezco el apoyo y esfuerzo de mi padre J. Aristides Sampieri Lacayo y mi tío Jorge Aranda Almazán

Agradezco a mis grandes amigos y colegas que han estado siempre conmigo así en las buenas como en las malas, Martín Peralta Gil, Gabriel Sandoval López y Takuya Nishigaki.

Agradezco a mis compañeros y amigos del laboratorio de forma muy especial a Victor Rivelino Juárez González y Clementina Castro.

Agradezco a mis maestros de ajedrez quienes me han demostrado el valor de una pieza en la vida, Grand Master Marcel Sisniega Campbell e Ing. Alfonso Ferríz

Agradezco a todos mis instructores de buceo por permitirme conocer el mundo del silencio.

Agradezco a todos mis maestros que han formado en mí una persona siempre con ganas de saber más.

Agradezco de manera muy especial al Dr. Luis Servín González por su admirable labor de paciencia y comprensión hacia mí, así como su gran profesionalismo, inteligencia y sabiduría.

“Tened en mente que las cosas maravillosas que se aprenden en las escuelas son el trabajo de muchas generaciones, producidas por el esfuerzo entusiasta y la labor infinita en todos los países del orbe. Todo esto se pone en vuestras manos como herencia para que la recibáis, honréis, aumentéis y, un día, con toda vuestra fe, la traspaséis a vuestra descendencia. Esta es la forma en que nosotros los mortales logramos la inmortalidad en las cosas permanentes que creamos en común.”

Dr. Albert Einstein

RESUMEN	1
1.- INTRODUCCION	3
1.1- Generalidades de <i>Streptomyces</i>	3
1.2- Plásmidos en <i>Streptomyces</i>	5
1.3- Mecanismo del Circulo Rodante (RCR)	7
1.4- Plásmido pIJ101	10
1.5- Plásmido pSN22	14
1.6- Plásmido pJV1	16
2.- HIPOTESIS	21
3.- OBJETIVOS	22
4.- MATERIAL Y METODOS	23
4.1- MEDIOS	23
4.2 AISLAMIENTO DE COLONIAS EN PLACAS DE AGAR	26
4.3 PURIFICACION DE PLASMIDOS	28
4.4 TRANSFORMACION DE <i>Streptomyces sp.</i> y <i>Escherichia sp.</i>	36
4.5 HIBRIDACION DNA-DNA TIPO SOUTHERN	39
5.- RESULTADOS	41
5.1 Construcción del plásmido pB72	41
5.2 Construcción del plásmido pB50	43
5.3 Construcción del plásmido pB57	43
5.4 Construcción del plásmido pB61	43
5.5 Construcción de los plásmidos pB83 y pB84	43
5.6 Construcción de los plásmidos pB87 y pB88	44
5.7 Construcción de los plásmidos pB85 y pB86	44
5.8 Construcción del plásmido pB58	46
5.9 Construcción del plásmido pB2	46
5.10 Construcción del plásmido pB62	46
5.11 Construcción del plásmido pB45	46
5.12 Localización del sitio de inicio de la síntesis de cadena sencilla (ss ori) del plásmido pJV1	46
5.13 Determinación del fenotipo <i>sti</i> del plásmido pJV1	52
6.- DISCUSION	57
7.- CONCLUSIONES	60
8.- PERSPECTIVAS	61
9.-BIBLIOGRAFIA	62

INDICE DE FIGURAS**PAGINA**

I.	Figura 1. Ciclo de vida de <i>Streptomyces spp.</i>	4
II	Figura 2. Replicación por el mecanismo del círculo rodante (RCR)...	8
III	Figura 3. Plásmido pIJ101.....	11
IV	Figura 4. Plásmido pSN22.....	15
V	Figura 5. Plásmido pJV1.....	19
VI	Figura 6. MCS del plásmido pB72.....	42
VII	Figura 7. Derivados del plásmido pJV1.....	45
VIII	Figura 8. Hibridación tipo Southern.....	48
IX	Figura 9. Hibridación tipo Southern.....	49
X	Figura 10. Hibridación tipo Southern.....	50
XI	Figura 11. Hibridación tipo Southern.....	51
XII	Figura 12. Fenotipo de furte incompatibilidad (<i>sti</i>).....	53
XIII	Figura 13. Alineamiento de la región ScaI-NcoI de pJV1 con pIJ101..	54
XIV	Figura 14. Alineamiento de la región ScaI-NcoI de pJV1 con pSN22...	55
XV	Figura 15. Alineamiento de pJV1 con pIJ101 y pSN22.....	56

RESUMEN

Los *Streptomyces* son bacterias Gram positivas, aeróbicas. Durante el crecimiento en agar, su ciclo de vida es similar a la diferenciación y desarrollo asexual en los hongos filamentosos. El contenido de guaninas y citocinas del DNA de *Streptomyces* es muy alto (70-75 %) y es característico de este género de bacterias..

En los plásmidos de *Streptomyces* relativamente pequeños de tamaño de aproximadamente 10 Kpb, parece ser que el modo de replicación de estos plásmidos es por medio de la replicación por el círculo rodante (RCR).

La replicación por círculo rodante comienza con la síntesis de la proteína de replicación (Rep), la cual reconoce el origen de replicación ds ori y hace un corte en la cadena positiva, esta es desplazada y la cadena negativa se va sintetizando una nueva cadena complementaria por la extensión de un extremo 3'OH terminal. La proteína Rep crea un segundo corte en el origen ds ori al terminar un círculo de replicación religa el plásmido. Dando como resultado un plásmido de cadena doble (dsDNA) y un plásmido intermediario de cadena sencilla (ssDNA).

La síntesis de la cadena negativa del plásmido intermediario de cadena sencilla (ssDNA), es iniciada por las polimerasas celulares reconociendo a un segundo origen de replicación conocido como origen ss ori de replicación.

En el presente trabajo se analizó DNA total de *Streptomyces lividans* por medio de hibridación tipo Southern en condiciones no desnaturalizantes. Utilizando varios derivados del plásmido pJV1 se observó que en un fragmento de *ScaI-NcoI* colocado en su orientación natural no acumula intermediarios de cadena sencilla, demostrando que este sitio es el origen ss ori de pJV1.

En los plásmidos de *Streptomyces* existe un fenómeno llamado incompatibilidad fuerte, en dicho fenómeno, un par de plásmidos pueden coexistir si los dos plásmidos poseen un sitio *sti* en su orientación correcta (Sti +) o ambos han perdido su sitio *sti* o ambos poseen

su sitio *sti* en la posición reversa (Sti -). Por otra parte plásmidos Sti + y plásmidos Sti - no pueden coexistir, en este caso el plásmido Sti + es retenido en la célula hospedera y el plásmido Sti - se pierde.

Se transformó una cepa de *Streptomyces lividans* que contenía un derivado de pJV1 (el cual no posee el sitio *ss ori*) con diferentes derivados de pJV1, para observar si algunos derivados contenían el sitio *sti*. Se encontró que el sitio *ss ori* (fragmento de *ScaI-NcoI*) es el responsable del fenotipo de incompatibilidad fuerte.

Se han caracterizado completamente tres plásmidos pJ101, pSN22 y pJV1. En el presente trabajo se demostró que el plásmido pJV1 de *Streptomyces phaeochromogenes*, se replica por medio del mecanismo de círculo rodante y se localizó el sitio de replicación *ss ori*, así como se demostró que este sitio funciona como el sitio de incompatibilidad fuerte (*sti*) del plásmido pJV1 de *Streptomyces phaeochromogenes*.

INTRODUCCION

Generalidades de *Streptomyces*

Los *Streptomyces* son bacterias Gram positivas, que crecen bajo condiciones aeróbicas; su hábitat natural es el suelo. Durante el crecimiento en agar, se diferencian dos tipos de células; células largas que crecen en forma de sincisio y que es el micelio estratificado que posteriormente da lugar al micelio aéreo, el cual esporula. Esto es similar a la diferenciación en el crecimiento y desarrollo asexual en los hongos filamentosos (Figura 1). Este tipo de desarrollo morfológico complejo es característico en todo el grupo de los Actinomicetos, que incluyen más de 30 géneros de bacterias Gram positivas, que muestran filamentos, racimos o células con morfología irregular (Gusek y Kinsella, 1992).

El término *Actinomyces* aparece en la literatura en 1887, en el tiempo cuando L. Pasteur y R. Koch se encontraban fijos en su actividad de investigación. Este nombre significa en griego "hongo rayo" y sugiere que estos microorganismos fueron observados, cultivados y estudiados como hongos en aquellos días. (Hopwood *et al.*, 1986, Gusek y Kinsella, 1992). (Figura 1).

Por ahora su posición taxonómica está bien establecida en el reino Procariota; esta clasificación se basa en el concepto propuesto por Chatton, cuando en 1937, clasificó a los microorganismos de acuerdo a su organización celular general. La clasificación de *Streptomyces* se basa en su organización celular, la presencia de lípidos característicos, azúcares y quinonas (Williams *et al.*, 1983). El contenido de guaninas y citocinas del DNA de *Streptomyces* es muy alto (70-75 %) y es característico de este género de bacterias.

La gran diversidad química de metabolitos secundarios en *Streptomyces* ha hecho de este género el objeto de intensos estudios en universidades y laboratorios industriales en todo el mundo por su morfología, características fisiológicas, la composición de los constituyentes celulares, como la pared, enfatizando la biología relacionada con la producción de antibióticos y el uso de *Streptomyces* en la industria de la fermentación permitiendo el estudio multidisciplinario en la investigación.

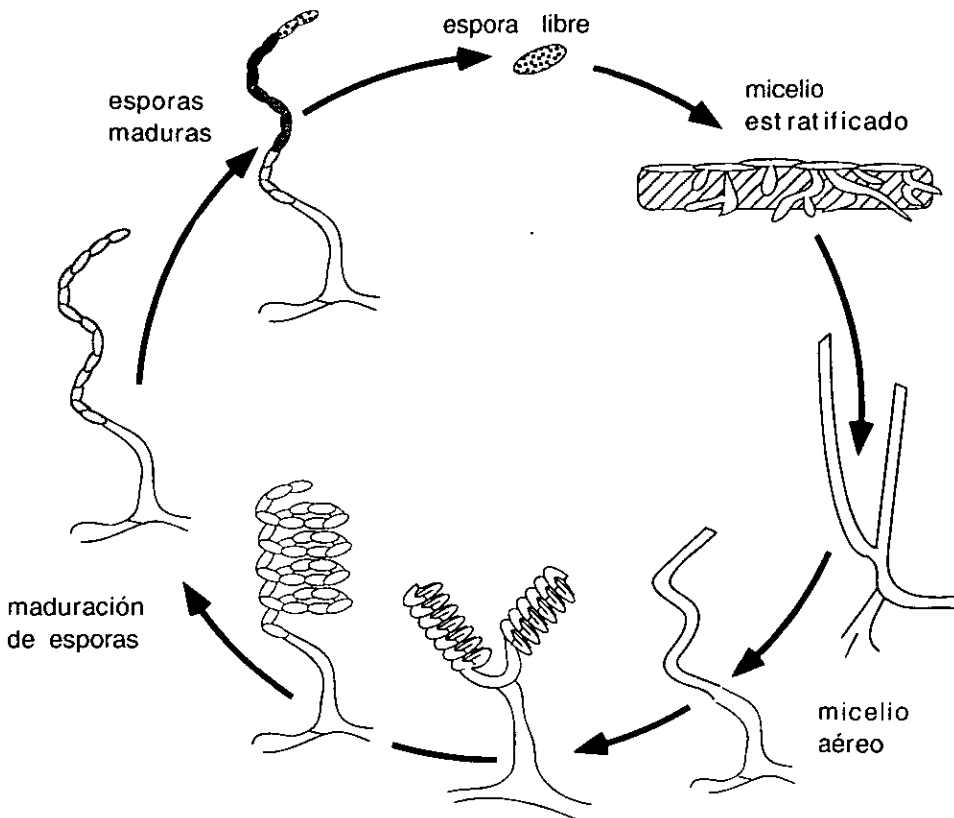


Figura 1: Ciclo de vida de *Streptomyces* spp.

tomado de Chater, 1998.

El conocimiento de las propiedades moleculares de *Streptomyces* es importante por su capacidad de elaborar una gran variedad de antibióticos. Es usual observar que durante un barrido "screening" de estudios de antibióticos de cepas aisladas del suelo más del 50% de éstas producen antibióticos. Esta es una de las razones de porqué *Streptomyces* y otros Actinomicetos atraen gran atención para aplicaciones microbiológicas. La actinomicina fue el primer antibiótico aislado de un *Streptomyces* por Waksman y Woodruff en 1940, seguido por el primer antibiótico antituberculosis, la estreptomycin, por Waksman y colaboradores en 1944. Estos y la penicilina fueron los elementos iniciadores de un campo de trabajo de mucha importancia económica y médica, el 90% de los antibióticos de *Streptomyces* han tenido una aplicación práctica en medicina veterinaria y humana, agricultura y en la industria pesquera (Hopwood *et al.*, 1986).

El conocimiento en la microbiología de *Streptomyces* es rápidamente incrementado debido a que estos microorganismos han atraído una nueva atención para los estándares de la tecnología del DNA recombinante. La nueva tecnología promete un progreso paralelo en microbiología pura y aplicada; las técnicas utilizables incluyen recombinación por conjugación y fusión de protoplastos, transformación, transducción, transfección y clonación de genes usando sistema de vectores (plásmidos, fagos y cósmidos).

Plásmidos en *Streptomyces*

Las bacterias además del DNA cromosómico, presentan material genético extracromosómico, dentro del cual están los plásmidos. Se sabe que los plásmidos son unidades autoreplicativas del material hereditario que se conservan como elementos genéticos extracromosómicos a lo largo de sucesivas divisiones de las células bacterianas. Varían en tamaño, comúnmente son moléculas de DNA circular covalentemente cerradas (cccDNA), aún cuando algunos son lineares con telómeros terminales (Hopwood *et al.*, 1986, Keen *et al.*, 1988, Chen *et al.*, 1993).

En los *Streptomyces* se han aislado y caracterizado una amplia variedad de plásmidos y estos presentan un rango de tamaño de <4 a> 600 Kpb (Hopwood *et al.*, 1986; Kataoka *et al.*, 1991a, Kieser *et al.*, 1982). En numerosas cepas de *Streptomyces* se han descubierto una gran

cantidad de plásmidos; dentro de estos se han encontrado algunos plásmidos lineales de tamaños que van de 12 a más de 640 Kpb (Keen *et al.*, 1988, Kinashi *et al.*, 1987, 1991, 1992, Zotchev *et al.*, 1994, 1992). Sin embargo, los plásmidos más importantes de *Streptomyces* son los plásmidos circulares de tamaño pequeño. La mayoría de estos plásmidos presentan características en común. Una de ellas es la presencia de genes involucrados en los eventos de transferencia intermicelial de plásmidos (genes *tra*) y de diseminación de los mismos a lo largo del micelio receptor (genes *spd*): Estos genes son los únicos requeridos para la conjugación de estos microorganismos (Kataoka *et al.*, 1991a y b). Como producto de las funciones de transferencia los plásmidos de los *Streptomyces* presentan la capacidad de movilizar genes cromosomales de la célula donadora, hacia la célula receptora del plásmido. Esto es llevado mediante eventos de recombinación. De esta manera el cromosoma, tiene un nuevo gen funcional y el plásmido permanece libre en el citoplasma de la bacteria (Holloway, 1979).

La mayoría de los plásmidos de *Streptomyces* presentan la capacidad de formar "pocks", fenómeno también conocido como zigosis letal (LTZ). Los pocks son zonas circulares, visibles a simple vista en un tapete miceliar. Son de 1-4 mm de diámetro, y se deben al retardo en el crecimiento de la cepa receptora del plásmido (Bibb *et al.*, 1977, 1978, 1980; Murakami *et al.*, 1983; Hopwood *et al.*, 1983; Hopwood *et al.*, 1986). Algunos plásmidos de *Streptomyces* presentan un operón de genes involucrados en la transferencia del plásmido; el producto del gen *kor* se autoregula y regula a nivel transcripcional los productos formados por los genes *kil*, los cuales están involucrados en esta transferencia (Stein *et al.*, 1989).

Por otra parte los estudios de los plásmidos en *Streptomyces* se han manejado con el propósito de desarrollar vectores de clonación para la manipulación genética (Kieser *et al.*, 1982; Lidiate *et al.*, 1985; Thompson *et al.*, 1980, 1982). Los plásmidos de *Streptomyces* han sido investigados por diferentes motivos, dentro de los cuales los más importantes son el estudio de su forma de replicación (Deng *et al.*, 1988; Pigac *et al.*, 1988), sitios específicos de integración y escisión (Boccard *et al.*, 1989a, 1989b), formación de "pocks" (Bibb y Hopwood, 1981; Hopwood *et al.*, 1985; Kieser *et al.*, 1982; Kataoka *et al.*, 1991a), y la relación con la producción de antibióticos (Wright y Hopwood, 1976).

Mecanismo del Circulo Rodante (RCR)

Una de las facultades más importantes de los plásmidos es su capacidad de replicarse. Se han observado dos tipos de replicación. Uno es el llamado círculo rodante (RCR), y el otro es llamado replicación teta. El primero es usado por algunos plásmidos pequeños; y el segundo por plásmidos grandes (Gros *et al.*, 1987; Gruss y Ehrlich, 1989, Dabert *et al.*, 1992).

En muchos casos, ambos tipos de replicación requieren dos elementos codificados en el mismo plásmido: un origen de replicación y una proteína que los inicie en la replicación.

Es interesante que muchos plásmidos aislados de bacterias Gram positivas usen el mecanismo RCR. Sin embargo algunos de los plásmidos con mecanismo RCR aislados de bacterias Gram positivas son replicados en *E. coli* (Kleanthos *et al.*, 1991).

La replicación por círculo rodante fue descrita por primera vez en el bacteriófago ϕ X174 de *E. coli* (Baas *et al.*, 1981), en el cual se han encontrado homologías con algunos plásmidos en sus orígenes y proteínas de replicación (Gros *et al.*, 1987, 1989), debido a la acumulación de DNA de cadena sencilla (ssDNA) y similitudes en estructura y modo de replicación con los fagos ssDNA o plásmidos RCR (Gruss y Ehrlich, 1989, Baas *et al.*, 1981).

La replicación por círculo rodante comienza con la síntesis de la proteína de replicación (Rep), la cual reconoce el sitio de unión y hace un corte en una sola cadena (la cadena positiva), la cual contiene el origen de replicación $ds\ ori$ o ori^+ . La proteína Rep es covalentemente pegada al extremo 5', creado por el corte. La cadena positiva es desplazada con ayuda de una helicasa codificada por el hospedero; en la cadena negativa se va sintetizando una nueva cadena complementaria por la extensión de un extremo 3'OH terminal formado por el corte y realizado por las DNA polimerasas del hospedero. La proteína Rep crea un segundo corte en el origen $ds\ ori$ al terminar un círculo de replicación religa el plásmido

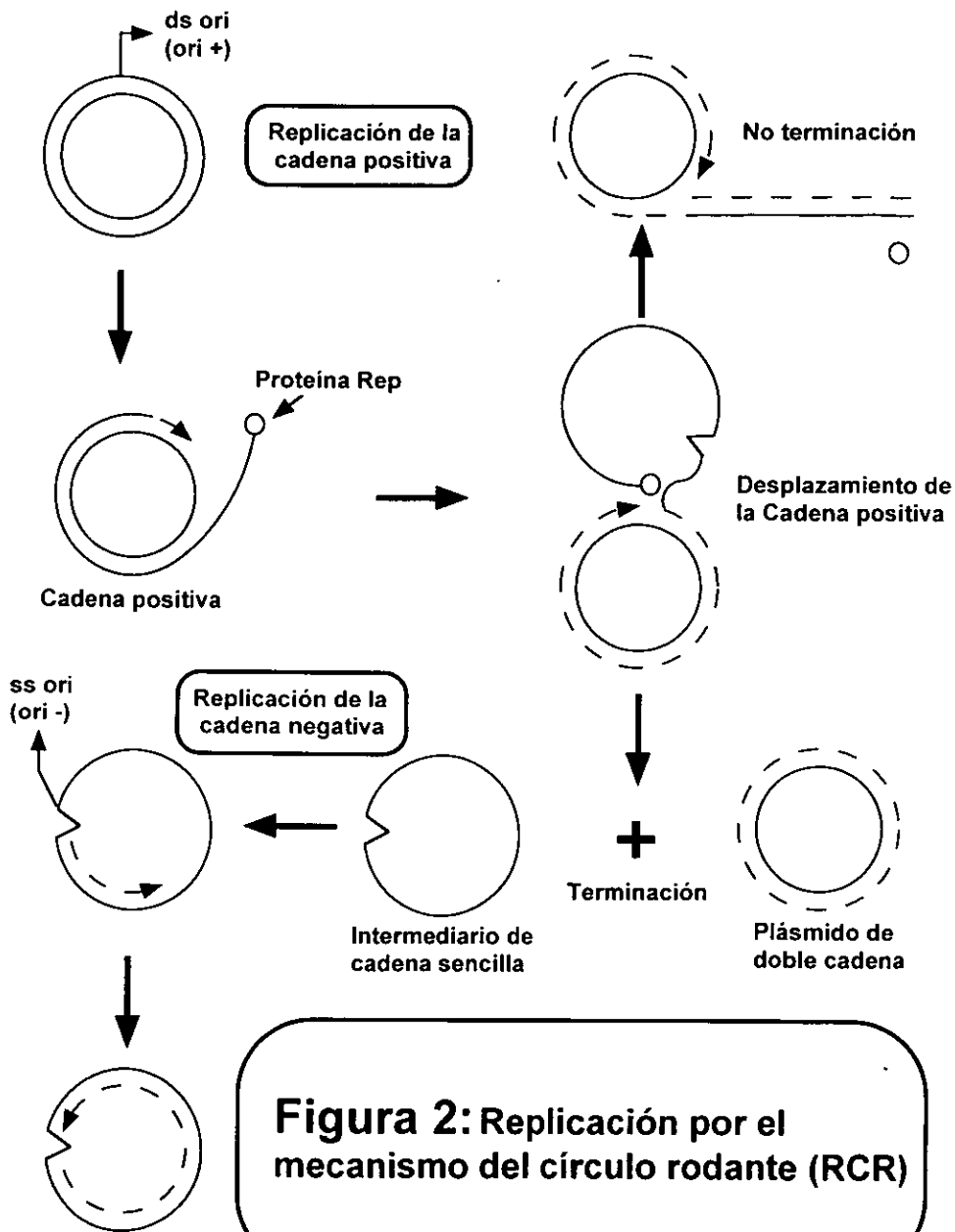


Figura 2: Replicación por el mecanismo del círculo rodante (RCR)
 tomado de del Solar *et al.*, 1993.

monomérico dejándolo circular y de cadena sencilla (ssDNA) (Gruss *et al.*, 1989). Una vez que se ha terminado de desplazar la cadena positiva se libera la proteína Rep, dando como resultado un plásmido de cadena doble (dsDNA) y un plásmido intermediario de cadena sencilla (ssDNA).

La síntesis de la cadena interna o cadena negativa del plásmido intermediario de cadena sencilla (ssDNA), es iniciada por las polimerasas celulares reconociendo a un segundo origen de replicación conocido como origen ss ori de replicación u (ori⁻). El ssDNA generado durante la replicación de la cadena positiva sirve como templado para la replicación de la cadena negativa. (Gruss *et al.*, 1987) (Figura 2).

El origen menos de replicación ss ori o (ori⁻) es distinguible y separable del ds ori o (ori⁺); este es el sitio de conversión de ssDNA a DNA de cadena doble (dsDNA) (Gruss *et al.*, 1987). La iniciación eficiente de la replicación del intermediario de cadena sencilla, requiere de un sitio específico de origen ss ori de replicación (Boe *et al.*, 1989; Devine *et al.*, 1989; Gruss *et al.*, 1987). También se requiere de una RNA polimerasa, la cual coloca un primer de RNA, con la cual se puede llevar una replicación del origen ss ori. Esta observación fue demostrada *in vivo* por la adición de rifampicina a los cultivos bacterianos con un plásmido RCR; esta adición induce la acumulación de cadena sencilla (Boe *et al.*, 1989; Birch *et al.*, 1992).

Aún no está claro si las cadenas positiva y negativa en su síntesis son discontinuas y no se conoce si ocurre la iniciación durante la síntesis de la cadena positiva o después de que el círculo de ssDNA es realizado (Gruss *et al.*, 1987). Interesantemente, algunos plásmidos ssDNA se replican en dos o más hospederos (del Solar *et al.*, 1987; Ehrlich, 1977; Goze y Ehrlich, 1980).

Los plásmidos circulares de ssDNA son particularmente abundantes si un origen de replicación ss ori no funcional está presente en el plásmido, que es frecuente en el caso de un hospedero heterólogo (Boe *et al.*, 1989; Gruss *et al.*, 1987). La importancia de dicho origen de replicación ss ori (ori⁻) radica en la formación de un plásmido de doble cadena funcional, a partir de un intermediario de cadena sencilla no funcional (Figura 2).

Plásmido pIJ101

El plásmido pIJ101 fue aislado originalmente de la cepa de *Streptomyces lividans* ISP 5434 (Kendall y Cohen, 1988). Es un plásmido multicopia de 40 a 300 copias por cromosoma, con un amplio rango de hospederos (Kieser *et al.*, 1982; Kendall y Cohen, 1988). Se ha secuenciado completamente, siendo un plásmido de cccDNA de 8.83 Kpb, con una composición de 72.98 % en guaninas y citosinas, que es similar en composición al cromosoma de *Streptomyces* (Kendall y Cohen, 1988).

Se han identificado siete ORFs y se han correlacionado genéticamente. Los marcos de lectura abiertos (ORF) que se han encontrado son el *tra* (621 a.a.), *spd A* (146 a.a.), *spd B* (274 a.a.), y el *kil B* (177 a.a.), estos genes están involucrados en la transferencia y diseminación del plásmido. Otros dos genes son reguladores en *trans kor A* (241 a.a.) y *kor B* (80 a.a.). El plásmido pIJ101 es capaz de transferirse al 100 %, además de movilizar genes cromosomales a una frecuencia de 10^3 y de formar "pocks" en cepas receptoras (Kendall y Cohen, 1987, 1988) (Figura 3).

El producto del gen *tra* es responsable de la transferencia del plásmido e induce la movilización de genes cromosomales durante la conjugación (Kendall y Cohen, 1987, 1988). El gen *tra* media la transferencia de DNA cromosomal a alta frecuencia pero promueve la eficiente transferencia sólo cuando contiene un locus llamado *clt*, donde la delección o una mutación en esta región reduce la transferencia. Cuando el plásmido se transfiere en *Streptomyces* comúnmente produce zonas de inhibición del crecimiento del micelio receptor o "pocks" (Bibb y Hopwood, 1981). Los genes del plásmido *tra*, *spdA*, *spdB* y *kilB*, están involucrados con esta inhibición (Kendall y Cohen, 1987, 1988). Mutaciones en estos genes afectan el tamaño de los pocks (Kendall y Cohen, 1987, Kieser *et al.*, 1982).

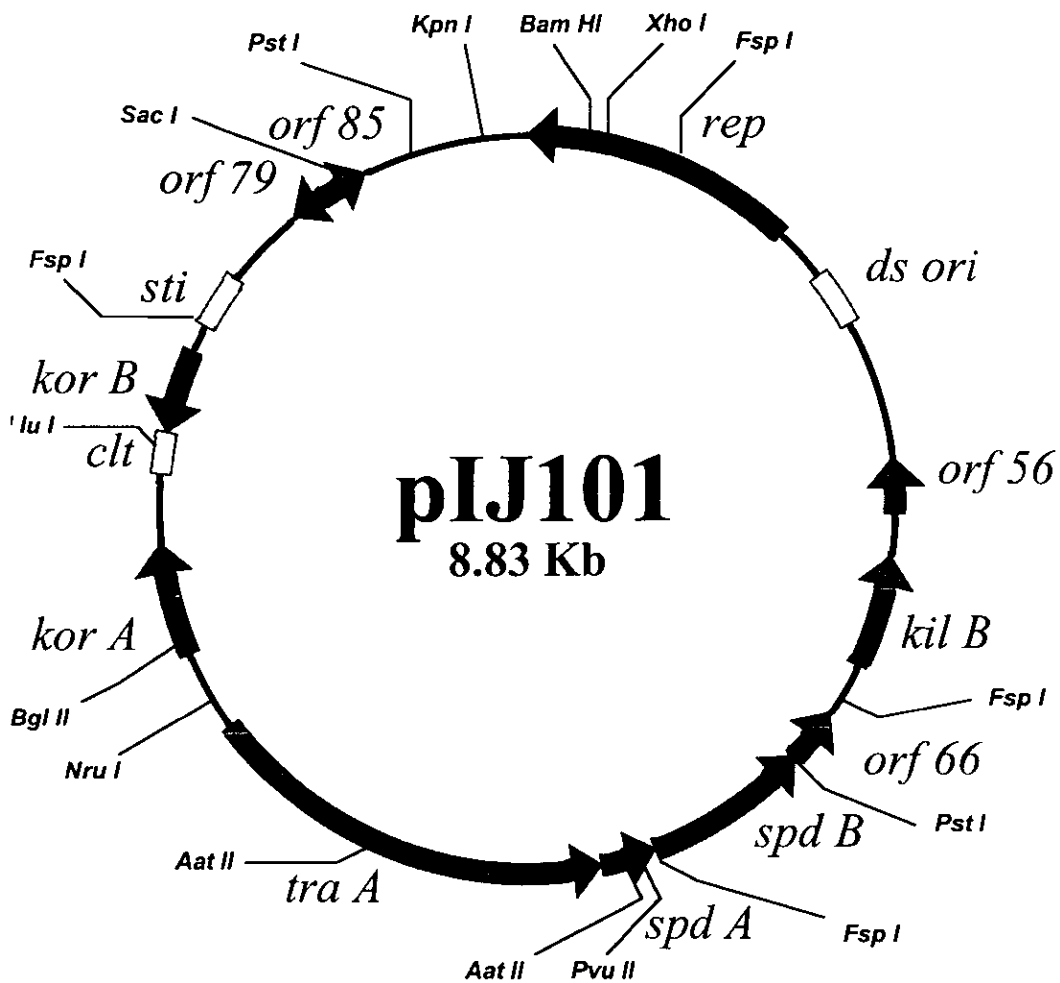


Figura 3: Plásmido pIJ101

Durante el complejo ciclo de vida de *Streptomyces* puede donar y recibir DNA a través de transferencia conjugativa y de esta manera pIJ101, con la presencia de genes involucrados en los eventos de transferencia intermicelial, acarrea genes del cromosoma. Como producto de las funciones de transferencia pIJ101 moviliza genes cromosomales de la célula donadora, hacia la célula receptora del plásmido, ocasionando eventos de recombinación. De esta manera el cromosoma, tiene un nuevo gen funcional y el plásmido permanece libre en el citoplasma de la bacteria; a este proceso se le conoce como movilización del cromosoma (CMA) (Hopwood y Kieser, 1983; Holloway, 1979).

El gen *tra* es especialmente requerido para el evento de CMA, (Kieser *et al.*, 1982). El promotor de *tra* es negativamente regulado por *KorA* (Stein *et al.*, 1989), que es codificado por secuencias que sobrelapan una parte del locus *tra* (Kendall y Cohen, 1987). El *korB* codifica una proteína represora que controla la expresión del *kilB* (Stein y Cohen 1990, Stein *et al.*, 1989, Tai y Cohen, 1993, 1994; Zaman *et al.*, 1992). Adicionalmente la proteína *KorB* interacciona y puede regular el locus *sti* que es adyacente al 5' del *korB* y es requerido para la síntesis de dsDNA durante la replicación del plásmido (Deng *et al.*, 1988; Kataoka *et al.*, 1994a).

La proteína que lleva implicada la replicación autónoma del plásmido es la proteína *Rep* de 456 a.a. codificada en el gen *rep*. El origen de replicación ds *ori* (*ori* +) se encuentra hacia arriba de *rep*, que es similar al plásmido pC194 (Zaman *et al.*, 1993). La región mínima esencial de autonomía del plásmido pIJ101, es una región de 2.2 Kpb. que contiene al ds *ori* y al gen *rep* (Kendall *et al.*, 1988; Zaman *et al.*, 1993; Kendall y Cohen, 1987, 1988).

Deng y colaboradores (1988) identificaron una región no codificadora, la cual llamaron *sti*, la cual causa incompatibilidad fuerte cuando esta presente en su orientación natural con respecto al plásmido silvestre. Este sitio fue localizado en una región del plásmido de 0.7 Kpb. En un fragmento de este plásmido de 0.53 Kpb, se detectó una estructura secundaria el cual posee un hexanucleotido consenso (TAGCCT), que se encuentra en sitios *ss ori* de algunos plásmidos y bacteriofagos. Deleciones en este fragmento (*sti*), implican

acumulación de cadena sencilla, postulando este sitio como el origen de replicación *ss ori* (*ori* -) (Deng *et al.*, 1988; Zaman *et al.*, 1993).

Incompatibilidad Fuerte

Los términos competencia, exclusión e incompatibilidad, son sólo utilizados para describir situaciones en las cuales la presencia de un plásmido da la rápida pérdida del otro (Davison, 1984, Novik, 1987, 1989). El término incompatibilidad no es utilizado en estos plásmidos debido a que este término es generalmente utilizado para describir la inhabilidad de plásmidos relacionados (que se diferencian sólo por un marcador genético diferente) para coexistir establemente en la misma célula bacteriana bajo condiciones no selectivas.

Un par de plásmidos en los cuales ambos poseen *sti* en su correcta orientación (*Sti* +) o ambos han perdido su sitio *sti* o ambos poseen su sitio *sti* en la posición reversa (*Sti* -) pueden coexistir, pero plásmidos *Sti* + y plásmidos *Sti* - no lo pueden hacer: en este caso el plásmido *Sti* + es retenido en la célula hospedera y el plásmido *Sti* - se pierde. Este fenómeno es llamado incompatibilidad fuerte, para diferenciarlo de la incompatibilidad clásica donde plásmidos idénticos o similares son incompatibles y plásmidos no similares son compatibles.

La secuencia de *sti*, la que causa esta incompatibilidad fuerte, fue localizada sobre un segmento de DNA de aproximadamente 700 pb la cual es una parte no esencial de la región de replicación de pIJ101. La función de *sti* es activa sólo cuando el fragmento de DNA que acarrea está presente en su orientación original con respecto a pIJ101. pIJ101 se replica por medio de RCR. *sti* puede ser un sitio donde la síntesis de la cadena complementaria de DNA se lleva a cabo debido a que plásmidos *Sti* - acumulan más cantidad de plásmido en forma de cadena sencilla.

Ciertos derivados de pIJ101 se encontraron que no podían coexistir en *Streptomyces*, por ejemplo la presencia de pIJ355, que es el pIJ101 con un gen de resistencia a valinomicina disminuye en más de 10000 veces la frecuencia de transformación de pIJ425. Este último plásmido lleva un gen de resistencia a tioestreptona el cual lleva el replicón mínimo de pIJ101. El plásmido residente (pIJ355) fue eliminado con una alta frecuencia de las colonias

transformadas y la recombinación entre el plásmido huésped y el hospedero para formar moléculas dimericas fue poco frecuente. En un experimento recíproco, se transformó pIJ355 a protoplastos que contenían a pIJ425, donde de todas las transformantes fueron resistentes a viomicina y sensibles a thioestreptona, ya que perdieron el plásmido residente pIJ425 (Deng *et al.*, 1988; Zaman *et al.*, 1993).

La incompatibilidad fuerte se asoció al fragmento *BclI*-E del plásmido pIJ101. En un estudio de compatibilidad, se introdujo este fragmento al plásmido pIJ424, en la orientación correcta y reversa, dando origen a los plásmidos pIJ2740 y pIJ2741, respectivamente. Sólo el plásmido con la orientación correcta, pIJ2740, pudo coexistir con el plásmido pIJ101 (Deng *et al.*, 1988; Zaman *et al.*, 1993).

Plásmido pSN22

El plásmido pSN22 es una molécula de DNA de 10.922 Kpb, con un contenido de guaninas y citocinas de 71.76 %. Es un plásmido multicopia, con un amplio rango de hospederos y con la capacidad de formación de “pocks”. El plásmido pSN22 fue originalmente aislado de una cepa de *Streptomyces nigrifaciens* (Kataoka *et al.*, 1991a, 1991b). El análisis genético del pSN22 revela que la transferencia del plásmido es requerida para la formación de “pocks”. Una proteína codificada en este plásmido, llamada TraB que realiza la catálisis de transferencia intermicelial del plásmido, semejante al gen *tra* de pIJ101. Esta proteína es un regulador transcripcional del operón de transferencia y sólo TraA y TraB poseen expresión en la presencia de TraR. La inhibición o fenotipo Kil en TraR y TraB se encuentran en relación similar al KorA y KilA (Tra) o KorB y TraB de pIJ101. Dos loci, *spdA* y *spdB*, abajo de *traR* y *traB*, respectivamente están involucrados en la diseminación del plásmido en el micelio recipiente como fue propuesto para los genes *spd* de pIJ101.

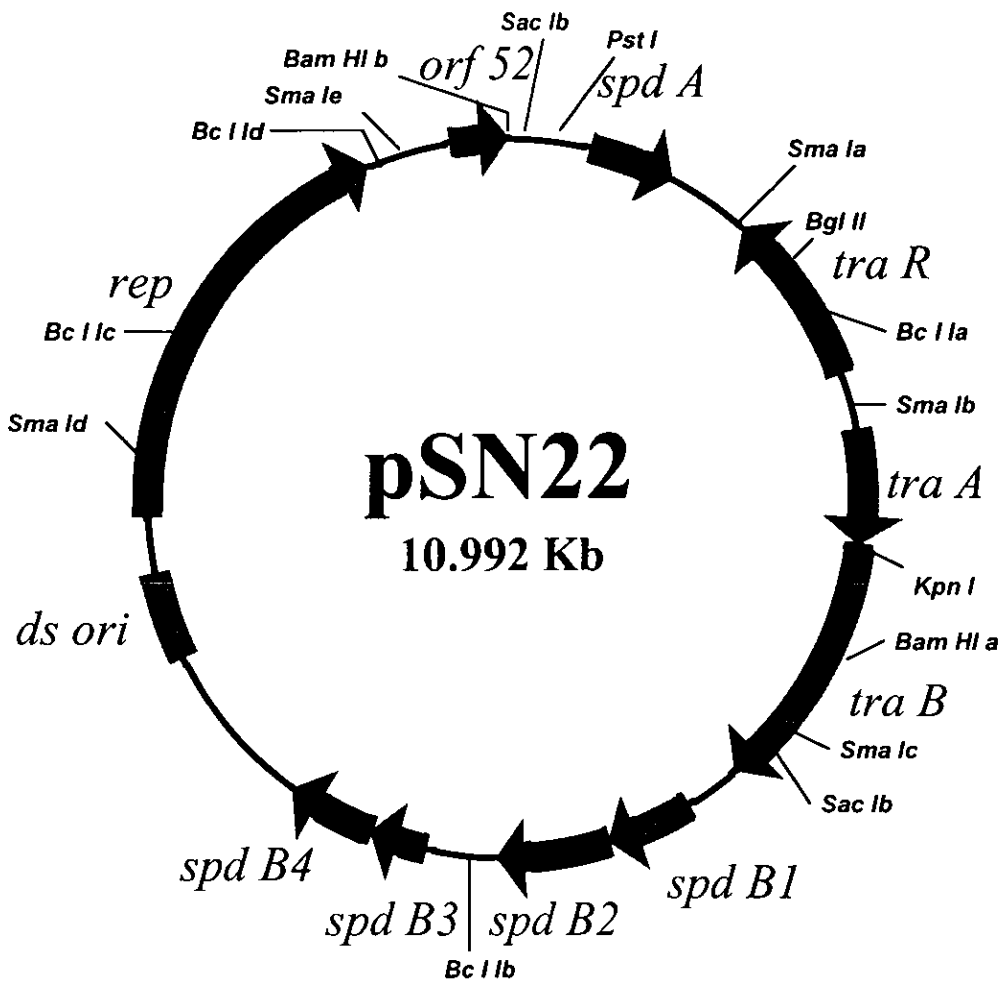


Figura 4: Plásmido pSN22

La región esencial de replicación de pSN22 está localizada en un segmento de 3.5 Kpb. Un análisis de Southern blot indica que esta región es altamente homóloga a la región correspondiente del plásmido pIJ101. El ORF del gen *traR* es leído en sentido opuesto a la replicación, y codifica una proteína de 246 a.a. (iniciando en el nucleótido 1972 y terminando en el 1235). El ORF *traA* inicia en el nucleótido 2113 y termina en el nucleótido 2670 y codifica para una proteína de 186 a.a. Este gen es esencial para efectuar la transferencia y formación de "pock". El ORF *traB* empieza y termina en los nucleótidos 2688 y 4640 respectivamente, codificando para una proteína de 651 a.a. Este gen es esencial para la transferencia intermicelial. Ambos, el *traB* de pSN22 y el *tra* de pIJ101 son letales para *Streptomyces* cuando se sobreexpresan en la ausencia de sus represores, TraR y KorA, respectivamente (Kataoka *et al.*, 1994a).

La región mínima esencial para la replicación del plásmido, fue localizada en un fragmento de 1.9 Kpb, conteniendo a la proteína de replicación Rep de 451 a.a. y una región no codificadora de 360 pb, la cual contiene el origen de replicación ds ori.

En un fragmento de 500 pb se identificó una zona no codificante que está entre los sitios *Bgl*II-a *Sma*I-b, la cual añadida a la región mínima de replicación del plásmido en orientación correcta, es capaz de dar origen a la síntesis de la cadena complementaria. A esta región se le denominó como el sitio ss ori (ori -). Sin embargo parece ser que este sitio no está involucrado en la incompatibilidad fuerte del plásmido. (Kataoka *et al* 1994b), (Figura 4). Esta región corresponde a la zona entre *traR* y *traA*.

Plásmido pJV1

El plásmido pJV1 fue aislado originalmente de *Streptomyces phaeochromogenes* NRRL B-3559. Fue inicialmente aislado por el interés de que este plásmido acarreará el gen de producción de cloranfenicol. De ocho cepas productoras de cloranfenicol sólo la cepa SPI tuvo un resultado positivo, de la cual se obtuvo una molécula de cccDNA. Este plásmido fue designado pJV1. Por medio de una electroforesis de la molécula lineal, se le asignó un tamaño de 10.8 Kpb (Doull., 1983). En un trabajo posterior se comprobó que este plásmido presenta un amplio rango de hospederos en cepas de *Streptomyces* (Bailey *et al.*, 1986). Se observó que

el plásmido pJV1 presenta aproximadamente 150 copias por cromosoma. Esto fue determinado por análisis en geles con diferentes diluciones de DNA total de *Streptomyces phaeochromogenes* (Doull., 1983). También se comprobó que la región mínima de replicación de pJV1 se encuentra en un segmento de 2.5 Kpb localizado entre los sitios *Bam*HI y *Kpn*I (Bailey *et al.*, 1986).

Actualmente el plásmido pJV1 ha sido totalmente secuenciado. Es una molécula de cccDNA de 11.143 Kpb (Servín *et al.*, 1995). Se sabe que posee la capacidad de formar "pocks" de 1 a 2 mm de diámetro durante la conjugación con cepas receptoras (Bailey *et al.*, 1986; Servín *et al.*, 1995).

Debido a su pequeño tamaño, este es, por sí mismo altamente transmisible por conjugación intermicelial. Esta eficiencia de diseminación en el micelio recipiente (formación de pocks) y su movilización del cromosoma (CMA) a frecuencia baja, requieren sólo unos cuantos genes codificados por el plásmido. (Kieser *et al.*, 1982; Kendall y Cohen, 1988; Smokvina *et al.*, 1991; Hagege *et al.*, 1993b; Kataoka *et al.*, 1991a, 1994a).

Varios vectores de clonación han sido derivados del plásmido pJV1. (Bailey *et al.*, 1986, Miller, 1991, Denis y Breezinaki, 1992, Qin *et al.*, 1994). La secuencia nucleotídica del replicón mínimo de pJV1 fue determinada y se dedujo que la secuencia de la proteína de replicación Rep es 35% idéntica a la de pIJ101 y la secuencia del ds ori de pIJ101 y pJV1 son muy similares cercanas al sitio de corte (Servín-González, 1993).

Localización de genes involucrados en la transferencia de plásmido y movilización cromosoma.

Una serie de derivados de pJV1 fueron construidos los cuales llevan inserciones, deleciones y mutaciones que generan cambios en la fase de lectura (frameshift). Estas fueron probadas en *S. lividans* para la transformación de plásmido, formación de pocks y CMA. La inserción de 1.1 Kpb del fragmento *Bcl*II contiene el gen de resistencia a thioespreptona (gen *tsr*) dentro del sitio único de *Bgl*II de pJV1, situado en un sitio no esencial y no codificante (Bailey *et al.*, 1986, Servín-González, 1993) produciendo el vector pB50.

Como se esperaba, este plásmido fue similar a pJV1 en transferencia, formación de pock y CMA. Los datos están de acuerdo a los de (Bailey *et al.*, 1986) pero la formación de pocks de 1-2 mm de diámetro en tapetes miceliales en pJV1 es una observación nueva.

Los derivados de pB50, pB57 (fragmento largo de 4.7 Kpb *Bam* HI I6-11), pB58 (delección de 2.4 Kpb de *Nco*I-12-*Nco*I-18) y pB59 (delección de 0.5 Kpb de *Bst*XI-14-*Bst*XI-15) han perdido CMA y la habilidad de formar pocks. Esto indicó que al menos uno de los sitios *Bst* XI está dentro de un gen de transferencia. pB75, el cual tiene *tsr* en el sitio único de *Asp*700, presenta una reducción de 105 veces en su transferencia de plásmido y 10 veces la del cromosoma, y no forma pocks. El pB66, que carece del fragmento *Sst*I-2-4 de 1.5 Kpb, no forma pocks visibles, tuvo aproximadamente 10 veces reducida su transferencia y un CMA normal, lo cual indica la disrupción de las funciones de diseminación (spread). Mutaciones generadas por rellenamiento y religación del sitio *Asp*71811-13 (pB75) o el sitio *Nor*I-1 (pB89) no dan pocks y un fenotipo reducido de transferencia similar al pB66.

Por otra parte parece ser que el sitio *Bpu*11021-13, está localizado en el gen de la función Kor, el cual reprime potencialmente la función letal, fenotipo Kil en la región de transferencia (Servín *et al.*, 1995).

Genes de transferencia

El gen *traR* de pJV1 codifica para una proteína de 245 a.a. (26.5 KDa). Análisis comparativo de secuencias demuestran una identidad de 83% y 88% de similitud con la KorA de pJ101 (Kendall y Cohen, 1988). Las proteínas Kor de *Streptomyces*, se alinean con 34% de similitud. Estas tienen cerca del N-terminal un dominio hélice-vuelta-hélice (HTH). Esta es una evidencia indirecta que estas proteínas Kor son reguladores transcripcionales.

Los genes *traA* y *traB* codifican para proteínas de 184 a.a. (19.4 KDa) y 678 a.a. (71.7 KDa) respectivamente. Presentan una identidad de 69 y 65% con las proteínas TraA y TraB de pSN22 respectivamente (Servín *et al.*, 1995).

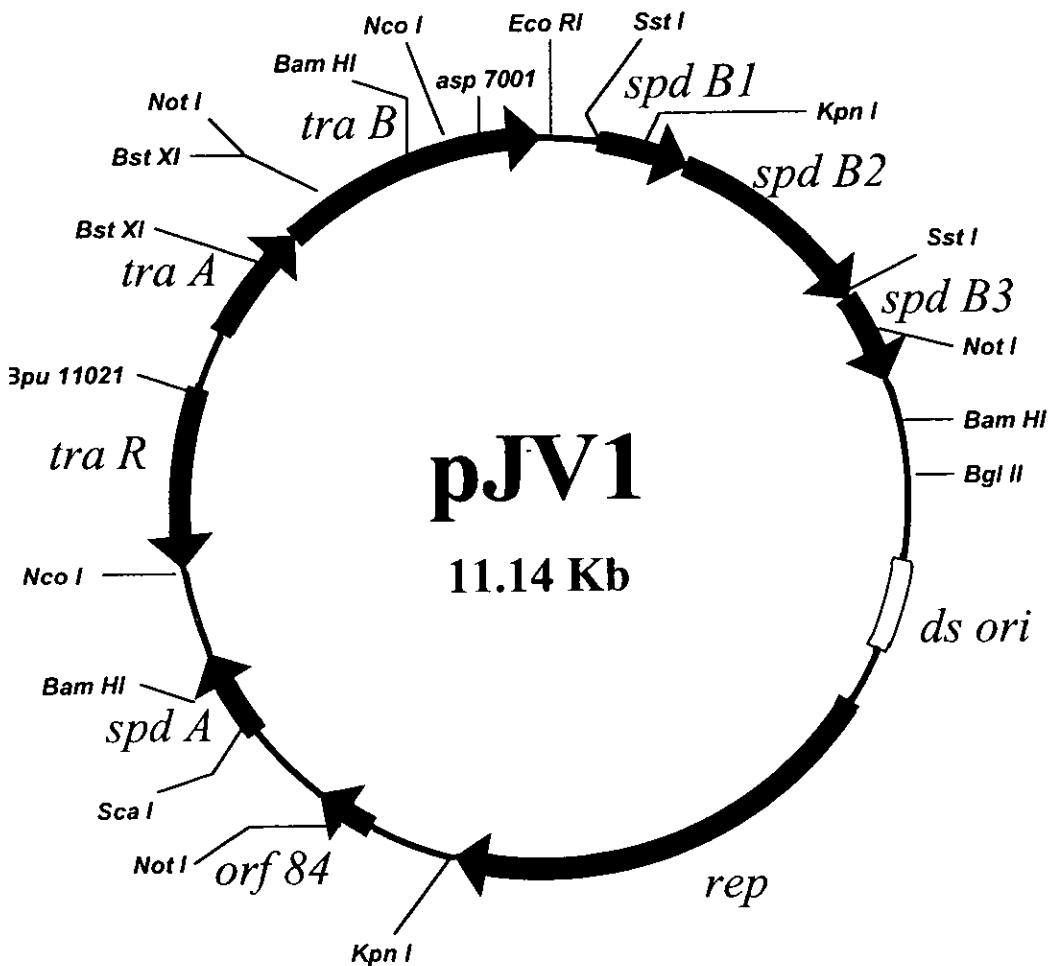


Figura 5: Plásmido pJV1

Genes de diseminación

Los genes *spd* de pJV1 están constituidos por tres ORFs que están acoplados transcripcionalmente.

El gen *spdB* 1 codifica para una proteína de 174 a.a. con tres posibles hélices transmembranales. Tiene 30% de identidad con el extremo C-terminal de la proteína SpdB 1 de pSN22.

El gen *spdB* 2 de pJV1 codifica para una proteína de 371 a.a. y el extremo N-terminal, es 52% idéntica a la respectiva en pSN22.

El gen *spdB* 3 codifica para una proteína muy hidrofóbica de 147 a.a., la cual presenta tres posibles hélices transmembranales y presenta una identidad de 63% con el gen *spdB* 4 de pSN22. (Servín *et al.*, 1995).

Región de replicación

La proteína de replicación Rep de pJV1 presenta una identidad de 35% con las proteínas Rep tanto para pIJ101, como para pSN22. Pero en la región cercana al sitio *ds ori* de pJV1, se observa una identidad del 35% para la proteína Rep de pSN22 y 95% de identidad para la proteína Rep de pIJ101.

El plásmido pJV1 parece tener una organización modular en su estructura, siendo muy parecido a pSN22 en la organización de los genes de transferencia y diseminación, mientras que posee una región de replicación con gran identidad a la región de replicación de pIJ101 (Servín *et al.*, 1995), (Figura 5).

HIPOTESIS

Si el plásmido pJVI se replica por medio del mecanismo RCR, entonces haciendo experimentos de hibridación tipo Southern de DNA total en condiciones no desnaturalizantes se encontrarán algunos derivados del plásmido pJVI que acumulen o no intermediarios de cadena sencilla.

Si se coloca el fragmento de DNA de los derivados de pJVI que no acumulan intermediarios de cadena sencilla en su orientación nativa, en el replicón mínimo de pJVI, entonces este derivado dejará de acumular intermediarios de cadena sencilla por lo tanto deberá contener el sitio *ss ori*.

Si existe una relación entre el origen de replicación *ss ori* y el sitio *sti*, entonces cualquier derivado de pJVI que posea el sitio *ss ori* podrá coexistir con otro que también lo posea, pero no coexistirá con otro que no lo posea.

OBJETIVOS

Confirmar que el tipo de replicación del plásmido pJV1, sea mediante el mecanismo del círculo rodante (RCR).

Localización del origen de replicación de cadena sencilla (ss ori) del plásmido pJV1 de *Streptomyces phaeochromogenes*, mediante análisis de hibridación DNA - DNA tipo Southern.

Comparación del sitio ss ori y *sti* del plásmido pJV1 con los sitios equivalentes de otros plásmidos de *Streptomyces*.

Localización y caracterización genética del sitio de incompatibilidad fuerte (*sti*) del plásmido pJV1 de *Streptomyces phaeochromogenes*.

MATERIAL Y METODOS

Tomados del manual de Hopwood 1985 principalmente y con algunas modificaciones del Dr. Servin

MEDIOS

Luria Bertani (LB)

Bactotriptona	1 %
NaCl	1 %
Extracto de levadura	0.5 %
pH 7.2	

Luria Bertani (LB) sólido.

Bactotriptona	1 %
NaCl	1 %
Extracto de levadura	0.5 %
Bacto-agar	1.5 %

YT 2x 100ml

Bactotriptona	1.6 %
Extracto de levadura	1.0 %
NaCl	0.5 %
Ajustar a pH 7.2	

R5: 1L medio para esporulación de *Streptomyces*

K ₂ SO ₄	0.25g
MgCl ₂ .6H ₂ O	10.12 g
Glucosa	10.0 g
Difco casaminoácidos	0.1 g
Solución de elementos traza	2 ml

K ₂ SO ₄	0.25g
Difco extracto de levadura	5 g
Trizma base	3 g
Agar	1.5%
Ajustar pH a 7.2	
Aforar a 1l. con agua desionizada (Milli-Q)	

Solución de elementos traza por litro

ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ .6H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ .2H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	10 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	10 mg

Fundir 100 ml de la solución base con agar por cada cinco cajas de Petri a utilizar.

Añadir las siguientes soluciones en orden y mezclar en cada adición:

KH ₂ PO ₄ (0.5 %)	1 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O (5 M)	0.4 ml
L-Prolina (20 %)	1.5 ml
NaOH (1 N)	0.2 ml
CuSO ₄ (2 mM)	0.2 ml

R2

Este medio se utiliza para regenerar protoplastos, por lo que el material para prepararlo debe estar libre de cualquier traza de detergente, hay que usar agua desionizada para todas las soluciones y para el medio.

Solución base:

Sacarosa	103.0 g
K ₂ SO ₄	0.25 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	10.12 g
Glucosa	10.0 g
Casaminoácidos	0.1 g

Aforar con agua desionizada (Milli-Q) a 800 ml.

Colocar 2.2 g de Bacto-agar (Difco) en botellas y añadir 80 ml de la solución base y autoclavar.

Fundir 80 ml de la solución base con agar por cada cinco cajas de Petri a utilizar. Añadir las siguientes soluciones en orden y mezclar en cada adición:

KH ₂ PO ₄ (0.5 %)	1.0 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O (3.68 %)	8.0 ml
L-prolina (20 %)	1.5 ml
Tris-Cl (3 %)	10.0 ml
Solución de elementos traza	0.2 ml
CuSO ₄ (2 mM)	0.2 ml
NaOH (1 N)	0.2 ml
Extracto de levadura (10 %)	5.0 ml

Agar suave para transformación en *Streptomyces*

Sacarosa	10.3 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	1.012 g
Tris (3%, pH 7.2)	10 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O (5M)	0.4 ml

Aforar a 100 ml, agregar 0.65 g de Bacto-agar y autoclavar.

Luria Bertani Sacarosa (LBS)

Bactotripton	1 %
NaCl	1 %
Extracto de levadura	0.5 %
Sacarosa	34 %
Ajustar a pH 7.2	

Medio de extractos de levadura y malta (YEME)

Difco extracto de levadura	0.3 g
Difco bactopectona	0.5 g
Extracto de malta oxido	0.3 g
Glucosa	1.0 g
Sacarosa	34.0 g

aforar a 100 ml

Después de autoclavar se añaden:

MgCl ₂ .6H ₂ O (1M)	0.125 ml
Glicina 20 %	0.625 ml

AISLAMIENTO DE COLONIAS EN PLACAS DE AGAR

Para el trabajo genético en bacterias es necesario tener stocks puros de las cepas, las cuales son obtenidas fácilmente mediante dilución de esporas en agua desionizada o por estriamiento sucesivo.

Separación de colonias por dilución

Se toman 100 µl de un concentrado de esporas y se diluyen en 0.9 ml de agua

desionizada, y así sucesivamente hasta diluciones de 10^{-6} a 10^{-7} ; de cada dilución se toman 100 μ l y se espatulan en medio rico R5 y se dejan crecer las colonias a 29°C hasta esporular. Esto puede también ser realizado de una caja que contenga un crecimiento confluyente o algunas colonias que no se encuentren separadas tomando con un asa una muestra y depositándola en 0.5 ml de agua y hacer diluciones hasta lograr la separación de colonias.

Separación de colonias por estrías sucesivas

Se toma una muestra de bacterias con un asa bacteriológica y se estria en una pequeña zona de la caja, se esteriliza el asa y se vuelve a estriar sobre una zona pequeña de la caja estriando sobre una parte pequeña de la estria anterior, dando como resultado en estrías sucesivas la dilución de las esporas sobre la caja de agar, provocando la separación de colonias en las últimas estrías. (Hopwood *et al.*, 1985).

Cosecha de esporas

Con un asa se toman las esporas de una colonia aislada y se colocan en un tubo con 0.5 ml de agua desionizada, se dispersan las esporas agitando el tubo y se toman 100 μ l de la mezcla, se colocan en una caja de medio rico R5, y se incuban las cajas a 29°C. Una vez que se ha obtenido un crecimiento confluyente y las colonias han esporulado, se agregan 10 ml de agua desionizada estéril a cada caja de Petri y se raspa la superficie con un asa bacteriológica quedando las esporas en suspensión, la cual es filtrada a través de un tubo con algodón estéril dejando el resto del micelio o cualquier pedazo de agar en el algodón; se colocan 5 ml de agua estéril a la caja para desprender el resto de esporas que se hubiesen quedado y se filtran en el mismo tubo con algodón. El filtrado es pasado a un tubo estéril con tapa de rosca y centrifugado a 3500 r.p.m. durante 10 min., se decanta el sobrenadante en zona estéril y el botón de esporas es vortexeado, se le agregan 5 ml de agua para lavar las esporas, se centrifuga como en el paso anterior, se resuspenden finalmente las esporas en 1 ml de glicerol al 20%, y se guardan en viales a -20°C.

PURIFICACION DE PLASMIDOS

Purificación de plásmidos de *Streptomyces* y *Escherichia coli*

Se colocan 25 ml de LBS o LB a matraces Erlenmeyer con o sin resorte de acero inoxidable en condiciones estériles, inoculando 200 μ l de esporas o una alícuota de 200 μ l de *E. coli* de un cultivo que se encuentre en fase logarítmica. Si las cepas contienen plásmidos debe administrarseles el antibiótico al medio en las concentraciones que a cada cual le correspondan. Para *Streptomyces* se deja en incubación con agitación a 29°C por 48 hrs., y para *E. coli* también en agitación a 37°C por aproximadamente 6 hrs.

Se examinan que el micelio o las células hayan crecido bien y que no estén contaminados. Se colocan los cultivos que contienen el micelio o las células en tubos y se centrifugan a 6500 r.p.m. durante 10 min.

Se decantan los sobrenadantes; para *Streptomyces*, el botón de micelio se resuspende en 10 ml de sacarosa al 10.3 % y se centrifuga a 6500 r.p.m. durante 10 min.

Se decanta el sobrenadante y el botón de micelio se resuspende en 5 ml de una solución de lisozima a 2 mg/ml, la lisozima se disuelve en TE 25 mM (Tris 25 mM -EDTA 1 mM, pH 8).

Se pone a incubar el tubo a 37°C por 30 min., este tiempo es estimado para que la lisozima haya actuado sobre el micelio, pero el tiempo de incubación puede variar hasta el punto en que el micelio este completamente lizado; debe observarse la solución totalmente viscosa.

Para *E. coli* se colocan 5 ml de TE 25 mM sin lisozima y se deja incubando en hielo durante 15 min.

Para ambos, *Streptomyces* y *E. coli* los siguientes pasos son iguales.

Se añaden 2 volúmenes (10 ml) de una solución fresca de NaOH 0.2 M / SDS 1 %, se agita muy bien por inversión del tubo hasta que la solución se observe homogénea y transparente. Se incuba en hielo durante 10 min.

Se agrega 1.5 volúmenes (7.5 ml) de una solución de acetato de potasio 3 M, pH 4.8 y se agita por inversión hasta observar un precipitado blanco; se incuba en hielo por 15 min. y se centrifuga a 6500 r.p.m. durante 10 min.

Se recupera el sobrenadante, se coloca en dos tubos de centrifuga a cada uno se le agregan 5 ml de una solución 1:1 de fenol cloroformo, se mezcla bien y se centrifuga a 6500 r.p.m. durante 10 min.

En el tubo se forman dos fases, en la interfase se encuentran lípidos y proteínas. Se recupera la fase acuosa que contiene el plásmido y RNA (fase orgánica superior), se recomienda sea con una pipeta automática para no llevarse nada de la interfase, se coloca 1 volumen de isopropanol a cada tubo y se incuban por 10 min. en hielo, se centrifugan a 6,500 r.p.m. por 10 min. a 4°C.

Se decantan los sobrenadantes y se desecha todo el residuo de isopropanol con una pipeta automática. Se agregan 500 µl de una solución de TE 10 mM (Tris 10 mM EDTA 1 mM pH 8), se agita para que se resuspenda (es muy importante que quede bien resuspendido y homogéneo para no perder plásmido), en caso de que no se resuspenda puede lograrse una buena resuspensión en un baño María a 50°C por 10 min.

Se coloca la solución en un tubo de vidrio con rosca y se agregan 3 volúmenes de una solución de acetato de sodio 4 M, pH6 (1.5 ml), se mezcla bien y se incuba a -20°C para obtener una buena precipitación, durante por lo menos 2 hrs. se centrifuga a 3500 r.p.m. durante 10 min. a 4°C.

El botón es RNA y en el sobrenadante se encuentra el plásmido, se pasa el sobrenadante a otro tubo de vidrio y se agrega 1 volumen de isopropanol (1.5 ml) se mezcla bien y se incuba 10 min. en hielo. Se centrifuga a 3500 r.p.m. durante 10 min. a 4°C.

Se decanta todo el isopropanol y se resuspende en 500 μ l de TE 10 mM. Se pasa la solución a un tubo Eppendorf. Se agregan 5 μ l de RNAsa 10 mg/ml, se mezcla y se pone a incubar en baño María a 37°C durante 30 min.

Se agrega un volumen de PEG 20 % NaCl 2.5 M (500 μ l), se pone a incubar en hielo por lo menos 2 hrs.

Se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 10 min. y se extrae totalmente todo el sobrenadante. Se resuspende el pellet en 150 μ l de TE 10 mM, para dar una mejor resuspensión se puede colocar el tubo a 50°C durante unos 10 min.

Una vez bien resuspendido se agrega 1 volumen de fenol cloroformo, se agita bien la mezcla y se centrifuga durante 2 min. en una microfuga a 14000 r.p.m.

Se toma la fase acuosa sin llevarse la interfase, esta se coloca en otro tubo y se agregan 1/10 del volumen, de una solución de acetato de sodio 3 M, pH6 (15 μ l), se mezcla bien y se agrega 1 volumen de isopropanol, se pone a incubar en hielo durante 10 min. y se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 10 min.

Eliminar todo el sobrenadante (isopropanol) y evaporar el resto que se haya quedado en el pellet a 50°C durante unos 10 min. Resuspender el pellet en 100 μ l de TE 10 mM y guardarlo a -20°C.

Gradiente de cloruro de cesio

Se pesan 4.5 g de cloruro de cesio y se disuelven en 4.5 ml de solución total, la cual está compuesta por 4 ml de TE 10 mM, 0.2 ml del plásmido resuspendido en TE 10 mM y 0.3 ml de una solución de bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml. La forma de verter al tubo toda la mezcla es utilizando un pipeta Pasteur como embudo.

Se equilibra el tubo con un tubo contrapeso, en el caso de que el tubo de gradiente pese más que el contrapeso se puede utilizar aceite de parafina para ajustar la calibración; una vez calibrado el tubo se sella al calor y se procede a correr el gradiente de manera secuencial de la siguiente manera: 90000 r.p.m. durante 1.5 hrs., 87000 r.p.m. durante 0.25 hrs., 85000 r.p.m. durante 0.25 hrs., 83000 r.p.m. durante 0.5 hrs., y 80000 r.p.m. durante 0.5 hrs. Estas centrifugaciones son manejadas por un programa en la ultra centrifuga Beckman Optima XL-90, con un rotor NVT-90.

Una vez que ha concluido la centrifugación se procede a picar el tubo. El tubo se ilumina con luz ultravioleta de longitud de onda larga, para visualizar las bandas. La banda superior son restos de DNA cromosomal y/o plásmido roto y la banda inferior es la que contiene la muestra de plásmido. Se recomienda picar el tubo con agujas gruesas (20 x 25) y con una jeringa de 3 ml, procurando que se pique un poco más abajo de la banda y con el bisel de la aguja mirando hacia la banda.

Se saca la banda en un volumen apropiado (200 a 300 μ l), y se coloca en un tubo Eppendorf.

Por otra parte se satura isopropanol con cloruro de sodio de la siguiente manera: se agrega un volumen de isopropanol y un volumen de NaCl 5 M en un tubo, se agita y se deja reposar.

Se extrae el bromuro de etidio del tubo que contiene el plásmido, agregando un volumen de isopropanol saturado con NaCl; se mezcla bien y se centrifuga por dos minutos a 14000 r.p.m. en una microfuga, se elimina la fase orgánica superior. Este procedimiento se

debe repetir varias veces hasta lograr eliminar de la muestra todo el bromuro de etidio.

Se pasa la muestra a un tubo de vidrio y se le agregan 2 volúmenes de agua y 6 volúmenes de etanol absoluto. se deja incubando a -20°C durante toda la noche para dar mayor eficiencia a la precipitación.

Se centrifuga a 3500 r.p.m. durante 15-20 min. a 4°C . Se extrae todo el sobrenadante y se seca el botón a 50°C . Se resuspende el botón en 400 μl de TE 10 mM y se coloca en un tubo Eppendorf. Se añade 1 volumen de fenol- cloroformo (1:1), se agita bien y se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 10 min.

Se toma la fase orgánica superior, se coloca en un tubo limpio y se le agrega 1/25 de volumen de NaCl 5 M y 1 volumen de isopropanol, se incuba durante 10 min. en hielo y se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 10 min. en la microfuga.

El botón es finalmente resuspendido en 100 μl de TE 10 mM y guardado a -20°C hasta que sea utilizado.

Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa de bajo punto de fusión (LMP)

Una vez que se ha digerido con endonucleasas de restricción el plásmido y se ha comprobado que la digestión ha sido completa y se ha identificado la banda de interés por medio de un gel de agarosa normal se procede a fabricar el gel de agarosa LMP.

Antes de correr el gel es necesario tener en cuenta que la agarosa LMP tiene propiedades diferentes a la agarosa normal, por lo que es necesario que los geles se dejen a 4°C durante 40-60 min. para una gelificación completa. Además es conveniente hacerlos más diluidos que los de agarosa normal, siempre y cuando la banda de interés no sea menor a 1 Kpb; un gel de agarosa LMP al 0.6 % equivale a uno de agarosa normal al 1 %.

El gel con la muestra es corrido a 30 V durante 5 hrs. o a 12 Volts durante 16 hrs. Es importante que el buffer TBE sea nuevo y que el bromuro de etidio se prepare momentos

antes de teñir el gel.

Después de correr el gel y teñir con bromuro de etidio hay que cortar las bandas, procurando cortar la agarosa lo más cerca del DNA para reducir el volumen de la rebanada y utilizando luz ultravioleta de longitud de onda larga por un tiempo corto.

Se pone a fundir la rebanada de agarosa que contiene el DNA en un tubo Eppendorf a 65-70°C durante 10 minutos. Se calcula el volumen de la agarosa fundida y se añade 1/10 de volumen de NaCl 5 M, se mezcla bien y se deja otros 5 minutos en el baño.

Por otra parte se satura un poco de fenol con NaCl de la siguiente manera: en un tubo Eppendorf se mezclan 100 µl de NaCl 5 M con 400 µl de H₂O y 500 µl de fenol. Se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 2 min., se retira la fase acuosa y se coloca el fenol saturado a 37°C.

Se coloca el tubo con la agarosa fundida a 37°C durante 3-5 min. Se añade después al tubo con agarosa 2/3 de volumen del fenol saturado e inmediatamente se agita en vórtex durante 30 seg; se recomienda trabajar lo más rápido posible para evitar que la agarosa se gelifique.

Se centrifuga a 14000 r.p.m. en la microfuga durante 5 min. y se pasa la fase acuosa a un tubo limpio. Se añade al fenol 45 µl de TE 10 mM o agua y 5 µl de NaCl 5 M, se agita en vórtex y se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 2 min. Una vez hecho esto se mezcla la fase acuosa con la anterior.

Se añade 1 volumen de fenol-cloroformo (1:1) a la fase acuosa, se agita 15 seg. en vórtex y se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 2 min.

Se pasa la fase acuosa a un tubo limpio y se añade un volumen de cloroformo, se agita 15 seg. en vórtex y se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 2 min.

Se pasa la fase acuosa a un tubo limpio y se añade 1 μ l de tRNA a una concentración de 10 mg/ml (el tRNA se añade para recuperar mayor cantidad de DNA, siempre y cuando el DNA no vaya a ser usado posteriormente para ser tratado con fosfatasa alcalina o cinasa), se mezcla bien y se añade 1 volumen de isopropanol, se mezcla y se incuba a -20°C durante 2 hrs. por lo menos.

Se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 10 min. en la microfuga, se extrae todo el isopropanol con una pipeta, teniendo cuidado de no llevarse el botón que por lo regular es muy pequeño y fácil de despegar. Se seca el botón durante unos 10 min. a 50°C y finalmente se resuspende en un volumen adecuado de TE 10 mM.

Minipreparaciones de plásmido de *Streptomyces* y *Escherichia coli*

Se pasan con un asa esporas de *Streptomyces* a un tubo con 2 ml de medio LBS, el cual puede llevar antibiótico, siempre y cuando se necesite.

Se incuba a 29°C en agitación durante 48 hrs. Se pasa el medio conteniendo el micelio a tubos Eppendorf y se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 6 min. se retira todo el sobrenadante por medio de una línea de vacío.

De colonias aisladas de *E. coli*, se toman colonias con un palillo estéril y este se introduce en 2 ml de medio LB, el cual puede contener antibiótico. Se incuba a 37°C en agitación durante 6 hrs. Se pasa el medio conteniendo las células a tubos Eppendorf y se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 6 min. Se retira todo el sobrenadante por medio de una línea de vacío.

Se resuspende el paquete de células o de micelio en 100 μ l de Tris 25 mM, EDTA 25 mM pH 8. En el caso de *Streptomyces* el TE 25 mM debe contener lisozima a una concentración de 2 mg / ml. Para *E. coli* se incuba 5 min. en hielo y para *Streptomyces* al menos media hora a 37°C, o hasta que el micelio este visiblemente lizado (debe observarse translúcido y viscoso).

Se añaden 200 µl de una solución fresca de NaOH 0.2 N, SDS 1 %, se mezcla bien por inversión vigorosa de los tubos, hasta que se vea transparente, homogéneo y muy viscoso. Cuesta más trabajo mezclar bien las minipreparaciones de *Streptomyces*; en caso de que no se mezcle bien, se pueden agitar los tubos en vórtex durante 10-15 seg. Se incuba en hielo por 10 min.

Se añaden 150 µl de acetato de potasio 3 M pH 4.8, se mezcla bien por inversión hasta que se pierda la viscosidad y se vea un precipitado blanco. Se incuba 15 min. en hielo. Se añade al tubo 400 µl de fenol - cloroformo (1:1), se agita 30 seg. en vórtex y se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 2 min.

Se pasa la fase acuosa a otro tubo y se añade 1 ml de etanol absoluto frío y se deja precipitar 5 min. a temperatura ambiente. Se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 10 min.

Se retira todo el sobrenadante (etanol) con una línea de vacío, es necesario dar un pulso en la microfuga para extraer todo el residuo de etanol del tubo. Se resuspende el botón en 50 µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM pH 8) y se añaden 150 µl de acetato de sodio 4 M pH 6. Se mezcla bien y se incuba por lo menos durante 1 hr. a -20°C.

Se centrifuga durante 10 min. a 14000 r.p.m. en la microfuga. Se pasa el sobrenadante a un tubo limpio y se añaden 200 µl de isopropanol, se deja precipitando por 10 min. en hielo.

Se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 10 min. en la microfuga, se elimina todo el sobrenadante y se resuspende el botón en 45 µl de TE 10 mM. Se agregan 5 µl de acetato de sodio 3 M pH 6, se mezcla bien y se añaden 125 µl de etanol frío. Se deja precipitando 10 min. en hielo.

Se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 10 min. en la microfuga. Se elimina todo el sobrenadante y se pone a secar el botón 10 min. a 50°C. Se resuspende finalmente en 25 µl de TE 10 mM.

TRANSFORMACION DE *Streptomyces sp.* y *Escherichia coli*

Obtención de micelio para transformación en *Streptomyces lividans* JT46

Se agrega a un matraz Erlenmeyer de 250 ml con resorte, 23.75 ml de medio YEME complementado con $MgCl_2$ y se agrega 1.25 ml de glicina al 10 % más 200 μ l de una solución de esporas concentradas. Se deja en incubación por 40 hrs. a 29°C.

Se colecta el micelio por centrifugación y se lava 2 veces con sacarosa al 10.3 %. El botón de micelio se guarda congelado a -20°C hasta su uso.

Buffer P

El buffer P es especialmente utilizado para la transformación, siendo un medio isoosmótico para la transformación de protoplastos de *Streptomyces*. Para lo cual se necesita que todo el material (vasos, probetas, etc.), se encuentre totalmente libre de cualquier tipo de detergentes.

Sacarosa	51.5 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1.01 g
K_2SO_4	0.125 g

Se disuelve y se afora a 400 ml, se distribuyen alícuotas de 40 ml en botellas de 40 o 60 ml y se autoclavea. Antes de usarse se añaden, en el siguiente orden y agitando después de cada adición las siguientes soluciones.

Elementos trazas R5	100 μ l
KH_2PO_4 (0.5 %)	0.5 ml
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (3.68 %)	5.0 ml
Tris.HCl (3 %, pH 7.2)	5.0ml

Procedimiento de transformación en *Streptomyces*

Después de preparar una botella de buffer P completo se recomienda dejar reposar la solución por lo menos dos horas y posteriormente filtrar con filtros Millipore de 0.45 mm.

Se deja descongelar un tubo con micelio a temperatura ambiente y se resuspende suavemente. Se agregan 5 ml de una solución de lisozima filtrada por Millipore 0.45 mm a una concentración de 1 mg/ml en buffer P. Se sube y se baja la solución con el micelio de 4-5 veces con una pipeta para homogeneizar la solución, se pone a incubar a 30°C y se toman muestras cada 20 min., se observan en el microscopio hasta que se obtenga la mayor concentración de protoplastos. En cada muestreo hay que resuspender la solución para facilitar el desprendimiento de los protoplastos del micelio.

Se filtran los protoplastos en un tubo con algodón para eliminar los restos de micelio, y se agregan 5 ml de buffer P para diluir la lisozima. Un tubo de micelio alcanza para dos transformaciones; se dividen los protoplastos en dos tubos y se centrifuga a 3500 r.p.m. durante 10 min.

Se decanta el sobrenadante, el botón de protoplastos se resuspende con su gota muy suavemente para evitar que se rompan. Se agregan 10 ml de buffer P para lavar los protoplastos, resuspendiendo suavemente con una pipeta. Se centrifuga a 3500 r.p.m. durante 10 min.

Mientras se centrifugan los protoplastos se pone a fundir a calor 0.5g de polietilenglicol (PEG 1000) estéril, ya fundido se agregan 1.5 ml de buffer P y se mezcla en vórtex; también se funde agar suave hipertónico y se deja en baño María a 50°C hasta antes de usarse.

Una vez que han salido de la centrifugación los protoplastos, se decanta el sobrenadante y el botón se resuspende suavemente. Se agrega el DNA a los protoplastos e inmediatamente se agregan 0.5 ml de la solución de PEG. Se resuspende subiendo y bajando todo el volumen con la pipeta Pasteur cuatro veces. Antes de que pasen 3 min. se añaden 5 ml

de buffer P, y se centrifuga a 3500 r.p.m. durante 10 min.

Se alistan las cajas de medio R2YE secas y el agar suave. En el caso de que se requieran hacer diluciones estas se deberán hacer en buffer P y utilizando pipetas de vidrio.

Se decanta el sobrenadante y con golpes con el dedo se resuspende el botón de protopastos, se añaden 0.5 ml de buffer P. Una vez que se han hecho las diluciones a un volumen de 1 ml, se colocan 100 µl de estas en el centro de la caja y se agregan 3 ml de agar suave esparciéndolo por toda la caja. Se deja gelificar el agar suave sobre las cajas de R2YE y se incuba a 29°C hasta que esporulen las colonias de *Streptomyces*. En caso de que se requiera añadir algún antibiótico se tiene que poner a las 18 hrs. posteriores a la transformación.

Procedimiento para transformación de *Escherichia coli*

Se coloca con un asa el inóculo de *E coli* en un tubo con 2.5 ml de medio YT2X y conteniendo 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y se deja incubando de 3-5 hrs. a 37°C en agitación.

En un matraz Erlenmeyer de 250 ml se inoculan a 12.5 ml de medio YT2X conteniendo 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ con 1/100 del volumen del inóculo del paso anterior. Se deja en incubación por 2 hrs. a 37°C con agitación.

El cultivo obtenido se coloca en un tubo estéril y se incuba en hielo de 10-15 min. Se centrifuga a 3500 r.p.m. durante 10 min. a 4°C.

Se decanta el sobrenadante y se extrae el residuo de medio con una pipeta automática. El botón de células se resuspende suavemente y se agregan 4 ml de buffer de transformación standard (TFB), resuspendiendo en este volumen. Se incuba en hielo de 10 a 15 min. Se centrifuga a 3500 r.p.m. durante 10 min. a 4°C.

Se decanta el sobrenadante y el botón se resuspende suavemente. Se agrega 1 ml de

TFB y se resuspende en este volumen. Se añaden 35 μ l de una solución de DND al 3.5% dimetilsulfoxido y ditionitrol (DMSO y DTT) y acetato de potasio 10mM, poniendo el volumen en el centro del tubo con las células y se agita suavemente en círculo. Se deja incubando en hielo durante 10 min. Después se vuelve a añadir una alícuota igual de DND (35 μ l), para dar una concentración final de 7%. Se incuba el tubo en hielo de 10 - 20 min., los reactivos son preparados de acuerdo a (Hanahan, 1985).

Se divide en alícuotas de 200 μ l en tubos preenfriados. En una alícuota se añade el plásmido en un volumen menor de 20 μ l, se mezcla bien y se incuba en hielo de 20 - 40 min.

Se da un choque térmico a las células poniéndolas a incubar a 42°C durante 30 seg., se colocan inmediatamente a incubar en hielo por 2 min. Para que las células empiecen a replicar el plásmido antes de colocarse en un medio de selección para el marcador que posea el plásmido, se le agrega al tubo 0.8 ml de YT2X y se incuba en agitación durante 1 hr. a 37°C.

Se platan 100 μ l del tubo. en caso de que sea necesario se debe hacer diluciones para obtener colonias aisladas.

Hibridación DNA-DNA tipo Southern

Sistema de marcaje de DNA para pruebas no radioactivas

El sistema de marcaje de DNA BioPrime (de Life Technologies), es especialmente diseñado para el uso de sondas biotiniladas. Los octameros con secuencia al azar son añadidos al templado de DNA desnaturalizado y sirven como "primers" para el fragmento mayor de la DNA polimerasa I (Klenow), en la presencia de biotina-14-dCTP, para producir sondas de DNA biotinilado, para el uso de la detección no radioactiva de DNA y RNA. Con este sistema de marcaje se obtiene una considerable ganancia en síntesis de DNA, resultando en una amplificación de 10-40 veces de sonda. Este producto está diseñado para pruebas en las que el DNA es limitado.

Sistema Quimioluminiscente de Detección de Ácidos Nucleicos (SQDAN)

El SQDAN fue diseñado para la detección no radioactiva, quimioluminiscente de sondas biotiniladas de hibridación de ácidos nucleicos inmovilizados sobre membranas de nylon. Los procesos de detección involucran tres pasos básicos.

Una sonda marcada biotinilada es hibridada contra ácidos nucleicos inmovilizados.

El conjugado streptavidina-fosfatasa alcalina (SA-AP), es unido a grupos biotinilados.

La membrana es incubada con un sustrato de fosfatasa alcalina que emite luz cuando es fosforilado. Esta señal es detectada por exposición a una película de rayos X.

El procedimiento de detección se lleva de acuerdo al protocolo recomendado por los fabricantes.

Detección de cadena sencilla de DNA

El DNA total de *Streptomyces* fue aislado tratando micelio con lisozima y por lisis con SDS y extracción con fenol cloroformo utilizando el procedimiento no. 4 de Hopwood *et al.*, (1985). Después del paso 3 del procedimiento (extracción fenol cloroformo) las muestras fueron cargadas en geles de agarosa al 0.8 %. Cadena sencilla de DNA fue detectada por hibridación en membranas de nitrocelulosa sin llevarse a cabo desnaturalización como describe (te Riele *et al.*, 1986).

RESULTADOS

Construcción del plásmido pB72

El plásmido pB72 es un derivado del plásmido pIJ2925 (Janssen y Bibb, 1993), el cual presenta origen de replicación, un gen de resistencia a ampicilina y sitios de múltiple clonación (MCS) localizado en el gen del fragmento alfa de la β -Galactosidasa. Como característica importante tiene los sitios de clonación flanqueados por sitios para la enzima *Bgl*II.

La construcción se hizo a partir del polilinker del plásmido pUCBM21 de Boehringer Mannheim, utilizando los sitios *Hind*III y *Eco*RI e insertándolo en el plásmido pIJ2925 digerido previamente en los sitios *Hind*III y *Eco*RI. Posteriormente se eliminó el sitio de *Apa*I con Klenow y ligasa para restaurar la fase correcta del gen *lacZ*.

El resultado es un plásmido tipo pUC con un polilinker que presenta un sistema de múltiple clonación, con los sitios en los cuales se pueden introducir fragmentos del pJV1. El plásmido permite seleccionar por color, siendo colonias blancas las que llevan el fragmento clonado en el sistema MCS, y dando colonias azules las células que obtuvieron el plásmido nativo (pB72) en presencia de X-Gal e IPTG. (Figura 6).

pUCBM21

Hind III Nco I Eco RV Sph I
ATGACCATGATTACGCCAAGCTTCCATGGGATATCGCATGC
M I T P S F H G I S H A
Pst I Sac I Xba I Sal I Apa I Kpn I Not I
CTGCAGAGCTCTAGAGTCGACGGGCCCGGTACCGCGGCCGC
C R A L G S T G P V P R P
Mlu I Bam HI Sma I Eco RI
ACTTAAGTTACGCGTGGATCCCCGGGAATTCACTGGCC
H L S Y A W I P G N S L A

pIJ2925

Bgl II Pst I Hind III Sph I Sal I
ATGACATGATTACCAGATCTGCAGCCAAGCTTGCATGCCGGTTCG
M I T R S A A K L A C R S
Xba I Bam HI Sma I Kpn I Eco RI Bgl II
ACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCCCCAGATCT
T L E D P R V P S S N S P D L
GAGCTTG
S L

pB72

Bgl II Pst I Hind III Nco I Eco RV
ATGACATGATTACCAGATCTGCAGCCAagcttccatgggatatc
M I T R S A A K L P W D I
Sph I Pst I Sac I Xba I Sal I Kpn I Not I
gcatgcctgcagagctctagagtcgacGCggtaccgcgggccgca
A C L Q S S R V D A V P R P H
Mlu I Bam HI Sma I Eco RI Bgl II
cttaagttacgcggtggatccccgggAATTCCCCAGATCTGAGCT
L S T A W I P G N S P D L S
TG
L

Figura 6: MCS del plásmido pB72

Construcción del pB50

El plásmido pB50 se obtuvo digiriendo el pJV1 en el sitio de *Bgl*II al cual se insertó un fragmento que tiene el gen de resistencia a thioestreptona (*tsr*) obtenido del plásmido pIJ702 con la enzima *Bcl*I. El gen de thioestreptona se transcribe en dirección inversa a la replicación del plásmido, posee todas las secuencias del pJV1 y por lo tanto debe de llevar el sitio *ss ori* funcional. (Figura 7).

Construcción del plásmido pB57

El plásmido pB57 tiene un tamaño de 5.7 Kpb. Se construyó digiriendo el pB50 con *Bam*HI y purificando la banda mayor de 5.7 Kpb en un gel de agarosa LMP, la cual fue recircularizada e introducida a *S. lividans* JT46 por transformación; carece de los dos fragmentos pequeños de *Bam*HI. (Figura 7).

Construcción del plásmido pB61

El pB61 es un plásmido de 3.097 Kpb, el cual se construyó digiriendo el pB50 con *Bam*HI y *Kpn*I. La banda de 3.907 Kpb fue purificada y los extremos se trataron con Klenow para hacerlos romos. Se ligaron los extremos y se introdujo a la cepa *S. lividans* JT46 por transformación. EL pB61 contiene la región esencial del pJV1 y el gen *tsr*. Al religar después de utilizar Klenow se recupera el sitio de *Bam*HI y se pierde el sitio de *Kpn*I. Solamente es el replicón mínimo, carece de su sitio *ss ori* y por lo tanto acumula gran cantidad de ssDNA. (Figura 7).

Construcción de los plásmidos pB83 y pB84

Para la construcción de los plásmidos pB83 y pB84, se digirió el plásmido pIJ702 con la enzima *Bcl*I y el fragmento de 1.56 Kpb fue purificado a través de un gel de agarosa LMP. Este fragmento posee el gen *mel* que codifica para la producción de melanina. Por otra parte se digirió el plásmido pB61 en su único sitio de *Bam*HI y los extremos fueron desfosforilados. Se ligó el pB61 con el fragmento que contiene al gen de melanina del pIJ702 y se introdujo

por transformación en *S. lividans* JT46. Se hicieron minipreps de las colonias productoras de melanina y se encontraron las dos posibles orientaciones del gen de la melanina. Se purificaron por medio de gradiente de CsCl para usos posteriores. (Figura 7).

Construcción de los plásmidos pB87 y pB88

Para realizar las siguientes construcciones, el fragmento de *NcoI* del plásmido pJV1 de 2.409 Kpb fue purificado en un gel de agarosa LMP e insertado en el sitio único de *NcoI* del plásmido pB72 previamente desfosforilado. Posteriormente se hicieron minipreps de las transformantes blancas de *E. coli* JM101, para conocer la orientación en la cual se insertó el fragmento. Se purificó el fragmento con los sitios de flanqueo *BglII* y se insertó en el plásmido pB83 en su sitio único de *BglII* previamente desfosforilado. Se hicieron minipreps de las transformantes resistentes a thioestreptona, deficientes en la producción de melanina y se purificarán las dos orientaciones posibles. (Figura 7).

Construcción de los plásmidos pB85 y pB86

Para construir estos plásmidos, se digirió el plásmido pJV1 con las enzimas *ScaI* y *NcoI*. El fragmento de 656 pb fue purificado de un gel de agarosa LMP e insertado en el plásmido pB72, previamente digerido con *SmaI* y *NcoI*. El fragmento insertado en pB72 se extrajo utilizando los sitios de flanqueo *BglII* y se purificó en un gel de agarosa LMP.

El fragmento de *BglII* fue insertado en el sitio único del plásmido pB83 previamente desfosforilado. Una vez ligado fue introducido por transformación en *S. lividans* JT46. Se aislaron colonias no formadoras de melanina y resistentes a thioestreptona y se hicieron minipreps. De las minipreps se obtuvieron las dos orientaciones posibles. (Figura 7).

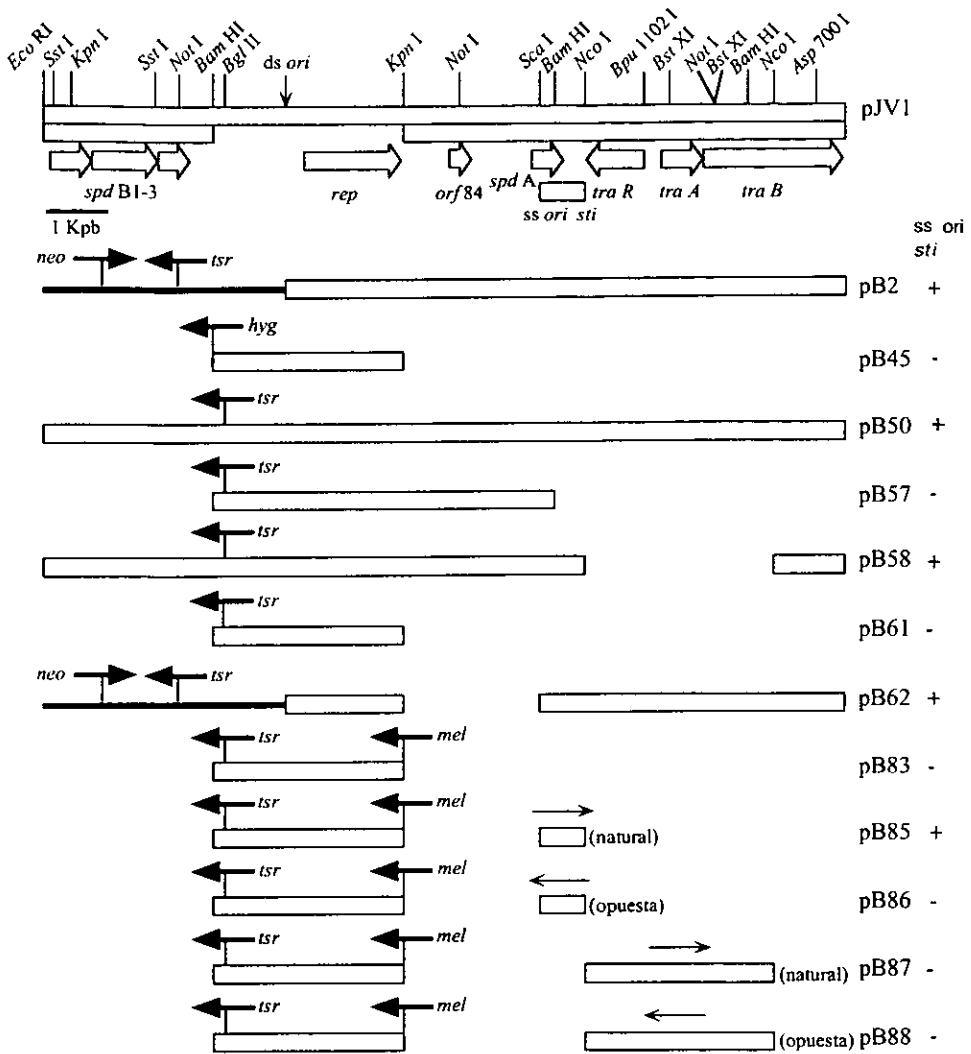


Figura 7: Derivados del plásmido pJV1

Construcción del plásmido pB58

El plásmido pB58 tiene un tamaño de 9.7 Kb que se construyó digiriendo el pB50 con la enzima *Nco*I. Se purificó la banda mayor de 9.7 Kpb en un gel de agarosa LMP. El fragmento fue religado e introducido a JT46 por transformación (Figura 7).

Construcción del plásmido pB2

Este plásmido tiene un tamaño de 10.5 Kpb y contiene un origen de replicación híbrido el cual fue generado *in vivo* al cointegrar al pJV1 silvestre con el vector pJJ486 (derivado del pJJ101), en sus sitios únicos de *Eco*RI (Servín, 1993). Por lo tanto el pB2 posee una parte proveniente del pJV1 (comprendida entre el inicio de la replicación y el sitio *Eco*RI) y otra proveniente del pJJ486 del sitio *Eco*RI al origen de replicación (Figura 7).

Construcción del plásmido pB62

Este plásmido fue realizado mediante la digestión del plásmido pB2, quitando un fragmento que va del sitio *Sca*I a *Kpn*I, siendo esta región parte del pJV1, la cual fue purificada en un gel LMP, religada en sus extremos romos e introducida en *S. lividans* JT46 mediante transformación (Figura 7).

Construcción del plásmido pB45

El plásmido pB45 es el replicón mínimo de pJV1 que fue obtenido mediante las enzimas *Bam*HI y *Kpn*I y posteriormente ligado al gen de resistencia a higromicina. Una vez hecha esta construcción fue transformada a la cepa *S. lividans* JT46 (Figura 7).

Localización del sitio de inicio de la síntesis de cadena sencilla (ss ori) del plásmido pJV1

Para la localización del sitio (ss ori), se utilizó la técnica de hibridación tipo Southern, utilizando el sistema de detección quimioluminiscente. Se analizó DNA total no desnaturalizado de cepas de *Streptomyces lividans* JT46, conteniendo diferentes derivados del

plásmido pJV1 (ver material y métodos, y construcciones de derivados). Se utilizó como sonda el replicón mínimo de pJV1, que se localiza del sitio de *Bgl*II a *Kpn*I, siendo marcado este fragmento con biotina-dCTP. En todos los casos se colocaron 10 µl de la extracción de DNA total en un gel de agarosa 0.8%. corriéndose durante la noche a 12 Volts.

Se probaron los plásmidos pB57, pB50, pB62 y el pB58, mediante hibridación contra la sonda previamente biotinilada. Los plásmidos que pueden hibridar son solamente los intermediarios monoméricos de cadena sencilla en las condiciones no desnaturalizantes que se utilizaron. Se puede apreciar que sólo el plásmido pB57 presenta una gran acumulación de plásmido en forma de cadena sencilla. Las hibridaciones no específicas que se pueden apreciar como manchas no intensas probablemente sean debidas a plásmidos que se están replicando (Figura 8).

Cuando se probaron los plásmidos pB50, pB61, pB57, pB2 y pJV1, en la hibridación contra la sonda biotinilada, sólo los plásmidos pB61 y pB57 acumularon gran cantidad de DNA de cadena sencilla, mientras que pB50 y pJV1, que son silvestres, no acumularon cadena sencilla. De igual manera el plásmido pB2 no acumula cadena sencilla (Figura 9).

Se probaron los plásmidos pB61, pB83, pB85, pB86 y pB50, en la hibridación contra la sonda biotinilada. Los plásmidos pB61 y pB83 acumularon una gran cantidad de plásmido en forma de cadena sencilla. El plásmido pB50 no acumuló plásmido de cadena sencilla. Lo trascendente es que el plásmido pB85 que tiene un fragmento de 656 pb que se encuentra entre los sitios *Sca*I y *Nco*I en la orientación original con respecto al pJV1, no acumuló cadena sencilla, mientras que el plásmido pB86 el cual contiene el mismo fragmento de 656 pb del pB85, sólo que en la orientación reversa, acumuló gran cantidad de plásmido en forma de cadena sencilla similar a los plásmidos pB61 y pB83 (Figura 10). Por lo tanto este fragmento reunió las características de un origen de replicación de cadena sencilla.

Cuando se probaron los plásmidos pB83, pB87, pB88 y pB50, en la hibridación contra la sonda biotinilada, el plásmido pB83 (que se puede considerar como un replicón mínimo derivado del pJV1), acumuló una gran cantidad de intermediarios de cadena sencilla. Los plásmidos pB87 y pB88 (que poseen un fragmento de 2.4 Kpb procedente de los sitios *Nco*I y

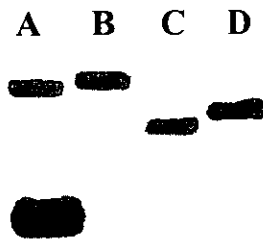


Figura 8: Hibridación tipo Southern de DNA total no desnaturalizado de *S. lividans* con diferentes plásmidos; carril A, pB57; carril B, pB50; carril C, pB62; carril D, pB58

A B C D E

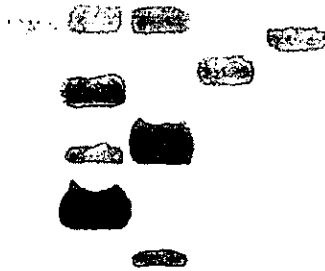


Figura 9: Hibridación tipo Southern de DNA total no desnaturizado de *S. lividans* con diferentes plásmidos; carril A, pB50; carril B, pB61; carril C, pB57; carril D, pB2; carril E, pJV1.

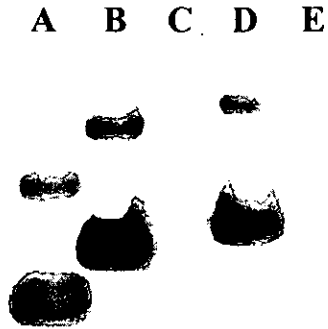


Figura 10: Hibridación tipo Southern de DNA total no desnaturalizado de *S. lividans* con diferentes plásmidos; carril A, pB61; carril B, pB83; carril C, pB85; carril D, pB86; E, pB50.

A B C D



Figura 11: Hibridación tipo Southern de DNA total no desnaturalizado de *S. lividans* con diferentes plásmidos; carril A, pB83; carril B, pB87; carril C, pB88; carril D, pB50.

que además varían en su orientación uno respecto del otro), acumularon igual cantidad de cadena sencilla que el plásmido pB83. El plásmido pB50 (que se puede comparar con el plásmido silvestre pJV1), no acumuló plásmido en forma de cadena sencilla (Figura 11).

Determinación del fenotipo de incompatibilidad fuerte (*sti*) del plásmido pJV1

Para comprobar que el sitio *ss ori* produce el fenotipo de incompatibilidad fuerte (*sti*) se introdujo por transformación a la cepa *S. lividans* JT46 el plásmido pB45, el cual carece de *ss ori* (Fig. 7). A esta cepa se introdujeron posteriormente los plásmidos pB83, pB50, pB85 y pB86. Se seleccionan las transformantes y se cosecharon las esporas. Posteriormente se hicieron diluciones de los concentrados de esporas en cajas de Petri con thioestreptona y cajas de Petri con thioestreptona e higromicina. De las colonias que se obtuvieron se hizo otra ronda de esporulación y se plaquaron en los mismos medios de selección.

Como se aprecia en la figura 12, en el primer ciclo de esporulación el plásmido pB85 y el pB50 son los únicos plásmidos que presentan incompatibilidad fuerte con pB45 y son capaces de desplazarlo. Aún más sorprendente pB85 parece presentar más incompatibilidad fuerte hacia pB45 que pB50. Las colonias al final del segundo ciclo son muy pequeñas y con morfología irregular además de que tardan más en esporular (Figura 12).

Se hizo un alineamiento de la secuencia del fragmento *ScaI* – *NcoI* de pJV1 contra la secuencia de los plásmidos pIJ101 y pSN22. Como se puede apreciar en las figuras 13, 14 y 15 el plásmido que más se parece a pJV1 en esta región es el pSN22, por lo cual se piensa que este es el sitio *ss ori* de pSN22.

Determinación de el fenotipo de incompatibilidad (*sti*) del pJV1

PLÁSMIDOS	PRIMER CICLO		SEGUNDO CICLO	
	Tsr	Tsr - Hyg	Tsr	Tsr - Hyg
pB83 / pB45	5.4×10^8	6.4×10^8	4.8×10^8	4.6×10^8
pB50 / pB45	5.9×10^8	8.0×10^7	4.0×10^8	2.7×10^7
pB86 / pB45	1.92×10^9	1.67×10^9	8.9×10^8	1.2×10^9
pB85 / pB45	6.9×10^8	4.4×10^6	1.75×10^9	5.0×10^5

Figura 12: Fenotipo de incompatibilidad fuerte (*sti*).

Expresadas en número de colonias por ml en rondas de crecimiento en presencia de thioestreptona.

```

PIJ101      --GAGGCCGGTCCCGCGAGCCGTGCCG--ATCACGGCAATGAGCCGTGTCACCAT-OTGA
PJV1        CCCCGAGTACTGCCCGCCCTCTTCCGCCCAAGCCGCCTACGAGGACAGGCCCTCCCTGA
      * * * * *
PIJ101      GCCCCTGGCCGTCTGTCCCT--CTGCCACGTGTAT-CAGCTGACACGCACGTGTCAG
PJV1        GCGCCAGCGCGAAGCGGTGTAGCCCTCTCCGCAAGCCGCTCTCCGCACCTCCGTTTC
      * * * * *
PIJ101      GTTCCGCAATGGGTA---GCCCCCGCCGTTTC-CGCGCGGCCATCCGTATCGCGCGG
PJV1        GTACGTGACGATCGCCGACTCTCTCCGATTCCTCACGTGACGAAACG--GTCCGCC--
      * * * * *
PIJ101      TGCTGAGTCGCGCGCGAGCTGTGGGTGGCGGAGGATGACCGGATCTCCCGCCGC
PJV1        TCCCGGATCCCCAGCTAGTCCGCCGTTGTGGTCCCGCTCCCGGAAAGTCCGCGCCCTC
      * * * * *
PIJ101      CGT----CGACCCCGCGAAGCCCGCCCGGGCGG--GTCCGCGGATTTGTCCGG
PJV1        CGAAGGAACAGCCCGCGTGGCCAGGGATGGGGTTGTGTGACCGCGGATCG-CGGGA
      * * * * *
PIJ101      GTCCGCGCGCGCGAGGGCCGACG-GCCAGGACCATGCGCGGATCGCCACCGTGGCGAG
PJV1        CCGTGCCTCCCGGACCGCCCGAGCCCTGGATCAGCTCGACTGCCTTAGCCATCGCG
      * * * * *
PIJ101      GTAGCGAGGGCGATCACCGGCCACCTCCCTCCTGACCGCGCCAGGACCCCTCCAGC
PJV1        GTAG-CAGCTCCTCCCTCAGCC-CGAGACGGCGGTCCGCTCGCTCACCGCCCGTTC
      * * * * *
PIJ101      CGTGCCTCCC-CGGCGGAGTAGC-CCATGTCCCGAAGCGTCCCGC--GGCAGCCGGTA
PJV1        TGGGTGACCGCGGGGTACGGCCCGCCCGCCACTCCCGCGCGCCAGACGGCCGTTTA
      * * * * *
PIJ101      CGACCCG-GAGTCGACAGGCCGGACATGATCCCGTCAATCTCCTGTTCTGACGGGA
PJV1        GCGCCGTGACCCCAACCCTCCCGCGTCAGCCGCTTTTCCCGCCGAGCGCCCGCAG
      * * * * *
PIJ101      CCACGTCCGCGCACCCCTCGATGCGCGCCGGAGCGGCTCCGTGGTCC--CCAGCGGG
PJV1        CCGCGC--ACCGCCGTGCCACGGAGGATT--ACGGACCTTGGCGCCCTCCCTACGGT
      * * * * *
PIJ101      CAGGCGCCAGGAGGCGGAGACGTGGCCGTGACACGA--GAGGTGACCGAGGTCAAG-C
PJV1        CGGAGAGCCTGAAG---AAGCCCCCCACCGCCCGCGCGGGCGGCGTATGTAGGGGT
      * * * * *
PIJ101      GCCTGCCGTGCCCTCCCTCCGCGCCCTCCTCCAGCGTCGACCAGCCGACCGCAGCTC
PJV1        GCAGGAAGGTCACTGCCCATGGGGACC-----
      * * * * *
PIJ101      CCCGCGGTCTCCGCTGGACCCCGCGAC
PJV1        -----

```

Figura 13: Alineamiento de la región Scal-NcoI de pJV1 con la región equivalente de pIJ101

```

PSN22      -CGCAAGAAGCTGCTCGGGCGTACATGAAGGGCCGGCCGAGGAGGCTGAGCTGCGCGG
PJV1       CCGCGATACTGCGCCCGCTCCTGCCCGAG--CGCGCTACGAGGACAGGCGCTCCG
* * * * *
PSN22      AGGAAATCACGTGACGATGCGAGGAAATCAGCTGACTTTCGGGTCCGCAAGGCCCGCAGC
PJV1       TGAGGCCACGCGGAAAGCGGTGGTAGCCGCTCTCCGCAAGGCCGCTCTCCGCACTTCCGT
* * * * *
PSN22      AAGTCACTGAC--TTTCCAAAACCC--CAGGTCAACCTCGGGTTCGCGGTCCCGCGG
PJV1       TTGGTCACTGACGATCGCCGACTCCTCCGATTCGCTCACGTGACGAAAGCGTCCGCT
* * * * *
PSN22      TCCCGGTGAC---GTCCGCGCCCGGTGAAAGGCCCGCC---CCTGCTGCCCC
PJV1       CCGCGATCCCCCAGTAGTCCGCGGTGGTGGTCCCGGTGCGGAAAGTCCGGCGCTCC
* * * * *
PSN22      CGCGC--CGGCGTGCAGCGG--AGACGCTCCCGCTGTTCCGGCAGCAGCAGCGCAG--
PJV1       GAAGGAACAGCCCGCGGTGGCAAGGGATGGGGTGT--GGTGCAGCGCGATCGCCGA
* * * * *
PSN22      CCGCGCCCTCGATGGCGCGCCGACCGAGTGCACACGAGCGCCCTCACCCCATCGC
PJV1       CGGTCCCGCGGACGGCC--CGCAAGCGCTGGATCAGCTGACTGCCCTTAGCCACATCGC
* * * * *
PSN22      GGCAGCAGCCCGCTCCCCATCGACCCGAGACGGGGCGTCCGCTCGCTCACGAGCCAG
PJV1       GGTAGCACT-GCTCCCCCTCAGCCCGAGACGGGGCGTCCGCTCGCTCACGC--GCCGCT
* * * * *
PSN22      CCCCC-CGACGGCGGGGTACGGGGGTCCGGCGACTCCTGGCCGCCAGAGCGCCGAC
PJV1       CTGGGTGACGGCGGGGTACGGCGCCCCCGCCCACTCCCGGCCCGCAGAGCGCCGTTT
* * * * *
PSN22      AGAGCCCGGACCCCCACCCCTCCCGCCAGCCGTCCGGCAGCGGCAACAGAC----
PJV1       AGCGCCCGTGCACCCACCCCTCCCGCGCTCAGCCGCTTCCCGGCCGAGCGCCCGCA
* * * * *
PSN22      GATGCCCGCGCGCGGTGACGGCCCGCATGTA---AACCGTCAAGGATCGCGCTCG
PJV1       GCGCGCACCGCCCGTGCACCGGAGATTACGGACCTTGGCGCCCTCCCGTACGGTCCG
* * * * *
PSN22      TGGGCAGCAGAAAGCCCCCGCGGTCTCGGACGGGGCTCAATGGGGAGGTAGGGCGG
PJV1       AGAGCTGAAAGAACCCCCCGCACGGCCCG--CGGGGGCGCGTATGTACAGGGTGCAGG
* * * * *
PSN22      GGCTGGGOTCACTGCCCATGGGCACC-
PJV1       AA----GATCACTGCCCATGGGACCC
* * * * *

```

Figura 14: Alineamiento de la región *Scal-NcoI* de pJV1 con la región equivalente de pSN22

```

PSN22      ---CGCAAGAAGCTGCTGCGCCGCTACATGAAGGGCCGGGCCGAGGAGGCTGAGCTGCGC
PJV1       --CCGCGAGTACTGCCGCCCTCTCTGCCGCCAG--CGCGCTACGAGGACAGGCCCTC
PIJ101     ----GAGCCCGTCCCGGGAGCGTGCCTGAT----CACGGCAATGAGCGTGGTCACCAT
          * * * * *
PSN22      GGAGGAAAAGTCACGTGACGATGCAGGAAAGTCACGTGACTTTCCTCCGTCCGCAAGCCCA
PJV1       CGTGAGGCCCCAGCGCGAAGCCGCTGTAGCCCTCTCGCCAAAGCCCGCTCTCCCACTTCC
PIJ101     -GTGAGCCCCCTGGCGTCTGTCTCCGTCTGCCCTACGTT--TAT-CAGTCTGACACGCACT
          * * * * *
PSN22      GCAAAGTACAGTGAC--TTTCCAAAACCC--CAGGTCACCCCTGGGTTCCCGCTCCCGC
PJV1       GTTTCGTCACTGACGATCGCCGACTCTCTCCGATTCCGTCACTGACGAAACGGTGCGC
PIJ101     GTCAGGTTGCCCAATG---GOTAGGCCCCCGCGTTTC-CGGCGGGCCATCCCTCATGC
          * * * * *
PSN22      GTCCCGCTGAC--GTCCCGGCCCGGTGGAAGGCCCGGCC----CGTCTCTGCC
PJV1       GGACGCTGCCCCCAAGTACTCGCCGCTGTGTGTCCCCGTGGCGAAGGTGCCCGCGCT
PIJ101     GCGGTGCTGAGTCCGGCCGGGAGCTGTGTG--GTGGCGCGAGGATGACCGGGATCTCC
          * * * * *
PSN22      CCGCGC---CGGCGTGAACCGGG-AGACGCTCCCGCTGTTCCGGCAGCAGCACGCA
PJV1       CCGAAGGAA-CAGCCCGCCGTGGGCAAGGATGGGTTGT--GOTGACGGCGATCGCC
PIJ101     CCGCCCGTGCACCCCGCGAGGCGCGGGCCGGCGGTT-GCCCGCGATTGOTCGG
          * * * * *
PSN22      G--CCCGGCCCTCGATGGCCGC--CCGACACGGAGTGACCCAGACGGCCCTACCCC
PJV1       GGACGCTGCCCCGGGAGCGCC-CG--CAGCGCTGAGATCAGCTGACTGCCCTAGCCAC
PIJ101     GGTGGCGCGCGCGGAGGGCGAGCGCCAGGACCATGGCGCGATCGCCACGGTGGCGAG
          * * * * *
PSN22      ATCG-CGGCAGCAGCCC-GCTCCCATCGACCCGAGACGGCGGTGCGGTCCGCTCACGC
PJV1       ATCG-CGOTAGCAGCT--GCTCCCTCAGCCCGAGACGGCGGTGCGGTCCGCTCACGC
PIJ101     GTAGCGAGGGCGGATCACGCGCCACTCTCTCTGTCGACCGCGCCAGGACCGCTGCAAC
          * * * * *
PSN22      AGCCAGCCCGC-CGACG--GCGGGGTAC--GGGGGTCCGGGACT-CCTGGCCCGCC
PJV1       -GCCCTCTGGGTGACG--GCGGGGTAC--GGCGCCCGCCCACT-CCCGGGCCCGCC
PIJ101     CTTCCCTCCCGCGGAGTAGCCCATGTCCCGGAAGCGTCCGGCGGACCCCGTACGAC
          * * * * *
PSN22      AGACGGCCGCACAG--AGCCCGGACCCCCACCCCTCCCGCCGACCGCTCGCGACCGG
PJV1       AGACGGCCGTTAG--CGCCGTGACCCCCACCCCTCCCGCGTCAAGCCGCTTTGCCCGC
PIJ101     CCGAAGTGCACCGAGCCGAGCATGATCCCGTCACTCTCTCTGTGCTGAGCGGAGCAGC
          * * * * *
PSN22      CACAAGCAC----GATGCCCGCGGC-CGGGTGACGGCCCGCCATGTA----AACCGC
PJV1       CCAGCGCGCCCGCAGCCCGCCACCGGC-CGTGCCACGGAGGATTACGGACT-TGGCGCC
PIJ101     TCGCCGACCCCTCGATGGCGCCGGGACGGCTCGGTGGTCCCCAGACGGCGAGCGCC
          * * * * *
PSN22      TCAGGATGCCGCTCTGTGGCAGCAGAAAGCCCCCGCCGGTCTCGGACGGGGCTCAAT
PJV1       CTTCCGTACGGTCCGAGAGCGTGAAGAAGCCCCCGCCACCGCCG-CGGGGCGCGCT
PIJ101     CAGGAGGGCGGAGACTGGCCGTGACACGAGAGGTGACCAAGGTCAG-AGCCGTGCCCT
          * * * * *
PSN22      GGGGAGTAGG-CGGGGGCCCTGGGTCACTCCGCCATGGGCACC-----
PJV1       ATGTCAAGGGT-CCAGGAA----GOTCACTCGCCATGGGACCC-----
PIJ101     GCCCTCCCGCTCGCGGCCCTCTCTCAGCG-TCGACAGGCCAGCCCACTCCCGCGG
          * * * * *
PSN22      -----
PJV1       -----
PIJ101     TCTCGGCTGGACCCGGCGAC

```

Figura 15: Alineamiento de la región Scal-NcoI de pJV1 con las regiones equivalentes de pIJ101 y pSN22.

DISCUSION

La localización del sitio de inicio de la replicación de precursores de cadena sencilla en diferentes derivados del plásmido silvestre pJV1 de *Streptomyces phaeochromogenes*, fue llevada a cabo en la cepa de *Streptomyces lividans* JT46 debido a que esta cepa no produce recombinación intraplásmidos entre pequeñas regiones repetidas contenidas en dos plásmidos; esto garantizó la integridad, e individualidad de los derivados de pJV1, dentro de la cepa *S. lividans* JT46.

La utilización de pB72 y *Escherichia coli* JM101 como vector y hospedero secundario respectivamente agiliza las subclonaciones de fragmentos para cualquiera de los derivados hechos de pJV1, los cuales requieren ser amplificados con un sitio único de *Bgl*II que los flanquee, estando éste en el MCS de pB72.

El sistema típico para hibridar una sonda de DNA biotinilada contra DNA total, requiere que el DNA sea previamente desnaturalizado. Sin embargo en la hibridación de plásmidos que se replican por medio del círculo rodante no es necesario efectuar desnaturalización, lo que permite detectar directamente cuales son los plásmidos que acumulan DNA de cadena sencilla y los que no acumulan de DNA cadena sencilla dentro de la célula.

La región comprendida entre los sitios *Sca*I y *Nco*I, con un tamaño de 656 pb, contiene una secuencia que en la orientación nativa con respecto al plásmido pJV1 silvestre (como en el pB85) contiene el sitio ss ori funcional, en el cual muy probablemente interacciona la RNA polimerasa para sintetizar un primer de RNA que servirá para que las DNA polimerasas del hospedero puedan iniciar la síntesis de la cadena complementaria. En el caso de pB86, que posee su sitio ss ori no funcional ya que su orientación es opuesta respecto a pJV1 (ss ori rev), ya que es la cadena complementaria a la cadena que va siendo sintetizada en los primeros pasos de la replicación la cadena más (+) y no permite la interacción ssDNA-RNA polimerasa. Eventualmente una cierta cantidad de estos plásmidos pueden llevar a cabo la síntesis de la cadena complementaria, pero este es un efecto de síntesis inespecífica que no es llevada a cabo por el ss ori.

Se ha descrito que el plásmido pSN22 posee un sitio de *ss ori* en una región intergénica, arriba del gen *traR*. Los experimentos con los plásmidos pB87 y pB88, que llevan esta región intergénica del pJV1 demuestran que no hay en pJV1 una funcionalidad de *ss ori* en la misma región. El plásmido pJV1 presenta su sitio *ss ori* en una región hacia abajo del gen *tra R*, donde este sitio es más homólogo al plásmido pSN22 que al pIJ101.

Este sitio *ss ori* de pJV1 además de iniciar la síntesis de ssDNA posee el sitio *sti*, el cual actúa de igual manera que el sitio *sti* de pIJ101 (Deng *et al.*, 1988). La incompatibilidad del plásmido pB85 hacia el pB45 es enorme con respecto al plásmido pB86 hacia el pB45 debido a que estos dos son compatibles. La supervivencia en medios selectivos de las colonias baja a 104 veces en una segunda ronda de esporulación en las colonias que mantienen al plásmido pB85 y que desplazan al plásmido pB45. Las pocas colonias que crecen en el medio de selección conteniendo thioestreptona e higromicina son colonias con morfología irregular, son pequeñas y no esporulan, tal vez debido a que aún se esta efectuando el desplazamiento del plásmido pB45 por el pB85.

El plásmido pB86 coexiste con el plásmido pB45 debido a que el sitio *sti* de pB86 no es funcional y la supervivencia de colonias es 100 % igual en thioestreptona que en las placas replica con thioestreptona e higromicina.

Aún más interesante parece ser que el plásmido pB85 es más incompatible con el pB45 que el plásmido pB50 al pB45, ésto talvez se deba a que el pB50 de alguna manera regula negativamente la incompatibilidad hacia el plásmido pB45 y que el pB85 no puede efectuar.

Una investigación de base de datos de 200 pb del fragmento de *ScaI* a *NcoI* (del nucleotido 7250 al 7450) del pJV1 que contiene la actividad de *sti* y *ss ori* es muy similar en tamaño a un fragmento de pIJ101 que presenta también ambas actividades (Zaman *et al* 1993), mientras que en el pSN22 su sitio *ss ori* no se encuentra en un sitio similar ni presenta homología a los *ss ori* de pIJ101 y pJV1. Además de que el sitio de *ss ori* reportado para pSN22 no presenta actividad de sitio *sti*, lo cual nos hace creer que para pSN22 no se ha

CONCLUSIONES

Mediante las pruebas de hibridación de diferentes derivados del plásmido pJV1 de *Streptomyces phaeochromogenes*, introducidos en la cepa JT46 de *Streptomyces lividans*, se localizó una región de 656 pb, la cual se encuentra entre el sitio *ScaI* y *NcoI* del plásmido pJV1, la cual funciona como sitio de inicio de la replicación de cadena sencilla (ss ori). Esta región se encuentra en el plásmido pB85 en la orientación original con respecto a pJV1. Este fragmento no funciona como sitio de replicación ss ori al encontrarse en orientación reversa (ss ori rev) lo cual pasa en el plásmido pB86.

Todos los derivados de pJV1 que no poseen el sitio ss ori o todos los derivados que lo poseen en orientación reversa acumulan plásmido de cadena sencilla, aquellos derivados que tienen el sitio ss ori en orientación similar al pJV1 no acumulan plásmido de cadena sencilla, siendo por lo tanto el fragmento de 656 pb de *ScaI* a *NcoI*, el que contiene el sitio ss ori.

Un plásmido que posee el sitio ss ori en la orientación correcta (ss ori +), no puede coexistir con otro plásmido que no contiene el sitio ss ori (ss ori -), o que lo contiene pero en orientación reversa respecto al plásmido silvestre (ss ori rev). Sólo pueden coexistir plásmidos que posean el sitio ss ori en la orientación silvestre sti +, o que no posean *sti*.

El fragmento de 656 pb de *ScaI* a *NcoI* del pJV1, fue comprobado como el sitio que produce incompatibilidad fuerte ante pB45 un derivado de pJV1 que no posee el sitio *sti*.

En base a los resultados obtenidos el plásmido pJV1 es indudablemente un plásmido que se replica por medio del mecanismo de círculo rodante, conteniendo además de un ds ori, un sitio ss ori y este mismo funciona como sitio *sti*.

PERSPECTIVAS

De este trabajo pueden establecerse los siguientes puntos que de manera particular podrían contribuir aun más a esclarecer como se lleva a cabo la replicación del plásmido pJV1, así como utilizarlo en el futuro.

Establecer la región mínima de replicación de cadena sencilla ss ori de pJV1.

Modificar el plásmido pJV1, utilizando el replicón mínimo con su sitio ss ori para ser utilizado como vector de clonación o expresión en *Streptomyces spp.*

Modificar el plásmido pB83 con el sitio ss ori para ser utilizado como vector de clonación, así como un vector que permita seleccionar clonas positivas a través del gen *mel* utilizando un sitio MCS para genes de *Streptomyces spp.*

BIBIOGRAFIA

- Baas, P., R Low, and H. Jansz. (1981). Single-stranded DNA phage origins, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 136:31-70.
- Bailey, C.R., Bruton, C. J., Butler, M. J., Charter, K.F., Harris, J. E. and Hopwood, D. A. (1986) Propriates of in vitro recombinant derivatives de pJV1, multi-copy plasmid from *Streptomyces phaecromogenes*. J. Gen. Microbiology. 132:2071-2078.
- Bibb, M. J., Schottel, J. L., and Cohen S. N. (1980). A DNA cloning system for interpecies gene transfer in antibiotic producing *Streptomyces*. Nature (London) 274:398-400.
- Bibb, M. J., Freman, R. F., and Hopwood, D. A. (1977). Physical and genetic characterisation of a secon sex factor SCP2, for *Streptomyces coelicolor* A3(2). Mol. Gen. Genet. 154:155-166.
- Bibb, M. J., and Hopwood, D. A. (1981). Genetic studies of the fertility plasmid SLP2 and SLP2' variants in *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Gen. Microbiol. 126:427-442.
- Bibb, M. J., Ward, J. M., and Hopwood, D. A. (1978). Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. Nature. 274:398-400.
- Birch, P., and S. A. Khan. (1992). Replication of single stranded plasmid pT181 DNA in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:290-294.
- Boccard, F., Smokvina, T., Pernodet, J. L., Friedman, A., and Guérineau, M. (1989a). Structural analysis of loci involved in pSAM2 site-specific integration in *Streptomyces*. Plasmid. 21:59-70.
- Boccard, F., Smokvina, T., Pernodet, J. L., Friedman, A., and Guérineau, M. (1989b). The integrated conjugative plasmid pSAM2 of *Streptomyces ambofaciens* is related to temperate bacteriophages. EMBO. J. 8:973-980.

Boe, L., M. F. Groos, H. te Rile, S. Ehrlich, and A. Gruss. (1989). Replication origins of single-stranded DNA plasmid pUB110. *J. Bact.* 171:3366-3372.

Chater, K. F. (1998). Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology* 144:1465-1478.

Chen, C. W., Yu, T. W., Lin, Y. S., Kieser, H. M., and Hopwood, D. A. (1993). The conjugative plasmid SLP2 of *Streptomyces lividans* is a 50 Kb linear molecule. *Molecular Microbiol.* 7:925-932.

Dabert, P., S. D. Ehrlich, and A. Gruss. (1992) High-molecular-weight linear multimer formation by single-stranded DNA plasmid in *Escherichia coli*. *J. Bact.* 174:173-178.

Davison, J. (1984). Mechanism of DNA replication and incompatibility in ColE1-type plasmids – a review. *Gene.* 28:1-15.

del Solar, G., Moscoso, M., and Espinosa, M. (1993). Rolling circle-replication plasmids from Gram-positive and Gram-negative bacteria : a wall fall. *Molecular Microbiol.* 8:789-796.

del Solar, G., Puyet, A., and Espinosa, M. (1987). Initiation signals for the conversion of single to double stranded DNA forms in *Streptococcal* plasmid pSLS1. *Nucleic acids Res.* 15:5561-5580.

Denis, F. and Brzezinski, R. (1992). A versatile Shuttle cosmid vector for use in *Escherichia coli* and actinomycetes. *Gene* 111: 115-118.

Deng, Z., Kieser, T., and Hopwood, D. A. (1988). "Strong incompatibility" between derivatives of the *Streptomyces* multi-copy plasmid pIJ101. *Mol. Gen. Genet.* 214:286-294.

Devine, K., S. Hogan., D. Higgins, and D. McConnell. (1989). Replication and segregational stability of the *Bacillus* plasmid pBAA1. *J. Bact.* 171:1166-1172.

Doull, J. L., Vining, L.C., Stuttard, C. (1983). A cryptic plasmid in the chloramphenicol-producing actinomycete, *Streptomyces phaeochromogenes*. FEMS Microbiol. Lett. 16:349-352.

Ehrlich, S. D. (1977). Replication and expression of plasmids from *Staphylococcus aureus* in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:1680-1682.

Goze, A., and S. D. Ehrlich. (1980). Replication of plasmid from *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:7333-7337.

Gros, M. F., H. te Rile, and S. D. Ehrlich. (1987). Rolling circle replication of the single-stranded plasmid pC194. EMBO J. 6:3863-3869.

Gros, M. F., H. te Rile, and S. D. Ehrlich. (1989). Replication origin of single-stranded plasmid pC194. EMBO J. 8:2711-2716.

Gruss, A., and Ehrlich S. D. (1989). The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmid. Microbiol. Rev. 53:231-241.

Gruss, A., and H. Ross, and R. Novick. (1987). Functional analysis of a palindromic sequence required for normal replication of several *Staphylococcal* plasmids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:2165-2169.

Gusek, W. T., and Kinsella, J. E. (1992). Review of the *Streptomyces lividans* / Vector pIJ702 system for Gene cloning. Critical Reviews in Microbiology. 18:231-241.

Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli* In DNA cloning vol. 1 Glover, J. M IRL Press, Oxford pp. 109-135.

Hagege, J., Pernodet, J. L., Sezonov, G. Gerbaud. C, Friedmann, A., and Gerbaud. M. (1993). Transfer functions of the conjugative integrating element pSAM2 from *Streptomyces*

ambofaciens: Characterization of a Kil-Kor system associated with transfer. J. Bact. 175:5529-5538.

Holloway, B. W. (1979). Plasmids that mobilize bacterial chromosome. Plasmid 2:1-19.

Hopwood, D. A., Bibb, M. j., Charter, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, J. M., and Schremf, H. (1985). Genetic Manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual. Norwich : John Innes Foundation.

Hopwood, D. A., Kieser, T. Lydiate, D. J. and Bibb, M. J. (1986). *Streptomyces* plasmids: Their biology and use as cloning vectors. In "The Bacteria: A Treatise on Structure and Function" (S. W. Queener, and L. E. DAY, Rds.). 9:159-220. Academic Press, Orlando, F. C.

Hopwood, D. A., Kieser, T., Wriugh, H. M. (1983). Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans* . J. Gen. Microbiol. 129:2257-2269.

Janssen, G. R., Bibb, M. J. (1993). Derivatives of pUC18 that have *Bgl* II 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

Kataoka, M., Kiyose, Y. M., Michisuji, Y., Horiguchi, T., Seki, T., and Yoshida. T. (1994a). Complete nucleotide sequence of the *Streptomyces nigrifaciens* plasmid, pSN22: Genetic Organization and Correlation with Genetic properties. Plasmid. 32:55-69.

Kataoka, M., Kuno, N., Horiguchi, T., Seki, T and Yoshida, T. (1994b). Replication of the *Streptomyces* plasmid pSN22 though single-stranded intermediates. Mol. Gen. Genet. 242:130-136.

Kataoka, M., T., Seki, T and Yoshida, T. (1991a). Five Genes involved in Self-Transmission of pSN22, a *Streptomyces* plasmid. J. Bact. 136:4220-4228.

Kataoka, M., T., Seki, T and Yoshida, T. (1991b). Regulation and function of the *Streptomyces* plasmid pSN22 Genes involved in Pock Formation and Inviability. *J. Bact.* 173:7975-7981.

Keen, C. L., Mendelovitz, S., Cohen, G., Aharonowitz, Y., Roy, K. L. (1988). Isolation and characterization of a linear DNA plasmid from *Streptomyces clavuligerus*. *Mol. Gen. Genet.* 212:172-176.

Kendall, K. J. and Cullum, J. (1988). A vector for studying plasmid stability functions in *Streptomyces* *Genet. Res. Com.* 51:71-74.

Kendall, K. J., and Cohen, S. N. (1987). Plasmid transfer in *Streptomyces lividans*: identification of a kil-kor system associated with the transfer region of pIJ101. *J. Bact.* 169: 4177-4183.

Kendall, K. J., and Cohen, S. N. (1988). Complete Nucleotide Sequence of the *Streptomyces lividans* Plasmid pIJ101 and Correlation of the Sequence With Genetic Properties. *J. Bact.* 170: 4634-4651.

Kieser, T., Hopwood, D. A. Wrigth, H. M., and Thompson, C.J. (1982). pIJ101, a multicopy broad hosp range *Streptomyces* plasmid: funtional analysis and development of the DNA cloming vectors. *Mol. Gen. Genet.* 1985:223-228.

Kinashi, H., and Murauyama, S.M., and Hanafusa, T. (1991). Nucleotide sequence analysis of the unusually long terminal inverted repeats of a gigant linear plasmid, SCP1. *Plasmid.* 26:123-130.

Kinashi, H., and Murauyama, S.M., and Hanafusa, T. (1992). Integration of SCP1, a gigant linear plasmid, into the *Streptomyces coelicolor* Chromosome. *Gene.* 115 :35-41.

Kinashi, H., Shimaji, M., and Sakai, A. (1987). Gigant linear plasmid in *Streptomyces* which code for antibiotic biosynthesis genes. *Nature.* 328:454-456.

Kleanthos, H., C.L. Clayton, and S. Tabaqchali. (1991). Characterization of a plasmid from *Helicobacter pylori* encoding a replication protein common to plasmids in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 5:2377-2389.

Lydiate, D. J., Malpartida, F., and Hopwood, D.A. (1985). The *Streptomyces* plasmid SCP2*, its functional analysis and development into useful cloning vectors. *Gene.* 35:223-225.

Miller, E. S. (1991). Cloning vectors, mutagenesis, and gene disruption (*ermR*) for the erythromycin-producing bacterium *Aeromicrobium erythreum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2758-2761.

Murakami, T., Nojiri, C. H., Toyama, H., Hayashi, E., Yamada, Y., and Nagaoka, K. (1983). Pock forming plasmids from antibiotic-producing *Streptomyces*. *J. Antibiot (Tokyo)* 36:429-434.

Novik, R. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* 51:381-395.

Novik, R. (1989). Host-plasmid interactions affecting plasmid replication and maintenance in Gram-positive bacteria, *Annu. Rev.. Microbiological.* 43:537-565.

Pigac, J., Vujaklija, D., Toman, Z., Gamulin, V., Schrempf, H. (1988). Structural instability of bifunctional plasmid pZG1 and single-stranded DNA formation in *Streptomyces*. *Plasmid* 19:222-230.

Qin, Z., Peng, K., Zhou, Q., Chen, H., Hopwood, D. A., Kieser, T. and Deng, Z. (1994). Development of a gene cloning system for *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *yingchengensis*, a producer of three useful antifungal compounds, by elimination of three barriers to DNA transfer. *J. Bacteriol.* 176:2090-2095.

Servín, L. (1993). Relationship between the replication function of *Streptomyces* plasmids pJV1 and pIJ101. *Plasmid* 111:115-118.

Servín, L., Sampieri, A III., Cabello, S., Galvan, L., Juarez, V., Castro, C. (1995). Sequence and functional analysis of *Streptomyces phaeochromogenes* plasmid pJV1 reveals a modular organization of *Streptomyces* plasmids that replicate by rolling circle. *Microbiology* 141:2499-2510.

SmoKvina, T., Boccard, F., Pernodet, L. J., Fridmann, A., and Gúrineau. M. (1991). Functional Analysis of the *Streptomyces ambofaciens* Element pSAM2. *Plasmid*. 25:40-52.

Stein, D. S., and Cohen, N. S. (1990). Mutational and functional analysis of transcriptional regulatory signals of the *korA* and *korB* gene products of *Streptomyces* plasmid pIJ101. *Mol. Gen. Genet.* 222:337-344.

Stein, D. S., and Cohen, N. S. (1989). Identification and Analysis of transcriptional Regulatory Signals for the Kil and Kor loci of *Streptomyces* plasmid pIJ101. *J. Bact.* 171:5768-5775.

Te Riele H. Michel B. Ehrlich S. D. (1986). Single stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA.* 83:2541-2545.

Tai, T. J. And Cohen, S. N. (1993). The active form of the Kor B protein Encoded by the *Streptomyces* Plasmid pIJ101 Is a processor Product That binds diferentially to the Two Promoters It regulates. *J. Bact.* 175:6696-7005.

Tai, T. J. And Cohen, S. N. (1994). Mutations that affect regulation of the kor B gene of *Streptomyces lividans* plasmid pIJ101 alter plasmid transmission *Mol. Microbiol.* 12:31-39.

Thomson, C. J., Skinner R. H., Thomson, J., Ward, J. M., Hopwood, D. A., Cundliffe E. (1982). Biochemical characterization of resistance determinants cloned from antibiotic-producing Streptomycetes 151:678-685.

Thomson, C. J., Ward, J. M. and Hopwood, D. A. (1980). DNA cloning in the *Streptomyces*: resistance genes from antibiotics-producing species. *Nature* 286:525-527.

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

Williams, S. T., Goodfellow, M., Wellington, E. M., Vickers, J. C., Alderson, G., Sneath, P. H., Sackin, M. J., Mortimer, A. M. (1983). A probability matrix for identification of some *Streptomyces* J. Gen. Microbiol. 129:1815-1830.

Wright, L. F. and Hopwood, D. A. (1976). Identification for the Antibiotic Determined by the SCP1 plasmid of the *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Gen. Microbiol. 95:96-106.

Zaman, S., Radnedge, L., Richards, H., and Ward, J. M. (1993). Analysis of the site for second-strand initiation during replication of the *Streptomyces* Plasmid pIJ101. J. Gen. Gen. Microbiol. 139:669-676.

Zaman, S., Richards, H., and Ward, J. M. (1992). Expression and characterisation of the korB gene product from the *Streptomyces lividans* plasmid pIJ101 in *Escherichia coli* and determination of its binding site on the *korB* and *kilB* promoters. Nucleic Acids Res. 20:3693-3700.

Zotchev, S. B., and Schrempf, H. (1994). The Linear *Streptomyces* Plasmid pBL1 : analysis of transfer fuctions. Mol. Gen. Genet. 242:374-382.

Zotchev, S. B., Soldatova, I. L., Grekhov A. V., Schrempf, H. (1992). Characterization of a linear extrachromosomal DNA element (pBL1) isolated after interespecific mating between *Streptomyces bambergensis* and *Streptomyces lividans*. Res. Microbiol. 143:839-845.