



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS
PARA LA PRODUCCIÓN Y EXTRACCIÓN
DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES.**

PROYECTO DE DESEMPEÑO ESCOLAR

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA :
SANDRO CERVANTES NÚÑEZ.**

**DIRECTOR DE PROYECTO:
DR. VIANNEY F. ORTIZ NAVARRETE.**



MÉXICO, D.F. 2002



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.



U.N.A.M. CAMPUS

|

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Vianney F. Ortiz Navarrete por su apoyo y amistad en todo momento, pero sobre todo por su incondicional atención y la confianza que ha depositado en mí a pesar de tantos tiempos difíciles.

Al M. en C. Elías Piedra Ibarra por su amistad, apoyo y confianza desde el principio y a lo largo de esta etapa, y por todos aquellos momentos en que supo tenerme paciencia y otros tantos en los que supo brindarme un consejo académico o personal.

A la Dra. Martha Martínez García y al Dr. Jorge Campos Contreras, por su atención, calidad humana y gran apoyo, pero sobre todo por sus oportunos consejos.

A los estudiantes de Maestría y Doctorado del Laboratorio de Inmunología del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV, por su apoyo, enseñanzas y consejos, pero en especial al Biol. Benjamín Ortiz López, por la atención, tiempo y apoyo que me brindó, pero sobre todo, por saber lo que la amistad representa.

DEDICATORIA

A mi madre: Con todo mi cariño, admiración y respeto, por ser mi madre, mi padre, mi amiga, mi maestra, mi compañera, mi ejemplo, y por tantas cosas que no acabaría de mencionar. Por todo lo que ha sido y ha representado para mi y por que gracias a ella, estoy donde estoy y tengo la oportunidad de llegar aún mas lejos.

Por esto y mil cosas mas:

Gracias por darme la mejor de las herencias.

Gracias por ser mi madre.

Gracias por existir.

A mi tía Yolanda Núñez: Por su cariño, amistad, consejos, confianza, paciencia, atención e increíble calidad humana, pero sobre todo, por su apoyo incondicional desde mi primer día hasta la fecha. Gracias por contribuir enormemente en todo mi desarrollo y por ser lo que eres y como eres.

A mi tía Esmeralda Núñez: Por ser mi primer baluarte y pilar, por todos esos días de cuidados y atención, y por estar ahí, siempre lista para ofrecer cariño y apoyo.

A mis hermanos Dulce, Edgar y Rogelio: por ser una de las partes mas importantes de mi vida, por todos esos años de amistad, cariño, apoyo, aceptación, tolerancia, comprensión, compañerismo y convivencia. Gracias por todo lo que han sido, son y serán para mi.

A mi amigo Miguel A. Cárdenas Z: Por ser mi amigo en todo momento, por su tiempo, consejos, apoyo y sinceridad, y por exhortarme y animarme a llegar a esta meta y mas alla.

CONTENIDO

IZT.

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	3
1.2. Justificación.....	4
1.3. Objetivo.....	5
II. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. <i>Escherichia coli</i>	5
2.2. Antibióticos.....	6
2.3. El operón <i>LAC</i>	7
2.4. El Factor F.....	7
2.5. Restricción, modificación y metilación de DNA.....	8
2.6. Recombinación y sus efectos en clonas insertas de DNA.....	9
2.7. Vectores derivados de plásmidos.....	10
2.7.1. Replicadores de alto y bajo numero de copias.....	10
2.7.2. Control laxo y rígido del número de copias.....	11
2.7.3. Mecanismos de replicación y control del número de copias por los derivados de los vectores de clonación pMB1 y ColE1.....	11
2.8. Incompatibilidad plasmídica.....	12
2.9. Marcadores de selección.....	12
2.10. Fagos Lambda.....	12
2.11. Crecimiento lítico.....	13
2.11.1. Expresión génica temprana.....	13
2.11.2. Replicación del DNA.....	13
2.11.3. Empaquetamiento y lisis.....	14
2.12. Crecimiento lisogénico.....	14
2.12.1. Expresión génica.....	14

2.12.2. Regiones de inmunidad.....	14
2.12.3. Inducción.....	15
2.13. El cósmido, un vector plásmido derivado de lambda.....	15
2.14. Preparación y análisis del DNA.....	16
2.14.1. Generalidades.....	16
2.14.2. Geles y circuitos eléctricos.....	17
2.14.3. Minigeles y midigeles.....	17
2.14.4. Fotografía del DNA en geles de agarosa.....	18
2.15. Manipulación enzimática del DNA y RNA.....	18
III. METODOLOGÍA.....	18
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
IV. CONCLUSIONES.....	23
V. BIBLIOGRAFÍA.....	23
VI. APÉNDICE.....	27
5.1. Técnica de células competentes.....	27
5.2. Técnica de transformación.....	28
5.3. Técnica Mini prep.....	29

I. INTRODUCCION

Una vez que la estructura del DNA y del código genético fue revelada, comenzaron a aclararse muchos de los profundos secretos biológicos sobre el DNA. Aún así, la identificación de las secuencias de grandes regiones parecía inalcanzable y casi un sueño. Posteriormente, en la década de los 70, una avalancha de descubrimientos de técnicas cambió drásticamente esta perspectiva y ha permitido grandes avances en la biología molecular de la célula en los últimos años basados en el análisis y manipulación de macromoléculas, particularmente del DNA (Lodish, et al., 1995).

A partir de estos estudios y descubrimientos, surgió la química celular, la cual se planteó como objetivo la purificación de una sustancia de interés en cantidad suficiente para poder analizar su comportamiento químico. Mediante la utilización de enzimas y posterior selección de determinados fragmentos en base a su tamaño, fue posible aislar, a partir de una muestra relativamente simple, muestras puras de secuencias específicas de DNA (Darnell, et al., 1986 y Lodish, et al., 1995). Pero si el DNA de interés proviene de una célula eucarionte superior, la complejidad total de la muestra de DNA es tan grande que la concentración de un segmento específico, con una longitud entre 10^3 y 2×10^3 pares de bases, puede considerarse inferior a 1 en 106. Después de una digestión con enzimas se generan muchos fragmentos de DNA con el mismo tamaño aproximado que será imposible obtener genes puros directamente a partir de las células en que se encuentran. Este obstáculo en la obtención de muestras puras de DNA a partir de genomas complejos se ha superado con las técnicas conocidas, en su conjunto, con el nombre de tecnología del DNA recombinante (Darnell, et al., 1986).

Para producir este DNA recombinante es necesario el uso de dos tipos de enzimas. El primer tipo fue llamado, enzimas de restricción, las cuales cortaban el DNA de algunos organismos dentro de secuencias específicas de algunos cuantos nucleótidos, generando sets reproducibles de fragmentos. Las enzimas del otro tipo fueron llamadas DNA ligasas, las cuales insertaban fragmentos restringidos de DNA en moléculas de DNA replicativo (Lodish et al., 1995).

Existen dos grandes sistemas de preparaciones de DNA recombinante que se producen o crecen en células bacterianas: los clones genómicos y los clones de cDNA. Un clon genómico es el cultivo de una célula huésped que contiene un fragmento de DNA genómico; un clon de cDNA es un cultivo de una célula huésped que contiene una molécula de DNA complementario, DNA que se copió a partir de un RNA en una reacción catalizada enzimáticamente. En ambos casos el DNA de interés se une a un vector, ya sea un bacteriófago que puede multiplicarse en un huésped determinado, o bien en un plásmido (Darnell et al., 1986)

Los plásmidos son moléculas circulares de DNA de doble cadena (dsDNA) que son independientes del DNA cromosomal. Este DNA extracromosomal se encuentra normalmente en bacterias y se detectaron originalmente por su capacidad de transferir genes entre estos microorganismos, también pueden encontrarse en el núcleo de las

levaduras y en algunas células eucarióticas superiores, manteniendo una relación parasítica o simbiótica con su hospedero. El tamaño de los plásmidos va desde unos cuantos cientos de pares de bases hasta más de 100 kb. Al igual que el DNA cromosomal del hospedero, el DNA plasmídico se duplica después de cada división celular. Durante la división celular al menos una copia del DNA plasmídico es segregada a cada célula hija, asegurando la continua propagación del plásmido a través de las generaciones sucesivas de la célula hospedera (Maloy et al, 1994)

Generalmente, los plásmidos contienen genes que le confieren algún beneficio a la célula huésped, lo que obliga a la célula a retenerlos, estableciendo de esta forma un tipo de relación simbiótica. Por ejemplo algunos plásmidos bacteriales tienen genes que codifican para enzimas que inactivan antibióticos. Esto le permite a la bacteria que lo contiene resistir a los antibióticos y replicarse en un ambiente que los contiene, mientras que a la que no presenta dicha resistencia muere (Lodish et al., 1995).

Estos plásmidos resistentes a antibióticos representan un gran problema en el tratamiento de una gran variedad de bacterias patógenas comunes. Por otro lado, debido a que se ha utilizado una amplia variedad de antibióticos, algunos plásmidos contienen algunos genes de resistencia que hacen a sus hospederos resistentes a una gran variedad simultánea de antibióticos. Muchos de estos plásmidos además contienen "genes de transferencia", los cuales codifican para proteínas que intervienen en la transferencia de una copia de los plásmidos a otras células hospederas de la misma o emparentada especie bacteriana. La transferencia ocurre a través de un complejo macromolecular con forma tubular denominado "Pili F", el cual es construido por proteínas codificadas por algunos de los genes de transferencia. Tal transferencia trae como consecuencia el rápido esparcimiento de los plásmidos y por tanto un incremento en el número de bacterias resistentes a ciertos antibióticos, este fenómeno es característico de los hospitales (Lodish et al., 1995).

Se ha demostrado que una región específica del círculo asegura su replicación en la bacteria huésped, esta zona recibe el nombre de ORI. El DNA plasmídico o vector puede ser cortado por un solo punto con un enzima de restricción en un lugar denominado polilinker, sitio en el cual se encuentran todos los sitios de corte posibles de las diferentes enzimas capaces de cortarlo. El plásmido se corta de modo que no quede afectada su capacidad de reproducirse en la bacteria huésped, entonces puede ser insertado el DNA de interés en el sitio de corte mediante la enzima ligasa y el círculo se cierra, dando lugar a DNA recombinante. Células de *E. coli*, específicamente tratadas denominadas células competentes, interiorizan el plásmido mediante un tratamiento que se denomina transformación en el cual se hace permeable la membrana plasmática permitiendo la entrada del plásmido, entonces la molécula recombinante se multiplica durante el cultivo al mismo tiempo que las células, de esta forma se obtienen grandes cantidades de plásmido con el crecimiento y proliferación celular en medios selectivos que contienen algún tipo de antibiótico para el cual las bacterias transformadas gracias a su plásmido son resistentes. Posteriormente el plásmido puede ser extraído mediante técnicas convencionales.

1.1. ANTECEDENTES

Desde la década de los 70's se han venido utilizando distintos plásmidos para diversos fines y cada año surgen plásmidos nuevos que se integran a la lista de herramientas que pueden ser ocupadas en el transporte y manejo del DNA.

El primer plásmido en descubrirse, fue el plásmido F, el cual fue detectado mediante experimentos de recombinación con dos sepas de *E. coli*, las cuales presentaban el siguiente fenotipo: Seps (A) Met⁻ Bio⁻ Thr⁺ Leu⁺ y Seps (B) Met⁺ Bio⁺ Thr⁻ Leu⁻. Mediante mezclas y cultivo de estas dos sepas se descubrió que existía un factor que era donado de la sepa B a la A, lo cual producía colonias que presentaban un fenotipo Met⁺ Bio⁺ Thr⁺ Leu⁺.

A partir de este descubrimiento se llevaron a cabo una gran cantidad de experimentos que condujeron al descubrimiento de nuevos plásmidos, pero no solo eso, sino que también a través del tiempo y a medida que se lograba un mayor avance en las técnicas moleculares, comenzaron a desarrollarse y construirse plásmidos que atendían a necesidades específicas o estaban diseñados para fines muy particulares y específicos.

A continuación se muestra una pequeña lista de antecedentes en donde se menciona de forma muy breve la utilización de estas herramientas moleculares:

Lui y col. en 1997, llevaron a cabo la transfección y expresión de cDNA de trombopoietina humana para el tratamiento de trombocitopenia en ratón. En dicho trabajo, utilizaron el plásmido pCIneo para transfectar células COS-7.

Trouet y col., en 1997 utilizan un vector de expresión GFP bicistónico para caracterizar canales de iones después de la transfección de células de mamíferos, dicho vector fue construido con el plásmido pCIneo.

Dai y col., en 1998 reportaron un análisis de la secuencia nucleotídica de una sonda especie específica mediante un fragmento insertado en el plásmido pCX7 de la *Leptospira interrogans*.

Houghton y col., (1998), realizaron un estudio de inhibición de la apoptosis en células de carcinoma del colon, dicha inhibición es conferida por un oncogén denominado K-Ros. En este estudio utilizan el plásmido pCIneo para transfectar las células con el oncogén.

Kakikawa y col., en enero del 2000, reportaron haber utilizado 3 plásmidos pKK232-8, pKPL y pACYC177 para estudiar las vías de regulación del switch genético de la proteína Cpg de *Lactobacillus plantarum* (phi)g1e.

Otro estudio donde utilizaron el plásmido pcDNA3 es en el de Cruz-Revilla et al., en febrero del 2000, donde estudian el efecto protector y la respuesta inmune contra *Taenia crassiceps cysticercosis*, generada por la inmunización con DNA.

En febrero del 2000, Dautzenberg y col., reportaron que para estudiar la función del receptor endógeno del factor liberador de corticotropina tipo 1, expresado en células embrionarias humanas de riñón 293, utilizaron el plásmido pcDNA3.

Moser y col., en febrero del 2000, reportaron la utilización de los plásmidos pcDEF3 y pcDNA3, para clonar y llevar a cabo la expresión funcional del receptor hNPY Y5 en células humanas de cáncer endometrial

En febrero del 2000, Yevenes y Cardemil reportaron la utilización del plásmido pTbp60B para obtener, mediante PCR, el gen que codifica para la fosfoenolpiruvato (PEP) carboxicinas en *Trypanosoma brucei*, y después lo clonaron en el plásmido pYES2 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Kopko y col., en Marzo del 2000, reportaron la utilización del plásmido pCDN3 para evaluar la respuesta de los pollos a un antígeno recombinante de *Eimeria tenella*, administrado utilizando varias estrategias de inmunización.

En abril del 2000, Chen y Roberts, reportaron la sobre expresión, purificación y análisis del comportamiento complementario de la proteína Suh B de *E. coli*; para clonar los genes de esta proteína utilizan el plásmido pET23a.

Ribas y col., en abril del 2000, reportaron altos niveles de expresión en *E. coli* de un fragmento carboxilo terminal de la proteína de fusión Thioredoxina del tétanos. En este proyecto utilizan el plásmido pET32a donde insertan la secuencia para dicho fragmento.

Wang y col., en abril del 2000, reportaron haber clonado y sobre expresado un gen de tirosina a partir de *Pseudomonas maltophilia*. En este estudio utilizaron el plásmido pWS18 donde insertaron un fragmento del gen sal I para transfectar células HB101.

Zhao y col., en abril del 2000, reportaron la expresión de proteínas homeobox Cardiac-específicas humanas en *E. coli*, en dicho estudio el cDNA del homeobox fue insertado en el plásmido pET32a.

Kohno y col., en mayo de este mismo año, reportaron la utilización del plásmido pUC Del(2), en un estudio de reducción de la transcripción y producción de progenie viral del virus de la Hepatitis B.

Osmanagaoglu y col., (2000), clonaron y expresaron un determinante de la pediocina del *Pediococcus acidilactici* F. insertándolo en el plásmido pQE322.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Bien sabemos que las técnicas han sido diseñadas mediante ejercicios y pruebas, y son difundidas cuando con su aplicación se han logrado obtener los resultados requeridos. Ahora bien, está claro que estas técnicas son la base de la cual se parte para poder repetir

estos resultados lo más semejantes posibles las veces que se emplee la técnica, pero no podemos descartar que en algún momento dichos procedimientos no nos conduzcan a cumplir nuestros objetivos debido a que los resultados del empleo de la técnica no sean los esperados. Este acontecimiento es debido principalmente a que las condiciones ambientales, físicas, infraestructurales, entre otras, donde se desarrollan las técnicas no siempre son las mismas, ya que varían de un laboratorio a otro, además de que cada investigador tiene su estilo de realizar el procedimiento debido a su educación, por que aunque sigan al pie de la letra la técnica nunca la desarrollaran igual. Por tal motivo es indispensable que en cada laboratorio se lleve a cabo la estandarización de las técnicas que en el se ocupan; en este caso llevé a cabo la estandarización de las técnicas utilizadas para la producción y extracción de DNA plasmídico.

1.3. OBJETIVO

Estandarización de las técnicas utilizadas para la producción y purificación de plásmidos recombinantes.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli es una célula bacteriana de forma de varilla con un cromosoma circular de cerca de 3 millones de pares de bases. Esta bacteria puede crecer en medio mínimo que contenga glucosa como fuente de carbón y de energía, y sales como suplemento de nitrógeno, fósforo y trazas de metales. *E. coli* crece rápidamente en medio rico, el cual provee a la célula de aminoácidos, nucleótidos y vitaminas, así como de otros metabolitos que de no contenerlos, la célula tendría que sintetizarlos. Cuando *E. coli* crece en medio líquido, atraviesa una serie de fases o periodos. Inmediatamente después de ser inoculada en el medio líquido, *E. coli* entra en una fase de crecimiento llamada *periodo lag*, posteriormente a esta fase comienza a dividirse. En medio rico, un cultivo de sepa típica dobla su número cada 20 a 30 min. Esta fase de crecimiento exponencial se conoce con el nombre de *fase log* (en ocasiones esta fase se subdivide en log-temprana, log-media, y log-tardía). Cuando en el cultivo, la densidad celular alcanza un punto en el que los nutrientes y el oxígeno se vuelven escasos, y los desechos celulares (en su mayoría ácidos), se incrementan, las células detienen rápidamente su división. A esta nueva fase se le conoce con el nombre de *saturación*, en la cual bajo condiciones normales de laboratorio, se obtiene una densidad celular de $1 \text{ a } 2 \times 10^9$ células/ml. Aprox. (Neidhardt, et al., 1987).

A pesar de pertenecer a un grupo bastante interesante, así como uno de los más importantes médicamente, no existe nada obvio acerca de *E. coli*, que explique su gran popularidad como modelo experimental en una amplia variedad de proyectos de investigación. *E. coli* no se diferencia (como *Caulobacter*), esporula (como *Bacillus*),

fotosintetiza (como *Rhodospirillum*), quimiosintetiza (como *Nitrosomas*), excreta grandes cantidades de proteínas (como *Bacillus*), o crece en condiciones extremas (como *Thermus* o *Thiobacillus*), sin embargo, la popularidad de *E. coli* deriva de una mezcla de propiedades convenientes y accidentes históricos.

A principios de este siglo, los bacteriólogos, interesados en la estructura, función y crecimiento, eligieron organismos que fuesen fácilmente accesibles, que no presentaran una alta virulencia, y que crecieran rápidamente en medios químicos definidos. Dos bacterias reunieron estas características, *E. coli* y *Salmonella*. Por otro lado, los primeros trabajos realizados sobre virus que se multiplicaban rápidamente en estos organismos, aumentaron su popularidad y su estudio intensivo. En 1940, el virólogo André Lwoff influenció a Jacques Monod a elegir a *E. coli* como modelo en el cual realizó los estudios clásicos de la fisiología del crecimiento bacteriano. Finalmente, la popularidad de *E. coli* fue determinada de una vez por todas por el descubrimiento del proceso de intercambio genético denominado conjugación. El análisis genético de las funciones celulares se hizo posible por primera vez en organismos que poseían además otras características deseables, como el rápido crecimiento, a razón de una nueva generación cada 20 min., produciendo extractos celulares enzimáticamente activos con relativa facilidad, así como, la capacidad de obtener tanto metabolitos como moléculas marcadas con isótopos radioactivos en diferentes vías. Esta combinación de propiedades colocó a *E. coli* como uno de los más importantes sistemas biológicos para los estudios celulares de todos los tiempos (Neidhardt et al., 1996).

2.2. Antibióticos

Los antibióticos son importantes herramientas para las técnicas de ingeniería genética, debido a que con ellos es posible identificar y seleccionar células en función de su resistencia a estos. La resistencia de las células a los antibióticos la confieren genes llamados *genes de resistencia* los cuales se encuentran principalmente en los plásmidos que portan las células bacterianas. Actualmente se conocen cientos de antibióticos, los cuales poseen la capacidad de inhibir la expresión génica (Neidhardt, et al., 1987).

Algunos antibióticos inhiben de forma específica el proceso de transcripción en bacterias, tal es el caso de la Rifampicina, la cual se une a una de las subunidades principales de la enzima RNA polimerasa evitando de esta forma la iniciación de la síntesis de RNA, sin embargo, este antibiótico carece de acción sobre la RNA polimerasa una vez que se ha iniciado el proceso de la transcripción. Otras clases de antibióticos, con acción similar a la Rifampicina han sido bastante utilizados, tal es el caso de la Estreptolidigina, la cual se une a la RNA pol e inhibe el proceso de elongación.

La mayoría de los antibióticos conocidos inhiben la síntesis de proteínas, como es el caso de la Estreptomina y de la Kanamicina, los cuales se unen a la subunidad 30s ribosomal e inhiben la unión del RNAm con el ribosoma. La Tetraciclina, inhibe la unión del RNAt con la subunidad ribosomal 30s, el Cloramfenicol por su lado, inhibe a la peptidil transferasa, y la Puomicina, ocasiona terminación prematura de la cadena peptídica. En la genética microbiana, los alelos sensibles y resistentes a estos antibióticos son utilizados comúnmente como marcadores génicos. Los antibióticos tales como la penicilina, no

afectan los procesos de transcripción y/o traducción, sino que mas bien, intervienen en la síntesis de la pared celular bacteriana.

Mientras que algunas bacterias poseen una resistencia natural a ciertos antibióticos, alguna pueden adquirir esa resistencia, a través de una mutación. Existen dos vías principales mediante las cuales las bacterias desarrollan resistencia a los antibióticos:

- adquiriendo cierta actividad enzimática que inactiva directamente al antibiótico.
- adquiriendo una mutación que modifique el sitio de acción del antibiótico.

Por ejemplo, la resistencia a la penicilina se debe frecuentemente a una actividad enzimática, mientras que la resistencia a la estreptomycinina es debida a la modificación del sitio de acción del antibiótico. La resistencia natural a la penicilina es conferida por un gen que sintetiza a la β -lactamasa, la cual es una enzima que corta el anillo lactámico en penicilina, ampicilina y cefalosporina, dicho gen es acarreado en muchos plásmidos. Para el caso de la estreptomycinina, la cual actúa uniéndose a una de las subunidades ribosomales, las mutaciones que confieren la resistencia ocurren en la proteína de la subunidad que es ocupada como blanco para este antibiótico, lo cual imposibilita su unión y por tanto su acción.

2.3. El operón *LAC*

Muchas de las técnicas de ingeniería genética surgieron gracias a los primeros estudios del operón *LAC* de *E. coli*. El operón *LAC* consiste de tres genes: *lacZ*, *lacY* y *lacA*. Cuando la célula crece en medio rico o medio mínimo con glucosa, el represor *lac* bloquea la transcripción, uniéndose a un sitio denominado operador, el cual precede al gen *lacZ* y evita que pueda unirse la RNA polimerasa al promotor. Cuando la célula crece en medio que contiene lactosa o componentes relacionados, el represor *lac* libera al operador, permitiendo de esta forma que la RNA polimerasa sintetice una hebra sencilla de mRNA la cual codifica para los genes *lacZ*, *lacY* y *lacA*. *lacY* codifica para una permeasa la cual es necesaria para la utilización de la lactosa y de ciertas azúcares relacionadas. *lacZ* codifica para la β -galactosidasa, la cual divide la lactosa en glucosa y galactosa, las cuales son posteriormente utilizadas por la célula. Por último, *lacA* codifica para una enzima llamada tiogalactósido transacetilasa. Aunque esta enzima no es requerida para el metabolismo de la lactosa, su función durante el crecimiento en medio rico en lactosa no es aún clara (Miller, 1978)

2.4. El Factor F

Este factor, es una unidad genética encontrada en algunas cepas de *E. coli*. Las cepas que contienen el factor F son comúnmente utilizadas para muchas de las técnicas de ingeniería genética, principalmente por dos razones. Primero, la posesión del factor F permite a la célula ser infectada por vectores basados en fagos filamentosos, mediante estructuras denominadas pili, las cuales son elaboradas por las células que contienen el factor F. Segundo, los genes *lacZ* defectuosos que codifican para el fragmento ω de la β -

galactosidasa, son comúnmente acarreados en el factor F. El factor F posee tres formas características: la primera es en forma de DNA de doble cadena, DNA de cadena sencilla, o plasmídico extracromosomal circular (F⁺); la segunda es como plásmido F⁺ incluyendo a varios genes bacteriales (F[']); y la tercera es como DNA linear y compacto integrado en varios sitios del cromosoma bacteriano (Hfr). El poseer el factor F, le confiere a *E. coli*, la habilidad de donar DNA en cruza bacterianas. Por esta razón, las células que portan el factor F se denominan machos. Los plásmidos F o F['] pueden transferirse por sí mismos a otras células y en ocasiones propiciar la transferencia de otros plásmidos, proceso denominado movilización. Las mutaciones denominadas Tra previenen que el factor F se auto transfiera o movilice otros plásmidos. Los factores F Tra⁺ pueden ocasionar la transferencia de DNA cromosomal a otras células, pero el receptor usualmente no recibe la secuencia del factor F (Bachmann, 1983).

2.5. Restricción, modificación y metilación de DNA

E. coli, posee al menos cuatro sistemas de restricción, los cuales identifican DNA extraño y lo destruyen. Estos sistemas codificados por hsdRMS, mcrA, mcrB, y mrr, pueden ser evadidos mediante fragmentos genéticos en los cuales estos sistemas están deshabilitados por mutación. Para seleccionar los fragmentos adecuados, es necesario conocer la cantidad de bases metiladas en el DNA que será clonado. El sistema de restricción EcoK, codifica para genes hsdRMS siendo los mecanismos de restricción de estos genes los mas conocidos. Estos atacan hebras de DNA que poseen secuencias específicas ya conocidas, lo que resulta en el corte de la hebra a ciertas distancias desde el sitio de reconocimiento, originando una serie de fragmentos de varios tamaños que eventualmente se van degradando. Para que el DNA no sea atacado es necesario que carezca de aquellas secuencias reconocidas por los sistemas de restricción o que las adeninas del sitio de reconocimiento se encuentren metiladas. La enzima EcoK es tanto genética como enzimáticamente compleja. Para llevar a cabo la restricción de un segmento no metilado, se requieren las tres subunidades de dicha enzima, las cuales son: HsdR, HsdM y HsdS. Cuando un sustrato esta metilado en solo una de sus hebras, este complejo proteico de la EcoK, lleva a cabo la metilación de la otra hebra, protegiendo del corte a dicha hebra. El segmento HsdM y el HsdS juntos, pueden metilar tanto segmentos no metilados, como hemimetilados. Si alguna de las tres subunidades presenta algún defecto, el complejo entero se inactiva en cuanto a restricción, pero aun puede continuar metilando si el defecto lo presenta la subunidad SDR. En contraste con EcoK, los otros 3 sistemas de restricción de *E. coli* K-12-mcrA, mcrB y mrr, atacan específicamente a DNA que esta metilado en secuencias particulares en vez de atacar a DNA no-metilado. El efecto conjunto de mcrA y mcrB reduce el número de clones que pueden recuperarse de las librerías hechas con DNA genómico de otros organismos, lo que permite seleccionar fragmentos específicos de dichas librerías. En cuanto a mcrB, existe evidencia de que una nucleasa es responsable de estos efectos, en cuanto a las demás aún no se ha encontrado evidencias sólidas de su acción. Un fragmento génico, debe ser usado cuando carece de un apropiado sistema de restricción metil-especifico, al clonar DNA genómico que contenga bases metiladas. Todos los mamíferos y las plantas superiores, así como muchos procariontes, contienen metilcitosina, por tanto el sistema McrA'B['] es el mas correcto para usarse en librerías de DNA para estos organismos. Las bacterias y los eucariontes inferiores pueden contener metiladenina, por lo que debe ser considerada su sensibilidad al sistema Mrr. Sin embargo,

los principales organismos experimentales como *Drosophila melanogaster* y *Saccharomyces cerevisiae* contienen bases metiladas no detectables.

En suma, es necesario que cuando el DNA es metilado durante su manipulación in vitro, se seleccione el hospedero deficiente-restrictor adecuado para ser usado como receptor del DNA. Las metilasas son utilizadas para generar nuevas especificidades para las enzimas de restricción o para proteger el cDNA de subsecuentes digestiones.

Una vez que el DNA es introducido en *E. coli*, comienza su replicación, entonces el patrón de metilación extraño se pierde y los clones adquieren el patrón de *E. coli*, a menos que acarrean actividad de metilasas. Una vez introducido exitosamente el patrón nuevo, las clonas pueden ser transferidas libremente a través de sepas *E. coli* Mcr^+ Mrr^+ , ya que el patrón actual ya no podrá ser extraño. Es importante que las clonas sean introducidas en una sepa $HsdM^+$ antes de intentar introducir las en una $HsdR^+$.

El patrón normal de metilación del DNA de *E. coli*, es el producto de tres metilasas. La metilasa EcoK modifica secuencias específicas y conocidas. Los productos de los genes *dam* y *dcm* también son metilasas. Las modificaciones llevadas a cabo por dichas metilasas, confieren resistencia total o parcial al DNA contra algunas endonucleasas de restricción usadas para trabajos *in vitro*. Las metilasas *Dam* y *Dcm* no están asociadas con ninguna función de restricción en *E. coli*; la pérdida de metilación por *Dam* y/o *Dcm* no provoca que el DNA sea sensible a restricción por EcoK aunque la pérdida de modificaciones en *K* sí lo hace. Sin embargo, modificaciones en *Dam* y *Dcm* confieren sensibilidad a análogos de *Mrr* y *Mcr* en especies de *Streptomyces* (MacNeil, 1988).



2.6. Recombinación y sus efectos en clonas insertas de DNA

Durante su propagación en *E. coli*, el DNA insertado en vectores es frecuentemente rearrreglado por las proteínas involucradas en la recombinación del DNA. Afortunadamente, aunque la genética y la enzimología de la recombinación en *E. coli* no están aún del todo entendidas, existen sepas mutantes disponibles que pueden proveer soluciones a dos problemas comunes.

El primer problema es el siguiente: el DNA contiene secuencias repetidas dispersas. La recombinación ocurre entre estas secuencias repetidas, provocando pérdidas de partes del DNA. Para librerías de plásmidos, este problema puede ser resuelto mediante la propagación del DNA en un hospedero *recA⁻*, donde la recombinación de homólogos no ocurre. Para librerías hechas utilizando vectores- λ derivados, los vectores deben ser recombinantes defectuosos. Sin embargo, solo del 30 al 50% de las células son viables como tales, y las librerías, particularmente las librerías de fagos, resultan ser difíciles de propagar. Los vectores λ -Fagos que son recombinantes defectivos, no originan altos títulos de lisado en sepas *recA*, y los fagos *gam* recombinantes defectivos no crecen en ninguna sepa, a menos que la enzima *recBCD* sea inactivada. Muchos vectores λ son recombinantes defectuosos *gam* y no pueden llevar a cabo selección *Spi⁻* o hacer espacio para grandes insertos.

El segundo problema es el siguiente: El DNA insertado contiene repetidas secuencias invertidas cercanas. Esta cercanía en el DNA no permite una propagación estable en algunos fagos o vectores plásmidos. Se considera que grandes palíndromos, pueden en ocasiones, formar una estructura alternativa que se asemeja a un intermediario encontrado en recombinación normal, llamado intersección especial, el cual es aceptado por el sistema de recombinación del hospedero.

Existen sepas bacterianas en las cuales el fago o las clonas de plásmidos que contienen palíndromos son recuperados a una alta frecuencia. El papel de ExoV en la estabilización de los palíndromos fue descrito por Leach and Stahl (1983), usando palíndromos contruidos artificialmente en fagos λ , y en hospederos mutantes para *recB*, *recC*, y *sbcB*. Ya que las sepas *recB*, *recC* son mutantes, tienden a presentar mutaciones adicionales, una en *sbcB* y otra en *sbcC*, cuya naturaleza bioquímica es aún desconocida. Juntas estas mutaciones restauran la recombinación e incrementan la viabilidad celular.

El papel de *recD* fue descrito por Wertman et al. (1986) y Wyman et al. (1986). *recD* codifica para la actividad de nucleasa de ExoV, el cual es distinto de la actividad recombinante de la enzima. Las sepas mutantes solo en *recD*, son *Rec⁺* y comúnmente no acumulan mutaciones secundarias. Tales sepas son los mejores hospederos para estabilizar palíndromos usando fagos λ -derivados.

2.7. Vectores derivados de plásmidos.

Los plásmidos bacterianos, son moléculas autoreplicables de DNA circular, extracromosomal. En la naturaleza existe una gran variedad de plásmidos. Los plásmidos aislados naturales de *E. coli* contienen genes que les confieren a sus hospederos resistencia contra los antibióticos, resistencia a los metales pesados, sensibilidad a mutágenos, sensibilidad o resistencia a bacteriófagos oscuros, producción de enzimas de restricción, producción de aminoácidos raros, o catabolismo de complejas moléculas orgánicas, etc. La replicación de estos plásmidos, puede o puede que no requiera de proteínas codificadas por el plásmido y puede o puede que no se sincronice con el ciclo celular. Algunos de estos plásmidos transmiten libremente su material genético a otras bacterias de distinta especie, algunos solo a la misma especie, mientras que otros no transmiten a ninguna. Durante la década de los 70's, muchos plásmidos fueron producidos en laboratorio a partir de fragmentos de plásmidos originales. Estos plásmidos artificiales y sus derivados son los vectores mas comúnmente usados en trabajos de DNA recombinante. Todos los plásmidos usados como vectores de clonación, contienen tras características comunes: un replicador, un marcador de selección y un sitio de clonación. El replicador es un tramo de DNA que contiene el sitio en el cual comienza la replicación del DNA, usualmente llamado el origen de la replicación (ORI), además, este sitio contiene genes que codifican para los RNAs y proteínas necesarias para la replicación. El marcador de selección, es usualmente dominante y es generalmente un o una serie de genes que codifican para proteínas que confieren resistencia a antibióticos. El sitio de clonación es el lugar donde intervienen las endonucleasas de restricción, las cuales realizan cortes que permiten la inserción del DNA extraño, sin intervenir ni afectar la habilidad del plásmido para replicarse o para desarrollar el fenotipo de selección en el hospedero (Norlander et al., 1983; Sutcliffe, 1978).

2.7.1. Replicadores de alto y bajo numero de copias.

Los distintos plásmidos replicadores han sido clasificados en base al número de copias que producen. El número de copias, es definido usualmente como el número de plásmidos por célula bacterial cultivada bajo ciertas condiciones estándar, pero en ocasiones es usado para describir el numero de copias de plásmido por cromosoma bacterial (Stoker et al., 1982).

2.7.2. Control laxo y rígido del número de copias.

Los plásmidos de alto número de copias tienden a caer en un control laxo. Estos plásmidos en ocasiones llamados plásmidos laxos o relajados, inician su replicación en un proceso controlado por las funciones codificadas por el plásmido, el cual no depende de la inestable replicación iniciada por la síntesis de proteínas al comienzo del ciclo celular bacteriano. Ya que su replicación no depende de las proteínas del hospedero, los plásmidos laxos pueden usualmente ser amplificados, esto es, que el número de copias que estos producen puede ser incrementado enormemente cuando las células que los portan son tratadas con inhibidores de síntesis proteica, tales como cloranfenicol o espectinomycin. Los plásmidos de alto número de copias usualmente no poseen mecanismos para asegurar la correcta segregación de sus copias a las células hijas. Los plásmidos de bajo número de copias usualmente tienden a caer en un control rígido. La iniciación de la replicación en estos plásmidos depende de las proteínas sintetizadas al inicio de la replicación del material genético del hospedero en su ciclo celular y por tanto la aplicación de estos plásmidos es sincronizada con la replicación del cromosoma bacteriano. Muchos de los plásmidos bajo control rígido contienen sitios en su DNA llamados par (partición), loci que les confiere a las copias ser segregadas correctamente en las células hijas con bastante eficiencia (Chang and Cohen, 1978; Stoker et al., 1982).

2.7.3. Mecanismos de replicación y control del número de copias por los derivados de los vectores de clonación pMB1 y ColE1.

La vasta mayoría de plásmidos usados en trabajos rutinarios de DNA recombinante, contienen replicadores derivados de plásmidos pMB1 o ColE1. Las células que contienen muchas copias de estos plásmidos, aunque cada copia se replica una vez por ciclo celular en promedio, algunas de estas copias se replican mas de una vez, mientras que otras ya no lo vuelven a hacer. La replicación de los plásmidos comienza con la síntesis de un primer de RNA mediante la RNA polimerasa del hospedero. Como el primer transcrito es extendido a partir de la región ori, el dsDNA de dicha región se separa y en este mismo sitio se aparea el transcrito mas reciente con una de las hebras. La RNasa H mella el primer, y la DNA polimerasa I del hospedero extiende a dicho primer apareado y mellado, comenzando de esta forma la síntesis de la primera hebra. La iniciación de la síntesis del DNA es negativamente regulada por otro RNA codificado por el plásmido, llamado RNA I, el cual hibridiza con el primer de RNA. El apareo del primer de RNA con el RNA I es suficiente para modificar la estructura secundaria del primer de RNA, lo que lo inhabilita para aparearse con el DNA de la región ori. La formación del híbrido RNA I-primer de RNA es de alguna forma facilitada por la acción de la proteína Rop. Los plásmidos más actuales tales como los plásmidos pUC cuyos replicadores derivan de plásmidos pMB1, no contienen el gene rop intacto, por los que se transforman en plásmido de alto número de copias a diferencia de aquellos que presentan replicon pMB1 intacto (Melton, et al., 1978; Weinstock et al., 1983).

2.8. Incompatibilidad plasmídica.

Las células normalmente no pueden contener dos pMB1 o ColE1 diferentes. Esto es debido a un fenómeno denominado incompatibilidad plasmídica; pMB1 y ColE1 se consideran incompatibles con cualquier otro plásmido con el mismo replicador y por tanto, que pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad. La incompatibilidad de ColE1 y pMB1 es consecuencia de dos hechos. El primero es que la replicación de estos plásmidos es controlada negativamente por RNA I, la cual actúa en *trans* en otros plásmidos con el mismo primer de RNA, y el segundo, es que ambos plásmidos carecen de mecanismos que les aseguren replicarse una vez por ciclo celular. Debido a estas dos razones, si una célula contiene un pMB1 y es subsecuentemente transformada con otro pMB1, perderá el primer plásmido (Zinn et al., 1983; Kahn et al., 1979).

2.9. Marcadores de selección.

Los genes que codifican para proteínas que confieren resistencia a la ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol, son los marcadores de selección comúnmente más utilizados para los vectores plásmidos. Estos genes de resistencia a los antibióticos, debido a que son dominantes, esto es, que el fenotipo antibiótico-resistente es dominante en comparación con el fenotipo antibiótico-sensible de aquellas células que no lo poseen. Otros marcadores de selección que también son utilizados son la kanamicina, y la inmunidad a los fagos lambda. En ocasiones, los marcadores recesivos son utilizados en la selección de plásmidos, por ejemplo, en el caso de *E. coli* leuB⁻ la cual no puede crecer en ausencia de leucina, se puede llevar a cabo una selección de aquellas colonias transformadas con un plásmido que contenga algún gen que complementa a leuB, poniéndolas a crecer en un medio que carezca de leucina (Bolívar et al., 1977; Rütger and Muller-Hill, 1983).

2.10. Fagos Lambda

La biología de los vectores derivados de fagos lambda es bien conocida. Lambda es un fago temperado, lo cual significa que puede crecer tanto lítica como lisogénicamente. Cuando λ infecta a una célula, este inyecta su DNA dentro de la bacteria hospedero. Cuando crece de forma lítica, este realiza múltiples copias de su genoma, las cuales son posteriormente empaçadas hasta formar nuevas partículas λ , finalmente, se lleva a cabo la lisis de la bacteria hospedero, lo cual libera a la progenie. Cuando λ crece lisogénicamente, este inserta su DNA en el cromosoma del hospedero. El DNA insertado del fago es replicado simultáneamente con el cromosoma del hospedero. En algunas ocasiones, cuando el DNA de la célula es dañado, el DNA del fago se libera del cromosoma hospedero y comienza a crecer de forma lítica. Las células lisógenas, son inmunes a la superinfección por fagos λ adicionales, debido a que portan una región de inmunidad homologa. De esta forma, el plaqueo de fagos temperados es turbio, debido a la presencia tanto de células lisadas por fagos líticos, como de células exentas de infecciones posteriores, debido a que han sido transformadas en células lisógenas

El genoma λ ha sido agrupado en un bloque discreto de genes relacionados. Este hecho es bastante conveniente para los biólogos moleculares, debido a que esto ha permitido la construcción de muchos vectores de clonación derivados de fagos, los cuales poseen a su vez una serie de deleciones en grandes tramos del DNA que no son esenciales para el crecimiento lítico. En suma con estas extensas áreas, gran parte de la región de inmunidad, incluyendo a los genes *cII*, *cro*, *cI* y *rex*, son esenciales para el crecimiento lítico (Banuett et al., 1986).

2.11. Crecimiento lítico.

2.11.1. Expresión génica temprana.

El crecimiento lítico conlleva a la producción de nuevas partículas virales y a la subsecuente lisis de la célula hospedero. El crecimiento lítico comienza desde la infección o posteriormente a la desactivación del represor *cI* existente en la célula lisógena. La transcripción comienza por los promotores tempranos P_R y P_L . El transcrito del promotor P_R termina en t_{R1} y codifica para el gen *cro*, mientras que el transcrito del promotor P_L continúa hasta t_{L1} y codifica para el gen *N*. El producto del gen *N* es un factor de antiterminación; esto es, que permite a los transcritos que se inician en P_L o P_R proceder más allá de t_{L1} y t_{R1} respectivamente. El transcrito *N*-antiterminador de P_R , el cual termina en t_{R2} , codifica para los genes *O*, *P*, y *Q*. Las proteínas *O* y *P* son requeridas para la replicación del DNA del fago. La proteína *Q* es otra proteína de antiterminación, pero es específica para los transcritos iniciados en un promotor localizado a la derecha de *Q* llamado $P_{R'}$. La continuación de la transcripción que ocasiona *Q* en $P_{R'}$ procede a través de otro terminador llamado t_{R65} y de la región tardía, luego, a través de genes los cuales han sido asociados con la misma unidad de transcripción, cuando el DNA del fago entrante fue circularizado, y finalmente termina su camino al llegar a *b*. El transcrito $P_{R'}$ codifica para las proteínas necesarias para el ensamble cabeza-cola, empaquetamiento del DNA, y lisis de la célula hospedero. Esta expresión secuencial de las funciones del fago, permite la replicación del genoma λ , su subsecuente empaquetamiento, y la lisis del hospedero en el orden temporal correcto (Frischauf et al., 1983).

2.11.2. Replicación del DNA.

La replicación durante el crecimiento lítico, requiere tanto a las proteínas del hospedero, como a las proteínas codificadas por el genoma del fago. La replicación del DNA lítico se divide en dos fases, la temprana y la tardía. La fase temprana comienza con la inyección del DNA lineal del fago dentro de la célula bacteriana. Este DNA posee en ambos extremos, terminaciones complementarias y cohesivas de cadena sencilla, generadas por el corte del sitio *cos*. Estas terminales cohesivas contienen bases que pueden aparearse, las cuales son ligadas por las enzimas del hospedero produciendo una molécula circular cerrada. Después del súper enrollamiento efectuado por las topoisomerasas del hospedero, la molécula está lista para llevar a cabo el proceso de replicación. La replicación comienza en el sitio denominado *ori* y procede bidireccionalmente. En este tipo de replicación se forma primero un intermediario tipo teta y posteriormente se forman dos DNA's circulares hijos.

Aproximadamente 15 min. Después de la infección por el fago, la replicación cambia a la fase tardía. Esta se caracteriza por la replicación tipo círculo rodante, la cual produce largos polímeros llamados concatémicos. El producto del gen *gam*, protege a los concatémicos de la degradación por una exonucleasa codificada por los genes *recB* y *recC*. Los concatémicos, sirven como sustrato para el empaquetamiento (Blattner et al., 1984).

2.11.3. Empaquetamiento y lisis

En las etapas finales de la infección, la replicación del DNA y el empaquetamiento de λ , ocurren simultáneamente. Una vez que se han formado las estructuras concatémicas, estas son condensadas en procápside de λ . Los sitios *Cos* son reconocidos por las proteínas de λ y el DNA que se encuentra entre los dos sitios *cos* es cortado a partir del concatémico coincidente con su empaquetamiento en la procápside. Las proteínas restantes que formaran la cápside son ensambladas y posteriormente la cola cuyo ensamble es independiente, se fusiona con la cápside para formar el fago completo. El DNA localizado entre ambos sitios *cos* será únicamente empaquetado en la forma en la que puede ser inyectado, esto es entre 38 y 53 kb de longitud. El último evento en el crecimiento lítico, es precisamente la lisis de la célula hospedera. Las proteínas codificadas por el fago destruyen la membrana interna y degradan la pared celular de la célula hospedera (Banuett et al., 1986).

2.12. Crecimiento lisogénico.

2.12.1. Expresión génica.

Posterior a la inyección, los fagos λ silvestres, en ocasiones apagan la mayoría de su genoma y se integran al cromosoma bacteriano; entonces el fago es llamado profago y la célula que lo contiene es llamada lisógena. El producto del gen *cI*, el cual es un represor de λ , es esencial para el crecimiento lisogénico. Esta proteína se une con los operadores O_L y O_R , bloqueando la transcripción de los genes tempranos, previniendo de esta forma el crecimiento lítico. Por otro lado, la unión con O_R además estimula la transcripción de P_{RM} , el cual es un promotor que transcribe al gen *cI*. El represor lambda es el que mantiene el estado lisogénico, reprimiendo la transcripción de los genes necesarios para el crecimiento lítico, así como para estimular la auto transcripción. Existen mutantes de *E. coli* llamadas *hfl*, las cuales son utilizadas para la construcción de librerías λ gt10, en las cuales, los fagos silvestres siempre se vuelven lisógenos. La secuencia necesaria para que se lleve a cabo la integración comienza con la asociación de las terminales coherivas y la circularización del genoma. La proteína *cII* se une posteriormente con el promotor P_{int} y activa su transcripción. La proteína *Int* cataliza un evento de recombinación entre la secuencia *attP* del fago y un sitio en el cromosoma bacteriano denominado *attB*, dando como resultado la integración del fago (Gibson et al., 1982).

2.12.2. Regiones de inmunidad.

Ciertos bacteriófagos, incluidos el 434, el 21, el 82 y el 80, están relacionados con los fagos λ , mediante significativos tramos de DNA homólogo. Únicos para cada fago,

contienen la región de inmunidad. Esta región incluye un gran número de sitios regulatorios y genes tales como P_L y P_R , cI y cro , así como también O_R y O_L , y P_{RM} . Una célula bacteriana establemente lisogenizada con un fago lambdaide en particular, es inmune a la infección de un segundo fago, el cual porta la misma región *imm* que el lisógeno, debido a que es reprimida la transcripción de P_L y P_R del fago entrante (Dunn and Blattner et al., 1984).

2.12.3. Inducción.

El proceso de inducción ocurre cuando el fago lisógeno se separa del cromosoma y comienza un crecimiento lítico. Este proceso de escisión requiere los productos de los genes *int* y *xis* del fago. Estos son sintetizados por el transcrito antiterminador-N de P_L . La transcripción de P_L se inicia cuando el producto de cI es inactivado. La inducción ocurre espontáneamente a baja frecuencia en fagos λ lisógenos, pero esta puede elevarse durante la respuesta SOS debido al corte del represor λ , o mediante la desestabilización de un represor mutante termo sensitivo cuando la temperatura alcanza los linderos permitidos.

En el laboratorio, la respuesta SOS bacteriana, es inducida por el daño al DNA causado por la exposición de la célula a agentes tales como la luz UV o la mitomicina C. Durante esta respuesta, LexA, una proteína bacterial represora, es inactivada, lo que provoca la inducción de varios genes bacterianos. Debido a que las proteínas represoras de λ y de bacteriófagos relacionados se asemejan a LexA, por lo que son también inactivadas. Algunos vectores de clonación, contienen una mutación en el gen cI , la cual le confiere sensibilidad a la temperatura (cI^{ts}). Como resultado, el represor se mantiene estable a 30° C como el de tipo silvestre, pero a 42° C se vuelve inestable. La mutación cI^{ts} permite que el crecimiento lítico sea inducido simplemente elevando la temperatura en la cual esta creciendo el lisógeno (deWet et al., 1971).

2.13. El cósmido, un vector plásmido derivado de lambda.

Los cósmidos fueron creados para permitir la clonación de grandes piezas de DNA. Los cósmidos contienen un marcador de selección, un sitio ori plasmídico, un sitio en el cual el DNA puede ser insertado, y un sitio *cos* heredado del fago λ . El vector es cortado con enzimas de restricción y mezclado con los fragmentos de DNA que van a ser clonados. Las DNA ligasas unen al vector que fue cortado y a los fragmentos de DNA que van a ser insertados para formar moléculas concatémicas. El conjugado es mezclado posteriormente con un extracto de empaquetamiento, que contiene las proteínas necesarias para empaquetar el DNA desnudo del fago en su cápside. En cualquier caso, ambos sitios *cos* se presentan y están separados por 40,000 a 50,000 nucleótidos, los cuales pueden ser cortados y empaquetados en cápsides. Los fagos que contienen cósmidos son infecciosos, estos inyectan su DNA a las células, aunque el DNA inyectado es plasmídico, esto es, que cuando es inyectado el DNA a la célula hospedera, se circulariza debido a las terminaciones cohesivas, y a las ligasas del hospedero, adquiriendo una estructura circular que se replica como plásmido (Frischauf et al., 1983).

2.14. Preparación y análisis del DNA.

2.14.1. Generalidades.

Para poder aplicar las técnicas de biología molecular en el análisis de genomas complejos, es necesario disponer de DNA puro, de alto peso molecular. Virtualmente, todos los protocolos en biología molecular requieren, en algún punto, el fraccionamiento de los ácidos nucleicos. Las técnicas cromatográficas resultan ser una útil herramienta para algunos casos, como la separación de ácidos nucleicos de cadena doble o sencilla, etc., así como para la separación de plásmidos del DNA genómico o para la separación del DNA genómico de los restos en un lisado celular. La electroforesis en gel, sin embargo, presenta mucha más resolución y es generalmente el método de fraccionamiento más usado. La separación electroforética en gel permite un uso tanto analítico como preparativo y dada su resolución, permite el fraccionamiento de fragmentos con pesos moleculares menores a 1000 Dáltones y de más de 10^8 Dáltones, existe una gran variedad de sistemas electroforéticos los cuales pueden ser ajustados al tamaño de la molécula a fraccionar.

En general, su uso para separar ácidos nucleicos es más sencillo que su aplicación en el análisis de proteínas, esto debido a que los ácidos nucleicos presentan una carga negativa uniforme y a que en el caso del DNA de cadena doble, rara vez se presentan complicaciones estructurales que afectan su movilidad. Para entender esto hay que tomar en cuenta, una serie de variables que afectan la migración del DNA en el gel. Algunas de ellas incluyen la conformación del ácido nucleico, el tamaño del poro de las partículas que conforman el gel, el gradiente de voltaje aplicado, y la concentración de sales del buffer. La más básica de estas variables es, el tamaño del poro del gel, el cual determina el tamaño de los fragmentos de ácidos nucleicos a ser fraccionados. En la práctica, esto significa que para fragmentos grandes de 500 a más de 1000 pb, se utiliza el gel de agarosa, mientras que para fragmentos más pequeños que 1000 pb se utiliza el gel de acrilamida o de agarosa fina. Con frecuencia, cuando se desea identificar un fragmento en una mezcla compleja, aunada a la electroforesis en gel, se utiliza una técnica denominada Southern blotting, en la cual, los fragmentos pueden ser transferidos de un gel a una membrana de nylon o nitrocelulosa, donde el fragmento de interés es identificado por hibridación con una sonda de DNA. Otras aplicaciones de la electroforesis en gel incluyen el fraccionamiento de RNA o DNA de cadena sencilla. Los geles de poliacrilamida que contienen una alta concentración de urea como desnaturizante ofrecen un sistema bastante confiable para el fraccionamiento de RNA o DNA de cadena sencilla. Los geles de poliacrilamida pueden fraccionar fragmentos que difieren entre sí por un solo nucleótido de longitud, lo que los hace básicos para cualquier protocolo de secuenciación del DNA. Por otro lado, estos geles también son comúnmente utilizados en técnicas de análisis de la estructura de RNA's mensajeros mediante el análisis de S1, en protección contra ribonucleasas, o en extensión de primers. Por último, los geles desnaturizantes de poliacrilamida son además muy usados para aplicaciones preparativas, tales como la purificación a baja escala de sondas radioactivas de cadena sencilla, así como para la purificación a larga escala de oligonucleótidos sintéticos (Vogelstein and Gillespie, 1979).

2.14.2. Geles y circuitos eléctricos.

La electroforesis en gel sea cual sea su aplicación es considerada solo un circuito eléctrico, el cual puede ser comprendido usando dos simples ecuaciones. La ley de Ohm, $V=IR$, la cual considera que el campo eléctrico, V (representado en volts), es proporcional a la corriente, I (representada en mili amperes), por la resistencia, R (representada en Ohms. Cuando una cierta cantidad de voltaje es aplicada a un circuito sencillo, una cantidad constante de corriente fluye a través de todos los elementos, entonces cuando se registra un decremento del voltaje total aplicado en algún elemento se considera como consecuencia directa de la resistencia de dicho elemento. En el caso de un aparato de electroforesis en gel, la resistencia es inversamente proporcional tanto al espacio entre ánodo y cátodo como a la fuerza iónica del buffer. Comúnmente, el gel por si mismo, proporciona casi el total de la resistencia del circuito, de tal forma que el voltaje aplicado al gel será, esencialmente igual al voltaje total aplicado al circuito. Para una corriente dada, el decremento en la densidad del gel o en la fuerza iónica del buffer, incrementara la resistencia, por ende, incrementara el gradiente de voltaje a lo largo del gel, así como, la movilidad electroforética de la muestra.

La habilidad del aparato de disipar el calor determina el limite máximo voltaje que puede ser utilizado. De aquí se parte hacia una segunda ecuación, $P=I^2R$, la cual considera que la potencia (P , representada en watts), producida por el sistema, es proporcional a la resistencia por el cuadrado de la corriente. La potencia producida se manifiesta en forma de calor, y cualquier aparato de electroforesis puede disipar cierta cantidad de potencia, sin incrementar la temperatura del gel. De acuerdo con lo anterior, un pequeño incremento en el voltaje podría causar un incremento de temperatura significativo y potencialmente desastroso en el gel. Por tal motivo, es importante conocer que tanta potencia puede un determinado aparato de electroforesis disipar y al saber esto, es de igual forma importante monitorear la temperatura del gel cuando se ha sobrepasado dicho limite (Eickbush and Moudrianakis, 1978).

2.14.3. Minigeles y midigeles.

Los geles pequeños, ya sean minigeles o midigeles, generalmente permiten un corrimiento más rápido que los geles grandes y se emplean frecuentemente en aplicaciones analíticas. Debido a que en los geles pequeños se utilizan pozos angostos y el gel es delgado, se requieren cantidades pequeñas de DNA para poder visualizar la separación de fragmentos. A pesar de sus características estructurales, en los geles pequeños se utilizan protocolos bastante similares a los utilizados en los geles grandes, además, los factores que afectan la movilidad de los fragmentos de DNA son los mismos para ambos.

Para seleccionar un aparato de mini o midigel, es importante considerar la capacidad volumétrica del tanque para el buffer, considerando que los buffers electroforéticos se desgastan rápidamente debido a los altos voltajes ($>10V/cm$), que los geles pequeños utilizan para realizar su corrimiento. Por tanto, utilizar aparatos con tanques relativamente grandes, ofrecen una gran ventaja. Por otro lado, estas herramientas son relativamente fáciles de construir, la caja del minigel puede construirse con materiales simples (acrilico), mientras que para el caso del tanque puede utilizarse una caja plástica de 15 cm de largo,

por 8 cm de ancho, por 4 cm de altura. Dicha caja tiene que ser equipada con dos conectores machos y dos electrodos delgados de platino unidos a los conectores que deben ser colocados en ambos extremos de la caja.

Aunque las cajas para fundir geles pequeños son comercialmente comunes, los geles pueden aplicarse a superficies de cristal liso o a otros soportes que carezcan de paredes. Estos geles se mantienen en el soporte simplemente por la tensión superficial. Después de haber sido aplicada la capa de gel sobre el soporte, se coloca inmediatamente el peine para marcar los pozos; el peine se sostiene mediante pinzas metálicas para papel, las cuales se colocan en los extremos del peine. Para separar el peine del gel, debe llevarse acabo con mucho cuidado debido a que en el fondo de los pozos comúnmente no queda agarosa que pueda asirse al soporte, por lo que el gel puede separarse o romperse (Maniatis et al., 1989).

2.14.4. Fotografía del DNA en geles de agarosa.

El DNA teñido con bromuro de etidio, puede ser fotografiado en geles de agarosa mediante iluminación con luz UV ($>2500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). Para este propósito se utiliza comúnmente un transiluminador de luz UV, los cuales dependiendo el tipo de visualización y fotografía están disponibles comercialmente. El sistema de fotografía debe contener un filtro naranja para conseguir una imagen adecuada de la luz transmitida por la fluorescencia del DNA. También se requiere un filtro claro para bloquear la luz UV (Thorne, 1967).

2.15. Manipulación enzimática del DNA y RNA.

Muchos de los cambios revolucionarios que han ocurrido en las ciencias biológicas desde hace algunos años se han atribuido directamente con la habilidad de manipular el DNA. Una de las principales herramientas en la ingeniería genética son las enzimas las cuales son capaces de catalizar reacciones específicas en los ácidos nucleicos. Desde una perspectiva histórica, el descubrimiento de las enzimas de restricción, las cuales son capaces de cortar el DNA reconociendo ciertas secuencias de nucleótidos, ha sido el avance más significativo de la biología molecular así como de otras ciencias; esto tomando en cuenta lo sig: Primero, los sitios de corte en el DNA han permitido identificar sitios de marcaje específicos los cuales a su vez han permitido obtener mapas físicos del DNA. Segundo, la habilidad de producir fragmentos específicos de DNA mediante el corte en ciertas secuencias de nucleótidos con enzimas de restricción ha hecho posible la purificación de estos fragmentos mediante la clonación. Y tercero, los fragmentos de DNA generados por endonucleasas de restricción se consideran sustratos básicos para la gran variedad de técnicas de manipulación enzimática del DNA conocida hasta la fecha.

III. METODOLOGÍA

Se utilizaron células *E. coli* DH5 α , las cuales fueron hechas competentes para recibir el plásmido mediante el protocolo modificado de Cohen et al., (1972), (Anexo 1).

El plásmido que se utilizó fue el pCIneo, del cual se tomó 1 µl de muestra, para transformar una alícuota de 100 µl de *E. coli* DH5α competentes.

La transformación se llevó a cabo de acuerdo al protocolo modificado de Cohen et al., (1972), (Anexo 2).

Para la extracción del DNA plasmídico, se llevó a cabo la técnica de Mini prep siguiendo el protocolo modificado de Birnboim, et al. (1981), (Anexo 3).

A cada una de las alícuotas que se obtuvieron de DNA plasmídico se les midió la concentración en un Fluorómetro DyNA Quant 200 Hoefer.

Posteriormente se realizó un ensayo de restricción de una muestra representativa, con las enzimas BamH 1, Cla 1, Hind III, Kpn 1 y Pst 1 para corroborar la presencia de pCIneo en las muestras.

El DNA de cada digestión fue fraccionado por electroforesis en gel de Agarosa (1%), conducido en solución amortiguadora TAE 1x, a 70 volts, por una h. aprox., se incluyó un marcador de peso molecular de 1 kb. Finalizada la electroforesis el gel fue colocado en un transiluminador UV para su observación y toma de fotografías.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IZT.



Para el protocolo de células competentes, se llevaron a cabo dos modificaciones. Entre el paso 4 y 5 que corresponden a desechar el sobrenadante y a resuspender la pastilla respectivamente, se introdujo un paso donde se lavó la pastilla con PBS 1M pH 7.0 y se volvió a centrifugar a 4000 rpm, desechando el sobrenadante y recuperando la pastilla, para después seguir con el paso 5. La otra modificación se llevó a cabo en el paso 5 donde el tiempo de reposo en el hielo, se alargó de 60 min. a 3 hrs. (ver anexo 1).

Para el protocolo de transformación, se llevaron a cabo 4 modificaciones. La primera fue en el paso 2, donde el tiempo de shock térmico se alargó de 90 seg. a 2 min. La segunda modificación se llevó a cabo en el paso 3, donde el tiempo de reposo en el baño de hielo se incrementó de 2 min. a 5 min. La tercera modificación se realizó en el paso 4, el cual dice textualmente que se deben agregar 800 µl de medio SOC al tubo, dicha cantidad se redujo a 200 µl de medio LB y el tiempo de incubación se incrementó de 45 min. a 1 hora, la cual fue la cuarta modificación (ver anexo 2).

Según Maniatis (1989), después de una transformación exitosa, las colonias de células transformadas deberían aparecer después de 12 a 16 h. de incubación. Aplicando los protocolos originales de preparación de células competentes y transformación, no ocurre lo anterior, sino que más bien el tiempo de aparición de las colonias se ubica entre las 14 a 18

horas de incubación. Esto se considera debido a probablemente la temperatura y humedad del lugar de trabajo o a que se trataba de una sepa bastante sensible al manejo.

En cambio, con la aplicación de los protocolos de preparación de células competentes y transformación, modificados en los pasos que han sido descritos con anterioridad, se logró mejorar tanto el tiempo como el número y tamaño de las colonias, esto es, el número de colonias se elevó a poco más del doble, de 14 colonias en promedio con los protocolos originales a 31 colonias en promedio con los protocolos modificados. En cuanto al tamaño de las colonias, la observación se llevó a cabo de forma meramente cualitativa, apreciándose un incremento significativo en las colonias obtenidas bajo los protocolos modificados. Mientras que el tiempo de aparición de las colonias, se logró reducir considerablemente, de 10 a 14 horas de incubación. (Gráfica 1.)

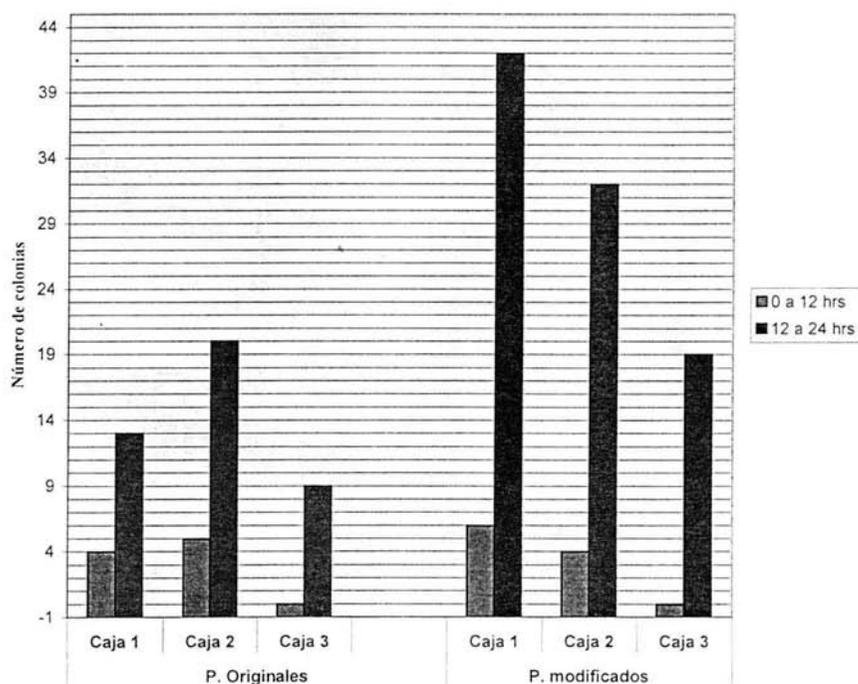


Fig. 2. Gráfico que muestra el número de colonias y su lapso de tiempo de aparición para cada repetición tanto de los protocolos originales como de los modificados

Dado que la temperatura de incubación se mantuvo constante y los experimentos junto con sus repeticiones se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones de esterilidad y bajo condiciones semejantes de temperatura ambiental, se atribuye la diferencia en los resultados a las modificaciones realizadas a los protocolos. Dichas modificaciones se considera empíricamente que contribuyeron a reducir el maltrato y la mortandad celular. Para el caso del protocolo de preparación de células competentes se considera que la primera modificación contribuyó a estabilizar la presión osmótica de las células al incrementar los

lavados de la pastilla, retirando de esta forma una mayor cantidad de desechos celulares, los cuales a ciertos niveles resultan ser potencialmente dañinos para las células (Maloy, et al. 1994), por otro lado, se logra lavar de una forma más eficiente el exceso de medio líquido de incubación, el cual se va acidificando a medida que va aumentando la población celular en el cultivo (Maloy, et al. 1994). En el caso de la segunda modificación, se considera que incrementando el tiempo de reposo de las células en el hielo se les permite a estas estabilizarse y repararse del posible daño sufrido por la centrifugación y manipulación anterior.

Para el caso de las modificaciones realizadas en el segundo protocolo se considera que al incrementar el tiempo de baño en el paso 2, permitió alargar el tiempo en el cual las moléculas de DNA pueden entrar a las células cuando su pared se ha distendido y vuelto porosa debido al incremento de temperatura del medio (Maloy, et al. 1994), y de esta manera asegurar una mayor eficiencia de transfección. La segunda modificación se llevó a cabo con la intención empírica de permitir a las células estabilizarse y recuperarse del posible maltrato o daño sufrido por el shock térmico. La tercera modificación surgió debido a la baja disponibilidad del medio SOC, el cual no fue posible adquirir de forma inmediata por lo cual se consideró utilizar medio LB como sustituto, teniendo en cuenta que ambos reactivos podrían cumplir con la misma función de estabilizar a las células y prepararlas para su cultivo en medio rico con antibiótico, pero además por la consideración de que en medio de cultivo, las células podrían comenzar a reproducirse incrementando de esta forma la cantidad de células a sembrar, elevando sutilmente la posibilidad de adaptación y crecimiento en el nuevo medio con antibiótico.

En cuanto al protocolo de extracción se llevaron a cabo 4 modificaciones. La primera se realizó entre el paso 4 y 5, donde se anexó un paso que consistía en adicionar 50 μ l de lisozima (10 mg/ml), a cada tubo e incubar a temperatura ambiente por 15 min., esto con la intención de acelerar y facilitar el proceso de lisis celular. La segunda modificación consistió en centrifugar por 30 min. la muestra y no por 5 min. como pide el paso 7, esto con el fin de precipitar la mayor cantidad posible de restos de pared celular y membrana, posteriormente se agregaron 100 μ l de isopropanol a cada tubo con el fin de precipitar el DNA y al centrifugar a 12000 por 15 min. poder empastillarlo. La tercera modificación consistió en agregar otro paso entre el paso 7 y 8, el cual consistía en realizar una digestión con RNAsas, para lo cual se le agregó a cada tubo 10 μ l de RNAsa y se incubó por 1 hora a 37 °C, esto para garantizar la limpieza del DNA y asegurar una extracción libre de posibles contaminantes. La última modificación se llevó a cabo en el paso 9 donde además de agregar etanol a cada tubo, también se agregó un décimo de Acetato de potasio, con la intención de lavar el DNA lo más posible de restos de fenol:cloroformo y garantizar su precipitación.

Al llevar a cabo estas últimas modificaciones se logró incrementar la concentración de DNA que se obtenía al finalizar la extracción, lo cual pudo deberse a que con estas modificaciones se reducía la pérdida de DNA en cada paso al manejarlo y al trasladarlo de un tubo a otro durante el desarrollo de la técnica.

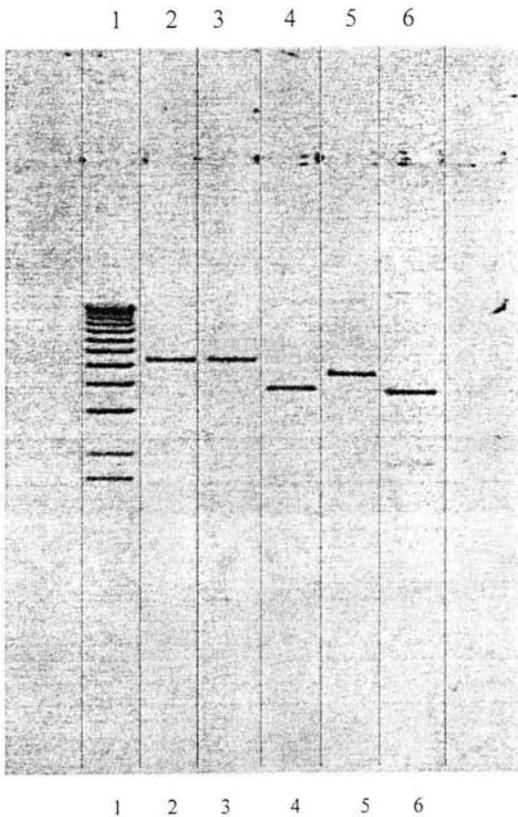
De la primera extracción sin modificaciones se obtuvieron 5 alícuotas con las siguientes concentraciones de DNA:

- 1.- 0.13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 2.- 0.21 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 3.- 0.11 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 4.- 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 5.- 0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

De la extracción final con las modificaciones se obtuvieron 10 alícuotas con las siguientes concentraciones de DNA:

- 1.- 1.56 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 2.- 0.95 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 3.- 1.41 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 4.- 0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 5.- 0.93 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 6.- 0.55 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 7.- 0.12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 8.- 1.47 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 9.- 0.85 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 10.- 0.40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

En el ensayo de restricción se obtuvo el siguiente esquema (Fig 1):



Carril 1.- Marcador de peso molecular de 1 kb.

Carril 2.- Un fragmento de 5474 pb aprox. = plásmido linealizado. Corte con la enzima BamH 1

Carril 3.- Un fragmento de 5474 pb aprox. = plásmido linealizado. Corte con la enzima Cla 1

Carril 4.- Dos fragmentos de 1659 pb y 3815 pb aprox. Corte con la enzima Hind III.

Carril 5.- Dos fragmentos de 941 pb y 4533 pb aprox. Corte con la enzima Kpn 1.

Carril 6.- Dos fragmentos de 1808 pb y 3666 pb aprox. Corte con la enzima Pst 1.

Estos resultados concuerdan con lo reportado en bibliografía para ensayos de restricción con este plásmido, por lo que se corrobora que el DNA de las muestras es pCIneo.

IV. CONCLUSIONES

Las modificaciones realizadas a los protocolos de producción y extracción de DNA plasmídico contribuyeron a elevar la concentración final de DNA de las muestras.

Por otro lado, contribuyeron también a acortar al tiempo requerido para desarrollar dichos protocolos, así como a simplificar el tiempo de aparición de colonias y a aumentar la cantidad y tamaño de las mismas.

V. BIBLIOGRAFÍA

- Bachmann, B.J. 1983. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, séptima edición. **Microbiol. Rev.** 47:180-230.
- Banuett, F., Hout, A.M., McFarlane, L., Echols, H., and Herskowitz, I. 1986. *hflB*, a new *Escherichia coli* locus regulating lysogeny and the level of bacteriophage lambda cII protein. **J. Mol. Biol.** 187:213-224.
- Birnboim, H. C., Jevcak, J.J. 1981. Fluorometric method for rapid detection of DNA strand breaks in human white blood cells produced by low doses of radiation. **Cancer Res.** 41(5):1889-92.
- Blattner, F.R., Williams, B.G., Blechl, A.E., Denniston-Thompson, K., Faber, H.E., Furlong, L.A., Grunwald, D.J., Kiefer, D.O., Moore, D.D., Schumm, J.W., Sheldon, E.O., and Smithies, O. 1977. Charon Phages: Safer derivatives of bacteriophage lambda for DNA cloning. **Science** 196:161-169.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heynecker, H.L. and Boyer, H.W. 1977. Construction of useful cloning vectors. **Gene** 2:95-113.
- Chang, A.C.Y. and Cohen, S.N. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. **J. Bacteriol.** 134:1141-1156.
- Chen L. and M. F. Roberts. (2000). Overexpression, Purification, and Analysis of Complementation Behavior of *E. coli* SuhB Protein: Comparison with Bacterial and Archaeal Inositol Monophosphatases. **Biochemistry** Apr 11;39(14):4145 – 4153.

- Cruz-Revilla C., G. Rosas, G. Fragoso, F. López-Casillas, A. Toledo, C. Larralde and E. Sciuotto. (2000). *Taenia crassiceps cysticercosis*: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. **J. Parasitol. Feb;86(1):67 – 74.**
- Dai B., J. Xiao, Z. Yan, C. Shen, S. Li and Z. Fang. (1998). Nucleotide sequence analysis of a species specific probe by an inserted fragment from recombinant plasmid pCX7 of *L. interrogans sensu stricto* serovar lai. **Hua Hsi I Ko Ta Hsueh Pao Dec;29(4):349 – 354.**
- Darnell J., Lodish H., y Baltimore D. 1986. *Biología celular y molecular*. Primera edición. Edit. Labor, S.A. New York, E.U. Pag. 125, 137, 248-251.
- Dautzenberg F. M., J. Higelin and U. Teichert. (2000). Functional characterization of corticotropin-releasing factor type 1 receptor endogenously expressed in human embryonic kidney 293 cells. **Eur. J. Pharmacol. Feb 25;390(1-2):51 – 9.**
- Dunn, I.S. and Blattner, F.R. 1987. Charon 36 and 40: Multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. **Nucl. Acids Res. 15:2677-2698.**
- DeWet, J.R., Daniels, D.L., Schroeder, J.L., Williams, B.G., Denniston-Thompson, K., Moore, D.D., and Blattner, F.R. 1980. Restriction maps fro twenty-one Charon vector phages. **J. Virol. 33:401-410.**
- Eickbush, T. H. and Moudrianakis, E. N. 1978. The compaction of DNA helices into either continuous supercoils of folded-fiber rods and toroids. **Cell 13:295-306.**
- Frischauf, A.M., Lahrach, H., Polstka, A., and Muray, N.M. 1983. Lambda replacement vectors carrying polilinker sequences. **J. Mol. Biol. 170:827-842.**
- Gibson, T.J., Coulson, A.R., Sulston, J.E., and Little, P.F.R. 1987. Lorist 2, a cosmid with transcriptional terminators insulating vector genes from interference by promoters within the insert: Effect on DNA yield and cloned insert frequency. **Gene 53:275-281.**
- Houghton J. A., R. Ebanks, F. G. Harwood and D. M. Tillman. (1998). Inhibition of apoptosis after thymineless stress is conferred by oncogenic K-Ras in colon carcinoma cells. **Clin. Cancer Res. Nov;4(11):2841 – 8.**
- Kahn, M., Kolter, R., Thomas, C., Figurski, D., Meyer, R., Remaut, E., and Helinski, D.R. 1979. Plasmid cloning vehicles derived from plasmids ColE1, F, R6K, and RK2. **Meth. Enzymol. 68:268-280.**
- Kakikawa M., S. Ohkubo, M. Syama, A. Taketo and K. I. Kodaira. (2000). The genetic switch fro the regulatory pathway of *Lactobacillus plantarum* phage (phi)gle: characterization of the promoter P(L), the represor gene cpq, and the cpq-encoded protein Apg in *E. coli*. **Gene Jan 25;242(1-2):155 – 166.**

- Kohno K., A. Nishizono, H. Terao, M. Hiraga and K. Mifune. (2000). Reduced transcription and progeny virus production of hepatitis B virus containing an 8-bp deletion in basic core promoter. **J. Med. Virol.** **May**;61(1):15 – 22.
- Kopko S. H., D. S. Martin and J. R. Barta. (2000). Responses of chickens to a recombinant refractile body antigen of *Eimeria tenella* administered using various immunizing strategies. **Poult Sci. Mar**;79(3):336 – 42.
- Leach, D.R.F. and Stahl, F.W. 1983. Viability of λ phages carrying a perfect palindrome in the absence of recombination nucleases. *Nature* 305:448
- Liu D., H. Yin and X. Wu. (1997). Transfection and expression of human thrombopoietin cDNA for treatment of thrombocytopenia in mice. **Chung Hua I Hsueh Tsa Chih. Nov**;77(11):834 – 7.
- Lodish H., D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira and J. Darnell. 1995. *Molecular cell biology*. Tercera edición. Edit. Scientific American Books. New York, USA. Pág. 221 – 229 y 252 – 254.
- Maloy, R. S., Cronan, Jr. J., Freifelder, D. 1994. *Microbial Genetics*. Second Edition. Edit. Jones and Bartlett Publishers. Boston, USA. Pag. 213 – 218.
- MacNeil, D. 1988. Caracterización of a unique methyl-specific restricción system in *Streptomyces avermitilis*. *J. Bacteriol.* 170:5607-5612.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition. Edit. Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor, N. Y. USA. Pag.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K., and Green, M.R. 1984. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmid containing a bacteriophage SP6 promoter. **Nucl. Acid Res.** **12**:7035-7056.
- Miller, J.H. 1978. The *lacI* gene: Its role in *lac* operon control and its uses as a genetic system. In the *Operon*. Cuarta edición.. Edit. Cold Spring Harbor. NY, USA. pp. 31-88
- Moser C., G. Bernhardt, J. Michel, H. Schwarz and A. Buschauer. (2000). Cloning and functional expression of the hNPY Y5 receptor in human endometrial cancer (HEC-1B) cells. **Can. J. Physiol Pharmacol.** **Feb**;78(2):134 – 42.
- Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M., and Umberger, H.E. 1987. *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: Celular and Molecular Biology. *Microbiology*. Edit. American Society of Microbiology. Washington, D.C. Pag. 225

- Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W., Riley, M., Schaechter, M., and Umberger, H.E. 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Second Edition. Volumen I. Edit. American Society of Microbiology. Washington, D.C. U.S.A. Pag. 2
- Norlander, J., Kempe, T., and Messing, J. 1983. Construction of improved M13 vectors using oligonucleotide-directed mutagenesis. **Gene** **26**:101-106.
- Osmanagaoglu O., Y. Beyatli and U. Gunduz. (2000). Cloning and expression of a plasmid-linked pediocin determinant trait of *Pediococcus acidilactici* F. **J. Basic. Microbiol.** **40(1)**:41 – 49.
- Ribas A. V., P. L. Ho, M. M. Tanizaki, I. Raw and A. L. Nascimento. (2000). High-level expression of tetanus toxin fragment C-thioredoxin fusion protein in *Escherichia coli*. **Biotechnol. Appl. Biochem. Apr** **1**;31(2):91 – 94.
- Rüter, U. and Muller-Hill, B. 1983. Easy identification of cDNA clones. **EMBO J.** **2**:1791-1794.
- Stoker, N.G., Fairweather, N.F., and Spratt, B.G. 1982. Versatile low-copy-number plasmid vectors for cloning in *E. coli*. **Gene** **18**:335-341.
- Sutcliffe, J.G. 1978. Complete nucleotide sequence of the *E. coli* plasmid pBR322. **Quant. Biol.** **43**:77-90.
- Thorne, H. V. 1967. Electrophoretic characterization and fractionation of polyoma virus DNA. **J. Mol. Biol.** **24**:203.
- Trouet D., B. Nilius, T. Voets, G. Droogmans and J. Eggermont. (1997). Use of bicistronic GFP-expression vector to characterise ion channels after transfection in mammalian cells. **Pflugers Arch. Sep**;434(5):632 – 8.
- Volgestein, B. and Gullispie, D. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.** **76**:615-619.
- Wang G., A. Aazaz, Z. Peng and P. Shen. (2000). Cloning and overexpression of a tyrosinase gene mel from *seudomonas maltophila*. **FEMS Microbiol. Lett. Apr** **1**;185(1):23 – 27.
- Weinstock, G.M., Rhys, C., Berman, M.L. Hampar, B., Jackson, D., Silhavy, T.L. Weisemann, J., and Zweig, M. 1983. Open Reading Frame expression vectors: A general method for antigen production in *E. coli* using protein fusions to β -galactosidase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **80**:4432-4436.

- Wertman, K.F., Wyman, A.R. and Botstein, D. 1986. Host/vector interaction which affect the viability of recombinant phage lambda clones. **Gene** 49:253-262.
- Wyman, A.R., Wertman, K.F., Barker, D., Helms, C., y Petri, W.H. 1986. Factors which equalize the representation of genome segments in recombinant libraries. **Gene** 49:263-271.
- Yevenes A. and E. Cardemil. (2000). Expression of the *trypanosoma brucei* phosphoenolpyruvate carboxykinasa gene in *saccharomyces cerevisiae*. **Biochimie Feb;82(2):123 – 127.**
- Zhao J. H., Z. Xu and Z. C. Hua. (2000). Expression of Human Cardiac-Specific Homeobox Protein in *E. coli*. **Protein Expr. Purif. Apr;18(3):316 – 319.**
- Zinn, K., DiMaio, D., and Maniatis, T. 1983. Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human β -interferon gene. **Cell** 34:865-879.

VI. APENDICE

Nota: Las modificaciones se muestran en negritas.

5.1. Técnica de células competentes

1.- Tomar 1 sola colonia de DH5 α (2 a 3 mm de diámetro), de una placa de cultivo fresca crecida por 16 a 20 hrs. a 37 °C y transferirla a un recipiente estéril con medio LB o SOB. Crecer las células por 2.5 a 3 h. a 37 °C con oscilación vigorosa (300 ciclos/min. en un oscilador). Para llevar a cabo una eficiente transformación, es esencial que el número de células viables no exceda las 10⁸ células/ml. Se recomienda monitoriar el crecimiento del cultivo cada 20 a 30 min. a una densidad óptica de 600.

2.- Transferir asépticamente las células a tubos estériles de 50 ml. (Falcon 2070). Enfriar los tubos en hielo por 10 min.

3.- Recuperar las células por centrifugación a 4000 rpm. por 10 min. a 4 °C en un rotor Sorvall GS3 (o su equivalente).

4.- Decantar el sobrenadante conservando la pastilla. Colocar los tubos en posición invertida por 1 min. para permitir que drenen las últimas trazas de medio.

4^a.- Lavar suavemente sin resuspender la pastilla con una solución de PBS 1M pH 7.0 y volver a centrifugación a 4000 rpm. por 10 min. a 4 °C en un rotor Sorvall GS3 (o su equivalente).

5.- Resuspender cada pastilla en 10 ml de CaCl_2 0.1 M frío y colocar en hielo por (60 min.) **3 hrs.**

6.- Recuperar las células por centrifugación a 4000 rpm. por 10 min. a 4 °C en un rotor Sorvall GS3 (o su equivalente).

7.- Decantar el sobrenadante y conservar el pastilla, y colocar los tubos en posición invertida por 1 min. para permitir que drenen las últimas trazas de sobrenadante.

8.- Resuspender cada pastilla en 2 ml de CaCl_2 0.1 M. con glicerol 10 % frío por cada 50 ml del cultivo original.

9.- Transferir 200 μl de cada una de las suspensiones anteriores de células competentes a tubos estériles de microcentrífuga para preparar alícuotas y congelar y guardar a -70 °C.

5.2. Técnica de transformación

1.- Adicionar a una alícuota de células competentes 1 μl de DNA (a una concentración de 4 ng aprox. para óptimos resultados), y agitar suavemente el tubo varias veces para mezclar el contenido. Colocar los tubos en hielo por 30 min.

2.- Transferir el tubo a un rack y colocarlo en un baño de agua circulante precalentado a 42 °C. Dejar el tubo en el baño por (90 seg.) **2 min.** exactamente. No batir o sacudir los tubos.

3.- Cumplido el tiempo, transferir rápidamente el tubo a un baño de hielo y dejarlo reposar por (1 a 2 min.) **5 min.**

4.- Adicionar (800 μl de medio SOC) **200 μl de medio LB al tubo.** Entibiar el tubo a 37 °C en un baño de agua y después transferirlo a un incubador oscilatorio a 37 °C. Incubar el cultivo por (45 min) **1 hr.** para permitir que la bacteria se recobre y exprese la resistencia al antibiótico conferida por el plásmido. Para maximizar la eficiencia de la transformación se recomienda mantener una agitación suave (225 ciclos/min. o menos), durante el tiempo de recuperación.

5.- Transferir el volumen apropiado (aprox. 200 μl por placa de 90 mm), de células competentes transformadas a placas con SOB agar MgSO_4 20 mM y con el antibiótico apropiado. Usar una aza triangular de vidrio para dispersar las células transformadas en toda la superficie del agar de la placa.

6.- Colocar las placas a temperatura ambiente hasta que el líquido sea absorbido.

7.- Invertir las placas e incubarlas a 37 °C. Las colonias deberán aparecer después de 12 a 16 horas aprox.

5.3. Técnica Mini prep.

1.- Transferir 1 sola colonia bacteriana a 2 ml de medio LB con el antibiótico apropiado, en un tubo de 15 ml tapado. Incubar toda la noche a 37 °C con agitación vigorosa.

2.- Vaciar 1.5 ml de cultivo en un tubo de microcentrifuga. Centrifugar a 12000 g por 30 seg a 4 °C.

3.- Remover el sobrenadante por decantación o aspiración, dejando que el pastilla se seque lo mas posible.

4.- Resuspender el pastilla en 100 µl de Solución I (Glucosa-Tris-EDTA) fría, usando vortex.

4ª.- Adicionar 50 µl de lisozima (10 mg/ml), a cada tubo e incubar a temperatura ambiente por 15 min.

5.-Adicionar 200 µl Solución II (NaOH-SDS 1%) recién preparada. Cerrar perfectamente el tubo y mezclar el contenido invirtiendo el tubo rápidamente 5 veces. Asegurarse de que la superficie entera del tubo entre en contacto con la Solución II. No usar vortex. Mantener el tubo en hielo.

6.- Adicionar 150 µl de Solución III (Acetato de potasio-ácido acético) fría. Cerrar el tubo y dar vortex suavemente en posición invertida por 10 seg. para dispersar la Solución III obteniendo un lisado viscoso. Poner el tubo en hielo por 3 a 5 min.

7.- Centrifugar a 12000 g por (5 min.) **30 min.** a 4 °C en una microcentrifuga. Transferir el sobrenadante a tubos limpios.

7ª.- Agregar a cada tubo 10 µl de RNAsa e incubar por 1 hora a 37 °C.

8.- Opcional: Adicionar un volumen igual a la muestra, de fenol:cloroformo. Mezclar con vortex. Después centrifugar a 12000 g por 2 min. a 4 °C y transferir el sobrenadante a un tubo limpio.

9.- Precipitar el DNA con 2 volúmenes de etanol a temperatura ambiente y **agregar un décimo de Acetato de potasio con respecto a la muestra.** Mezclar con vortex. No mover la muestra por 2 min. a temperatura ambiente.

10.- Centrifugar a 12000 g por 5 min. 4 °C.

11.- Remover el sobrenadante y mantener el tubo invertido sobre un papel absorbente para permitir que todo el liquido sea drenado. Secar perfectamente el tubo.

12.- Enjuagar la pastilla con 1 ml de etanol al 70 % a 4 °C. De nuevo remover el sobrenadante y permitir que la pastilla se seque bien, por aprox. 10 min.

13.- Resuspender la pastilla en 50 µl de TE (pH 8.0) con RNAsa (20 µg/ml). Aplicar vortex. Guardar a -20 °C.