



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

**Construcción de una biblioteca genómica de
Rhodococcus pyridinovorans V51B**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

JASMÍN NÚÑEZ PINEDA



**DIRECTORA DE TESIS: DRA. GEORGINA GARZA RAMOS
ASESORA DE TESIS: DRA. MARTHA LEGORRETA HERERA**

MÉXICO D.F.

FEBRERO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

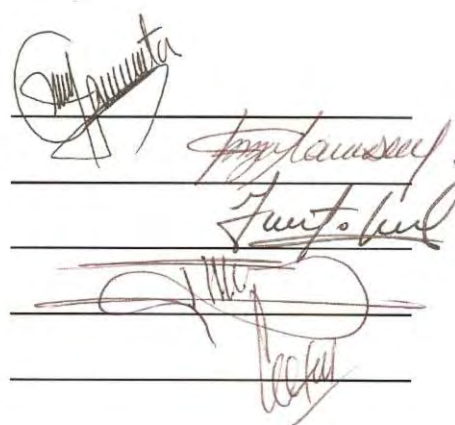
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

SINODALES ASIGNADOS

PRESIDENTE DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
VOCAL* DRA. GEORGINA GARZA RAMOS MARTÍNEZ
SECRETARIO DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
SUPLENTE Q.F.B. MA. LOURDES VEGA NAVARRETE
SUPLENTE DRA. MA. DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ



Handwritten signatures of the five members of the committee, each written over a horizontal line.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE FISICOQUÍMICA E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS, FACULTAD DE MEICINA, UNAM. MEDIANTE EL APOYO FINANCIERO DE CONACyT REF: 41328.

ÍNDICE

RESUMEN	I
I. MARCO TEÓRICO	1
A. Nitrilos	1
B. Nitrilasas	2
C. Nitrilasa de <i>Rhodococcus pyridinovorans</i>	3
D. Herramientas de biología molecular	4
1. Bibliotecas de ADN recombinante	5
a. Biblioteca de ADN genómico	5
b. Biblioteca de ADN complementario	7
2. Enzimas	7
a. Enzimas de restricción	7
b. Ligasa	10
3. Vectores	11
a. pZErO-2™	13
b. pBluescript SK(+)	14
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
III. OBJETIVOS	17
IV. HIPÓTESIS	18
V. DISEÑO EXPERIMENTAL	19
A. Diagrama de flujo	19
B. Material.....	20
1. Soluciones y amortiguadores	20
2. Enzimas y material biológico	21
3. Equipo e instrumentos	21
C. Métodos	22
1. Extracción del ADN total de <i>Rhodococcus pyridinovorans</i> V51B	22
2. Preparación de células competentes	23
a. Células TOP 10	23
b. Células XL1-Blue	24
3. Construcción de la biblioteca genómica	25
4. Búsqueda en la biblioteca generada	30

VI. RESULTADOS	32
1. Extracción del ADN total de <i>Rhodococcus pyridinovorans</i> V51B	32
2. Preparación de células competentes	33
3. Construcción de la biblioteca genómica	34
4. Búsqueda en la biblioteca generada	41
VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS	47
VIII. CONCLUSIONES	50
IX. PERSPECTIVAS	51
X. REFERENCIAS BIBLOGRÁFICAS	52

RESUMEN

La bacteria *Rhodococcus pyridinovorans* es de gran interés tanto industrial como ambiental porque tiene la capacidad de degradar nitrilos. La mayoría de los nitrilos son compuestos potencialmente tóxicos; su molécula contiene el grupo funcional ciano y no biodegradan fácilmente. A pesar de que un grupo restringido de microorganismos utiliza nitrilos como fuente de carbono y nitrógeno, la degradación microbiológica se ha considerado como una alternativa eficiente para la eliminación de nitrilos contaminantes en el ambiente. La nitrilasa de *R. pyridinovorans* presenta una especificidad amplia, ya que convierte eficientemente sustratos alifáticos (valeronitrilo) y aromáticos (benzonitrilo). En ensayos de biotransformación con extractos parcialmente purificados o con células enteras, se comprobaron niveles de conversión para ambos nitrilos que se aproximan al rendimiento estequiométrico. La mayoría de las nitrilasas que a la fecha se han aislado y purificado son específicas para un solo tipo de sustrato, o alifático o aromático; esto señala a la nitrilasa de *R. pyridinovorans* como una enzima particularmente interesante como modelo de estudio.

Con el fin de estudiar la nitrilasa de la bacteria *Rhodococcus pyridinovorans*, así como también explorar las regiones reguladoras y codificadoras contiguas al gen que codifica para esta enzima, se intentó construir una biblioteca genómica de *R. pyridinovorans*.

El uso de bibliotecas genómicas es una técnica muy útil para aislar secuencias completas de ADN a partir de un microorganismo no caracterizado. Con la creación de estas bibliotecas se puede obtener información tanto taxonómica como funcional del microorganismo, ya que las células transformantes contienen fragmentos que abarcan la totalidad del genoma. Por esta razón se utilizan para identificar nuevos genes; tanto de bacterias, hongos, virus e incluso de seres humanos; así como aislar enzimas involucradas en la biosíntesis de nuevos productos farmacéuticos y otros usos industriales.

Para la creación de la genoteca, el DNA total de *R. pyridinovorans* se digirió parcialmente con la enzima de restricción Sau3AI, encontrando que las condiciones en las que se obtienen fragmentos de 5000 pb son incubando de 3.5 a 5.4 μ g de ADN con 0.4 U de la enzima de restricción por un periodo de 3-5 minutos. Estos fragmentos se intentaron ligar sin éxito al vector de clonación pZErO-2. Se optó por usar el fagémido pBluescript SK(+).

Con este vector primero se realizaron controles de la ligación, sustituyendo los fragmentos de ADN por el vector pET-24a+, que tiene un peso de 5310 pb. Con los datos obtenidos en estos controles se determinó que con la relación molar 2:1 se obtienen clonas recombinantes, sin embargo al ligar los fragmentos de ADN de *R. pyridinovorans*, se obtuvieron solo 44 vectores recombinantes. Al realizar el análisis de estas clonas con las enzimas de restricción se observaron patrones electroforéticos que indican que algunas clonas presentaron resistencia a la acción de alguna de las enzimas utilizadas. Esto nos indica la presencia de un vector contaminante. Esto se corroboró con reacciones de PCR, en las que no se tuvo amplificación de los insertos aparentemente clonados, ni del sitio múltiple de restricción del pBS SK(+).

I. MARCO TEÓRICO

A. Nitrilos

Los nitrilos son compuestos orgánicos que contienen un triple enlace carbono-nitrógeno, aparecen como intermediarios en la ruta metabólica del cianuro en animales, plantas y microorganismos. En la naturaleza están representados por los cianoglucósidos y cianolípidos en las plantas, los aminonitrilos y las cianhidrinas en los hongos y los mandelonitrilos en los artrópodos. Por otra parte la industria química produce extensamente nitrilos como acetonitrilo, adiponitrilo y acrilonitrilo (Conn, et al., 1980). Los nitrilos son compuestos altamente tóxicos y generalmente no son biodegradables. Por ejemplo, el crotononitrilo y acrilonitrilo se han propuesto como reactivos específicos para la alquilación del grupo sulfhidro de las proteínas, pero son tóxicos para el sistema nervioso central de animales y son mutagénicos debido a la capacidad de conjugar sus enlaces. Sin embargo algunos microorganismos son capaces de utilizar estos compuestos como fuente de carbono y/o nitrógeno (Banerjee, et al., 2002).

La industria química hace uso extenso de varios nitrilos para fabricar una gran variedad de polímeros y otros productos químicos, por ejemplo el acrilonitrilo y el adiponitrilo son necesarios para la producción de poliacrilonitrilo y polímeros del tipo nylon. Los nitrilos son importantes intermediarios en la síntesis orgánica de aminas, amidas, ácidos carboxílicos, ésteres, aldehídos, cetonas y compuestos heterocíclicos, los cuales se usan como disolventes, conservadores, intermediarios en la síntesis de fármacos (sintones quirales), herbicidas, pesticidas y edulcorantes (March, 2001).

Los métodos químicos tradicionales para la conversión de nitrilos a ácidos carboxílicos y amidas tienen desventajas: 1) las reacciones se tienen que llevar a cabo en condiciones fuertemente ácidas: 6M de HCl ó básicas: 2M de NaOH con reflujo. 2) temperatura de reacción alta. 3) formación de subproductos tóxicos como HCN o grandes cantidades de sales. Mientras que la conversión enzimática (biocatálisis) se lleva a cabo a temperatura ambiente y pH cercano a la neutralidad, además permite transformaciones químico, regio y enantioselectivas (Banerjee, et al., 2002, Kobayashi, et al., 1998).

B. Nitrilasas

La degradación microbiológica de los nitrilos procede por dos vías enzimáticas (Fig. 1). La nitrilasa que cataliza la hidrólisis directa de los nitrilos al correspondiente ácido carboxílico y amoníaco. Mientras que la nitrilo-hidratasa cataliza la hidratación del nitrilo a la correspondiente amida, seguida por la conversión a ácido carboxílico y amoníaco por medio de amidasas (Kobayashi, et al, 1998).

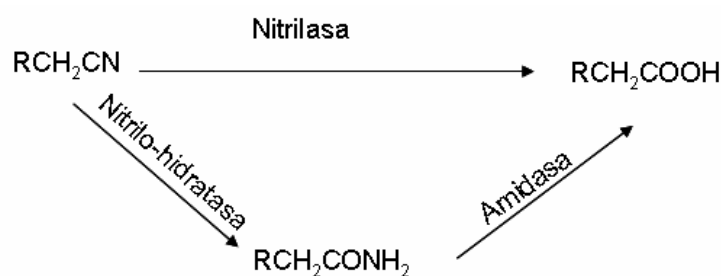


Fig. 1. La degradación microbiológica de nitrilos mediante la acción de la nitrilasa y la nitrilo-hidratasa.

Las nitrilasas pertenecen a la superfamilia de las hidrolasas carbono-nitrógeno, las cuales catalizan reacciones hidrolíticas de enlaces no peptídicos carbono-nitrógeno (Pace, et al., 2001). La nitrilasa fue la primera enzima descrita con la capacidad de metabolizar compuestos de tipo nitrilo, hace más de 40 años. La enzima, se obtenía de hojas de cebada, cataliza la conversión del 3-indol acetónitrilo a ácido 3-indolacético, que es una auxina. Esta reacción se observó en extractos enzimáticos obtenidos de diferentes plantas. Posteriormente se observó actividad de nitrilasa en extractos obtenidos de bacterias del suelo (*Pseudomonas*) seleccionadas para crecer en un medio que contiene el nitrilo natural ricina (N-metil-3-ciano-4-metoxi-2-piridona) como única fuente de carbono. A la fecha se han caracterizado aproximadamente diez nitrilasas provenientes de diferentes microorganismos, en la mayoría bacterias y una de plantas (*Arabidopsis thaliana*). Aunque para la mayoría de estas nitrilasas su caracterización bioquímica no es completa, los datos de la literatura indican que las propiedades bioquímicas varían dependiendo de la especie. Las diferencias más significativas son la especificidad por sustratos, la estructura nativa, las propiedades de agregación y pH óptimos (O'Reilly, et al., 2003).

Con base en la especificidad por los sustratos, las nitrilasas bacterianas se clasifican en tres categorías: las que hidrolizan nitrilos aromáticos o heterociclos, las que degradan preferentemente nitrilos alifáticos o arilacetnitrilos y por último las que tienen la capacidad de hidrolizar tanto nitrilos aromáticos como alifáticos (Banerjee, et al., 2002).

En la mayoría de los microorganismos las nitrilasas no se expresan constitutivamente. Se ha descrito que la nitrilasa de *Nocardia sp* se induce por benzonitrilo (Collins, et al., 1983); se ha usado el acetonitrilo para inducir la expresión en *Fusarium oxysporum* (Goldhust, et al., 1998); mientras que en *Rhodococcus rhodochrous* J1 se induce por el isovaleronitrilo (Nagasawa, et al., 1988) y caprolactama (Nagasawa, et al., 1990).

Se ha descrito la presencia de una cisteína en/o cerca del sitio activo. El mecanismo propuesto para la reacción catalizada por las nitrilasas involucra un ataque nucleofílico por el grupo tiol de un residuo de cisteína sobre el carbono del grupo ciano. Con lo cual se produce un intermediario iminotioéster tetraédrico. Seguido de la protonación del nitrógeno, produciendo una acil-enzima que se hidroliza formando el ácido carboxílico respectivo (Kobayashi, et al., 1998) (Fig. 2).

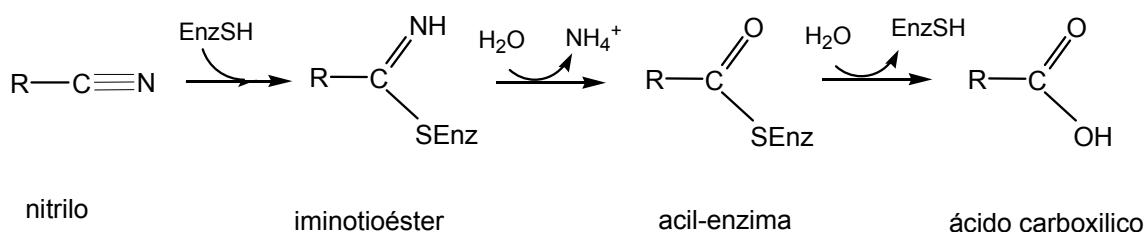


Fig. 2. Mecanismo de reacción propuesto para la nitrilasa

C. Nitrilasa de *Rhodococcus pyridinovorans*

La bacteria *Rhodococcus pyridinovorans* se encontró en muestras de suelo tomadas en Jiutepec Morelos como parte de un tamizado de muestras ambientales de diferentes regiones del centro de la República Mexicana. El método de selección fue la auxotrofia en nitrilos, un alifático (valeronitrilo) y un aromático (benzonitrilo) como fuente de carbono y nitrógeno. Se demostró que el microorganismo aislado no produce benzamida ni la metaboliza, lo que indica que la enzima presente tiene actividad nitrilasa y no nitrilo hidratasa o amidasa (Regla, 2005).

La bacteria se identificó por secuenciación del gen del ARNr 16S, como un miembro del género *Rhodococcus*. El alineamiento de 1473 nucleótidos de este gen mostró 99.93 % de identidad con el gen ARNr 16S de la bacteria degradante de piridina *Rhodococcus pyridinovorans*. Por lo que la cepa se nombró *Rhodococcus pyridinovorans* V51B. Una vez obtenida la cepa con actividad de nitrilasa, se probaron varias condiciones para optimizar su crecimiento e inducción. Tanto el isovaleronitrilo como la caprolactama son excelentes inductores de la nitrilasa de *R. pyridinovorans* V51B (Regla, 2005).

A diferencia de la mayor parte de las enzimas de la subfamilia de las nitrilasas, la enzima de *R. pyridinovorans* V51B presenta una especificidad amplia, ya que convierte eficientemente sustratos alifáticos y aromáticos. La caracterización cinética se ha realizado con valeronitrilo y benzonitrilo como sustratos, obteniéndose para ambos actividades específicas dentro del mismo orden de magnitud. En ensayos de biotransformación con extractos parcialmente purificados o con células enteras, se comprobaron niveles de conversión de estos y otros nitrilos (fenilacetónitrilo) que se aproximan al rendimiento estequiométrico. Una limitante en estos ensayos, es la solubilidad de algunos sustratos particularmente interesantes desde el punto de vista experimental o de las aplicaciones de esta enzima en la síntesis química (Regla, 2005).

D. Herramientas de biología molecular

El estudio de la estructura y función de los genes requiere grandes cantidades y en forma pura del gen individual. Las técnicas de ADN recombinante permiten la recuperación de fragmentos únicos de ADN a partir de mezclas extremadamente complejas derivados de cualquier genoma celular. Permite la disección de genomas complejos en segmentos discretos que contienen uno o varios genes lo que facilita su purificación en grandes cantidades (Singer, et al., 1993). El ADN recombinante es cualquier molécula de ADN compuesta por secuencias derivadas de diferentes fuentes, que modifica el genotipo de un organismo de forma determinada (Lodish, et al., 2004, Thomas, 2003). Este proceso involucra un vector, que proporciona la información necesaria para la propagación del fragmento de ADN que se introdujo en él. La clave para crear estas moléculas recombinantes son las enzimas. Las enzimas de restricción que cortan el ADN en secuencias específicas de la doble cadena y la enzima encargada de unir los fragmentos (Clark, 2005).

1. Bibliotecas de ADN recombinante

Una biblioteca genómica es una colección de clonas que contienen, en fragmentos, el ADN de algún organismo de interés que, cuando se realiza exitosamente, contiene al menos una copia de cada secuencia del genoma (Garret, et al., 1999, Russell, 2000). Se pueden realizar diferentes tipos de bibliotecas dependiendo de la naturaleza del ADN que se utilice para construirla. Así, se pueden tener bibliotecas genómicas, en las cuales se tiene representado la totalidad del genoma y las bibliotecas de ADN complementario, en las cuales se tiene solo la secuencia que codifica para un gen en particular (Watson, et al., 2004).

a. Biblioteca de ADN genómico

Este tipo de genoteca representa la totalidad del genoma, incluyendo el ADN codificante como el no codificante (genes que se transcriben a ARN mensajero, regiones reguladas que no se expresan, regiones generadas por la inserción de virus no funcionales, pseudogenes, secuencias de inserción, transposones y regiones de las que aun no se sabe su función) (www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte2_cap3.pdf). Por lo tanto, una biblioteca genómica es un medio para recuperar cualquier gen del genoma del organismo, pudiéndose estudiar con detalle junto con sus secuencias reguladoras adyacentes.

El número de clonas necesarias para incluir todo el genoma del organismo y así disminuir la probabilidad que se pierdan secuencias depende del tamaño del material genético y de los fragmentos de ADN que se inserten en el vector (Ringo, 2004, Russell, 2000). La probabilidad de tener al menos una copia de cada secuencia, dentro de la biblioteca genómica, se calcula con la fórmula:

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)}$$

Donde N es el número necesario de moléculas de ADN recombinante, P es la probabilidad de tener el fragmento representado y f es la fracción promedio del genoma representado por cada colonia. El valor de f se calcula dividiendo el tamaño promedio del inserto entre el tamaño del genoma (Cseke, et al., 2004).

El primer paso en la producción de una genoteca de este tipo consiste en aislar ADN genómico en forma intacta y libre de impurezas, ya que un ADN roto puede generar muchos problemas durante la etapa de clonación y con demasiadas impurezas puede intervenir e incluso inhibir a las enzimas de restricción que se emplean para cortar el material genético (Álvarez, et al., 2004).

Una vez que se sabe el número de colonias que se requiere obtener (tamaño de la biblioteca) el siguiente paso es cortar el ADN en fragmentos del tamaño requerido. El número y tamaño de los fragmentos generados por las enzimas de restricción dependen de la frecuencia en que aparece el sitio de reconocimiento en el ADN a cortar (Primrose, et al, 2006). Comúnmente se usa la enzima de restricción *Sau3AI* ya que su sitio de reconocimiento es pequeño y la probabilidad de encontrarlo a lo largo del genoma será mayor que un sitio de seis o más bases (Álvarez, et al., 2004). Esta enzima corta la cadena de ADN, en promedio, cada 256 pares de bases. Como la probabilidad de encontrar el sitio de reconocimiento en el genoma es muy alta, la digestión será mayor entre mas tiempo se deje la reacción. Obteniéndose fragmentos de ADN cada vez más pequeños, hasta obtener el tamaño deseado con el cual se pueda crear la genoteca. Por lo que es necesario seguir el progreso del corte. Sin embargo, los sitios de restricción no se encuentran distribuidos uniformemente en el genoma, por lo que se obtienen fragmentos más grandes que otros (Clark, 2005).

Para seguir el proceso de digestión, así como poder separar y purificar los fragmentos de ADN del tamaño adecuado, se utiliza la electroforesis en gel de agarosa. La electroforesis en gel de agarosa es una técnica que permite separar moléculas de ADN de diferentes tamaños (Brown, 2007). Cerca del pH neutro el ADN tiene carga negativa que hace que migre al polo positivo a través del gel cuando se le aplica una fuerza eléctrica (Lodish, et al., 2004). La velocidad de migración, a través del campo eléctrico depende de la carga neta, del tamaño y la fuerza iónica de las moléculas, de la viscosidad y temperatura del medio en el cual las moléculas se mueven (Hardin, et al., 2001). Las moléculas de ADN son flexibles y ocupan un volumen efectivo. Los poros en el gel tamizan las moléculas acorde a ese volumen. Las moléculas más largas migran mucho más lento a través del gel por que tienen mayor volumen efectivo que las moléculas de ADN cortas (Watson, et al., 2004). Para visualizar las bandas de ADN se utiliza el colorante fluorescente bromuro de etidio. Esta molécula se intercala entre las bases del ADN haciendo visible la molécula bajo luz ultravioleta (Brown, 2000).

Un parámetro de calidad a observar en una genoteca es el número de transformantes que tienen un inserto de ADN y de que tamaño es ese inserto. Para esto se toman unas cuantas colonias, se hacen crecer por separado, se purifica el vector recombinante y se le extrae el inserto por digestión con una o dos enzimas de restricción. Lo ideal es que la mayoría de los vectores tengan un inserto dentro del rango de tamaño que se seleccionó (Malacinski, et al, 1998). Un número elevado de colonias sin inserto o con insertos de tamaño muy distinto al deseado son indicios de una genoteca defectuosa. Esto reduce la eficiencia de los pasos posteriores de tamizado para encontrar el gen de interés dentro de la genoteca (Álvarez, et al., 2004).

b. Biblioteca de ADN complementario

Las bibliotecas de ADN genómico representan todo el genoma de un organismo. Sin embargo, en ocasiones solo interesan los genes que se expresan. De este modo si se transcribe solo una fracción de ADN de una célula, se tendrá un conjunto de genes que representan sólo una porción del genoma. Debido a la naturaleza del ARN, no es posible ligarlo al vector para hacer una genoteca, es necesario hacer una copia complementaria de ADN utilizando la enzima transcriptasa reversa. La enzima transcriptasa reversa utiliza el ARNm como molde para sintetizar su cadena complementaria utilizando desoxiribonucleótidos, lo que permite obtener ADN complementario de doble hebra que se puede ligar a vectores y posteriormente obtener células transformantes (Malacinski, et al, 1998). Este tipo de genotecas permite estudiar los genes que se expresan bajo ciertas condiciones específicas como enfermedad, estrés, nutrientes del medio de cultivo y diferenciación en el caso de eucariontes multicelulares o estados de desarrollo en hongos y levaduras (Watson, et al., 2004).

2. Enzimas

a. Enzimas de restricción

Todas las células contienen diferentes nucleasas que pueden clasificarse en dos amplias clases: exonucleasas y endonucleasas (Fig. 3). Las exonucleasas degradan los ácidos nucleicos desde un extremo de la molécula. Muchas actúan en la dirección 5'→3' o bien en la dirección 3'→5' eliminando nucleótidos sólo del extremo 5' o del 3' respectivamente. Mientras que las endonucleasas pueden empezar a degradar en cualquier punto de una cadena o molécula de ácido nucleico, reduciéndolo a fragmentos cada vez más pequeños (Lehninger, et al., 1993).

Hay una clase de endonucleasas, de gran importancia, llamadas de restricción. Estas cortan secuencias específicas que son palíndromos y producen cortes en ambas cadenas de la molécula de ADN (Malacinski, et al., 1998). Existen tres tipos de enzimas de restricción. En los tipos I y III no se conoce con exactitud la secuencia de los fragmentos obtenidos ya que no tienen un control estricto del corte en la secuencia de ADN que reconocen. Con las enzimas de tipo II el corte siempre es en el mismo lugar del sitio de reconocimiento, por lo que con la digestión de ADN con este tipo de enzimas se obtienen fragmentos cuya secuencia es conocida (Garret, et al., 1999).

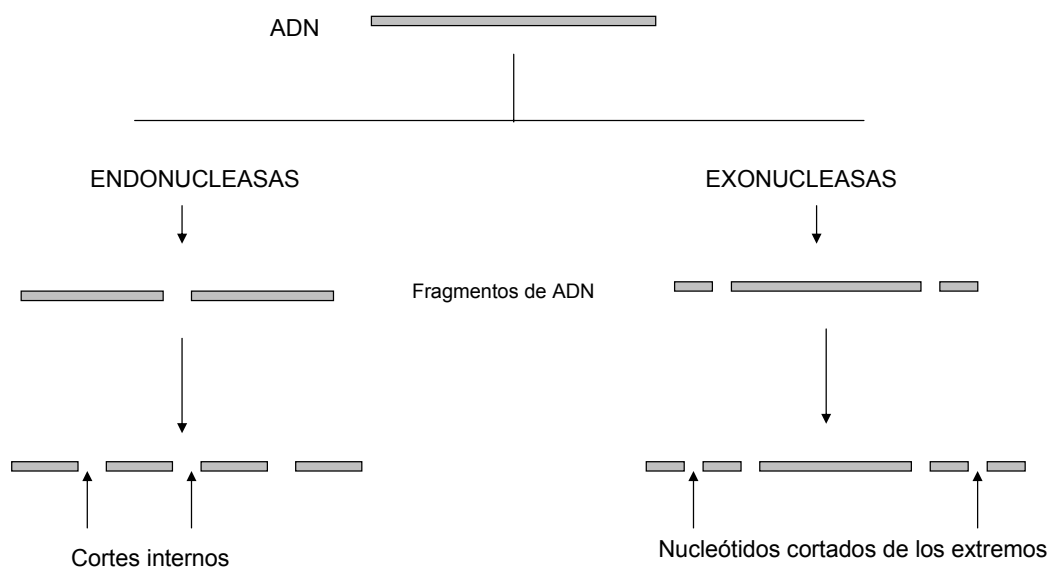


Fig. 3. Clasificación de las nucleasas. Las exonucleasas degradan el ADN desde los extremos de la molécula. Mientras que las endonucleasas degradan desde cualquier punto de la molécula.

Muchas enzimas de restricción están compuestas de dos subunidades idénticas, cada una de las cuales reconoce y corta una de las dos cadenas. Algunas de estas enzimas de restricción cortan el ADN en el centro de la secuencia de reconocimiento, en ambas cadenas, produciendo extremos romos (blunt-ends). En este caso las bases quedan apareadas, por lo tanto no tienden a unirse con extremos complementarios (Lehninger, et al., 1993). Existe otro tipo de enzimas que cortan las dos cadenas en diferentes posiciones, usualmente dos o cuatro nucleótidos de diferencia, obteniéndose fragmentos de cadena simple en cada extremo. Estos tienden a asociarse a una cadena complementaria de otro fragmento (con extremos producidos de la misma manera) por apareamiento de bases, por lo que se denominan extremos cohesivos. Algunas enzimas dejan extremos 5' (BamHI, Sau3AI) y otras que dejan extremos 3' (PstI) (Brown, 2007) (Fig. 4).

Werner Arber, Hamilton Smith y Daniel Nathans a finales de los años sesenta descubrieron a las enzimas de restricción (Stryer, 1995). Estas constituyen un mecanismo de defensa contra los fagos, puesto que cortan las secuencias de ADN extraño. Para cada enzima de restricción la bacteria también produce una enzima modificadora. La modificación consiste en la metilación de uno o dos bases en el sitio de restricción (Gardner, et al., 1998), de esta forma la bacteria puede distinguir su propio ADN haciéndolo resistente a la acción de las enzimas (Ringo, 2004).

Las enzimas de restricción se utilizan para hidrolizar moléculas de ADN produciendo fragmentos específicos que se pueden analizar y manipular con más facilidad que la molécula original (Kreuser, et al., 2001). Cada enzima de restricción tiene condiciones óptimas para utilizarse que se definen especialmente por la temperatura y la fuerza iónica del medio de reacción.

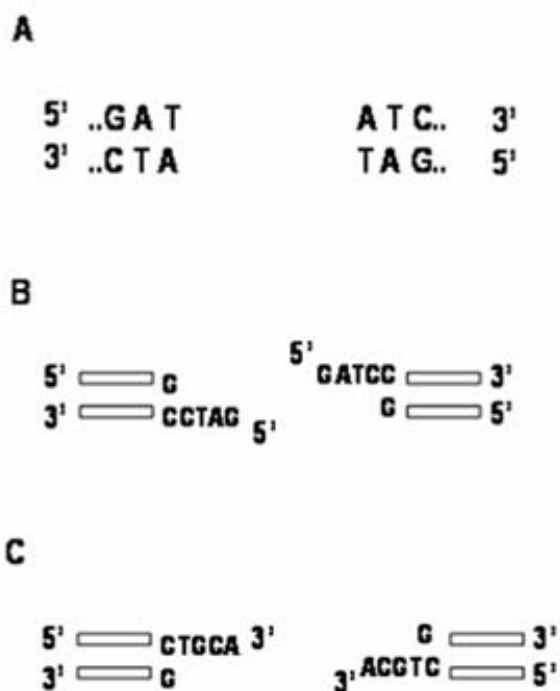


Fig. 4. Tipos de extremos que se obtienen con las enzimas de restricción. **A)** Extremo romo producido por la enzima EcoRV, **B)** Extremo cohesivo 5' producido por la enzima BamHI y **C)** Extremo cohesivo 3' producido por PstI.

b. Ligasa

Los extremos cohesivos de ADN que se han obtenido mediante la acción de enzimas de restricción permiten la unión por asociación de los segmentos. Sin embargo los puentes de hidrógeno que mantienen la unión son relativamente débiles y no siempre estables en las condiciones de manipulación que los experimentos imponen (Singer, et al., 1993). Pero pueden unirse nuevamente ya sea entre si o bien a otra secuencia, esto por medio de ligasas (Brown, 2007).

Las ligasas son enzimas que se requieren para la reparación y recombinación del ADN (Doherty, et al., 2000). Durante la replicación normal, la ligasa cataliza la unión de los fragmentos pequeños de ADN, llamados fragmentos de Okasaki (Lodish, et al., 2004). Este tipo de enzimas cataliza la formación de enlaces fosfodiéster de las hebras de ADN de la doble cadena (Doherty, et al., 2000). Para lo cual se requiere un grupo OH libre en el extremo 3' y un grupo fosfato en el extremo 5' (Stryer, 1995). Las ligasas se pueden clasificar en dos amplias clases: las que requieren NAD^+ como cofactor y las que requieren ATP. Las que requieren ATP son codificadas por arqueobacterias, virus y células eucariontes, mientras que las que requieren NAD^+ se encuentra exclusivamente en bacterias. Las ligasas ATP-dependientes tienen un tamaño de entre 30 a 100 kDa (Doherty, et al., 2000).

Las ADN ligasas catalizan la síntesis de enlaces fosfodiéster por medio de la esterificación del grupo fosfato en 5' al grupo hidroxilo en 3'. El mecanismo de reacción puede explicarse con tres pasos catalíticos. El primer paso involucra la activación de la ligasa a través de la formación de un intermediario enzima-AMP. En el segundo paso la molécula de AMP se transfiere de la ligasa al grupo 5' fosfato de la hebra rota. La catálisis finaliza con la pérdida del AMP (Doherty, et al., 2000).

La ligasa utilizada se debe escoger en función del objetivo buscado, así la ligasa que proviene de *Escherichia coli* solo puede ligar cadenas con extremos cohesivos, pero la ligasa vírica T4 puede unir también extremos romos (Doherty, et al., 2000). Así, la ligasa mas usada es la T4 que se obtiene de células *E.coli* infectadas con el bacteriófago T4. Esta enzima esta involucrada en la replicación del fago y esta codificada por el gen T4 (Brown, 2007).

Para que la ligación sea efectiva las hebras que han de ser unidas, deben alinearse correctamente (Singer, et al., 1993). La ligasa solo une covalentemente a los fragmentos que se encuentran alineados, no puede unir fragmentos que se encuentran sin asociar en la mezcla

de reacción (Brown, 2007). Segmentos de ADN con extremos cohesivos compatibles tienden a estar juntos, por lo tanto la ADN ligasa los unirá eficientemente. En cambio, los fragmentos con extremos romos se encuentran dispersos en la mezcla de reacción, por lo tanto la ligación de este tipo de fragmentos es menos eficiente y requiere alta concentración tanto de enzima como de ADN (Clark, 2005).

Para la ligación de fragmentos de ADN no es necesario que sean producidos por la misma enzima de restricción. Muchas enzimas de restricción producen extremos compatibles, es decir con bases que se pueden complementar, y ligar (Primrose, et al., 2006). Por ejemplo las enzimas Sau3AI y BamHI (Fig. 5).



Fig. 5. Sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción Sau3AI y BamHI. Estas enzimas producen extremos complementarios que se pueden ligar por la acción de la ligasa T4.

3. Vectores

Un vector es un vehículo genético para transportar y replicar ADN externo. Los vectores son también moléculas de ADN con capacidad de replicación autónoma de modo que una vez introducido en un organismo huésped el ADN recombinante se puede multiplicar, propagar y eventualmente expresar (Snyder, et al., 2003).

Un vector tiene tres componentes esenciales (Fig. 6):

1) Origen de replicación (ORI). Es una secuencia específica de ADN de 50-100 pares de bases (pb) necesaria para la replicación del vector. Las enzimas de las células huésped replican el vector, iniciando por el ORI y continúa alrededor de él. Por lo tanto cualquier secuencia de ADN insertado en el vector se replicara (Lodish, et al., 2004).

2) Genes marcadores. Producen fenotipos que pueden seleccionarse fácilmente, para distinguir a las células que contienen el vector. El gen marcador más usado es el que confiere resistencia a algún antibiótico. De esta forma al sembrar las células en un medio con el antibiótico adecuado, solo crecen las que contienen el vector (Russell, 2000). Además de un segundo gen marcador que permite diferenciar entre un vector recombinante y uno no recombinante (Twyman, 1998).

3) Sitio múltiple de restricción (polylinker). Es un segmento corto de ADN con muchos sitios de restricción diferentes, cada uno de ellos único para el vector. En algunas ocasiones este sitio forma parte del marco abierto de lectura (ORF) de un gen responsable de alguna característica fenotípica (segundo gen marcador). Por esto resulta sencillo de confirmar si tras el corte y ligado, se ha insertado efectivamente un fragmento de ADN, ya que la inclusión de este interrumpe la secuencia del vector, lo cual genera la pérdida de una funcionalidad del gen mediante inactivación por inserción (www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte2_cap3.pdf).

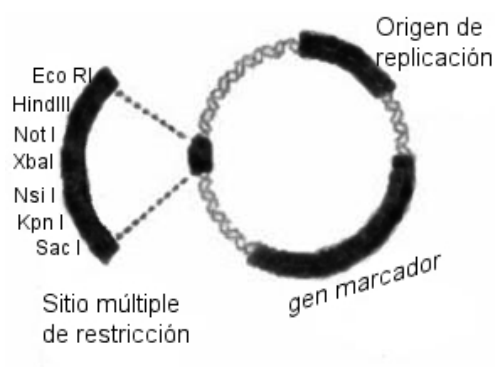


Fig. 6. Esquema general de los componentes de un vector de clonación

Los vectores pueden clasificarse en plásmidos, bacteriófagos (fagos), cósmidos, fagémidos y cromosomas artificiales.

Los plásmidos son moléculas de ADN circular extracromosómicas, de doble cadena, presentes en las bacterias y algunas células eucariotas en relación simbiótica o parasitaria (Lodish, et al., 2004). El papel de estos vectores y su origen en la célula es incierto, pero se sabe que son importantes para la sobrevivencia de la bacteria bajo condiciones adversas (Thomas, 2003).

Los plásmidos presentes de forma natural en la célula tienen características por las cuales se usan como vectores. Son de tamaño pequeño lo que permite mayor facilidad de aislamiento y manipulación. Son circulares lo que hace que el ADN sea más estable durante su purificación (Snyder et al., 2003). Se replican al mismo tiempo, pero de forma independiente al ADN cromosómico, en la célula bacteriana produciendo muchas copias.

Los genes de resistencia a los antibióticos funcionan como marcadores seleccionables que facilitan la detección y selección de los clones que los contienen. Los plásmidos usados en biología molecular, son derivados de estos plásmidos naturales, que se han modificado para usarse en la tecnología del ADN recombinante y son capaces de replicarse en células de *E. coli* (Watson, et al., 2004, Russell, 2000).

a. pZErO-2

El pZErO-2 es un plásmido con un peso aproximado de 3300 pb. Tiene dos genes marcadores. El primero es el que le confiere resistencia a kanamicina, para su selección en *E. coli*. El segundo es el gen letal *ccdB* localizado en el sitio múltiple de restricción fusionado con el gen *LacZ*. Este gen codifica para dos proteínas que funcionan, una como toxina y otra como "antitoxina". La proteína tóxica mata a la célula alterando a la ADN girasa provocando rupturas en la doble cadena (Snyder, et al., 2003). Sin embargo la inserción de un fragmento de ADN interrumpe la expresión del complejo *ccdB-LacZ* permitiendo el crecimiento únicamente de recombinantes positivos, las células que no contienen el vector recombinante mueren por la acción de la proteína tóxica. La eficiencia de clonación en este vector es muy alta (90%), sin la necesidad de defosfatarse el vector o enriquecer el medio con X-Gal o IPTG (Fig. 7) (Invitrogen, technical manual, N.K2600-01).

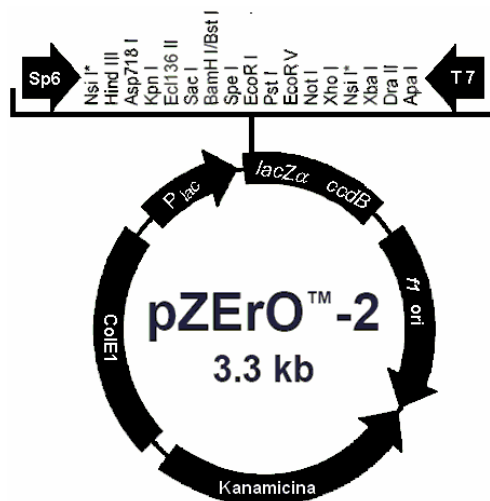


Fig. 7. Mapa estructural del vector pZErO-2. El gen *ccdB* está fusionado al gen *lacZ*. El gen *ccdB* que codifica para la proteína tóxica. Además se observa el gen que le confiere resistencia a kanamicina, el origen de replicación y el sitio múltiple de restricción.

b. pBluescript

El pBluescript es un fagémido que contiene dos cadenas circulares de aproximadamente 2961 pb. Los fagémidos son vectores artificiales híbridos que permiten la replicación de ADN de doble cadena. Además de poder recuperar ADN de cadena sencilla, al contar con un origen de replicación M13 (Étienne, 2001).

Este vector tiene dos genes marcadores. El primero le confiere resistencia a ampicilina para su selección en *E. coli*. El segundo gen, sirve para identificar los plásmidos recombinantes, es un fragmento del gen *lacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa. Se encuentra fusionado al sitio múltiple de restricción (Fig.8) (Étienne, 2001, Stratagene, instruction manual N. 212205).

La enzima β -galactosidasa transforma la lactosa en glucosa y galactosa. Esta enzima se puede usar como marcador. En presencia del inductor IPTG, la β -galactosidasa transforma al análogo del sustrato, X-Gal, de una sustancia incolora a una de color azul. Para que la enzima pueda expresarse, se debe tener un α -complementación. La célula huésped contiene sólo un fragmento de la β -galactosidasa, pero no es funcional, mientras el vector codifica un fragmento diferente de la enzima. Después de la transformación del vector ocurre la complementación, produciendo una β -galactosidasa funcional. Así, en un medio enriquecido con IPTG y X-Gal, la

β -galactosidasa convierte al X-gal, provocando que las colonias crezcan de color azul. Sin embargo, cuando un inserto de ADN se clona, el gen *lacZ* se interrumpe y no existen la α -complementación y por lo tanto no se tiene la β -galactosidasa funcional que pueda transformar la molécula de X-Gal (Karcher, 1995, Strachan, et al., 1999).

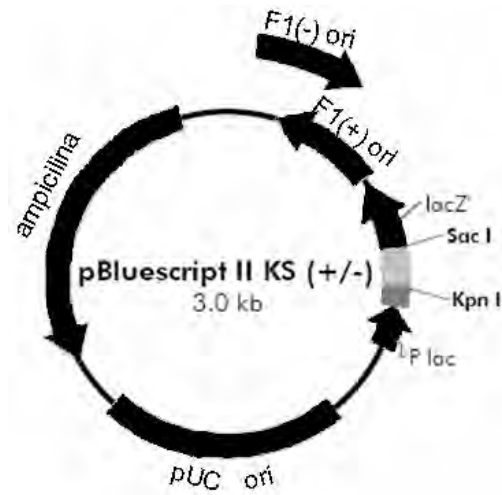


Fig. 8. Mapa estructural del fagémido pBluescript

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La nitrilasa de *R. pyridinovorans* presenta una especificidad amplia, ya que convierte eficientemente sustratos alifáticos (valeronitrilo) y aromáticos (benzonitrilo). En ensayos de biotransformación con extractos parcialmente purificados o con células enteras, se comprobaron niveles de conversión para ambos nitrilos que se aproximan al rendimiento estequiométrico. La mayoría de las nitrilasas que a la fecha se han aislado y purificado son específicas para un solo tipo de sustrato, o alifático o aromático; esto señala a la nitrilasa de *R. pyridinovorans* como una enzima particularmente interesante como modelo de estudio. El gen *nitA* no se expresa de manera constitutiva y su inducción se logra en presencia de valeronitrilo y benzonitrilo, sustratos de la enzima. La generación de una biblioteca al azar de ADN total de *R. pyridinovorans* nos permitirá clonar al gen *nitA* y explorar las regiones reguladoras y codificadoras contiguas al gen *nitA*. Además la clonación, purificación y caracterización cinética y estructural de esta nitrilasa nos permitirá obtener un catalizador eficiente en la síntesis regioselectiva de ácidos carboxílicos.

III. OBJETIVOS

Objetivo General: Construir una biblioteca genómica mediante la clonación de fragmentos de 5000 pb obtenidos a partir de la digestión parcial del ADN total de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B.

Objetivos Particulares:

1. Obtener el ADN total de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B con un alto grado de pureza mediante extracciones con fenol-cloroformo.
2. Determinar las condiciones óptimas de digestión parcial del ADN total para obtener fragmentos de 5000 pb mediante cinéticas de digestión.
3. Preparar células competentes con una eficiencia mayor a 1×10^7 UFC/ μ g ADN, sensibilizando las células con glicerol y cloruro de calcio.
4. Encontrar la relación molar inserto:vector que produzca clones recombinantes, mediante ensayos de ligación y transformación.
5. Selección e identificación de clones mediante análisis con enzimas de restricción.

IV. HIPÓTESIS

Si se construye una biblioteca de clonas constituidas por fragmentos de ADN de 5000 pb, entonces se dispondrá de una genoteca completa de *Rodococcus pyridinovorans* que permitirá el estudio directo del gen *nitA* y de sus regiones reguladoras y contiguas.

V. DISEÑO EXPERIMENTAL

A. Diagrama de flujo

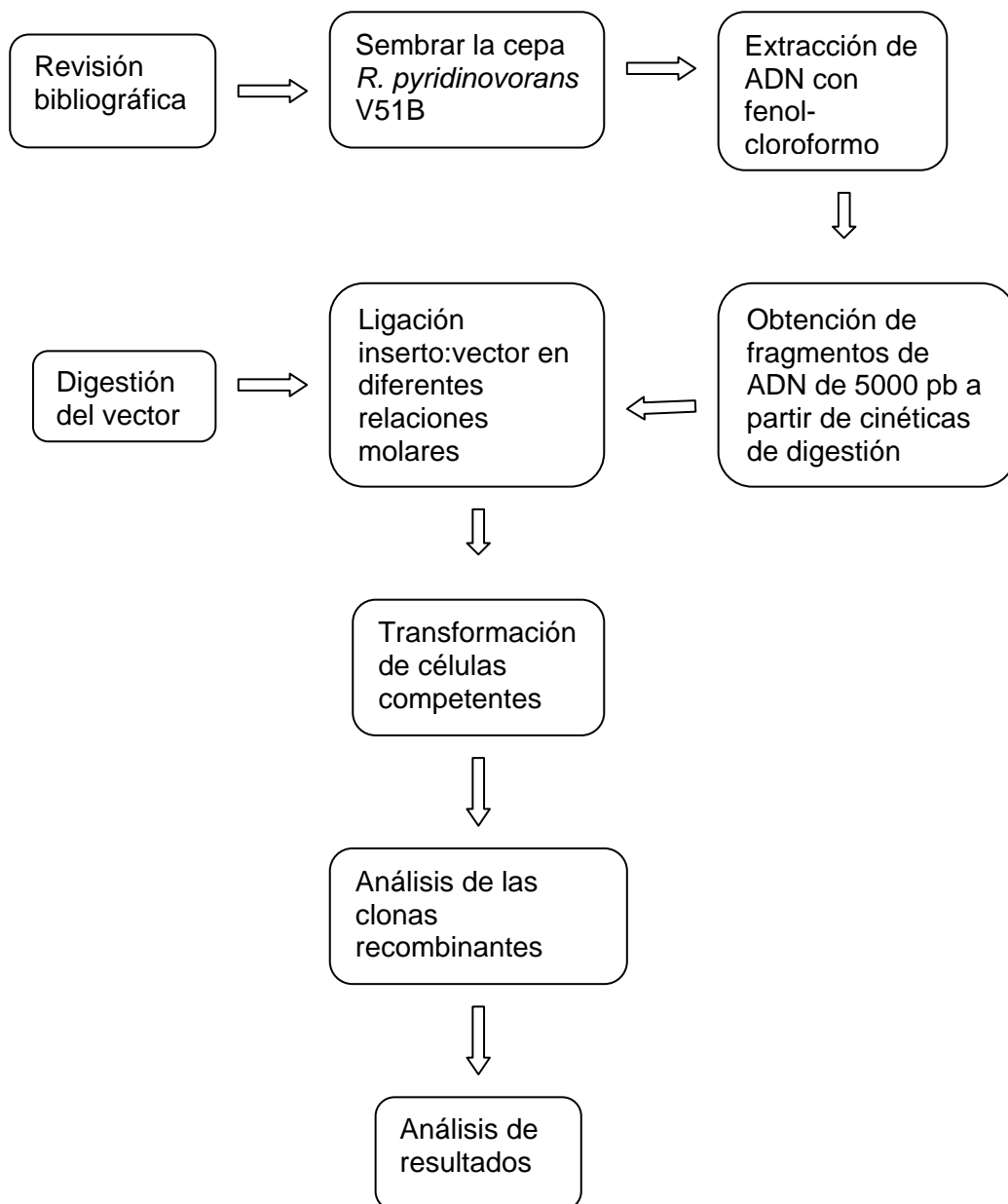


Fig. 9. Diagrama de la metodología usada para la construcción de la biblioteca genómica de *R. pyridinovorans*

B. Material

1. Soluciones y amortiguadores

Medio LB líquido y sólido (Luria- Bertani): 1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.05% NaCl y 1.5% de agar para el medio sólido

Medio SOC: 2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glucosa

X-Gal (5- bromo-4-cloro-3-indol-beta-D-galactopiranosido): 50mg/mL

IPTG (isopropilo-beta-D-galactopiranosido): 100 mM

Amortiguador de rompimiento TE: Tris 10 mM, EDTA 0.2 mM, pH 8

Amortiguador con RNAsa

Amortiguador TAE: Tris base 242 g, ácido acético glacial 57.1 mL, EDTA 18.6 g, pH 7.5

Amortiguador 2 (10X: 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 10 mM DTT, pH 7.9)

Amortiguador 4 (10X: 200 mM Tris-acetato, 100 mM acetato de magnesio, 500mM acetato de potasio, 10 mM DTT pH 7.9)

Amortiguador fosfatasa antártica: (Bis-tris-propano-HCl, MgCl₂ ZnCl₂, pH 6)

Amortiguador de ligación (10X: 50 mM Tris-HCL, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, pH 7.5)

BSA (albúmina sérica bovina): 100 X

SDS (Dodecil sulfato de amonio): 10%

CTAB (Bromuro de cetil-trietil amonio): 10% en NaOH 0.7 mM

CaCl₂ 0.1 M

CaCl₂ 0.1 M en glicerol al 20%

MgCl₂ 25 mM

MgSO₄ 10 mM

Glicerol 10%

Solución de carga (glicerol 30%, azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%)

Fenol saturado pH 8

Cloroformo

Etanol al 70% y 80%

Isopropanol

Bromuro de etidio

Marcador de peso molecular 1 Kb plus 50ng/μl

Kit QIAquick Gel Extraction, Kit QIA prep Spin Miniprep (QUIAGEN™)

Ampicilina: 1g /1 mL de agua

Kanamicina: 25 mg/1 mL agua

dNTPs (dinucleótidos trifosfato) :2.5 mM

Oligonucleótidos universales M13:10 pmol

Fw: GTA AAA CGA CGG CCA GT

Rw: CAT GGT CAT AGC TGT TTC C

Oligonucleótidos del gen nitA: 10 pmol

Fw: ATG GTC GAA TAC ACA AAC ACA

Rw: TCA GAG GGT GGC TGT CGC CCG

2. Enzimas y material biológico

Ligasa T4

Taq polimerasa

Fosfatasa antártica

Enzimas de restricción Sau3AI, BamHI, XbaI, HindIII, EcoRV, EcoRI

Vector de clonación pZErO-2 (Invitrogen™)

Vector de clonación pBluescript SK(+)

Vector de clonación pET-24a+

Escherichia coli TOP10 genotipo: F⁻mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG

Escherichia coli XL1 Blue genotipo: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 sup E44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15Tn10 (Tet^r)]

Cepa *Rhodococcus pyridinovorans* V51B

3. Equipo e instrumentos

Matraz Erlenmeyer 1000 mL, 500 mL, 250 mL, 20 mL

Vasos de precipitados 1000 mL, 500 mL, 250 mL, 100 mL

Probeta 40000 mL, 1000 mL, 500 mL, 250 mL 100 mL, 50 mL, 10 mL

Tubos eppendorf 1.5 mL, 0.6 mL
Cámara de electroforesis
Celdas de electroporación 0.2 cm Biorad
Electroporador Gen Pulser II Biorad
Centrifuga Vant J-25 I Beckman
Rotor y camisas JLA 10.500 Beckman™
Centrifuga Hettich Universal 30 RF
Centrifuga 5417 R Eppendorf™
Speed Vac SC110 Savat™
Transiluminador de luz ultravioleta
pHmetro Beckman™

C. Métodos

1. Extracción del ADN total de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B

En 10 mL de medio LB sin antibiótico se creció una colonia fresca de *Rhodococcus pyridinovorans*, toda la noche a 37°C en agitación constante. Las células se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm a 4°C. El botón se resuspendió en 200 µL de amortiguador TE, se agregó lisozima (10 mgmL⁻¹) y se incubó a 37°C durante una hora con agitación esporádica y suave. Luego de este tiempo se agregaron 200 µL de SDS al 10% y se incubó a 50°C por 15 minutos. Después se adicionaron 100 µL de CTAB/NaCl y se incubó a 50°C por una hora más.

El ADN se purificó mediante extracciones con fenol-cloroformo, primero 500 µL de fenol, seguido de dos extracciones 1:1 de fenol cloroformo y finalmente 500µL de cloroformo. El ADN se precipitó con 500 µL de isopropanol, mezclando suavemente y se dejó en hielo durante una hora. El ADN precipitado se recolectó por centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos. El botón de ADN obtenido, se lavó con etanol frío al 70% y se resuspendió en 50 µL de agua estéril, se etiquetó y congeló.

La pureza de la muestra se verificó por gel de agarosa utilizando como estándar el marcador de peso 1kb Plus. La concentración del ADN puro se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm, utilizando el coeficiente de extinción específico de 0.02 M⁻¹cm⁻¹

2. Preparación de células competentes

Para el proceso de clonación se requiere que el vector se introduzca a una célula hospedadora. El vector es capaz de replicarse por si solo, pero el proceso depende de las funciones de replicación proporcionadas por la célula hospedadora. Estas células deben proporcionar las funciones necesarias y compatibles para la replicación del ADN del vector. No debe contener elementos que inhiban la replicación del plásmido o que interfieran en las técnicas de selección. Debe evitarse el uso de células que posean sistemas de restricción activos. Así como los genes *dam* y *dcm* metiltransferasa normales, debido a que tras la replicación del ADN recombinante se crearían sitios resistentes a la acción de enzimas de restricción de uso común en el laboratorio (Strachan, et al., 1999). En este trabajo se utilizaron células de *E. coli* de la cepa TOP 10 para transformarse con el vector pZErO-2 y de la cepa XL1 Blue para el vector pBluescript. En ambos casos se prepararon células competentes para transformar por choque térmico y electroporación.

a. Células TOP 10

Se realizó un precultivo con una cepa fresca de células TOP 10 en 10 mL de medio LB sin antibiótico, incubando a 37°C con agitación constante toda la noche. Las células se cosecharon y resuspendieron. Se inoculó un litro de medio LB, sin antibiótico, con las células resuspendidas. Este cultivo se incubó a 37°C y agitación constante. Se siguió el crecimiento del cultivo midiendo el cambio en la densidad óptica ($D.O_{600}$). Cuando se alcanzó una $D.O_{600}$ de 0.4 -0.6, el cultivo se retiró de incubación y se colocó a 4°C.

El cultivo se dividió en dos partes, cada una se centrifugó a 5000 rpm, 4° C, 10 minutos para cosechar las células. Para las células calcio competentes el botón celular se resuspendió con 250 mL de $CaCl_2$ 100 mM y se dejó reposar en hielo durante 20 minutos. Después se centrifugó a 5000 rpm, 4°C durante 10 minutos. El botón se resuspendió en 2 mL de $CaCl_2$ 100 mM/glicerol al 20% y se tomaron alícuotas de 50 μ l para congelarlas en hielo seco y almacenarlas a -70°C.

La otra mitad del cultivo se usó para preparar las células electrocompetentes. El botón se resuspendió en 250 mL de glicerol al 10% y se centrifugó a 5000 rpm, 4°C, 10 minutos, se retiró el sobrenadante y repitió una vez más. El botón final se resuspendió en glicerol al 10%, se tomaron alícuotas (50 μ L) que se congelaron en hielo seco y almacenaron a -70°C.

b. Células XL1 Blue

Se realizó un precultivo con una cepa fresca de células XL1 Blue en 10 mL de medio LB enriquecido con 12.5 μ g/mL⁻¹ de tetraciclina, incubando a 37°C y agitación constante toda la noche. Las células se cosecharon y se resuspendieron. Se inocularon 500 mL de medio LB, con la misma concentración de antibiótico, con las células resuspendidas. Este cultivo se incubó a 37°C y agitación constante. Se siguió el crecimiento del cultivo midiendo la densidad óptica ($D.O_{600}$) en un espectrofotómetro. Cuando se alcanzó una $D.O_{600}$ de 0.4 -0.6, el cultivo se sacó de incubación y colocó a 4°C. El cultivo se centrifugó a 5000 rpm, 4°C durante 10 min. Para obtener las células electro-competentes se realizaron dos lavados con glicerol al 10%. El botón resultante se resuspendió en glicerol al 10%, se formaron alícuotas (50 μ L) y se almacenaron a -70°C.

Para la preparación de las células calcio-competentes se realizó un precultivo de 3 mL de LB enriquecido con 12.5 μ g/mL de tetraciclina, incubando a 30°C con agitación constante. Se inició un cultivo de 30 mL de medio LB, enriquecido con 12.5 μ g/mL de tetraciclina, con 300 μ L del precultivo e incubó a 30°C con agitación constante. Se siguió el crecimiento del cultivo midiendo la densidad óptica ($D.O_{600}$) en un espectrofotómetro. Cuando se alcanzó una $D.O_{600}$ de 0.4 -0.5, el cultivo se sacó de incubación y colocó a 4°C.

Las células se cosecharon a 6000 rpm 10 minutos a 4°C y se resuspendieron en 10 mL de CaCl₂ 50 mM frío. Para después dejarlas reposar 10 min en hielo. Se centrifugaron a 6000 rpm, 10 minutos, 4°C. El botón se resuspendió en 2 mL de CaCl₂ frío. Como estas células no están en un medio con glicerol, no se pueden almacenar por lo que se transforman el mismo día en el que se preparan.

3. Construcción de la biblioteca genómica

Los protocolos para la digestión de ADN, del vector, la ligación y la transformación se realizaron siempre de forma continua para obtener las condiciones óptimas para cada proceso.

Para generar una biblioteca genómica de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B con el 99.9% de probabilidad de tener representado la totalidad del genoma, se requieren fragmentos de ADN de aproximadamente 5000 pb, los cuales se pueden ligar eficientemente en plásmidos. Para obtener los fragmentos del tamaño deseado se debe digerir parcialmente el ADN (Champe, et al., 2005). Las condiciones óptimas de digestión parcial de ADN se determinaron por medio de cinéticas de digestión a diferentes concentraciones. En la mezcla de reacción se colocaron:

ADN	2.5 a 28.0 μ g
Amortiguador 4 (10X)	1/10
BSA (100X)	1/100
Sau3AI	0.4 U – 0.8 U

El volumen final de la mezcla se ajustó con agua a 20 μ L y se incubó a 37°C. A diferentes tiempos se tomaron alícuotas de 4 μ L, inactivando la enzima por calentamiento durante 10 minutos en agua hirviendo. Estas muestras se corrieron en geles de agarosa al 1%, en amortiguador TAE 1X para determinar el tamaño de los fragmentos generados. Cuando se obtuvieron las condiciones deseadas la banda de aprox. 5000 pb se cortó directo del gel y se purificó con el Kit QIA prep Spin. Al finalizar el proceso de purificación se corrió otro gel de agarosa para comprobar el peso y la concentración de los fragmentos purificados.

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de digestión se procedió a realizar las digestiones del ADN cromosómico y del vector de forma concertada. Como la digestión parcial de ADN total de *R. pyridinovorans* se llevó a cabo con la enzima Sau3AI, se seleccionó la enzima BamHI para digerir el vector. Con estas enzimas se obtienen extremos cohesivos compatibles que se pueden ligar con la enzima T4 ADN ligasa.

La digestión del vector pZErO-2 se llevó a cabo en una mezcla de reacción. En la cual se colocó:

Vector pZErO-2	1 µg
Amortiguador 2 (10X)	1/10
BSA (100X)	1/100
BamH1	10 U

La mezcla se incubó a 37°C siguiendo el proceso de digestión a través de electroforesis en gel de agarosa. Cuando la digestión del vector fue completa la enzima se inactivó con fenol-cloroformo. El vector se precipitó con acetato de sodio 3M y etanol al 80%.

Para poner la reacción de ligación se debe calcular la relación molar (inserto:vector) en la que se debe poner el inserto y el vector. La ecuación que nos permite saber la cantidad de inserto que se necesita para cada relación es:

$$\text{ng inserto} = \frac{(\text{ng de vector})(\text{pb del inserto})(2)}{\text{pb del vector}}$$

En este caso es para la relación molar 2:1. Para las otras relaciones se sustituye el 2 por el número correspondiente. Las relaciones molares que se probaron fueron: 2:1, 3:1, 4:1 y 5:1

Tabla 1. Ligación de los fragmentos de ADN de *R. pyridinovorans* al vector de clonación pZErO-2

	2:1	3:1	4:1	5:1	Control positivo
Vector digerido	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng
Fragmentos de ADN	30 ng	45.5 ng	60.6 ng	75.9 ng	-
Insertos control	-	-	-	-	20 ng
Amortiguador de ligación	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
T4 DNA Ligasa	400 U	400 U	400 U	400 U	400 U

El control positivo de ligación se realizó con los insertos de extremos romos incluidos en el kit pZErO Background™/ Kan Cloning. Por lo tanto el vector se digirió con EcoRV. Para las ligaciones con fragmentos de ADN el vector se digirió con BamHI. Las reacciones de ligación se realizaron en un volumen total 20 µL, incubándose a 16° C toda la noche.

Las células Top 10 se transformaron con 2-4 μL de esta ligación. En celdas de 0.2 cm se colocaron 60 μL de células electro-competentes, mezclando las ligaciones, para aplicar un choque de 1.8 mV. Estas células se dejaron recuperar en medio LB durante una hora en agitación constante. Se sembraron 200 μL de las células en placas de LB sólido enriquecidas con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina. Se incubó a 37°C.

Con este vector de reciente aplicación no se lograron clonar los insertos de ADN generados, así que se optó por usar el vector pBluescript SK(+) (pBS). Este es un vector que se utiliza de forma eficiente en la obtención de genotecas a partir de bacterias.

Hay un tipo de vectores que cuando se linearizan con una sola enzima tienden a religarse, disminuyendo la eficiencia de la clonación ya que se obtiene un alto número de vectores no recombinantes. Para prevenir la religación este tipo de vectores se deben tratar con la enzima fosfatasa alcalina (Surzyncki, 2000). Esta enzima remueve grupos fosfato de los extremos 5' de la molécula de ADN. Dos fragmentos con extremos que tengan grupos fosfatos se pueden ligar. Un extremo con grupo fosfato se puede ligar a un extremo que haya sido defosfatado. Pero la ligación no puede llevarse a cabo entre dos extremos a los cuales se les ha retirado los grupos fosfato. De esta forma, al retirar los grupos fosfato de una molécula de ADN se previene la religación (Brown, 2000).

El vector pBS (+) se amplificó en células XL1 Blue y se purificó con el kit QIA prep Spin Miniprep. Con el vector pBS se realizaron controles de ligación. Para estos controles se sustituyeron los fragmentos de ADN cromosómico por el pET-24a+ ya que tiene un peso de 5310 pb y un sitio de restricción para BamHI. Entonces ambos vectores se digirieron con BamHI.

Tabla 2. Digestión de los vectores pBS SK(+) y pET24a+ con BamHI

	pBS SK(+)	pET-24a+
Vector	2 μg	4 μg
Amortiguador 2 (10X)	2 μL	4 μL
BSA 100x	0.2 μL	0.2 μL
BamH I	40 U	80 U

La digestión de los vectores se realizó en mezclas de reacción con volumen total de 20 μL para pBS SK(+) y 40 μL para pET-24a+. Ambos vectores se purificaron por fenol-cloroformo.

Cuando se logró la digestión completa del vector pBS SK(+), se dividió en dos tubos y uno de ellos se defosfató agregando 1 μ L del amortiguador para la fosfatasa antártica y 5 U de esta enzima (5 U/ μ g de vector digerido). Se incubó la mezcla durante 15 minutos. Después de este tiempo las enzimas se inactivaron con fenol-cloroformo. El vector se precipitó con acetato de sodio 3M y etanol al 80%. Se corrió un gel para comprobar la concentración de vector. Se colocó en hielo. La mezcla de digestión del vector pET-24a+ se corrió en un gel de agarosa al 1% para detener la reacción y posteriormente cortar la banda y extraer el vector con el Kit QIAquick Gel Extraction.

Los controles que se llevaron a cabo fueron:

1. pBS defosfatado con ligasa.
2. pBS defosfatado sin ligasa.
3. pBS sin defosfatar con ligasa.
4. pET-24a+ con ligasa.
5. Ligación pET-24a+:pBS defosfatado en diferentes proporciones

Tabla 3. Controles de ligación con pBS SK(+)

	1	2	3	4	2:1	3:1	5:1	8:1
pBS s/d	X	X	20 ng	X	X	X	X	X
pBS d	20 ng	20 ng	X	X	20 ng	20 ng	20 ng	20 ng
pET-24a+	X	X	X	20 ng	66 ng	100 ng	166 ng	266 ng
Amortiguador	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
T4 ligasa	0.5 μ l	X	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l

Las ligaciones se realizaron en un volumen total de 10 μ L y se incubó toda la noche a 16° C. Aquí pBS s/d = vector sin defosfatar, pBS d = vector defosfatado

Con estas ligaciones se transformaron células XL1 Blue calcio-competentes. Se mezclaron 200 μ L de células competentes con 5 μ L de las ligaciones, dejando en hielo por 30 minutos. Después se dio choque térmico en agua a 37°C por 3 minutos. Se añadió 1 mL de medio LB y se colocaron en la estufa a 30°C por 30 minutos. Estas células se centrifugaron (14000 rpm, 2 minutos) y se resuspendieron en 50 μ L de sulfato de magnesio 10 mM y se sembraron. El control 4 se sembró en cajas con 25 mg/mL de kanamicina. Los demás controles en cajas enriquecidas con tetraciclina (12.5 μ g/mL), ampicilina (100 μ g/mL), IPTG (1 mM) y X-Gal (80 μ g/mL).

Ya que se tuvieron estas condiciones se trabajó nuevamente con el ADN genómico de *R. pyridinovorans*. También se realizaron los controles antes mencionados. Así que se hicieron digestiones de los dos vectores y la digestión parcial de ADN.

Tabla 4. Digestión total de los vectores de clonación y parcial del ADN de *R. pyridinovorans*

	pBS SK(+)	pET-24a+	ADN genómico
Material a digerir	10 µg	7 µg	6.4 µg
Amortiguador 2 (10X)	8 µL	8 µL	
Amortiguador 4 (10X)			16 µL
BSA	0.8 µL	0.8 µL	1.6 µL
Sau3A			1.6 U
BamHI	100U	100 U	
Agua	36.2 µL	25.5 µL	54.4 µL

El vector pBS SK(+) se purificó con fenol-cloroformo, mientras que el pET-24a+ y el ADN genómico se purificaron con gel de agarosa al 1%. Para cortar la banda de 5000 pb se utilizó como marcador de peso el pET-24a+.

Se prepararon cuatro controles de ligación, además de las ligaciones del ADN con el vector, en proporciones 2:1 y 5:1. Los controles fueron: pBS defosfatado sin ligasa, pBS sin defosfatar con ligasa, pET con ligasa, pET:pBS en relación 2:1. Todos con 20 ng de vector pBS, en mezclas de reacción de 10 µL.

Tabla 5. Ligación de los fragmentos de ADN genómico y controles de la ligación

	Controles de la ligación				Ligación de ADN genómico	
	1	2	3	4	2:1	5:1
pBS s/d	X	20 ng	X	X	X	X
pBS d	20 ng	X	X	20 ng	20 ng	20 ng
pET24a+	X	X	20 ng	66 ng	X	X
Fragmentos de ADN	X	X	X	X	66 ng	166 ng
Amortiguador	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	0.5 µL	0.5 µL
T4 ligasa	X	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL

Control 1: pBS defosfatado sin ligasa, control 2: pBS sin defosfatar con ligasa, control 3: pET con ligasa, control 4: pET:pBS en relación 2:1. Los controles se realizaron en mezclas de 10 µl, mientras que las ligaciones de ADN genómico se realizaron en 5 µl.

Se transformaron células XL1-Blue electro-competentes con las ligaciones, en celdas de 0.1 cm, con 50 μ L de células, electroporando a 1.8 mV. Se dejó que las células se recuperaran en 1mL de medio SOC con agitación constante. Para los controles uno a cuatro se transformó con 1 μ L de cada ligación y se sembraron 100 μ L en cajas enriquecidas con tetraciclina (12.5 μ g/mL), ampicilina (100 μ g/mL), IPTG (1 mM) y X-Gal (80 μ g/mL), a excepción del control tres que se sembró en caja con kanamicina (25 mg/mL). En el caso de las ligaciones 2:1 y 5:1 se transformaron las células electro-competentes con los 5 μ L y se sembraron todas las muestras en cajas con tetraciclina (12.5 μ g/mL), ampicilina (100 μ g/mL), IPTG (1 mM) y X-Gal (80 μ g/mL). Como control positivo se transformaron 17 ng de vector pBS SK(+) superenrollado. Las cajas se incubaron 24 horas a 37°C.

4. Búsqueda en la biblioteca generada.

De las cajas en que se sembraron las células transformadas se seleccionaron las colonias blancas para resembrarse por estriado. Cada caja se dividió en seis partes iguales y etiquetó debidamente. Se incubaron a 37°C por 24 horas. Las colonias blancas resultantes se sembraron en medio líquido LB-ampicilina (100 μ g/mL) para poder aislar el vector recombinante.

Los vectores recombinantes se aislaron por miniprep con el kit QIA prep Spin Miniprep. Para analizar estos vectores recombinantes se realizaron digestiones sencillas y dobles, con el fin de extraer los fragmentos clonados en ellos. Las enzimas que se eligieron para estas digestiones fueron: XbaI, HindIII, y EcoRI (Fig. 10).

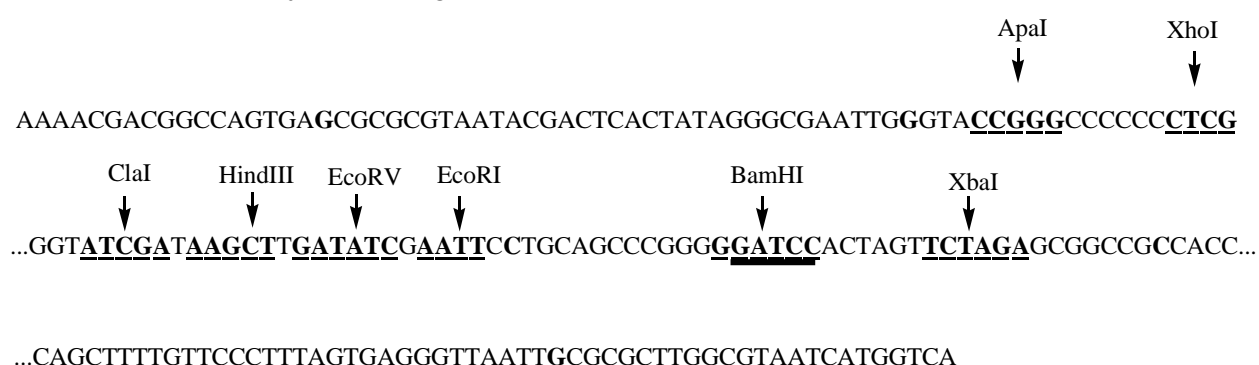


Figura 10. Sitio de clonación múltiple del vector pBluescript. Para analizar los insertos de ADN clonados se utilizaron las enzimas de restricción que están flanqueando el sitio BamHI. Se hicieron digestiones sencillas con cada una de las enzimas seguidas de dobles digestiones con HindIII y XbaI, de todos los vectores recombinantes obtenidos.

Para la técnica de PCR se utilizaron los oligonucleótidos universales M13 Forward (Tm: 55.9 °C) y Reverse (Tm: 50.8° C). Con 30 ciclos de: 2' 95°, 30" 52°, 40" 68°. También se realizaron reacciones de PCR con los oligonucleótidos, utilizados en la clonación del gen de la nitrilasa de *R. pyridinovorans*, Forward (Tm: 52.3° C) y Reverse (Tm: 66.4° C) (Leyva, 2008). Con 30 ciclos de: 2' 95°, 30" 50°, 90" 68°. Se realizaron mezclas de cinco vectores con una concentración final de 50 ng. Para cada mezcla de vectores se prepararon dos mezclas:

Tabla 6. Reacciones de PCR de los vectores recombinantes

	M13	NIT
Amortiguador Taq	5 µL	5 µL
dNTPs	250 µM	250 µM
Mg ²⁺	1.5 mM	1.5 mM
DNA	50 ng	50 ng
Taq polimersa	0.1 µL	0.1 µL
Fw	1 pmol	0.5 pmol
Rv	1 pmol	1 pmol

Se realizaron mezclas con un volumen total de 50 µL. El control se realizó colocando 50 ng de vector pBS SK(+)-super-enrollado. Los productos de PCR se corrieron geles de agarosa 1%.

VI. RESULTADOS

1. Extracción del ADN total de *Rhodococcus pyridinovorans* V51B

El primer paso en la purificación del ADN es la ruptura de las células. La mejor forma de romper las células y obtener ADN intacto, es por lisis química y enzimática. Los detergentes como el SDS ayudan a romper la pared celular y solubilizan los lípidos de la membrana celular. Sin embargo, es necesario un primer tratamiento con enzimas que degradan la pared celular, como la lisozima, para que la membrana celular este accesible a la acción de los detergentes (Malacinski, et al., 1998).

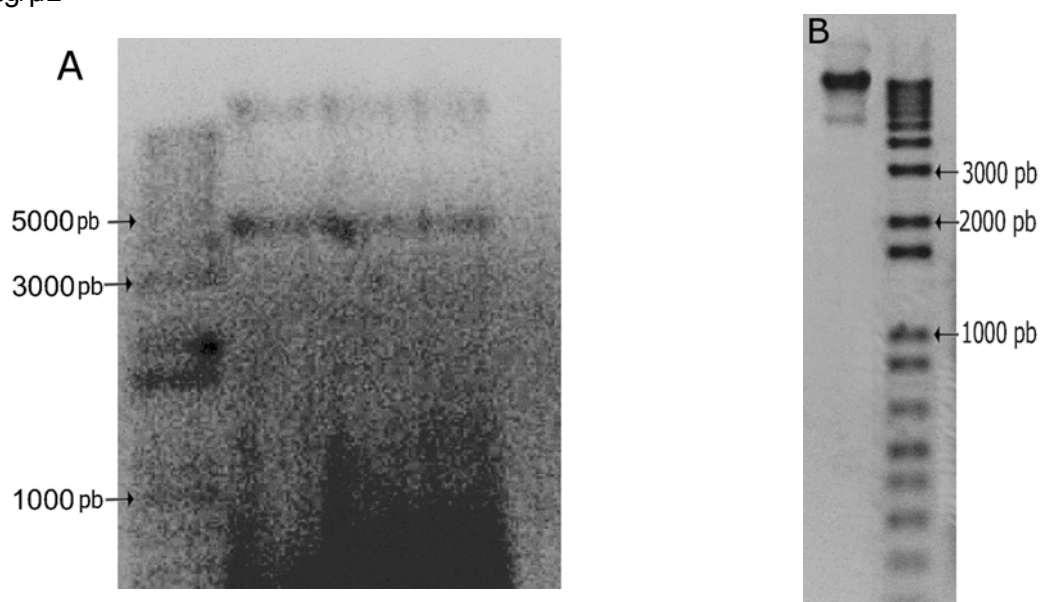
Para evitar la acción de nucleasas no específicas se adicionan inhibidores. El EDTA, es un potente inhibidor ya que forma complejos con el ión Mg^{2+} , que es un cofactor necesario para que actúen dichas enzimas. Los detergentes, además de solubilizar las membranas, son inhibidores de las nucleasas y actúan como agentes desnaturizantes de las proteínas. El CTAB es un detergente catiónico que solubiliza membranas y forma complejos CTAB:ADN, lo que facilita su posterior purificación. Para retirar el ARN de la muestra es necesaria la acción de la enzima ribonucleasa. Ésta degrada el ARN en pequeños oligonucleótidos, dejando intactas las moléculas de ADN (Surzynski, 2000).

El segundo paso en la purificación consiste en retirar las proteínas de la solución de ADN. Esto se logra por las diferencias de solubilidad entre los ácidos nucleicos y las proteínas. Los ácidos nucleicos son moléculas hidrofílicas, por lo que son altamente solubles en agua. Mientras que las proteínas al tener residuos aminoácido hidrofóbicos, tienden a ser más solubles en disolventes orgánicos. El disolvente más usado en la separación del ADN de proteínas es el fenol. En las extracciones se debe tener cuidado que el pH del fenol saturado sea de 8. Si el valor de pH es menor el ADN queda en la interfase fenol-agua, lo que provoca una disminución en el rendimiento de ADN (Clark, 2005).

Finalmente se tiene que concentrar el ADN con dos propósitos. El primero es obtener ADN de alto peso molecular y el segundo es remover nucleótidos, aminoácidos e impurezas de bajo peso molecular. Este paso se lleva a cabo por medio de la precipitación del ADN con alcoholes: etanol e isopropanol.

Los alcoholes disminuyen la solubilidad del ADN en agua haciendo que se precipite. Es recomendable el uso de isopropanol ya que con una menor cantidad de alcohol, se logra precipitar una mayor cantidad de ADN. Sin embargo, es difícil removerlo de la muestra por que es menos volátil. Así, lo mejor es precipitar el ADN con isopropanol seguido de varios lavados con etanol al 70% para retirar el excedente de isopropanol (Surzyncki, 2000, Clark, 2005).

Después de la primera extracción del ADN de *Rhodococcus pyridinovorans*, al determinar su pureza por electroforesis en gel de agarosa se observó que la muestra contenía un alto contenido de ARN. En la Fig. 11A se ve un barrido intenso a partir de 1000 pb. Para eliminar el contenido de ARN se agregó la enzima RNasa (10 μ g) y se incubó a 37°C durante una hora. En estas condiciones se obtuvo una muestra de ADN libre de ARN (Fig. 11B). Las concentraciones de las soluciones de ADN puro que se obtuvieron fueron de entre 0.3 a 5.6 μ g/ μ L



2. Preparación de células competentes

La eficiencia de las células competentes se determinó transformándolas con el vector sin digerir (ADN super-enrollado). En el caso de las células TOP 10, se transformaron con el vector pET-24a+ con resistencia a kanamicina. Las células XL1 Blue se transformaron con el vector pBS SK(+), que les confiere resistencia a ampicilina.

Las células electrocompetentes, tanto TOP10 como XL1 Blue, se prepararon con el método descrito previamente y en ambos casos, se obtuvo buena eficiencia. Sin embargo el método que se tenía establecido para la preparación de células calcio-competentes y que dio una buena eficiencia en el caso de las células TOP 10, no proporcionó buenos resultados para las células XL1-Blue. Así que se optó por un método alternativo, en el que las células al no resuspenderse en un medio con glicerol se transformaron inmediatamente después de prepararlas, obteniendo mejores resultados.

Tabla 7. Valores calculados para la eficiencia de las células competentes

	TOP 10	XL1 Blue	Intervalo (CFU/ μ g ADN)
Calciocompetentes	2.6×10^8	1.5×10^8	1×10^7 buenas
Electrocompetentes	4.5×10^8	6×10^8	1×10^8 muy buenas 1×10^9 excelentes

3. Construcción de la biblioteca genómica.

El primer paso en la construcción de la biblioteca fue digerir parcialmente el ADN hasta obtener fragmentos de 5000 pb. Las primeras condiciones probadas fueron con 2.5 μ g de ADN cromosómico, 0.4 U de enzima Sau3AI en un volumen final de 20 μ L y tiempos de 5, 10, 20, 30 y 60 minutos. Las muestras de esta cinética se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y se observó que desde los diez minutos de digestión se obtienen fragmentos menores a 5000 pb. En una nueva cinética se probaron tiempos de 1, 2, 3, 4 y 5 minutos. En el gel de esta cinética, se observó que a los cinco minutos de digestión parcial se obtuvo un barrido predominante en 5000 pb. Establecidas las condiciones el proceso se escaló (cinco veces el volumen de la mezcla) a fin de tener una alta concentración de fragmentos para ligar al vector. Del gel se cortó la banda de 5000 pb y se purificó. Al finalizar el proceso se corrió otro gel de agarosa para comprobar el peso y la concentración de los fragmentos purificados.

A pesar de la gran cantidad de ADN que se utilizó para generar los fragmentos, la concentración final de estos fue de 10 ng/ μ L. Para las posteriores digestiones se intentó obtener mayor concentración de fragmentos colocando una mayor cantidad de ADN total para digerir.

Entonces se incubaron 5.4 μg del ADN total con las mismas unidades de Sau3AI, y se realizaron nuevas cinéticas de digestión. El tiempo de digestión óptimo se mantuvo entre 3 y 5 minutos, en el cual se obtiene un barrido abundante en el intervalo de 1650 a 8000 pb (Fig. 12). Sin embargo la concentración de los fragmentos purificados a partir del gel fue de 10 a 30 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

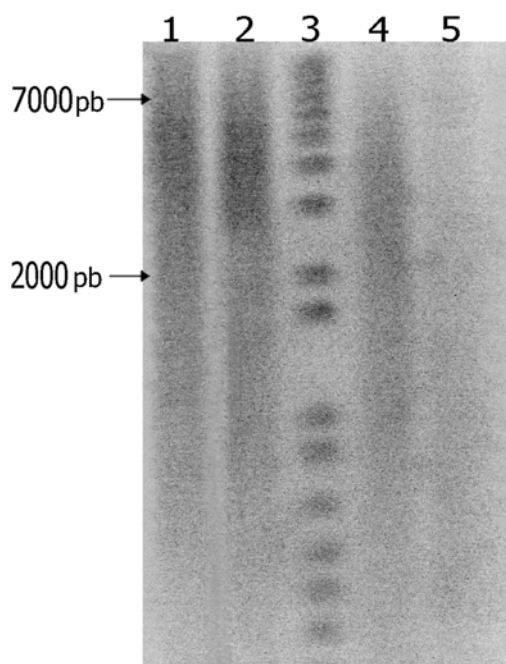


Fig. 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la digestión parcial de ADN (5.4 μg) con Sau3AI a diferentes tiempos de incubación. Carriles 1, 2, 4 y 5: 1, 5, 6 y 7 minutos. Carril 3: marcador molecular 1Kpb plus.

Como los fragmentos puros se obtenían a concentraciones bajas, se intentó digerir muestras de 28 μg , a partir de una solución de ADN muy concentrado. Sin embargo se tuvieron problemas de homogeneidad en la solución del ADN, ya que se formaron agregados viscosos. Al correr la electroforesis de esta digestión se puede observar (Fig. 13A) que la muestra incubada durante cinco minutos, se mantiene sin digerir ya que el ADN está agregado. Este problema se solucionó calentando la disolución de ADN a 60°C durante 15 minutos antes de digerirlo y pasándolo, varias veces, por una aguja de jeringa de 0.5mm de diámetro. De esta forma se obtuvo una muestra de ADN homogénea la cual se pudo digerir sin problemas. Los tiempos de digestión se recorrieron a 2 minutos (Fig. 13B), obteniendo fragmentos de aprox. 5000 pb, a una concentración de 30 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

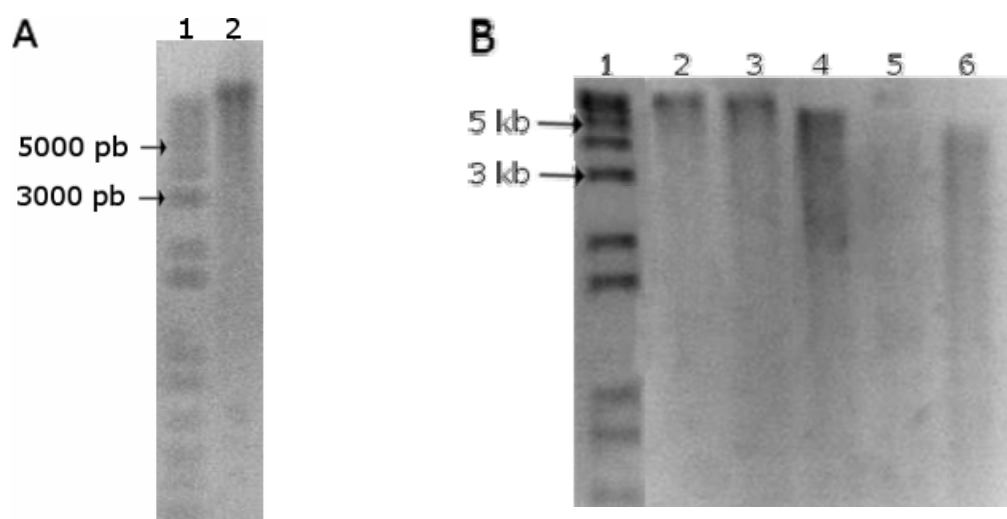


Fig. 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la digestión parcial del ADN (28 μ g) con Sau3AI a diferentes tiempos de incubación. En **A**, ADN total "agregado". Carril 1: marcador molecular 1 *Kb plus*. En **B**, ADN homogéneo y soluble. Carril 1: marcador molecular. Carril 2: 1 min. Carril 3: 1.5 minutos. Carril 4: 2 minutos. Carril 5: 3 minutos. Carril 5: 4 minutos. Carril 6: 5 minutos.

Inicialmente se planeó obtener la biblioteca genómica utilizando el vector pZErO-2, por las ventajas que éste ofrecía en la selección de colonias recombinantes. Sin embargo no se obtuvieron clones transformantes, aun con los insertos control que se proveen con el kit de clonación. Después de realizar las reacciones de ligación de los fragmentos de ADN con el vector pZErO-2, en relación molar 2:1 y 1:2, se corrió una electroforesis en gel de agarosa de las muestras (Fig. 14). En los carriles 2 y 3 se puede observar una banda con el peso esperado para los productos de las reacciones de ligación. Sin embargo, al transformar las células TOP 10 con estas ligaciones no se tuvo crecimiento de colonias en las cajas.

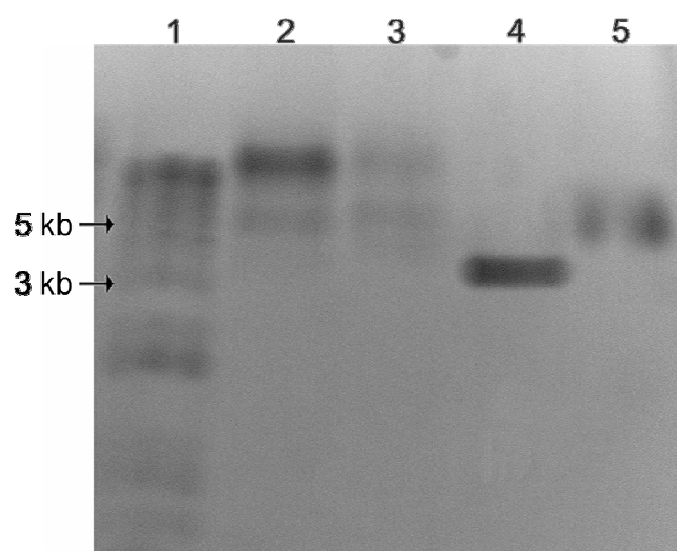


Fig. 14. Ligación de los fragmentos de ADN al vector de clonación pZErO-2. Carril 1: marcador molecular 1Kpb plus. Carril 2: ligación 2:1. Carril 3: ligación 1:2. Carril 4: pZErO-2 digerido con BamHI y carril 5: fragmentos de ADN.

Al no obtener clonas recombinantes con el vector pZErO-2 se empezó a trabajar con el vector pBluescript. Antes de clonar los fragmentos del ADN de *R. pyridinovorans* se realizaron varios controles de ligación, en los que se utilizó el vector pET-24a+ como inserto a clonar ya que su tamaño es de 5310 pb, similar al de los fragmentos del ADN que queremos clonar (Fig. 15).

Los controles que se llevaron a cabo fueron:

1. pBS SK(+) digerido y defosfatado incubado con la ligasa, como control de que la enzima fosfatasa antártica retiró eficientemente los grupos fosfato de los vectores. Se esperaba el mínimo crecimiento de colonias azules.
2. pBS SK(+) digerido y defosfatado sin ligasa. Que nos permitió saber si el vector era digerido completamente. En este control no se esperaba crecimiento de colonias.
3. pBS SK(+) digerido sin defosfatar con ligasa. Para calcular la eficiencia de la ligación ya que se esperaba recuperar el 90% de colonias azules.
4. pET-24a+ digerido e incubado con ligasa. Para calcular la eficiencia de la ligación, como el control anterior. Se esperaba crecimiento de colonias en placas LB suplementadas con kanamicina.
5. Ligación pET-24a+ y pBS defosfatado en proporciones: 2:1, 3:1, 5:1 y 8:1. En este control se esperaba obtener colonias blancas, es decir colonias recombinantes en mayor proporción a las colonias azules.

Estos controles se repitieron hasta que:

1. Se obtuvieron las condiciones óptimas para defosfatar el vector (control 1)
2. Se disminuyó el crecimiento de colonias azules debido a la digestión incompleta del vector (control 2)
3. Se obtuvo una eficiencia de la ligación del 50-70% (controles 3 y 4)
4. Se obtuvieron vectores recombinantes (control 5)

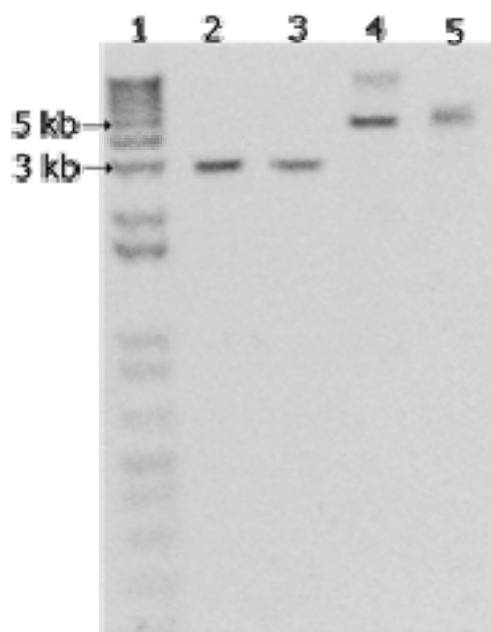


Fig. 15. Digestión de los vectores pBS SK(+) y pET-24a+ con BamHI. Carril 1: marcador molecular 1Kpb plus. Carril 2: pBS SK(+) sin defosfatar. Carril 3: pBS SK(+) defosfatado. Carril 4: pET-24a+. Carril 5: fragmentos 5000 pb del ADN de *R. pyridinovorans*.

Los resultados de los controles positivos son:

1. pBS defosfatado con ligasa: 17 colonias azules
2. pBS defosfatado sin ligasa: 58 colonias azules
3. pBS sin defosfatar con ligasa: 1240 azules
4. pET-24a+ con ligasa: 528 colonias resistentes a Kanamicina
5. Ligación pBS defosfatado con pET-24a+: se obtuvo crecimiento de colonias blancas solo en la relación molar 2:1
6. 10 ng de pBS super-enrollado: 6×10^8 CFU/ μ g ADN

De las clonas transformantes (control 5) se seleccionaron tres colonias para extraer los vectores recombinantes. El ADN de cada clona fue digerido con BamHI y se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Fig. 16 carriles 1, 3 y 6), donde se observan dos bandas, una en 3000 pb correspondiente al vector pBS SK(+) y otra en 5000 pb que corresponde al vector pET-24a+. Sin embargo dos clonas no mostraron el patrón de digestión esperado (Fig. 16 carriles 2 y 5).

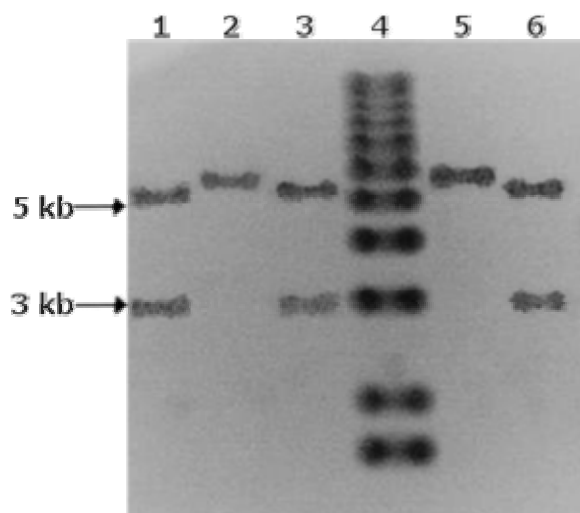


Fig. 16. Clonas transformantes de los controles de ligación. El ADN de cada clona se digirió con BamHI que da origen a dos fragmentos de 5000 pb (inserto) y 3000 pb (vector), carriles 1,3 y 6.

Sabiendo que los controles realizados nos permiten obtener vectores recombinantes se regresó a trabajar con la digestión parcial del ADN total de *Rhodococcus pyridinovorans*. Se realizó un primer intento, en el cual se pusieron a ligar los fragmentos obtenidos con 20 ng de vector pBS SK(+), en proporciones molares 2:1 y 5:1, además de los controles 1, 3, 4 y 5 antes mencionados. En las cajas donde se sembraron las células transformantes no se obtuvo crecimiento de ninguna colonia, aun en las de los controles.

Se realizó un segundo experimento, teniendo especial cuidado en lavar bien las soluciones de ambos vectores después de inactivar a las enzimas de restricción para así asegurarse de retirar todo el fenol que se utilizó para detener la reacción de digestión. Además de aumentar la cantidad de ADN genómico que se puso a digerir.

Se realizaron primero los controles: pBS SK(+) defosfatado sin ligasa, pBS SK(+) sin defosfatar con ligasa, pET-24a+:pBS en relación 2:1, todos con 20 ng de vector pBS. Los resultados de los controles realizados son:

Control	Resultado
pBS defosfatado con ligasa	1640 colonias azules
pBS defosfatado sin ligasa	1400 colonias azules
pBS no defosfatado con ligasa	6240 colonias azules
pET:pBS (2:1)	592 colonias blancas 1624 colonias azules

El número de colonias obtenidas en el control pBS SK(+) defosfatado sin ligasa, nos indica que la digestión del vector no fue completa. Sin embargo el vector se religó, como se observa en el resultado del control de pBS SK(+) no defosfatado con ligasa. Además de obtener un número suficiente de colonias blancas en el control de la ligación pET-24a+:pBS SK(+). Así que se realizó la digestión parcial del ADN de *R. pyridinovorans* para obtener los insertos de 5000 pb. La digestión parcial se llevó a cabo con 12 µg de ADN. Las bandas de 5000 pb se cortaron del gel, tomando como marcador de peso, el vector pET-24a+ digerido, para no dejar correr tanto la electroforesis y evitar tener una gran cantidad de agarosa en la banda a purificar. La concentración final de los fragmentos se estimó en 50 ng. La reacción de ligación se realizó incubando 1 µg de vector defosfatado y una cantidad de fragmentos que solo permitió alcanzar una relación molar 1:1 (inserto:vector)

Tabla. 8. Ligación de los fragmentos de ADN

pBS SK(+) defosfatado	1 µg
Insertos 5000 pb	1.6 µg
Amortiguador	4.2 µL
T4 ligasa	1120 U

El producto de esta ligación (46µL) se usó para transformar células XL1 Blue electrocompetentes (5 µL / 50 µL cel). Se añadió medio SOC (3.5 mL volumen final) y se dejaron recuperar por una hora a 37°C. Se sembraron un total de 29 cajas LB con tetraciclina, ampicilina, IPTG y X-Gal (120 µL de células por caja) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. En las cajas de este segundo experimento, como se esperaba se tuvo un gran número de colonias azules. Sin embargo se contaron las colonias blancas de cada caja, de las cuales crecieron 120 en total. Con el fin de aislar los plásmidos recombinantes, se resembraron estas colonias blancas, por estriado en cajas. De esta primer resiembra de clonas “transformantes” se obtuvieron en algunos casos colonias azules, en otras colonias blancas, en otros se tuvo crecimiento de mezclas de ambos tipos de colonias y por último, existieron casos en los que se obtuvieron colonias con un color blanquiazul muy claro. (Fig. 17). Se obtuvieron un total de 30 colonias blancas. Para el caso donde se observó crecimiento de colonias mezcladas, se seleccionaron las colonias blancas para resembrarlas. De esta segunda resiembra se volvió a tener crecimiento de los tres tipos mencionados. Con un total de 14 colonias blancas.

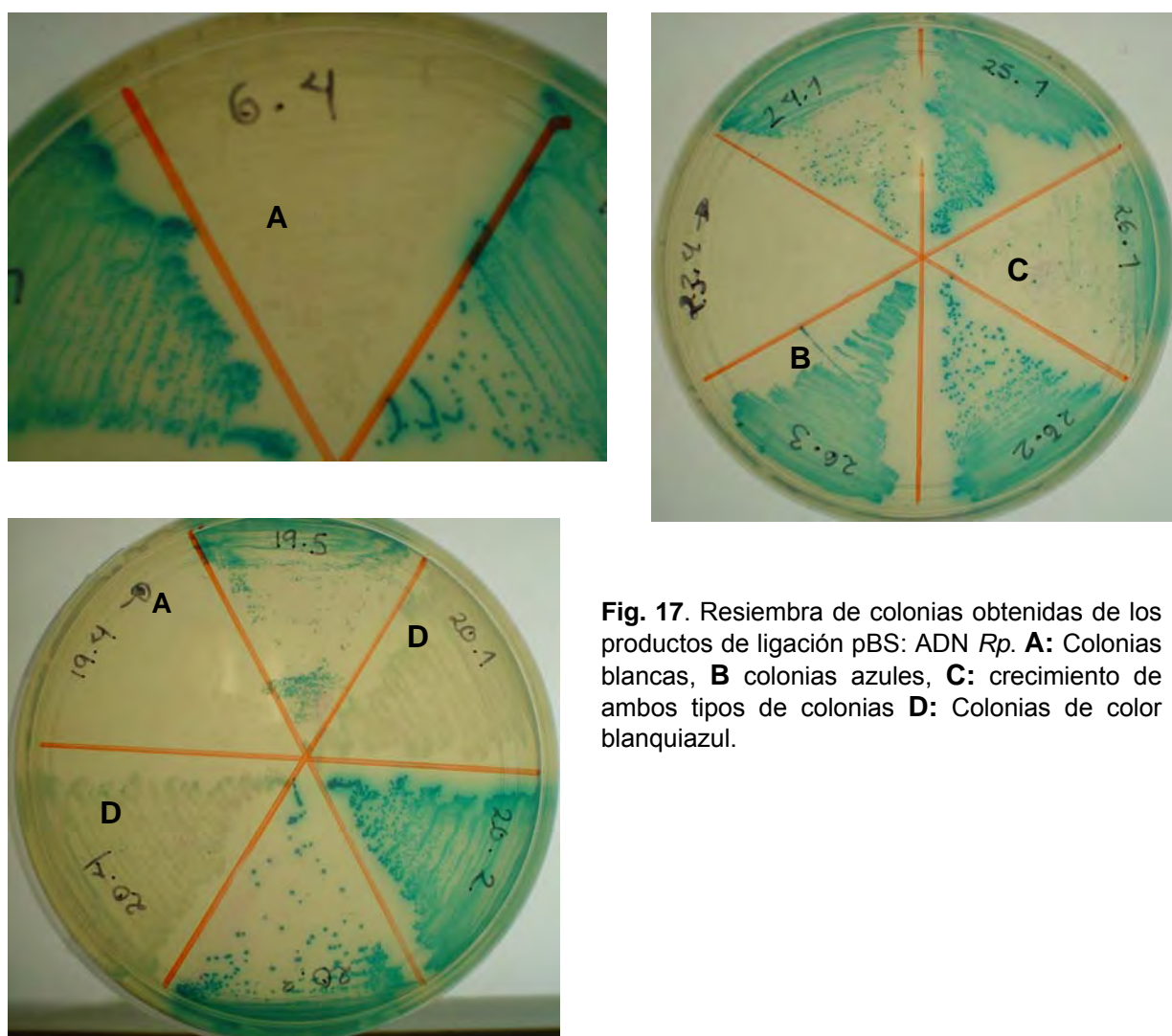


Fig. 17. Resiembra de colonias obtenidas de los productos de ligación pBS: ADN *Rp*. **A:** Colonias blancas, **B** colonias azules, **C:** crecimiento de ambos tipos de colonias **D:** Colonias de color blanquiazul.

4. Búsqueda de la biblioteca generada.

Después de aislar los vectores de las 44 colonias blancas obtenidas, en las dos resiembras, se analizó cada uno de los vectores por medio de digestiones con HindIII y XbaI, enzimas que tienen sitio de reconocimiento en el vector pBS SK(+) (Fig.18).

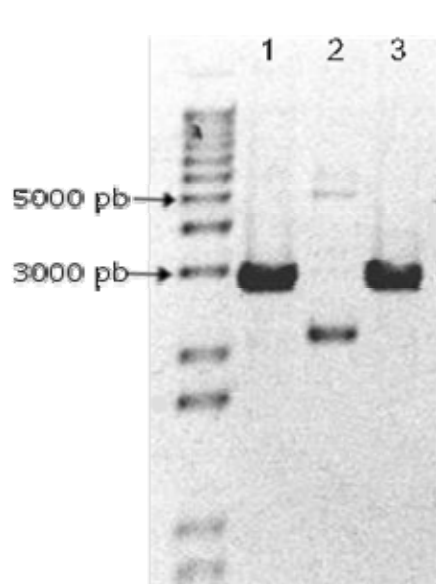


Fig. 18. Digestión del vector pBS. Carril 1: HindIII. Carril 2: vector sin digerir Carril 3: XbaI,

Las clonas transformantes se analizaron por medio de digestiones sencillas con HindIII y dobles digestiones con HindIII y XbaI. En la figura 19 se muestra el producto de la digestión sencilla y doble de 3 de las clonas recombinantes. El patrón electroforético esperado para una digestión sencilla sería una sola banda de más de 3000 pb, si el inserto no tiene sitio de restricción para alguna de estas enzimas. Para la doble digestión se esperaría una banda de 3000 pb correspondiente al vector y una o más bandas de inserto (≈ 5000 pb). Los productos de la digestión sencilla de la clona 1 dan una banda de ≈ 8000 pb y otra de mayor tamaño (Fig. 19A) posiblemente porque la digestión no fue total, sin embargo la doble digestión da como resultado dos bandas una de 5000 pb y otra en 600 pb, ninguna en el peso del vector (Fig. 19B). En el caso de la clona 2 se obtuvo por digestión sencilla dos bandas, una que corresponde al peso del vector (3000 pb) y una banda correspondiente al inserto de 5000 pb, que tendría un sitio de restricción para HindIII. En cambio para el caso de la clona 3 se observó una banda de 2000 pb, tamaño menor al esperado. Los resultados de la doble digestión muestran para la clona 2, una banda en el peso de vector y dos bandas más, una de aproximadamente 2500 pb y otra de 3500 pb. Lo que nos indicaría la presencia de un inserto de ADN de 6000 pb. La clona 3 da una banda correspondiente al peso del vector y una más en 4000 pb, indicando la presencia de un inserto de este peso. El resultado aparentemente esperado en dos de tres colonias analizadas nos llevó a hacer el análisis de todas las colonias restantes.

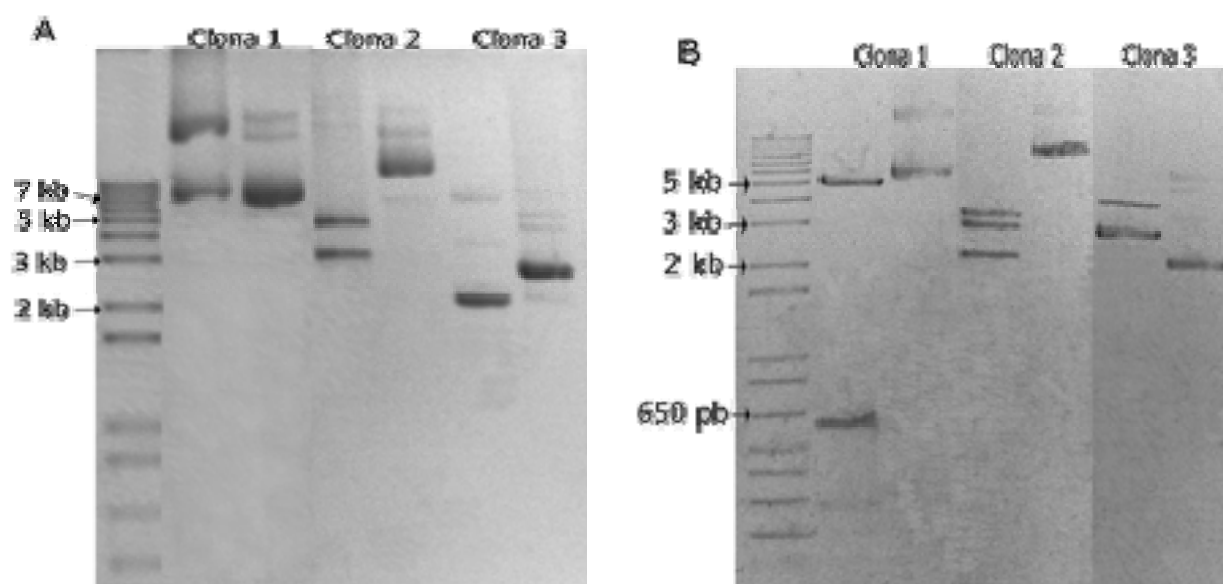


Fig.19. Digestión de las clonas recombinantes 1, 2 y 3, en **A** se observan las digestiones sencillas con HindIII y en **B** las dobles con HindIII y XbaI. En cada caso, se colocó la muestra digerida seguida del vector sin digerir.

Los vectores recombinantes siguientes se analizaron de manera simultánea por digestiones sencillas y dobles con HindIII y XbaI. En la figura 20 se observa que los productos de digestión de las diferentes clonas (4, 5, 6 y 7) no reflejan el patrón de bandas esperado, ya que al menos para las digestiones dobles, debiera observarse una banda de 3000 pb correspondiente al vector pBS SK(+). En las clonas 4 y 6, (Fig. 20 A y C) no hay corte por HindIII y si por XbaI, por lo tanto, las dobles digestiones de estas clonas son el resultado de la acción de esta última enzima y no se libera ningún inserto. En la clona 7 se observa el corte por HindIII y no por XbaI (Fig. 20D). La doble digestión de una de las cuatro clonas (clona 5) da 2 bandas de 3000 y 1300 pb, lo que nos indicaría la presencia de un inserto, de menor tamaño al esperado (Fig. 20B). El hecho de encontrar vectores resistentes a HindIII y XbaI nos llevó a realizar nuevas digestiones ahora con la enzima EcoRI. El patrón fue el mismo que para HindIII. Para el caso de las clonas 4 y 6 (Fig. 20 A y C) se observa que la enzima EcoRI no corta al vector recombinante.

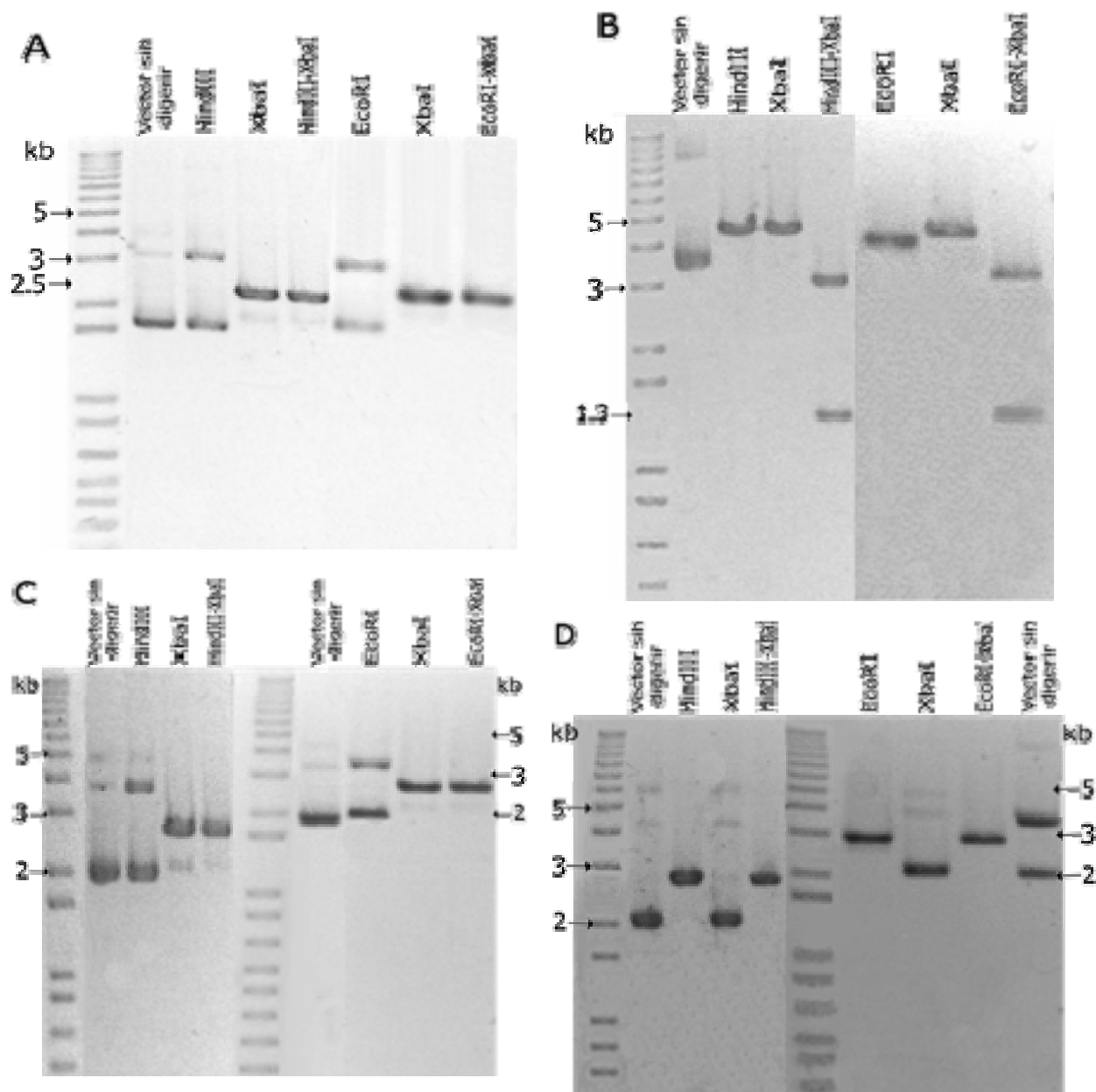


Fig. 20. Digestiones sencillas y dobles de cuatro de los vectores recombinantes obtenidos. En **A**: clona 4. En **B**: clona 5. En **C**: clona 6 y en **D**: clona 7

El análisis de las digestiones de los 44 vectores “aparentemente” recombinantes dio como resultado que solo en nueve de ellos se obtiene una banda de 3000 pb y otra de tamaño variable correspondiente al probable inserto. Estos resultados muestran que se obtuvo un número muy bajo de vectores recombinantes.

El hecho de que la mayoría de los vectores aparentemente recombinantes no dieran el patrón de corte esperado con estas enzimas, nos llevo a pensar que las clonas positivas fueran producto de un vector contaminante y no del vector pBS SK(+) recombinante. La forma en que podíamos descartar esta posibilidad de contaminación fue llevando a cabo reacciones de PCR

utilizando los oligonucleótidos universales M13, para comprobar que el vector purificado de las clonas positivas, fuera el pBS SK(+). De la misma forma se utilizaron los oligonucleótidos que se diseñaron para clonar el gen de la nitrilasa de *R. pyridinovorans* esperando que en alguno de los insertos del ADN de *R. pyridinovorans* se localizara la secuencia de este gen (Leyva, 2008).

Se realizó un control positivo de las reacciones de PCR. Los oligonucleótidos universales se utilizaron para amplificar la región de clonación múltiple del vector pBS (250 pb) y los oligonucleótidos de la nitrilasa con el vector pETNit esperando amplificar el gen de 1000 pb (Fig. 21).

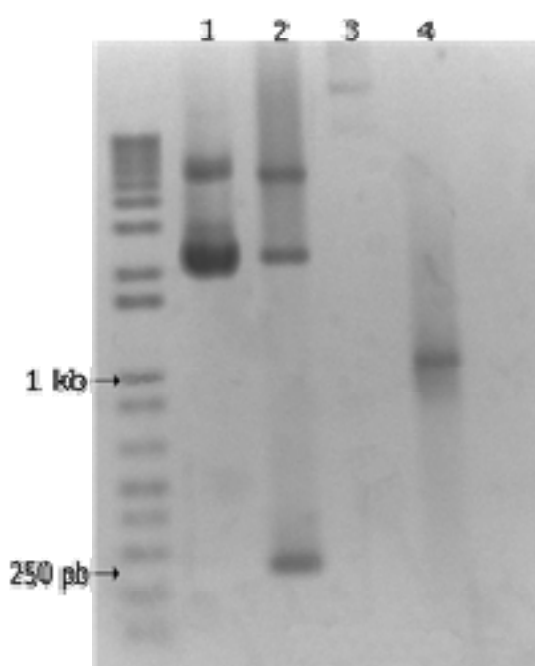


Fig. 21. Controles de la reacción de PCR. Carril 1: pBS super-enrollado. Carril 2: reacción de PCR con los oligonucleótidos M13. Carril 3: Vector pETNit. Carril 4: reacción de PCR con los oligonucleótidos del gen de la nitrilasa.

Del ADN aislado de las clonas positivas se hicieron mezclas, cinco vectores en cada tubo de reacción y se incubaron en las condiciones descritas en Métodos. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%. El resultado fue que no se logró amplificar ninguna secuencia (Fig. 22) ya que se esperaban bandas en el peso de 250 pb, en el caso de que el vector fuera el pBS SK(+). Como tampoco se observan bandas en el peso de 1000 pb.

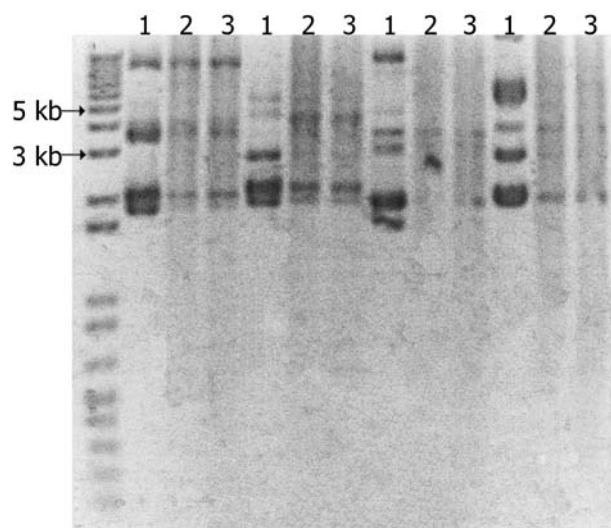


Fig. 22. Reacciones de PCR de las clonas obtenidas. Carriles 1: Mezclas de vectores. Carriles 2: reacciones de PCR con oligonucleótidos M13. Carriles 3: Reacciones de PCR con los oligonucleótidos Nit.

Se hicieron otras reacciones de PCR, utilizando como ADN templado a los vectores, que en el análisis con enzimas de restricción, presentaron dos bandas, la banda de 3000 pb correspondiente al peso del vector, además de una banda que indicara la presencia de inserto. Los resultados se muestran en la figura 23 y nuevamente no se obtuvieron las bandas esperadas, es decir no hubo amplificación de secuencias que nos indiquen la presencia del vector pBS en estas clonas aparentemente positivas. Esto indica la presencia de un vector contaminante en las clonas positivas.

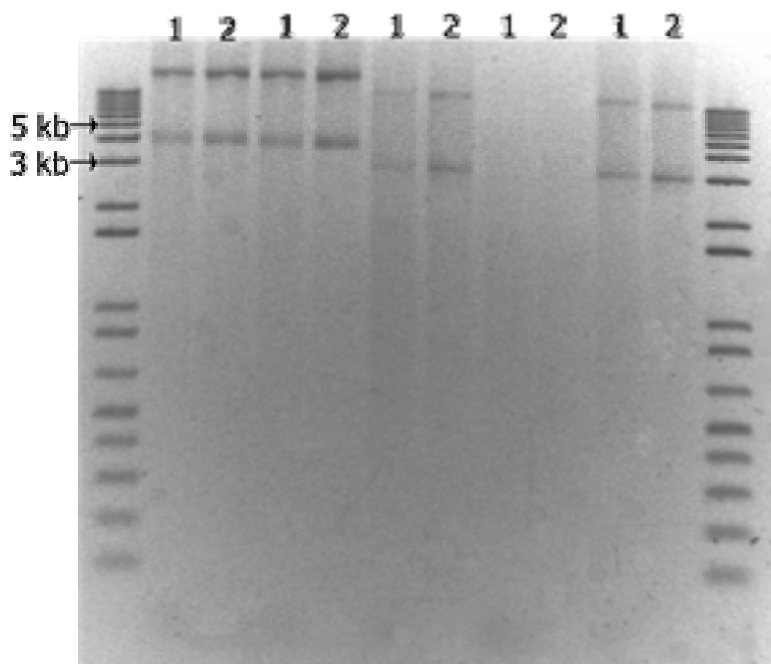


Fig. 23. Reacción de PCR de las clonas que presentaron el patrón de digestión que indicara la presencia de vector pBS y un inserto de ADN. Carriles 1: reacción de PCR con oligonucleótidos M13. Carriles 2: reacción de PCR con los oligonucleótidos Nit

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El aislamiento del ADN es un paso crítico en la construcción de bibliotecas genómicas, ya que la calidad de éste garantiza que las reacciones que se llevan a cabo se realicen exitosamente (Glover, et al., 1996). El método empleado para el aislamiento de ADN de alto peso molecular de la bacteria *R. pyridinovorans*, nos dio alto rendimiento, además de estar libre de ARN. Sin embargo no se determinó la pureza por espectroscopía, realizando barridos entre 220 a 320 nm, para determinar la relación $A_{260/280}$, que nos indica si las muestras obtenidas están libres de impurezas como proteínas, ARN o fenol (Clark, 2005, García et al., 2006).

Para la creación de la biblioteca genómica de *R. pyridinovorans* inicialmente se usó el vector de clonación pZErO-2, que por su nueva tecnología ofrece grandes ventajas en la selección de clonas, sin el uso de fosfatasas que implican un tratamiento “agresivo” para el ADN. Aunque existen referencias bibliográficas del uso de este vector para la generación de bibliotecas genómicas, en el laboratorio no fue posible obtener las condiciones adecuadas para generar clonas positivas, a pesar de realizar los controles incluidos en el kit. Como una alternativa se optó por usar el fagémido pBluescript SK(+). Al realizar los controles de ligación con este vector y el vector pET-24a+, se establecieron las condiciones para poder ligar los fragmentos de ADN al pBS SK(+). Sin embargo al realizar las ligaciones con los fragmentos de ADN de la bacteria en estudio, solo se obtuvieron 44 clonas y tomando en cuenta que los genomas bacterianos tienen aproximadamente 4.6×10^6 pb, se esperaba una biblioteca de 2994 clonas recombinantes. Estos datos nos indicarían que es probable que el problema esté en el ADN genómico aislado de *R. pyridinovorans*, ya sea en su naturaleza o en la calidad con la que se obtuvo.

García, et al., 2008, proponen una técnica de cromatografía de exclusión molecular para obtener ADN de alta pureza a partir de plantas, que contienen un alto contenido de polifenoles y compuestos tánicos. Se podría usar una técnica parecida para obtener ADN total de *R. pyridinovorans* de alta pureza y así descartar que los problemas en la obtención de la genoteca son producto del ADN genómico.

La presencia de fenol, alcoholes o alta concentración de sales puede inhibir e incluso inactivar a las enzimas de restricción y ligación (Álvarez, et al., 2004). Este problema se observó en el primer experimento (realizado después de obtener clonas recombinantes en los controles con

pET-24a+ y pBS SK(+), pag.36) donde no se tuvo crecimiento de colonias en ninguna de las condiciones. Entonces se tuvo especial cuidado en retirar todo el fenol, presente en las soluciones de ambos vectores de clonación. Estos lavados se repitieron con etanol al 80% hasta que desapareció el olor característico del fenol.

Otro factor importante en la ligación de extremos cohesivos, como los que se obtienen con las enzimas BamHI y Sau3AI, es la estabilidad y la calidad de estos. Al tener bases desapareadas, estos extremos son altamente lábiles y por lo tanto pudieran no aparearse con las bases complementarias, disminuyendo la eficiencia de la reacción de ligación. Una limitante en este trabajo fue la baja concentración de fragmentos obtenidos después de su purificación por electroforesis en gel de agarosa, además de posibles degradaciones de los extremos cohesivos, debido a la manipulación. Sin embargo esta técnica tiene un alto grado de resolución y requiere poco ADN (Glover, et al., 1996).

A pesar de que algunos lotes de agarosa pueden contener inhibidores de ADN ligasas, estos se pueden retirar con el uso de las columnas de elución (Glover, et al., 1996). Existen otras técnicas que se pueden utilizar para purificar los fragmentos de ADN, como es el uso de gradientes de sacarosa o de cloruro de sodio. Sin embargo los procesos para la selección de fragmentos de ADN implican la pérdida de material purificado. Una alternativa que se puede usar para evitar pérdidas de material en el proceso de purificación y que puede evitar la ligación de fragmentos de ADN entre sí es el llenado parcial de los extremos a ligar, aumentando de esta manera la eficiencia de la ligación inserto:vector. Después de la digestión del ADN y del vector, los extremos Sau3AI se llenan parcialmente con adenina y guanina, mientras que los extremos BamHI se llenan parcialmente con citosina y timina (Frischauf, 1987, Glover, et al., 1996). Debido a que no hay una selección de los fragmentos por peso, con esta técnica se obtendría un número elevado de recombinantes con peso distinto al esperado, ya sea mayor o menor al deseado (Álvarez, et al., 2004).

Cuando se realizaron los controles pET-24a+:pBS SK(+), se obtuvieron clonas que presentaron bandas en 3000 pb, correspondientes al peso del vector pBS SK(+) y otra en 5000 pb que corresponde al vector pET-24a+. Pero también se observan bandas que no corresponden al peso del vector (Fig.16, carriles 2 y 5), que en el momento no fue de importancia para nosotros, ya que tres de las clonas presentaban liberación de inserto de 5000 pb. Sin embargo, en las electroforesis de las clonas obtenidas en la clonación del ADN de *R. pyridinovorans*, se siguen observando patrones electroforéticos que no corresponden a los esperados. Así por ejemplo, se tienen bandas en el peso de 2000 pb e incluso algunas clonas recombinantes presentaron

resistencia a alguna de las enzimas de restricción utilizadas. Estos resultados nos sugieren, que desde el principio se tuvo un vector contaminante, que presenta resistencia a ampicilina pero no tiene sitios de restricción para las enzimas usadas en la digestión de las clonas. La presencia de este vector puede estar desde la amplificación del vector pBS SK(+) en células XL1 Blue, que se realizó en el laboratorio. Esta contaminación se comprueba con los geles de agarosa al 1% de las reacciones de PCR de las clonas que aparentemente eran recombinantes. En ninguna de las clonas se tuvieron amplificaciones de los insertos que se vieron en el análisis con enzimas de restricción, así como tampoco de la región de clonación múltiple del pBS SK(+).

La metodología para la obtención de una genoteca es muy larga, principalmente la selección de clonas y el análisis con enzimas de restricción. Namochi et al., 2006, minimizan el tiempo de obtención de bibliotecas genómicas utilizando directamente el producto de la reacción de ligación, para amplificar por PCR los insertos de ADN clonados. Con éste método lograron la identificación de múltiples sitios de inserción *IS6110* de *Mycobacterium tuberculosis*. Fullwood et al., 2008, utilizaron de la técnica de MDA (multiple displacement amplification) para amplificar plásmidos y largas cadenas de ADN usando la enzima phi29-polimerasa. Con lo cual se evita amplificar la biblioteca por medio de la siembra en agar sólido. Usando alguna de estas técnicas se podría intentar la obtención de la biblioteca genómica de interés, claro, antes asegurándose de la calidad del material genómico con el que se trabajará.

Otra alternativa que permitiría conocer los genes de interés de la bacteria *R. pyridinovorans* es con el método de Yin y Ji, 2008. Quienes usan la tecnología del ARN anti-sentido para identificar y regular la expresión de los genes esenciales en *Staphylococcus aureus*. Esta tecnología permite la identificación y caracterización de genes esenciales en el crecimiento de la bacteria, *in vitro* e *in vivo*.

VIII. CONCLUSIONES

La biblioteca genómica de *R. pyridinovorans* no se pudo obtener con los vectores propuestos en la metodología, (pZErO-2 y posteriormente pBS SK(+)) a pesar de los controles realizados durante el proceso. Lo que nos indica la importancia de la calidad del ADN que se ocupa para elaborar las genotecas.

La pureza del ADN obtenido se corroboró mediante electroforesis en geles de agarosa, teniendo material genómico libre de ARN, sin embargo no se determinó electroforéticamente.

Las condiciones óptimas para la digestión de ADN que se encontraron son: 3.5-5.4 μg de ADN total con 0.4U de Sau3AI con un tiempo de incubación de 3 a 5 minutos con la enzima. Así como también se observó que realizar digestiones con mayor cantidad de ADN provoca problemas con la homogeneidad, ya que se forman agregados viscosos.

Se obtuvieron células competentes con eficiencia en el intervalo de 1.5 a 6×10^8 CFU/ μg ADN. Lo que indica que las células están en el intervalo de muy buenas.

La relación molar inserto:vector para la clonación del ADN de *R. pyridinovorans* no se pudo determinar, ya que en el último experimento solo se tuvo la relación 1:1.

Con la identificación y selección de clonas se observó que las clonas obtenidas fueron producto de un vector contaminante que estuvo presente desde la propagación del vector pBS en células XL1 Blue, que dio como resultado patrones electroforéticos diferentes a los esperados.

IX. PERSPECTIVAS

Para la obtención del ADN genómico de *R. pyridinovorans*, la bacteria se resiembró en agar sólido sin antibiótico. Las resiembras continuas pueden ocasionar contaminaciones e incluso mutaciones en las colonias obtenidas. Se propone preparar glicerolos de esta cepa para almacenar y mantener viables las células. La bacteria *R. pyridinovorans* V51B crece en medio mínimo salino enriquecido con nitrilos como única fuente de carbono y nitrógeno, por lo que se propone también crecer la cepa en estas condiciones para confirmar la inducción del gen *nitA* responsable de la actividad de nitrilasa de esta cepa.

Recientemente en el laboratorio se logró clonar el gen *nitA* de *R. pyridinovorans* (Leyva, 2005). Con los oligonucleótidos diseñados para la clonación del gen *nitA* se podría efectuar un Southern blot con el ADN total, para hibridizar el gen silvestre y asegurarse de que el gen está presente en el ADN aislado, así como compararlo con el obtenido mediante reacciones de PCR.

Se propone realizar controles de la digestión parcial, utilizando el gen *nitA*, que corresponde a 1000 pb, para saber si la enzima *Sau3AI* digiere de forma excesiva la secuencia del gen de la nitrilasa.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Álvarez ME, Montaña LJ, Acuña R, Gaitán A, Pacheco PM. Construcción de una biblioteca genómica de *Coffea Arabica Var.* Colombia y evaluación con una secuencia homóloga a ubiquitina. Pontificia Universidad Javeriana 2004; vol. 9: 81 - 90.
2. Banerjee A, Sharma R, Banerjee UC. The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Appl Microbiol biotechnol* 2002; vol. 60: 33 – 44.
3. Brown TA. *Essential molecular biology*. 2a ed. Nueva York: Oxford University Press, 2000: vol 1: 89-99.
4. Brown TA. *Genomes*. 3a ed. Nueva York: Editorial Garland Science, 2007: 31 – 47.
5. Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. *Bioquímica*. Mexico DF: Editorial McGraw Hill, 2005: 507-511.
6. Clark D. *Molecular biology. Understanding the genetic revolution*. Amsterdam: Editorial Elsevier, 2005: 568 – 623.
7. Collins PA, Knowles CJ. The utilization of nitriles and amides by *Nocardia rhodochrous*. *Journal of General Microbiology*. 1983: vol. 129: 711-718.
8. Conn EE, Ebell EA, Charlwood BV- *Secondary Plant Products*. *Encyclopedia of Plant Physiology* Berlin: 1980: vol. 8.
9. Cseke L et all. *Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine*. 2a. ed. Boca Raton: CRC Press, 2004: 54, 55, 194, 195.
10. Doherty A, Sun SW. Structural and mechanistic conservation in DNA ligases. *Nucleic acids research* 2000; vol.28: 4051 – 4058.
11. Étienne J. *Manual de bioquímica genética y biología molecular*. Barcelona: Editorial Masson, 2001: 331-332.
12. Frischauf AM. Digestión of DNA: size fractionation. *Methods in enzymology*, 1987; vol. 152: 183-189.
13. Fullwood JM, Tan JJ, Ng WP, Chiu PK, Liu J, Wei C, Ruan Y. The use of multiple displacement amplification to amplify complex DNA libraries. *Nucleic acids research*, 2008: 1-7.
14. García CA, López FY, Riaño HN. Aplicación de una técnica de cromatografía de exclusión molecular para la purificación de ADN en plantas de *Coffea sp.* *Rev.Fac.Nal.Agr.* 2006; vol. 59: 3499-3507.
15. Gardner JE, Simmons MJ, Snustad PD. *Principios de Genética*. 4a ed. México DF: Editorial Limusa, 1998: 349-351.

16. Garret RH, Grisham CM. Biochemistry. 2a. ed. 1999: 396- 412.
17. Glover DM, Hames BD. DNA cloning 1. A practical approach. 2a ed. Oxford: IRL press Oxford university, 1996: 37-60.
18. Goldhust A, Bohak Z. Induction, purification and characterization of the nitrilase of *Fusarium oxysporum*. Biotechnology applied biochemistry, 1998; vol. 11: 581-601.
19. Hardin C, Pinczes J, Riell A, Presulti D, Miller W, Robertson D. Cloning, gene expression and protein purification. New York: Oxford University press, 2001: 52-55.
20. Invitrogene™.Zero background/ Kan cloning kit, technical manual. Catalog no. K2600-01
21. Karcher SJ. Molecular biology, a project approach. San Diego: Academic Press, 1995: 54-55.
22. Kobayashi M, Goda M, Shimizu S. Nitrilase catalyzes amide hydrolysis as well as nitrile hydrolysis. Biochem. Biophys. Res. Comm 1998; vol. 253: 662-666.
23. Kreuser H, Massey A. Recombinant DNA and biotechnology. 2a ed. Washington DC: ASM press, 2001: 190-192.
24. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principios de bioquímica. 2a ed. Barcelona: Ediciones Omega, 1993: 936- 397.
25. Leyva HE. Clonación y expresion del gen nitA de *Rhodococcus pyridinovorans* [Tesis de maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México, México 2008.
26. Lodish H, Berk A, Matsudira P, Kaiser C, Krieger M. Molecular cell biology. 5a ed. New York: W.H Freeman and Company, 2004: 361-363, 371.
27. Lucotte G, Baneyx F. Introduction to molecular cloning techniques. New York: VCH Publishers Inc, 1993: 83-85.
28. Malacinski GM, Freifelder D. Essentials of molecular biology. 3a ed. Boston: Jones and Bartlett publishers, 1998: 381 – 401.
29. March J. Advanced Organic Chemistry reactions, mechanisms and structure. 5a ed. New York: Wiley, 2001: 1179, 1305.
30. Nagasawa T, Kobayashi M, Yamada H. Optimum culture conditions for the production of benzonitrilase by *Rhodococcus rhodochromus* J1. Archives of Microbiology 1988, vol: 150: 1: 89-94.
31. Nagasawa T, Nakamura T, Yamada H. ϵ -caprolactam, a new powerful inducer for the formation of *Rhodococcus rhodochromus* J1 nitrilase. Archives of Microbiology 1990, vol: 155: 1: 13-17.
32. Namouchi A, Mardassi H. A genomic library-based amplification approach (GL-PCR) for the mapping of multiple IS6110 insertion sites and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of microbiological methods 2006: 210-211.

33. O'Reilly C, Turner PD. The nitrilase family of CN hydrolyzing enzymes- a comparative study. *Journal applied microbiology* 2003: 95, 1161-1174.
34. Pace HC, Brenner C. The nitrilase superfamily: clasification, structure and function. *Genome biology* 2001, 2 (1): reviews 0001.1-0001.9.
35. Primrose SB, Twyman RM. Principles of gene manipulations and genomics. 7a ed, E.U.A: Blackwel publishing, 2006: 41-42.
36. Regla J. Estudios para la síntesis enzimática y química de la D-homofenilalanina [Tesis de doctorado]. Universidad Autónoma de México, 2005.
37. Ringo J. Fundamental genetics. Nueva York: Cambridge University Prees, 2004: 254 – 264.
38. Russell PJ. Fundamentals of genetics. 2a. ed. San Francisco: Addison Wesley Longman Inc, 2000: 301 – 307.
39. Sebat JL, Colwell FS, Crawford RL. Metagenomic profiling: microarray analysis of an environmental genomic library. *Applied and environmental microbiology* 2003; vol.69: 4927-4934.
40. Singer M, Berg P. Genes y genomas. Barcelona: Ediciones Omega, 1993: 234-268, 361-367.
41. Snyder L, Champhess W. Molecular genetic of bacteria. 2a ed. Washington DC: ASM Press, 2003: 157-185.
42. Strachan T, Read A. Human molecular genetics. 2da ed. New York: Editorial Wiley-Liss, 1999: 79-81.
43. Stratagene™.pBluescript II phagemid vector, instruction manual.. Catalog no. 212205
44. Stryer L. Bioquímica. 4a ed. Barcelona: editorial Reverté, 1995: vol. 1: 120-127.
45. Surzyncki S. Basic techniques in molecular biology. Berlin: editorial Springer, 2000: 1-20.
46. Thomas A. Introducing Genetics. From Mendel to molecule. Reino Unido: Thomas publishing, 2003: 183 – 189.
47. Twyman R. Advanced Molecular Biology. New York: Bios Scientific Publishers, 1998: 327-330.
48. Watson J, Baker T, Bell S, Gann A, Levine M, Losick R. Molecular biology of the gene. 5a ed. San Francisco: CSHL Press, 2004: 648, 649, 652 – 657.
49. Yi D, Ji Y. Identification of essential genes in *Staphylococcus aureus* by construction and screening of conditional mutant library. *Methods in molecular biology* 2008; vol. 416: 297-305.
50. www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte2_cap3.pdf