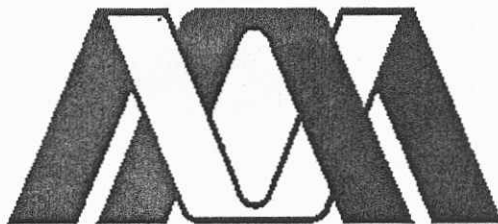


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



**Casa abierta al tiempo**

**“Construcción de un cósmido para la clonación y  
expresión de genes fúngicos”**

TESIS

para obtener el grado de  
**Maestro en Biotecnología**

PRESENTA

**Edgar del Carmen Sierra Palacios**

DIRECTOR

**Dr. Francisco José Fernández Perrino**

CO-DIRECTOR

**Dr. Javier Barrios González**

**Diciembre 2005**

---

---

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo consejo, con el No. de registro 0471-O”.

Este trabajo fue financiado por el CONACyT, a través de la beca de maestría No. 142338 y del proyecto “Desarrollo de estrategias moleculares para el mejoramiento genético de *Penicillium chrysogenum*” (ref. 400200-5-31431-B).

Iztapalapa, D. F., a 8 de diciembre 2005

Iztapalapa, D. F., a 8 de diciembre de 2005.

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la

tesis

“Construcción de un cósmido para la clonación y expresión de genes fúngicos”

que presentó

Edgar del Carmen Sierra Palacios

**Comité Tutorial:**

Director: Dr. Francisco Fernández Perrino

Co-Director: Dr. Javier Barrios González.

Asesor: Dr. Armando Mejía Álvarez

**Jurado:**

**Presidente:** Dr. Octavio Loera Corral



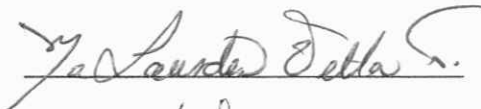
---

**Secretario:** Dr. Armando Mejía Álvarez



---

**Vocal:** Dra. Lourdes Villa Tanaka



---

**Vocal:** Dra. Nathalie Cabirol Gilles



---

---

## DEDICATORIA

### A MIS PADRES:

Adrian y Menas por el simple hecho de darme la vida,  
siempre les estaré profundamente agradecido.

### A MIS HERMANOS:

Por todo su apoyo, comprensión y amistad.

### A MIS PRIMOS Y SOBRINOS:

Gracias primos por todo su apoyo, cariño y amistad.

A todos mis sobrinos que son fuente de inspiración para toda la familia.

EN ESPECIAL PARA TI Mamá MARY, POR MANTENER A LA  
FAMILIA UNIDA DURANTE TANTO TIEMPO, POR TODAS TUS  
ENSEÑANZAS Y TU GRAN CARIÑO.

---

---

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa por permitirme y apoyarme a realizar la maestría, así como a todos mis profesores, nunca olvidare sus sabios consejos.

Al Dr. Javier Barrios por todo su apoyo académico y económico durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Lourdes Villa por la exhaustiva revisión de la tesis y sus importantes aportaciones al presente trabajo.

Al Dr. Armando Mejía por todo su apoyo durante mi estancia en el laboratorio y sus atinados comentarios para que el presente trabajo llegara a buen puerto.

Al Dr. Octavio Loera por la revisión del trabajo final, sus sabios consejos y por su amistad.

A la Dra. Nathalie Cabirol por todo su apoyo, comprensión y amistad, es usted una persona con grandes valores humanos.

En especial a ti PACO por toda la ayuda, sin tu ayuda desinteresada el presente trabajo no hubiera podido concluirse. Gracias por todas tus enseñanzas. GRACIAS a tu paciencia para transmitirme tus conocimientos, pude saciar una de mis grandes inquietudes, que era la de aprender un poquito de esta disciplina que es la biología molecular, MIL GRACIAS.

A todos mis amigos: Priscila, Juanita, el profe Arturo, Jaimito, Víctor, Rosita, Tania, Mónica, Rocio, Chucho, Carolina, Sandra, Anita, Blanquita, Octavio, mi cuñado, Gloria, Isaías, Charly, Xóchilt, Marcelo, Fred, Kalimberto, Lino, Miguel, Ángela, Nicolás, Vladimir y Joel. A todos gracias por su amistad, apoyo y por esos momentos de alegría.

A todos mis compañeros de maestría y a todas aquellas personas que de alguna manera u otra han contribuido a mi desarrollo personal.

---

## RESUMEN

Los vectores de clonación son moléculas de ADN que pueden ser mantenidas dentro de ciertas células hospederas, debido a que cuentan con elementos estructurales que les permiten replicarse de forma independiente al cromosoma. Estas moléculas artificiales tienen su origen en moléculas naturales de ADN encontradas en ciertos microorganismos, aunque el desarrollo de este tipo de vectores ha llevado a una cada vez mayor sofisticación. Hoy en día existen, de esta forma, una amplia gama de vehículos de clonación y expresión, entre los que se encuentran los plásmidos, bacteriófagos, cósmidos y cromosomas artificiales de bacteria, levadura y mamíferos.

Debido al gran tamaño de inserto que aceptan los cósmidos son atractivos para la elaboración de bibliotecas genómicas de microorganismos eucarióticos. Por ello, algunos cósmidos tienen, además del marcador de selección para *Escherichia coli*, un segundo marcador que les permite ser utilizados también en hongos o, sobre todo, en mamíferos. Son pocos, sin embargo, los cósmidos de este tipo existentes para hongos, por lo que su desarrollo aumentaría la posibilidad de investigación en biología molecular para este tipo de organismos.

El cósmido IztapaCos, desarrollado a lo largo del presente trabajo, contiene una región de resistencia al antibiótico fleomicina (compuesta por el gen de resistencia *ble* de *Streptoalloteichus hindustanus*, el promotor del gen *pcbC* de *Penicillium chrysogenum* y la región terminadora de la transcripción del gen *cyc1* de *Saccharomyces cerevisiae*), derivada del plásmido pULC43 y que constituye el mecanismo de selección para hongos. El promotor del gen *pcbC* presente en este módulo de expresión fue modificado por mutagénesis dirigida para favorecer los procesos de construcción del nuevo cósmido, en concreto se eliminaron por este método los sitios de corte para las endonucleasas de restricción *PstI* y *XbaI*. El mismo plásmido pULC43 aportó el marcador de selección para *E. coli* (resistencia a cloranfenicol).

Las secuencias *cos* y el policonector, necesarios para la formación del cósmido final, se obtuvieron a partir del cósmido comercial SuperCos<sup>®</sup> (Stratagene) mediante digestión con la endonucleasa de restricción *PstI*. Los elementos de interés se encontraban formando parte de un fragmento de 3.7 kpb.

---

Para confirmar la funcionalidad de IztapaCos en hongos, se transformaron esporas pregerminadas de *Penicillium chrysogenum* por electroporación y se seleccionaron transformantes resistentes a fleomicina, lo que confirma que las modificaciones realizadas en el promotor del gen *pcbC* no afectan a la expresión del marcador de selección. La presencia de un marcador de selección dominante, como es el caso, hace de este cósmido un vector utilizable en un amplio rango de hongos filamentosos.

---

## ABSTRACT

Cloning vectors are DNA molecules that can be maintained into host cells, because they have structural elements providing the ability to be replicated outside of the host chromosome. These artificial molecules are originated from micro organisms' natural DNA molecules, although the development of this kind of vectors originated a broader complexity. Today we can use, in this manner, a great variety of cloning and expression vectors, including plasmids, phages, cosmids, and bacterial, yeast, and mammalian artificial chromosomes.

Because the great insert's size the cosmids will accept, these vectors are attractive to create genomic libraries from eukaryotic micro organisms. For this, some cosmids have, additionally to a selective marker for *Escherichia coli*, a second marker for selection in fungi or, more frequently, mammals. There are few vectors of this kind for fungi, and its development will improve the possibility of research in Molecular Biology of such as organisms.

IztapaCos, the cosmid developed in this work, contains a region for resistance to antibiotic phleomycin (composed by the *ble* resistance gene from *Streptoalloteichus hindustanus*, the promoter of the *pcbC* gene from *Penicillium chrysogenum*, and the terminator from *Saccharomyces cerevisiae cyc1* gene), derived from pULC43 plasmid. This region is the basis for the selection mechanism for this vector in fungi. The promoter of the *pcbC* gene in this cassette was modified by directed mutagenesis to favour the construction of the new cosmid. In this way, cutting sequences for endonucleasas *PstI* y *XbaI* were eliminated. Selection marker for *E. coli*, resistance to chloramphenicol) was also obtained from pULC43 plasmid.

*Cos* sequences, and polylinker for the new cosmid were obtained from commercial cosmid SuperCos<sup>®</sup> (Stratagene), after digestion of this vector with endonuclease *PstI*. These elements were contained into a 3.7 kb *PstI* fragment in SuperCos<sup>®</sup> cosmid.



---

---

To demonstrate the Iztapacos' functionality for fungal transformation, pregerminated spores from *Penicillium chrysogenum* were electroporated. Phleomycin-resistant transformants were selected, confirming that modifications made on the sequence of *pcbC* promoter do not affect the ability of the selection marker expression. This vector, including a dominant selection marker, is a useful vector for a wide range of filamentous fungi.

---

---

---



---

**ÍNDICE GENERAL**

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	x
<b>ÍDICE DE TABLAS</b>	xiv
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	xv
<b>ABREVIATURAS</b>	xviii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b>	4
<b>III. ANTECEDENTES</b>	5
3.1 CLONACIÓN Y EL USO DE LOS VECTORES	5
3.2 TIPOS DE VECTORES	7
3.2.1 PLÁSMIDOS	8
3.2.1.1 ASPECTOS GENERALES DE LOS PLASMIDOS	8
3.2.1.2 PLÁSMIDOS COMO VECTORES DE CLONACIÓN	9
3.2.1.2.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PLÁSMIDOS UTILIZADOS COMO VECTORES DE CLONACIÓN	9
3.2.2 BACTERIÓFAGOS	13
3.2.2.1 EL BACTERIÓFAGO LAMBDA COMO VETOR	13
3.2.3 CÓSMIDOS	14
3.3 VECTORES EN HONGOS	17
3.3.1 MECANISMOS DE SELECCIÓN EN HONGOS	17
3.3.2 SISTEMA DE EXPRESIÓN PARA MARCADORES DE ORIGEN PROCARIÓTICO	20
3.3.3 INTEGRACIÓN DEL ADN EN HONGOS	22

---

3.3.4 VECTORES DE CLONACIÓN EN HONGOS	23
3.4 VECTORES DE TIPO CÓSMIDO EN HONGOS	23
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	25
<b>V. OBJETIVO</b>	25
<b>VI. METERIAL Y MÉTODOS</b>	26
6.1 ELABORACIÓN DE CELULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i>	26
6.1.1 MÉTODO QUÍMICO	26
6.1.2 CÉLULAS ELECTRO-COMPETENTES	27
6.1.3 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS	28
6.1.3.1 CHOQUE TÉRMICO	28
6.1.3.2 ELECTROPORACIÓN	29
6.2 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN DE PLÁSMIDOS Y CÓSMIDOS	30
6.2.1 LISIS ALCALINA	30
6.2.2 MINIPREPARACIONES	31
6.2.3 MEGAPREPARACIONES	33
6.2.4 PURIFICACIÓN DEL ADN	34
6.2.4.1 ELIMINACIÓN DE ARN	34
6.2.4.2 ELIMINACIÓN DE PROTEÍNAS	34
6.3 ELECTROFORESIS Y EXTRACCIÓN DE ADN EN GELES DE AGAROSA	34

---

---

---

6.3.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	35
6.3.2 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA	38
6.3.2.1 EXTRACCIÓN POR QIAEX	38
6.3.2.2 EXTRACCIÓN POR CONGELACIÓN Y CENTRIFUGACIÓN CON LANA DE VIDRIO	39
6.4 MANIPULACIÓN DEL ADN	40
6.4.1 CORTE DEL ADN	41
6.4.2 RELLENADO	41
6.4.3 LIGACIÓN	42
6.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA ADN POLIMERASA	43
6.5.1 PCR ESTÁNDAR	44
6.6 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	45
6.7 TRANSFORMACIÓN DE HONGOS	47
6.7.1 ELABORACIÓN DE ESPORAS ELECTROCOMPETENTES	47
6.7.2 ELECTROPORACIÓN DE <i>Penicillium chrysogenum</i>	49
6.8 REACTIVOS, SOLUCIONES Y CEPAS	50
6.8.1 CEPAS	50
6.8.1.1 CEPAS BACTERIANAS	50
6.8.1.2 CEPAS FÚNGICAS	51
6.8.2 VEHÍCULOS DE CLONACIÓN	51
6.8.3 MEDIOS DE CULTIVO	52
6.8.3.1 MEDIOS PARA BACTERIAS	52

---

---

6.8.3.2 MEDIO DE CULTIVO PARA HONGOS	53
6.8.4 SOLUCIONES	53
6.8.5 REACTIVOS	53
6.8.6 APARATOS	53
<b>VII. RESULTADOS</b>	54
7.1 MUTACIÓN DEL PLÁSMIDO pULC43	54
7.1.1 AMPLIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO pULC43	55
7.1.2 MUTAGÉNESIS DEL PLÁSMIDO pULC43	57
7.1.2.1 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA PARA EL SITIO DE CORTE <i>Pst</i> I DEL PLÁSMIDO pULC43	57
7.1.2.2 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA PARA EL SITIO DE CORTE <i>Xba</i> I DEL PLÁSMIDO pSPUAM1	61
7.1.2.3 ELIMINACIÓN DE LOS SITIOS DE CORTE PARA <i>Xba</i> I Y <i>Bam</i> HI DEL PLÁSMIDO pSPUAM2	64
7.2 OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS COS	67
7.2.1 AMPLIFICACIÓN DEL CÓSMIDO SuperCos <sup>®</sup>	67
7.2.2 OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS COS DEL CÓSMIDO SuperCos <sup>®</sup> POR MEDIO DE LA AMPLIFICACIÓN POR PCR	69
7.3 CONSTRUCCIÓN FINAL DEL CÓSMIDO IztapaCos	79
7.3.1 ENSAMBLE DEL CÓSMIDO IztapaCos	79
7.3.2 COMPROBACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DEL CÓSMIDO IztapaCos.	83
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	85

<b>IX. CONCLUSIÓN</b>	86
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b>	87
<b>ANEXOS 1</b>	101
<b>ANEXOS 2</b>	104
<b>ANEXOS 3</b>	108
<b>ANEXOS 4</b>	111

### ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Algunos cósmidos empleados para procariontes y eucariontes.	16
<b>Tabla 2.</b> Algunos marcadores de selección nutricional usados en hongos filamentosos	18
<b>Tabla 3.</b> Principales marcadores de resistencia empleados en hongos filamentosos.	20
<b>Tabla 4.</b> Promotores utilizados en los sistemas de expresión en hongos filamentosos.	22
<b>Tabla 5.</b> Algunos plásmidos y cósmidos utilizados como vectores de clonación	23
<b>Tabla 6.</b> Concentraciones de agarosa utilizadas en los geles de acuerdo al tamaño del ADN.	36

---



---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Esquema general de un plásmidos	11
<b>Figura 2.</b> Mapa genético del bacteriófago lambda	13
<b>Figura 3.</b> Mapa de dos cósmidos comerciales. A: pWEB (epicentre) B: SuperCos <sup>®</sup>	15
<b>Figura 4.</b> Elementos que componen a un vector de expresión en hongos filamentosos.	21
<b>Figura 5.</b> Marcadores de tamaño para ADN	37
<b>Figura 6.</b> Plásmido pULC43	51
<b>Figura 7.</b> Cósmido SuperCos <sup>®</sup>	52
<b>Figura 8A.</b> Análisis electroforético del plásmido pULC43 con varias endonucleasa de restricción.	55
<b>Figura 8B.</b> Mapa de restricción simplificado del plásmido pULC43	56
<b>Figura 9.</b> Secuencia nucleotídica del promotor PpcbC	58
<b>Figura 10.</b> Electroforesis del producto de PCR realizado para la mutagénesis dirigida que eliminó el sitio de corte para la endonucleasa de restricción <i>Pst</i> I.	59
<b>Figura 11.</b> Análisis electroforético de los transformantes mutados en el sitio de corte <i>Pst</i> I.	60
<b>Figura 12.</b> Mapa parcial de restricción del plásmido pSPUAM1	61
<b>Figura 13.</b> Análisis electroforético del producto de la mutagénesis dirigida para eliminar el sitio de corte para la endonucleasa <i>Xba</i> I del promotor PpcbC contenido en el plásmido pULC43	62

---



---

---

<b>Figura 14.</b> Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.7% del ADN plasmídico de cada uno de los transformantes mutados en el sitio de corte para la enzima <i>XbaI</i> del promotor PpcbC contenido en el plásmido pSPUAM1 y digerido con <i>XbaI</i> .	63
<b>Figura 15.</b> Mapa parcial de restricción del plásmido pSPUAM2	64
<b>Figura 16.</b> Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.7% del ADN plasmídico de los transformantes a los que se les eliminaron los sitios de corte para las endonucleasas de restricción <i>XbaI</i> y <i>BamHI</i> en el policonector del plásmido pSPUAM2	65
<b>Figura 17A.</b> Análisis de restricción del plásmido pIZTAPA con varias endonucleasas de restricción en un gel de agarosa al 0.7%	66
<b>Figura 17B.</b> Mapa parcial de restricción del plásmido pIZTAPA	66
<b>Figura 18A.</b> Mapa parcial de restricción del cósmido SuperCos <sup>®</sup>	68
<b>Figura 18B.</b> Análisis de restricción del cósmido SuperCos <sup>®</sup> con varias endonucleasas en un gel de agarosa al 0.7%.	68
<b>Figura 19.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% del producto de PCR con los cebadores cos1 y cos2.	70
<b>Figura 20.</b> Secuencia nucleotídica repetida en el cósmido SuperCos <sup>®</sup>	71
<b>Figura 21.</b> Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.7% del producto de PCR con los cebadores cos1 y cos2A	72
<b>Figura 22.</b> Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.7% del producto de PCR con los cebadores cos1 y cos2B	73

---



- 
- Figura 23A.** Análisis de la secuencia de la banda de 2.3 kpb producto del PCR con los cebadores cos1 y cos2B.  
Secuencia inicial de nucleótidos del fragmento de 2.3 kpb amplificado por PCR, donde se observa las secuencias de corte para las enzimas de restricción *Bam*HI, *Eco*RI y *Not*I. 74
- Figura 23B.**- Análisis de la secuencia de la banda de 2.3 kpb producto del PCR con los cebadores cos1 y cos2B.  
Comparación de secuencias entre la secuencia final del fragmento de 2.3 kpb amplificado por PCR y la región 2850 a 3230 de la secuencia nucleotídica del cósmido SuperCos<sup>®</sup>. 75
- Figura 24.** Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.7% de la digestión del cósmido SuperCos<sup>®</sup> con la endonucleasa de restricción *Pst*I. 77
- Figura 25.** Análisis electroforético de la digestión del fragmento de 3.7 kpb con varias endonucleasas de restricción. 78
- Figura 26.** Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.7% de la digestión de los transformantes IztapaCos con la endonucleasa de restricción *Kpn*I 80
- Figura 27.** Electroforesis para el análisis de restricción del cósmido IztapaCos 81
- Figura 28.** Mapa parcial de restricción del cósmido IztapaCos 82
- Figura 29.** Transformantes de *P. chrysogenum* con el cósmido IztapaCos sembrados en medio Czapeck con de fleomicina. 84
-

---

**ABREVIATURAS**

<b>μg:</b>	microgramos
<b>μL:</b>	microlitros
<b>g:</b>	gramos
<b>hr:</b>	horas
<b>L:</b>	litros
<b>mg:</b>	miligramos
<b>min:</b>	minutos
<b>mL:</b>	mililitros
<b>kpb:</b>	kilopares de bases
<b>r.p.m:</b>	revoluciones por minuto
<b>μM:</b>	micromol
<b>mm:</b>	milímetro
<b>N:</b>	normalidad
<b>mg:</b>	miligramos
<b>ng:</b>	nanogramo
<b>°C:</b>	grados Celsius
<b>nm:</b>	nanometro
<b>μm:</b>	micrómetro
<b>kg:</b>	kilogramo
<b>pH:</b>	potencial de hidrógeno
<b>cm:</b>	centímetro
<b>psi:</b>	lb/pulg <sup>2</sup>
<b>volts:</b>	voltios

---

## I.- INTRODUCCIÓN.

La manipulación de las características genéticas de los microorganismos se realiza con métodos tradicionales desde mediados del siglo pasado, pero es en las últimas décadas cuando ha tomado importancia la manipulación genética a nivel molecular. Esta nueva tecnología está fundamentada en la enorme cantidad de información teórica generada acerca de los procesos genéticos naturales de la célula.

El objetivo fundamental de la ingeniería genética es la creación o construcción de nuevas combinaciones de material genético a partir de moléculas de ADN de diferente origen. Tales combinaciones genéticas, sin embargo, por si solas no tienen importancia relevante, por lo que deben ser introducidas dentro de un organismo hospedero apropiado (aunque no sea el natural), donde la molécula de ADN artificial pueda ser replicada y seleccionada. Para poder llevar a cabo la tarea de transmisión de la molécula recombinante es necesario acoplarla a un vector de clonación o expresión.

Los vectores de clonación son moléculas de ADN que pueden ser mantenidas dentro de ciertas células hospederas, debido a la presencia de elementos estructurales conocidos como origen de replicación (Winnacker, 1987). Estas moléculas artificiales tienen su origen en moléculas naturales de ADN encontradas en ciertos microorganismos (cuando se descubrió que estas moléculas naturales de ADN se replicaban separadamente del cromosoma bacteriano y que podían pasar de una célula a otra, este fue el momento en el que empezó el desarrollo de los vectores de clonación).

Los primeros elementos extracromosómicos encontrados recibieron el nombre de plásmidos, nombre que se hizo extensivo también a todas aquellas moléculas artificiales de ADN hechas a partir de éstos (Esser y Kempken, 1986). Los primeros plásmidos naturales empleados para construir vectores artificiales fueron pSC101 (Cohen y Chang, 1973 y 1977; Cohen y *col.*, 1973) y ColE1 (Clewell, 1972; Helinski y Clewell, 1971); posteriormente fue

---

aislado el plásmido pMB1, que junto con el ColE1 son la base de la gran mayoría de plásmidos hoy conocidos (Sambrook y Russell, 2001).

Aunque en un principio la manipulación genética y la tecnología del ADN tuvieron mucho éxito con los plásmidos, el desarrollo del conocimiento de la biología de los bacteriófagos atemperados (específicamente del bacteriófago lambda), llevó al descubrimiento de que estos organismos podían ser útiles como vectores de clonación. Desde el desarrollo de los primeros bacteriófagos como vectores (Murray y Murray, 1975; Murray *col.*, 1977) se han creado hasta ahora una amplia cantidad de dichos vectores.

Las características de funcionalidad de los plásmidos y bacteriófagos como vectores son distintas, teniendo cada uno de ellos ciertas ventajas bajo ciertas circunstancias particulares. Después de estudiar ampliamente a nivel molecular el funcionamiento de los vectores, Collins y Hohn (1978) aprovecharon las características funcionales de los dos tipos para fusionarlas en una sola molécula de ADN, dando paso a un nuevo vector conocido como cósmido.

Los cósmidos son moléculas de ADN circular que se comportan como plásmidos, por lo que pueden ser manipulados fácilmente y seleccionados en bacterias, y al presentar secuencias *cos* de bacteriófago pueden ser empaquetados *in vitro* y ser transmitidos a un hospedero adecuado, utilizando la maquinaria infectiva de los bacteriófagos, lo que proporciona eficiencias de transformación del 100% por encima de las que se obtienen con los plásmidos (Rodríguez y Denhardt, 1988).

Los cósmidos rápidamente se volvieron vectores de uso cotidiano debido a que, además de las características arriba mencionadas, pueden aceptar fragmentos de ADN de tamaños entre 40 y 50 kpb. En el momento histórico en que aparecen, ningún vector era capaz de poder aceptar dichos fragmentos, lo que llevó a los cósmidos a ser empleados en un principio en la elaboración de bibliotecas génicas y a utilizarse posteriormente para el mapeo de ciertos genomas de procariontes y eucariontes menores (Pühler, 1993).

Los primeros cósmidos estaban orientados para ser utilizados en procariontes, aunque rápidamente empezaron a surgir cósmidos para eucariontes, los cuales se diseñaron principalmente para ser empleados en células de mamíferos o insectos. La obtención de cósmidos eucariotas no se hizo esperar.

Al ser el género *Aspergillus* y *Neurospora crassa* los microorganismos más ampliamente estudiados dentro de los hongos filamentosos, los primeros cósmidos fúngicos se obtuvieron para estos géneros (Vollmer y Yanofsky, 1986). Estos primeros cósmidos requerían de cepas fúngicas mutantes (Kingham y Turner, 1992), aunque al descubrirse que los hongos eran sensibles a ciertas sustancias químicas (que no eran tóxicas para otros microorganismos) fue posible el uso de ciertos genes como marcadores de selección en hongos (lo que vino a hacer más accesible el uso de cósmidos en hongos filamentosos).

En el presente trabajo se tiene como objetivo construir un cósmido bifuncional para *Escherichia coli* y hongos filamentosos, con un marcador de selección para el antibiótico fleomicina. Dicho vector permitiera el manejo de genes de gran tamaño o rutas completas.

---

---

## II.- JUSTIFICACIÓN

Uno de los problemas para el desarrollo de métodos de mejoramiento genético en microorganismos eucarióticos es la falta de vehículos de clonación y expresión adecuados que puedan llevar grandes fragmentos de ADN. Con el desarrollo de la ingeniería genética se han creado una serie de vehículos de clonación y expresión de alta capacidad (entre ellos los cósmidos, con capacidad para aceptar insertos de ADN de entre 30 y 50 kpb). Aunque hoy en día existen muchos de estos vehículos de clonación para microorganismos eucarióticos, la mayoría se ha desarrollado principalmente para ser usados en el mejoramiento genético de células de mamíferos. Dentro del grupo de los hongos filamentosos son pocos los vehículos de clonación de este tipo, y la mayoría son específicos para géneros como *Aspergillus* o *Neurospora*.

Por tales motivos es importante desarrollar vehículos de clonación de alta capacidad para un rango de hongos de interés industrial, como es el caso de *Penicillium chrysogenum* entre otros.

---

### III.- ANTECEDENTES

#### 3.1 CLONACIÓN Y EL USO DE LOS VECTORES

El desarrollo de la clonación no hubiese sido posible sin los estudios previos acerca del material genético, su función y manipulación. Los primeros estudios acerca de este tipo de material fueron realizados por Friedrich Miescher, quien encontró una molécula de tamaño grande que presentaba un carácter ácido y que además era rica en fosfato. No sería hasta años después cuando Richard Altmann nombró a esta molécula como ácido nucleico. La composición química exacta de la molécula descubierta por Miescher, sin embargo, aún no era conocida y fue Phoebus Levene el primero en dar a conocer una composición química aproximada de la misma en 1929. La caracterización primaria de la molécula de ácido nucleico condujo al inicio del estudio del comportamiento de dicho material en los seres vivos, siendo Frederick Griffith el primero en postular la idea de que el material genético podía pasar de un organismo a otro: a dicho mecanismo se le denominó transformación bacteriana (Kart, 1996; Summers, 1996)

Años después, Oswald Avery (junto con sus colaboradores MacLeod y McCarty), contribuyeron al avance de la Biología Molecular al concluir que el ADN era el “principio transformante” capaz de modificar el fenotipo de ciertas bacterias una vez que se introducía en ellas. Otra aportación importante para establecer el papel del ADN en la célula fue dada en 1952 por Martha Chase y Alfred Hershey.

El conocimiento de la estructura química de la molécula de ADN se vio favorecido por los estudios de Edwin Chargaff, quien afirmó que el ADN estaba compuesto por cantidades iguales de purinas y pirimidinas. Con toda la información generada hasta ese momento, junto con los trabajos de difracción de rayos X de la molécula de ADN realizados por Rosalind Franklin, James Watson y Francis Crick (dos científicos de Cambridge) reportaron en 1953 la estructura del ácido desoxirribonucleico. El ADN estaba compuesto por dos cadenas entrecruzadas sobre su propio eje, con dirección hacia el lado izquierdo (aunque la secuencia de las dos cadenas corre en direcciones opuestas, es decir son antiparalelas). La estructura de

---

la molécula de ADN fue suficiente para que Watson y Crick discutieran sobre un posible mecanismo de copia o replicación del material genético (Watson y Crick, 1953a y 1953b).

Pero el descubrimiento del ADN, por si solo, no fue suficiente para permitir el desarrollo de la biología molecular; un aporte importante lo dio Hamilton O. Smith. Smith encontró que no era posible transformar una bacteria con el ADN perteneciente a otra especie de bacteria distinta (Yuan, 1981; Yuan y Hamilton, 1984; Bickle y Krüger, 1993). Estudios posteriores de este autor dieron a conocer que este fenómeno se debía a la presencia de enzimas que degradaban el ADN foráneo (Arber y Linn, 1969; Winnacker, 1987). Meselson y Yuan (1968) reportaron por primera vez la purificación de una de estas enzimas a partir de la bacteria *Escherichia coli*, y la denominaron enzima de restricción. Aunque esta enzima cortaba el ADN, los autores no fueron capaces de localizar el sitio exacto de corte dentro de la molécula de ADN. Apoyado en los trabajos de Meselson y Yuan, Smith aisló una enzima de *Haemophilus influenzae* con la que pudo demostrar que el corte en el ADN se realizaba siempre en un sitio específico (Mertz y Davis, 1972; Smith y Nathans, 1973; Smith y Birnstiel, 1976; Kessler y col., 1985; Kessler y Manta, 1990). Con toda la información generada hasta este momento, junto con el descubrimiento de los plásmidos por parte de Lederberg y el estudio de los bacteriófagos por parte de Luria, Lwoff y Lederberg, comienza una época de importante desarrollo de la biología molecular.

El desarrollo de los vectores de clonación, por su parte, comienza con el descubrimiento del factor F de *E. coli* (Marmur y col., 1961). Durante los primeros estudios, el factor F tenía interés sobre todo como una herramienta que facilitaba el análisis genético de *E. coli*, aunque la situación cambió drásticamente cuando se consideró a los plásmidos como los responsables de la resistencia a los antibióticos. No será, sin embargo, hasta principios de los años 70 del siglo pasado cuando los primeros plásmidos silvestres, como pSC101 (Cohen y col., 1973; Cohen y Chang, 1973 y 1977), y ColE1 (Clewwell, 1972; Helinski y Clewwell, 1972), se utilizaron como los primeros vectores de clonación.



El primer plásmido artificial utilizado fue el pBR322, un plásmido procedente de ColE1 y a partir del cual se ha derivado una gran cantidad de los modernos vectores plasmídicos (Bolívar *y col.*, 1977a, 1977b y 1977c). En la actualidad existe un número muy elevado de plásmidos, cubriendo una gran gama de utilidades.

El desarrollo de los vectores derivados de bacteriófagos se da también en esa misma década, aunque hoy en día su número y aplicación son mucho más limitados que los de los plásmidos. A principios de siglo se encontraban descritos alrededor de 400 vectores derivados de bacteriófagos, la gran mayoría descendientes de cepas silvestres de bacteriófagos (Murray y Murray, 1974; Murray *y col.*, 1977; Natt *y col.*, 1986; Hendrix *y col.*, 1983).

Itakura *y col.*, (1977) reportaron la primera clonación de un gen en *Escherichia coli*. Para ello utilizaron el plásmido pBR322, introduciendo en dicho vector el gen para la somatostatina humana (Itakura *y col.*, 1977 y 1984; Goeddel, 1979; Ikehara *y col.*, 1984). Dicho experimento marcó la pauta para clonar y expresar en *E. coli* los genes de otras proteínas, tales como la insulina humana (Goeddel *y col.*, 1979).

### 3.2.- TIPOS DE VECTORES.

Una clasificación de los vectores puede darse atendiendo al uso para el cual fueron diseñados. Así, se puede hablar de vectores de clonación (aquellos en los que el objetivo es simplemente asegurar la disponibilidad de un determinado ADN) y vectores de expresión (aquellos en los que lo que se persigue es la expresión funcional de un determinado gen en un determinado hospedador). Estos últimos están equipados con promotores para una expresión fuerte, y con los elementos necesarios para obtener los mejores resultados de expresión del producto de un gen (Amann y Brosius, 1985; Keasling y Cooper, 1994; Baneyx, 1999).

Otra posible clasificación se referiría al destino del vector en el interior del hospedador, pudiendo distinguir aquellos vectores que se mantendrán independientes del genoma del hospedador (los llamados vectores de replicación autónoma) de aquellos que se integrarán en

el genoma del hospedador (los denominados vectores integrativos). En el presente trabajo, por la naturaleza del objetivo perseguido, se trabajará con vectores de clonación con replicación autónoma para su manejo en *Escherichia coli*, aunque su destino final será la integración en el genoma fúngico.

Sin embargo, normalmente la clasificación de los vectores se basa en las características propias de cada grupo de vectores y, sobre todo, en la cantidad de ADN extraño que pueden alojar (la denominada “capacidad de un vector”). En esta clasificación podríamos nombrar, en orden creciente de capacidad: plásmidos, bacteriófagos, cósmidos y otros vectores de alta capacidad (PAC, BAC y YAC, por ejemplo).

### **3.2.1.- PLÁSMIDOS.**

#### **3.2.1.1.- ASPECTOS GENERALES DE LOS PLÁSMIDOS.**

Además del “cromosoma”, algunas células bacterianas contienen plásmidos. Estas moléculas de ADN juegan un importante papel en la evolución y adaptación bacteriana, además de ser importantes herramientas para los estudios de Biología Molecular.

Los plásmidos varían ampliamente en tamaño, desde unos cuantos miles a cientos de miles de pares de bases. Son moléculas normalmente de ADN circular de doble hebra (algunas bacterias tienen plásmidos lineales y los plásmidos de bacterias Gram positivas pueden tener sólo una hebra de ADN, debido a un sistema de replicación atípico denominado de “circulo rodante”). El número de copias también varía en función de los distintos plásmidos, y las células bacterianas pueden contener o alojar más de un tipo de plásmido (Willets y Skurray, 1980).

Como los cromosomas, los plásmidos codifican para proteínas y moléculas de ARN, y se replican a la par que se da la replicación celular. Al igual que ocurre en el caso del genoma, los productos de la replicación plasmídica son usualmente distribuidos entre cada célula hija

cuando la célula se divide. Sin embargo, los plásmidos no codifican para funciones esenciales del crecimiento bacteriano, pudiéndose considerar dispensables. Las características fenotípicas que aportan los plásmidos naturales (resistencia a antibióticos, producción de toxinas o asimilación de fuentes de carbono complejas, por citar sólo tres ejemplos) confieren ventajas a las bacterias sólo bajo ciertas circunstancias (Lederberg J., 1998, 1952; Foster, 1983).

### **3.2.1.2.- PLÁSMIDOS COMO VECTORES DE CLONACIÓN**

Como ya se mencionó, un vector de clonación es un fragmento de ADN, con capacidad de replicación autónoma, que puede incorporar fragmentos de ADN. Cualquier ADN insertado en el vector de clonación será replicado junto con el vector, pudiéndose obtener tantas copias del ADN de interés como copias del plásmido se encuentren en la célula.

Los plásmidos ofrecen muchas ventajas como vectores de clonación, entre las que cabe destacar el no provocar daño a la célula, no comprometer excesivamente el equilibrio energético de la bacteria, debido a su pequeño tamaño (característica propiciada porque se necesitan unas pocas funciones para que el vector se replique como plásmido) y el ser relativamente fáciles de purificar, para obtener el ADN clonado en ellos. Como resultado, los plásmidos son herramientas particularmente populares en algunos tipos de aplicaciones de clonación (Pühler, 1993).

#### **3.2.1.2.1.- CARACTERÍSTICAS DE LOS PLÁSMIDOS UTILIZADOS COMO VECTORES DE CLONACIÓN.**

Un pequeño número de plásmidos bacterianos naturales son la base del innumerable número de plásmidos desarrollados en la actualidad. Estos vectores están caracterizados por tres funciones básicas:

1. SISTEMA DE REPLICACIÓN: Que consiste normalmente en un fragmento de ADN necesario para el inicio de la replicación (el denominado “origen de replicación”). Esta

---

---

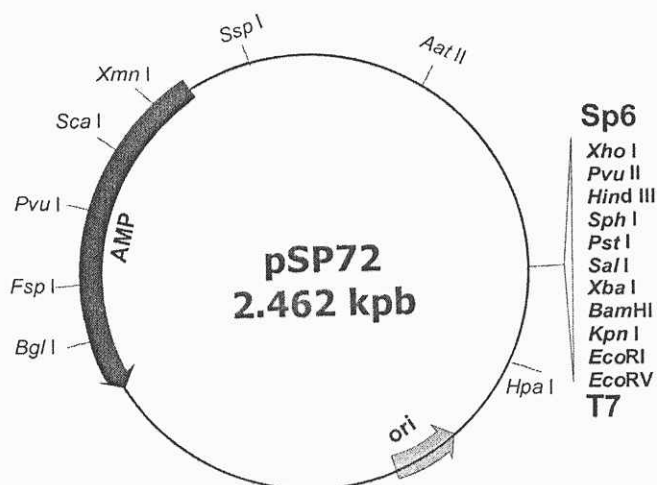
característica es la que determina la autonomía frente al genoma bacteriano y, en general, determina el número de copias del plásmido por célula e incluso la posibilidad de que dos plásmidos distintos puedan encontrarse a la vez en el interior de la célula. Normalmente se habla de plásmidos de bajo número de copias (aquellos en los que usualmente existen sólo unas pocas copias por célula, normalmente menos de 10) y plásmidos de alto número de copias (normalmente más de 20 copias por célula, pudiéndose alcanzar un número superior a 500).

2. MARCADOR DE SELECCIÓN: Esta característica permitirá diferenciar la célula bacteriana que porta un plásmido de la que no, permitiéndonos la selección de las células con la primera característica. Hay muchos mecanismos de selección descritos, aunque la mayor parte de los investigadores se inclina preferentemente por marcadores dominantes, es decir que confieren una característica fenotípica de selección a cualquier bacteria donde se integre (sin necesidad, pues, de cepas especiales). La mayor parte de estos marcadores dominantes son genes de resistencia a antibióticos, como ampicilina, cloranfenicol, kanamicina/neomicina y tetraciclina.

3. SITIO DE CLONACIÓN: Son secuencias de reconocimiento y corte para endonucleasas de restricción, localizadas fuera de regiones esenciales para el mantenimiento de las funciones requeridas para el mantenimiento del plásmido. En los vectores más usados, varias de estas secuencias están agrupadas en un pequeño fragmento artificial (la región múltiple de clonación o policonector), que proporciona de esta forma múltiples opciones para la inserción de ADN foráneo. Los sitios de clonación pueden localizarse incluso dentro de un gen de selección, para poder diferenciar células que contienen plásmidos que tienen ADN insertado de aquellas que contienen solamente el vector sin inserto. Este mecanismo de selección, llamado inactivación insercional, se basa en que la inserción del ADN en ese punto rompe la estructura del gen de selección y, por la tanto, impide la expresión de la característica fenotípica por él codificada (Esser y Kempken., 1986; Moser *y col.*, 1987; Rodríguez y Denhardt, 1988; Pühler, 1993).

Muchos plásmidos usados como vectores de clonación tienen otras propiedades especiales, que ayudan en experimentos particulares: por ejemplo, hay plásmidos que tienen sitios para movilidad (*mob*) y así pueden ser transferidos por conjugación a otras células, o algunos vectores de amplio rango de hospederos tienen regiones *ori* que les permiten replicarse en muchos tipos de bacterias o aun en organismos de diferentes reinos (los denominados vectores de enlace, por ejemplo, contienen más de un tipo de origen de replicación y así se pueden replicar en organismos no relacionados).

En la figura 1 se muestra un esquema general de un plásmido, incluyéndose las tres regiones anteriormente descritas.



**Figura 1.** Esquema general de un plásmido. Como ejemplo se toma el plásmido pSP72 (Promega). **Ori**, origen de replicación; **Amp<sup>r</sup>**, gen de resistencia ampicilina; **SP6** y **T7** promotores de bacteriófago que permiten la transcripción *in vitro*. Las letras itálicas representan los sitios de corte para las endonucleasas de restricción, agrupadas en un policonector o sitio múltiple de clonación.

Los primeros plásmidos artificiales se desarrollaron para *E. coli*, y se basaron en los mecanismos de replicación del plásmido natural pMB1 (o ColE1), que se caracteriza por encontrarse en un número de copias moderado dentro de la célula. El más ampliamente usado

---

---

de entre los vectores de esta familia fue el plásmido pBR322, vector del que derivan muchos de los plásmidos utilizados hoy en día (Balbás *y col.*, 1986). La evolución de este vector llevó a eliminar el gen de resistencia a tetraciclina y la región involucrada en la movilización y el control del número de copias, de tal forma que se consiguieron nuevos vectores, no movilizables y con un alto número de copias. El más conocido de esta serie de vectores es el vector pUC (Messing, 1983; Norrander *y col.*, 1983). Este plásmido contiene un policonector sintético o sitio múltiple de clonación, caracterizado por una disposición “en tandem” de sitios únicos de reconocimiento y corte para endonucleasas de restricción, y que pueden ser usados solos o en combinación para el clonaje de fragmentos de ADN. A la vez que se permite el clonaje, el uso de sitios múltiples de clonación facilita el poder subclonar los fragmentos, simplemente usando cualquier otra enzima de restricción que flanquee a los mismos y sin necesidad de modificaciones adicionales (con la adición de adaptadores, etc.) (Vieira *y* Messing, 1982).

Los plásmidos de la serie pUC fueron los primeros con los que se pudo distinguir entre las bacterias en las que aparece un plásmido sin inserto y aquellas otras en las que el plásmido sí contiene un inserto. Este tipo de selección secundaria (la primaria sigue basándose en la resistencia a un antibiótico) se basa en el mecanismo de la  $\alpha$ -complementación, mediante el cual un fragmento del gen *lacZ* contenido en el plásmido complementa la delección del mismo fragmento en el gen *lacZ* de la bacteria receptora del mismo. Aquellas bacterias que portan el plásmido sin inserto adquieren una coloración azul en presencia de un sustrato cromogénico denominado X-gal. Dicho color no aparece, pues no se da la complementación, cuando en el plásmido se inserta un ADN extraño que rompe la estructura del fragmento del gen *lacZ* (Messing, 1983).

Otra mejora incorporada en los plásmidos es la introducción de un fragmento de ADN que funciona como origen de replicación para un bacteriófago de cadena sencilla, como por ejemplo M13 ó f1. Esto permite la producción directa de ADN de una sola hebra a partir del plásmido recombinante (algo muy útil en las técnicas de mutagénesis “in vitro” y de análisis de la secuencia de nucleótidos), con lo que se elimina la necesidad de subclonar el fragmento de ADN en un vector fágico como el M13, algo que anteriormente se requería (Dente *y col.*, 1983).

En estos momentos existe una amplia gama de plásmidos con características muy particulares y para tareas muy específicas, aunque la gran mayoría de ellos descende de estos plásmidos anteriormente mencionados.

### 3.2.2.- BACTERIÓFAGOS.

#### 3.2.2.1.- EL BACTERIÓFAGO LAMBDA COMO VECTOR.

El bacteriófago lambda está constituido por una cubierta proteica que contiene una cadena lineal de ADN de doble cadena de aproximadamente 49 kpb. Los genes del bacteriófago lambda están organizados en el genoma de acuerdo a su funcionalidad (figura 2).

La región del brazo derecho incluye los genes *NuI* a *J*, cuyos productos son usados para el empaquetamiento del ADN viral dentro de las cabezas y para el ensamble de viriones infecciosos por llenado de cabezas y colas prefabricadas.

La región central, de *J* a *gam*, codifica para funciones involucradas en la regulación génica, establecimiento y mantenimiento de la lisogenia y la recombinación. Muchos de los genes de la región central no son esenciales para el crecimiento lítico y pueden ser dispensables a la hora de construir vectores de clonación fágicos.

La región del brazo derecho, de *gam* a *Rz*, contiene genes esenciales usados en la replicación del bacteriófago lambda y la lisis de las bacterias infectadas (Old y Primrose, 1998; Kameyama y col., 2000). En cada extremo de este ADN lineal aparece una secuencia de 12 pares de bases, con nucleótidos complementarios entre sí y denominadas secuencias o extremos *cos*.

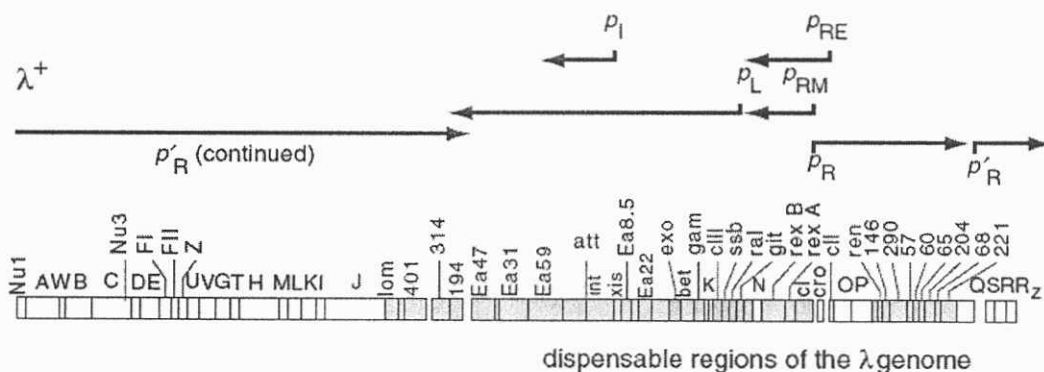


Figura 2. Mapa genético del bacteriófago lambda (Sambrook y Russell, 2001).

Una vez unido a la bacteria, unión que se da de forma específica en los receptores de maltoporina (codificados por el gen *lamB*), el ADN del bacteriófago es inyectado al interior de la bacteria. Ya en el citoplasma, la molécula lineal de ADN se circulariza por la complementariedad de los extremos *cos* anteriormente mencionados, de forma que se generan moléculas circulares de ADN que pueden seguir dos caminos distintos: ciclo lítico (con mantenimiento autónomo del ADN frente al ADN del hospedador y una rápida multiplicación) o ciclo lisogénico (mediante integración en el ADN del hospedador y replicación junto con éste). Como resultado final de la primera de estas vías, se forman moléculas lineales polimerizadas (los denominados concatémicos) que son procesadas para formar las moléculas de ADN finales, que se incorporarán a las cápsidas virales. En este proceso también juegan un papel esencial los extremos *cos*, al ser las secuencias reconocidas por las proteínas virales como inicio y final de la molécula madura de ADN.

Se han desarrollado una gran variedad de vectores derivados de bacteriófagos, algunos de los cuales han ganado en la capacidad de contener ADN extraño mediante la eliminación de las regiones de genes dispensables (los llamados vectores de reemplazamiento). Está fuera del alcance de esta Memoria el describir la gran variedad existente, por lo que a continuación pasaremos a describir una tercera categoría de vectores con características de plásmidos y bacteriófagos y que llevan hasta su máxima expresión la dispensabilidad de los genes de los bacteriófagos.

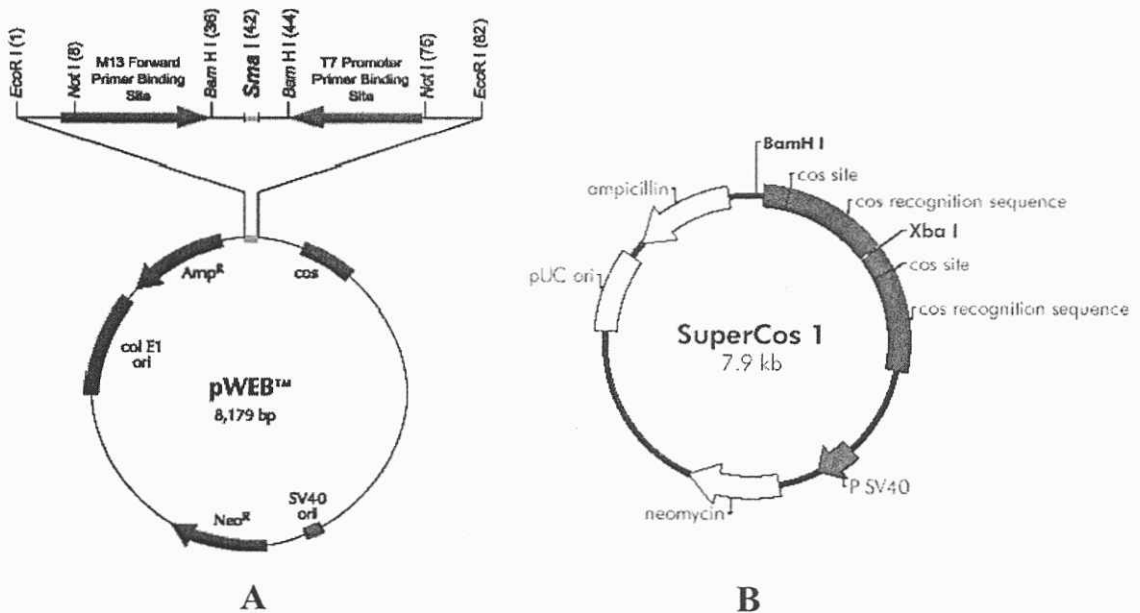
### 3.2.3.- CÓSMIDOS.

Los cósmidos son híbridos entre plásmidos y bacteriófagos, combinando los mejores aspectos de ambos sistemas. En principio, los cósmidos son plásmidos que sólo contienen como bacteriófagos la información genética necesaria para el empaquetamiento *in vitro* del ADN dentro de cabezas preformadas de virus. De tal forma, sólo una pequeña región de algunos cientos de pares de bases del fago  $\lambda$  incluyendo las secuencias *cos* (figura 3), son necesarias; la parte correspondiente al plásmido aporta el origen de replicación, un marcador de selección y un sitio apropiado de clonación. Estos vectores pueden ser bastante pequeños



(Collins y Hohn, 1978) y sacar provecho de la posibilidad de que las cabezas del bacteriófago  $\lambda$  pueden almacenar hasta un 105% de su tamaño original, lo que propicia una mucho mayor capacidad para integrar fragmentos grandes de ADN. Cualquier concatémero constituido de vector-inserto o construcciones que parten de cósmidos y que tengan dos copias de las secuencias *cos* pueden ser susceptibles de empaquetamiento.

Los cósmidos son, por lo tanto, capaces de incorporar fragmentos de alrededor de 50 kpb y aunque se introducen en *E. coli* después de su encapsidación “in vitro” (es decir, como bacteriófagos), después de la infección el ADN es circularizado en el hospedero y las moléculas recombinantes se presentan como un plásmido (Yanish-Perron y col., 1985). La biología, propagación y manejo *in vitro* de los cósmidos es, por lo tanto, como plásmidos, pues su ADN contiene unas mínimas regiones del ADN viral, careciendo de todos los genes que participan en los procesos de replicación y establecimiento de tanto ciclo lítico como ciclo lisogénico (figura 3).



**Figura 3.** Mapa de dos cósmidos comerciales. A: pWEB (Epicentre), cósmido con un sólo sitio *cos* B: SuperCos<sup>®</sup> 1 (Stratagene), cósmido con dos sitios *cos*.

En la tabla 1 se presenta una selección de cósmidos. En ella se describen el origen de replicación, sitios de clonación y propiedades especiales.

**Tabla 1.** Algunos cósmidos empleados para procariontes y eucariontes.

Nombre	ori	Marcador	Tamaño Kpb	Propiedades
pHC79	pMB1	<i>Amp</i> y <i>Tet</i>	6.43	Policonector con 8 sitios de corte
pJB8	pMB1	<i>Amp</i>	5.40	<i>Eco</i> RI flanquea al sitio de clonación
Pcos2EMBL	R6K	<i>Neo</i> y <i>Tet</i>	6.10	Doble sitio cos
pLAFR1	RK2	<i>Tet</i>	23.10	Cósmido de amplio rango de hospederos
pKPBY2	pMB1	<i>Cm</i> y <i>Amp</i>	9.90	Lleva el gen <i>trpC</i> de <i>A. nidulans</i> para la transferencia e integración en hongos.
pYC1	ColE1 y 2 $\mu$	<i>Amp</i>	10.00	Vector de enlace entre <i>E. coli</i> y levaduras, selección con <i>his3</i> en levaduras
pcosPneo	pMB1	<i>Amp</i> y <i>Neo</i>	9.20	Contiene el elemento P para la transposición en <i>Drosophila</i>
SuperCos <sup>®</sup>	SV40 y ColE1	<i>Amp</i> y <i>Neo</i>	7.90	Doble secuencia cos, promotores de fagos T7 y T3, uso en células de mamífero
pHC79	pMB1	<i>Amp</i>	11.80	Doble secuencia cos y es usado en células de mamífero.
pHSG274	ColE1	<i>Neo</i>	3.4	Usado en mamíferos.

Tabla tomada de Rodríguez, y Denhardt, 1988. **Amp** resistencia a ampicilina; **Cm**, resistencia a cloranfenicol; **Tet**, resistencia a tetraciclina; **Neo**, resistencia a neomicina

Básicamente, existen dos tipos de cósmidos:

1. Vectores para la propagación de grandes fragmentos de ADN en *E. coli*. Un prototipo de dichos vectores es pJB8 (Ish-Horowitz y Burke, 1981), que contiene el replicón pMB1, un gen de resistencia a ampicilina, el sitio *cos* y un sitio de clonación con varios sitios de restricción. Se han conseguido nuevos mejoramientos de este tipo de vectores con la introducción de promotores adyacentes al sitio de clonación, que son usados para la generación de transcritos *in vitro* a partir de los dos extremos del inserto, la incorporación de sitios *cos* adicionales (Bates, 1987) y/o el reemplazamiento del origen de replicación de los plásmidos por uno de bacteriófagos, en este caso para evitar problemas de inestabilidad (Gibson y col., 1987).

2. Los vectores de enlace (*shuttling*), para clonar ADN en *E. coli* y otros organismos, procariontes o eucariontes. Estos cósmidos contienen, además de los elementos mencionados en el párrafo anterior, elementos para su replicación y propagación en el segundo organismo hospedero. Una gran variedad de estos vectores ha sido desarrollada para varios hospederos, por lo que son muy usados en experimentos de complementación y de rescate.

### 3.3.- VECTORES EN HONGOS.

#### 3.3.1.- MECANISMOS DE SELECCIÓN EN HONGOS.

Hay dos mecanismos básicos para seleccionar vectores introducidos en hongos filamentosos. El primero de ellos, de tipo nutricional, consiste en la inserción de los genes de interés junto con un gen que complementa una mutación biosintética existente en el hospedero (auxotrofia). Éste es un método común en la investigación genética fundamental de hongos como *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa*, debido a que existe un gran número de mutantes ya disponibles y pueden introducirse fácilmente dentro de diferentes ambientes vía cruzamiento sexual (tabla 2).

El aislamiento de un transformante auxotrófico es muy tardado, por lo que disponer de mecanismos de selección positiva para cepas mutantes (fluoroorato, clorato y selenio, por ejemplo) es una gran ventaja.

**Tabla 2.-** Algunos marcadores de selección nutricional usados en hongos filamentosos.

Gen	Función	Especie de origen
<i>acuA</i> <sup>+</sup>	Acetil CoA	<i>Ustilago maydis</i>
<i>Ade-2</i> <sup>+</sup>	Fosforibosilaminoimidazol carboxilasa	<i>Schizophyllum commune</i>
<i>amdS</i> <sup>+</sup>	Acetamidasa	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>argB</i> <sup>+</sup>	L-ornitina carbamoil transferasa	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>leu</i> <sup>+</sup>	Isopropilmalato isomerasa	<i>Mucor circinelloides</i>
<i>met-2</i> <sup>+</sup>	Homoserina-O-transacetilasa	<i>Ascobolus immersus</i>
<i>niaD</i> <sup>+</sup>	Nitrato reductasa	<i>Aspergillus</i> sp. y <i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>Pyr-3</i> <sup>+</sup>	Dihidro-oratasa	<i>Ustilago maydis</i>
<i>Pyr-4</i>	Orotidina-5'-fosfato	<i>Neurospora crassa</i>
<i>qa-2</i> <sup>+</sup>	Deshidroquinasa	<i>N. crassa</i>
<i>PyrG</i>	Descarboxilasa	<i>Aspergillus</i> sp. y <i>N. crassa</i>
<i>sC</i> <sup>+</sup>	ATP sulforilasa	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>trpC</i> <sup>+</sup> y <i>trpI</i> <sup>+</sup>	Síntesis de triptófano	<i>Aspergillus</i> sp., <i>P. chrysogenum</i> , <i>N. crassa</i> , <i>Coprinus cinereus</i> y <i>S. commune</i> .
<i>Ura-5</i> <sup>+</sup>	Orotidilato pirofosforilasa	<i>Podospora anserina</i>

Tabla tomada de Pühler, 1993.

Sin embargo, es complicado poder disponer de una gran variedad de mutantes nutricionales de este tipo para especies de importancia comercial, como *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum*, por ejemplo (generalmente no es concebible que se introduzcan

“defectos” dentro de las cepas productoras para que después puedan ser corregidos). En tales casos, otros sistemas alternativos de selección, como los marcadores de tipo dominante, son deseables. Los marcadores dominantes reciben este nombre porque no dependen del ambiente genómico en el que se expresen: el efecto seleccionable aparecerá sin necesidad de recurrir a cepas mutantes o cepas especiales de microorganismos.

El gen *amdS* de *Aspergillus nidulans*, por ejemplo, codifica para la acetamidasa, una enzima que hidroliza la acetamida a amonio y acetato proveyendo al hongo simultáneamente de una fuente de carbono y nitrógeno. Muchos hongos, sin embargo, crecen muy pobremente en acetamida como fuente de nitrógeno por lo que la inserción del gen *amdS* de *Aspergillus nidulans* en una cepa silvestre con estas características puede dar como resultado un mejor crecimiento del microorganismo en un medio con acetamida. Este fenómeno fue primeramente observado en *A. niger* y ha sido empleado con éxito para otras especies fúngicas (Kelly y Hynes, 1985).

Los marcadores para resistencia a antibióticos (marcadores dominantes también) constituyen la forma más común de selección de transformantes en cepas hospedadoras silvestres. Una lista de algunos de estos marcadores se encuentra en la tabla 3.

Pueden ser, a su vez, de dos tipos:

A).- alelos para resistencia a antibióticos procedentes de hongos.

B).- genes bacterianos de resistencia bajo el control de promotores fúngicos.

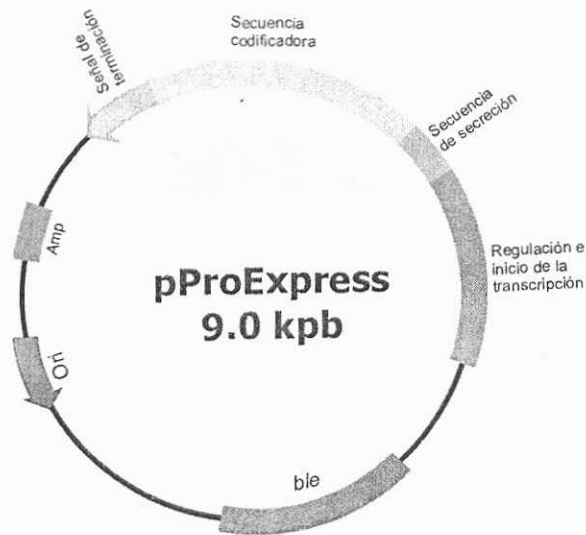
**Tabla 3.-** Principales marcadores de resistencia empleados en hongos filamentosos.**Genes fúngicos de resistencia.**

Gen	Función	Origen	Inhibidor
<i>oliC</i>	Subunidad 9 de la ATP sintasa	<i>Aspergillus</i> sp., <i>P. chrysogenum</i>	Oligomicina
<i>tub-2</i>	$\beta$ -Tubulina	<i>N. crassa</i> y <i>Septoria nodorum</i>	Benomyl
<i>bar</i>	Fosfinotricina acetilasa	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Bialofos
<i>bs</i>	Deaminasa	<i>Bacillus cereus</i>	Blasticidina S
<i>ble</i>	Fleomicina (unión a proteínas)	<i>Streptomyces hindustanus</i>	Fleomicina
<i>Hph</i>	Higromicina fosfotransferasa	<i>E. coli</i>	Higromicina
<i>sulI</i>	Dihidropterato sintetasa	<i>E. coli</i>	-----

Tabla tomada de Pühler, 1993.

### 3.3.2.-SISTEMAS DE EXPRESIÓN PARA MARCADORES DE ORIGEN PROCARIÓTICO.

El uso de los marcadores de selección procedentes de bacterias requiere de su adaptación al hospedero eucariótico. Un marcador útil debe así contar con un promotor eficiente (constitutivo o inducible, en función de los requerimientos) y con características de regulación apropiadas, características fundamentalmente iguales a las usadas en la mayoría de los vectores para expresión en eucariontes (figura 4). Muchos de los vectores construidos también contienen un terminador, una señal de finalización de la transcripción.



**Figura 4.** Elementos que componen un vector de expresión en hongos filamentosos. Ori, es el origen de replicación para *E. coli*, Amp, marcador de selección para bacterias y *ble*, marcador de selección para hongos.

Hay un amplio rango de promotores utilizados en biotecnología de Hongos (tabla 4); algunos de los cuales (como los procedentes de ascomicetos y deuteromicetos) pueden ser usados principalmente dentro de estas clases (siendo la expresión en un diferente hospedero no necesariamente óptima). Aún así, a menudo se ha observado una regulación casi normal de genes que se han transferido a especies filogenéticamente más alejadas (Cantwell *y col.*, 1990; Connerton *y col.*, 1991).

**Tabla 4.-** Promotores utilizados en los sistemas de expresión en hongos filamentosos.

Gen	Microorganismo Fuente	Inductor
<i>glaA</i> (glucoamilasa)	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i>	Almidón
Subunidad-9 de la ATP sintetasa	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i>	Expresión constitutiva
$\alpha$ -amilasa	<i>Aspergillus oryzae</i>	Almidón
<i>cbhI</i> (celobiohidrolasa I)	<i>Trichoderma reesei</i>	Celulosa
<i>alcA</i> (alcohol deshidrogenasa)	<i>Aspergillus nidulans</i>	Etanol y treonina
<i>gpdA</i> (gliceraldehído fosfato deshidrogenasa)	<i>Aspergillus nidulans</i>	Expresión constitutiva
<i>tpiA</i> (triosafosfato isomerasa)	<i>Aspergillus nidulans</i>	Expresión constitutiva

Tomada de Pühler, 1993.

### 3.3.3.- INTEGRACIÓN DEL ADN EN HONGOS.

El ADN transformado normalmente se integra dentro del cromosoma fúngico, por recombinación homóloga y no homóloga, durante el crecimiento vegetativo. La integración homóloga del ADN circular y lineal es similar a como ocurre en levaduras, excepto que la linealización de un ADN circular por corte en la secuencia homóloga no hace que se incremente la frecuencia de transformación, como ocurría en aquel caso.

La frecuencia relativa con que los eventos de integración homóloga y no homóloga (ectopica) se dan dependen de las especies y de la longitud de la región homóloga. En *A. nidulans* y *P. chrysogenum* más de la mitad de los eventos de integración son homólogos (Yelton y col., 1984; Bull y col., 1988), mientras que en *Neurospora crassa* tales eventos pueden ser menores al 5% (Dhawale y Marzluf, 1985).

Es común que durante la transformación de los hongos filamentosos puedan darse eventos múltiples de integración, lo que puede constituir una forma para incrementar la dosis génica en aplicaciones comerciales (Gwynne y col., 1987). Las cepas que llevan integradas múltiples copias son generalmente estables, esto si sobre todo cuando se mantiene la presión



selectiva. De todas formas, el incremento en la dosis génica por sí solo a veces no es suficiente, y factores como la posición en la que se ha efectuado la integración pasan a tener un papel significativo a la hora de explicar el nivel de expresión alcanzado (Christensen *y col.*, 1988). La expresión de múltiples copias de un gen puede, además, ser limitada por la concentración existente de proteínas reguladoras o factores transcripcionales (Gwynne *y col.*, 1987).

### 3.3.4.- VECTORES DE CLONACIÓN EN HONGOS.

Los hongos filamentosos han sido de considerable importancia en Biotecnología durante muchos años. Aunque se han usado muchos vectores estándar, ciertos cósmidos y plásmidos han sido especialmente contruidos para llevar marcadores de selección adecuados (generalmente que permitieran complementar auxotrofias en el hospedero) para la selección de los transformantes fúngicos (tabla 5).

**Tabla 5.** Algunos plásmidos y cósmidos utilizados como vectores de clonación.

Nombre	Vector	Marcador	Hospedero
pILJ16	Plásmido	<i>argB</i>	<i>A. nidulans</i>
pDJB3	Plásmido	<i>pyr-4</i>	<i>A. nidulans</i>
pKPBY2	Cósmido	<i>TrpC</i>	<i>Nectria haematococca</i> y <i>A. nidulans</i>
pRAL1	Plásmido	<i>qa-2</i>	<i>Neurospora crassa</i>
pSV50	Cósmido	<i>tub-2</i>	<i>N. crassa</i>

Tomada de Kinghorn y Turner, 1992.

### 3.4.- VECTORES DE TIPO CÓSMIDO EN HOGOS

En la actualidad son pocos los cósmidos creados exclusivamente para ser usados en hongos. Los primeros cósmidos fueron contruidos específicamente para ser usados en mamíferos (ratón y humano, principalmente) y en el caso de los hongos no fue sino hasta mediados de la década de los 80 del siglo pasado cuando se crean los primeros cósmidos

---

fúngicos, entre ellos el pKPBY2 para *Aspergillus nidulans* (Yelton y col., 1985) y el pSV50 (Barredo y col., 1989) para *Penicillium chrysogenum*.

Durante los últimos años se han creado nuevos vectores para la expresión de genes de otros eucariontes (levaduras y mamíferos) en hongos filamentosos, pero su número sigue siendo insignificante en comparación con otros vectores como los plásmidos (Jeenes y col., 1991; Archer, 1994; Archer y Peberdy, 1997; Maras y col., 1999; Punt y col., 2002;).

Aunque la aparición de vectores cuya capacidad es mucho mayor que la de los cósmidos (BAC, YAC o derivados del bacteriófago P1, por ejemplo) y que podría parecer que los cósmidos estuvieran en retirada, la utilidad fundamental de los vectores modernos de alta capacidad es la construcción de bibliotecas genómicas o el análisis de la secuencia de genomas completos. En ambos casos, los vectores están diseñados para su introducción en bacterias y no son buenas herramientas, a priori, para la expresión de genes en hongos filamentosos. La posibilidad de expresión en dichos hospederos de genes de gran tamaño o de rutas biosintéticas completas parece dar una nueva oportunidad a un tipo de vector no tan nuevo: los cósmidos.

#### **IV.- HIPÓTESIS.**

Se puede obtener un cósmido bifuncional (para bacterias y hongos) a partir del plásmido pULC43 y el cósmido comercial SuperCos<sup>®</sup> (Stratagene)

#### **V.- OBJETIVO.**

Construir un cósmido bifuncional para la clonación y expresión de genes y/o rutas completas de hongos.

## VI.- MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1.- PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN DE *E. coli*.

Los ácidos nucleicos no pueden entrar por sí solos hacia el interior de las células bacterianas, por lo que requieren ayuda para pasar la membrana celular y poder localizarse en el citoplasma, donde puedan ser expresados y replicados (Sambrook y Russell, 2001).

Hoy en día se conoce un número elevado de métodos para elaborar células competentes, aunque el método químico más empleado es el descrito por Hanahan (1983 y 1985) y el método físico de más uso es la electroporación.

**Equipo y materiales:** Guantes de látex, centrífuga refrigerada (Beckmank Avanti™ 30 centrífuga), tubos de centrífuga de 50 mL, matraces de 500 mL, balanza granataria, balanza analítica, hielo, tubos Eppendorf de 1.5 mL, baño de agua, electroporador (Gene Pulser II, Bio Rad), cubetas de electroporación de 0.1 cm (Bio-Rad), puntas de 200 y 1000  $\mu$ L, incubadora, campana microbiológica de flujo laminar, Micropipetas P20, P200 y P1000 (Gilson), pipetas Pasteur, Recipiente termo para contener el nitrógeno líquido, destilador (Rios s/Elix S-Millipore) y desionizador (Milli-Q RG-Millipore).

#### 6.1.1.- MÉTODO QUÍMICO.

Este método fue descrito por Hanahan (1983 y 1985) y consiste en lavar las células de *E. coli* con soluciones que contienen una mezcla de sales, que hacen que las células alcancen un “estado de competencia”. De esta forma, al ponerlas en contacto con el ADN, éste último penetra fácilmente hacia el interior de la célula. Con este método se obtienen altos porcentajes de transformación, de alrededor de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^9$  transformantes/  $\mu$ g de ADN plasmídico. Este procedimiento se utilizó para obtener células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Los pasos para preparar células competentes bajo este protocolo son los siguientes (todos los medios y soluciones empleados se detallan en el apartado de anexos):

- 1.- Se siembra en una placa de medio SOB sólido la cepa de *E. coli* que se vaya a utilizar como receptora del DNA de transformación. Se debe sembrar una cantidad de células que nos permita obtener colonias aisladas, incubando las células a 37°C durante 12 a 14 horas.
- 2.- Se inocula con una colonia aislada un matraz de 500 mL con 100 mL de medio SOB. El matraz se incuba a 37°C con 250 r.p.m hasta que el cultivo celular alcance una densidad óptica a 600 nm de 0.4 a 0.45; posteriormente se enfrían las células a 4°C durante 20 minutos.
- 3.- Se centrifuga para recoger las células a 3,000 r.p.m. (850 -1,000 x g) en un rotor Beckman F0650 durante 10 minutos, a 4°C.
- 4.- Se desecha el sobrenadante y las células precipitadas se resuspenden con suavidad, a una temperatura de 4°C, en la solución RF1 (un tercio del volumen inicial). La suspensión se mantiene durante 20 minutos en hielo.
- 5.- Se centrifuga bajo las mismas condiciones descritas en el paso 3, posteriormente se retira el sobrenadante y se resuspenden las células en solución RF2 (1/12.5 del volumen inicial). La suspensión de células se mantiene en hielo durante 20 minutos. Finalmente se reparte la suspensión en alícuotas de 200 µL.
- 6.- Las células competentes así preparadas pueden ser usadas inmediatamente o bien pueden conservarse a -70°C, previa congelación en nitrógeno líquido o en un baño de hielo seco/alcohol.

### 6.1.2.- CÉLULAS ELECTRO-COMPETENTES.

Este método se basa en la exposición de las células a una carga eléctrica que desestabiliza la membrana celular de las bacterias e induce la formación de poros transitorios por donde el ADN se introduce. En este método, las células sólo son lavadas con una solución de glicerol para eliminar todas las sales (Neuman *et al*, 1982).

Para este procedimiento se emplearon células de *E. coli* XL1-Blue MR. El protocolo se describe a continuación (Sambrook y Russell, 2001):

- 1.- En una caja de Petri con medio LA se siembran, por estría cruzada, las células que se vayan a utilizar, procurando obtener colonias aisladas.
- 2.- Se selecciona una colonia aislada, con la cual se inocula un matraz de 500 mL con 100 mL de medio TB. Se incuba a 37°C con una agitación de 250 r.p.m. hasta que el cultivo alcance

una densidad óptica a 600 nm de 0.6 a 0.9, en seguida se transfiere el cultivo a 4°C, en un baño de hielo, durante 20 minutos.

3.- Se recogen las células por centrifugación en un rotor Beckman F0650 a 4,000 r.p.m. (1,500 x g) durante 15 minutos, a 4°C.

4.- Se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células en un volumen de solución de lavado fría (4°C). A continuación se centrifuga bajo las mismas condiciones del paso anterior.

5.- Se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células en 0.5 volúmenes de solución de lavado fría a 4°C, tomando como referencia el volumen inicial. Se centrifuga en las mismas condiciones que en el paso 3.

6.- Se retira el sobrenadante y se resuspenden las células en 1/5 de volumen de solución de lavado fría a 4°C. Se recogen las células por centrifugación bajo las mismas condiciones de los pasos anteriores.

7.- Se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células en una cantidad de solución de lavado fría a 4°C que nos permita obtener una concentración celular final de  $1-3 \times 10^{11}$  células/mL. Posteriormente se reparte la suspensión celular en alícuotas de 50  $\mu$ L.

8.- Si se desea conservar las células electro-competentes por un largo período, éstas se congelan inmediatamente con nitrógeno líquido y se guardan a -70°C.

### 6.1.3.- TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS.

#### 6.1.3.1.- CHOQUE TÉRMICO.

Este método fue descrito por Hanahan (1983) y está basado en las observaciones de Mandel e Higa (1992), que encontraron que las células tratadas con una solución fría de  $\text{CaCl}_2$ , seguido de un pequeño choque térmico de 37 a 42°C, pueden ser transfectadas por el ADN del fago  $\lambda$ .

Las etapas del método son las siguientes:

1.- Se descongelan las células competentes en un baño de hielo y una vez descongeladas se mezclan 100  $\mu$ L de suspensión de células con el ADN, dejando reposar la mezcla durante 20 minutos en hielo. La solución de ADN no debe sobrepasar el 5% del volumen de la suspensión de células.

- 2.- La mezcla se somete a un choque térmico por inmersión en un baño de agua a 42°C durante 45 segundos, seguido de un rápido enfriamiento en hielo durante 2- 3 minutos.
- 3.- A continuación se añaden 900  $\mu\text{L}$  de medio SOC a la mezcla células-ADN y se incuba a 37°C con una agitación de 250 r.p.m. durante un tiempo máximo de 1 hora, con el fin de que las células en las cuales se insertó el ADN se recuperen y puedan expresar la resistencia al antibiótico que se empleará como marcador de selección.
- 4.- Por último, se siembra una alícuota de la transformación en una caja de Petri con medio LA y antibiótico<sup>1</sup>. Si se quiere obtener ADN de un transformante en concreto en grandes cantidades, puede inocularse un matraz con medio TB-antibiótico con una alícuota de la transformación.
- 5.- Una vez sembradas las células transformadas, se incuban a 37°C (en el caso de medio líquido se somete a una agitación de 250 r.p.m.), durante aproximadamente 12 horas.

#### 6.1.3.2.- ELECTROPORACIÓN.

Este método fue originalmente desarrollado para la introducción de ADN a células eucarióticas por Neuman (Neuman y Rosenheck, 1972; Neuman *y col.*, 1982), siendo posteriormente adaptado para bacterias (Dower *y col.*, 1988). Es un método muy eficiente, rápido, fácil y con un alto porcentaje de reproducibilidad en la transformación de células bacterianas.

El protocolo utilizado es el descrito por Sambrook y Russell (2001), describiéndose a continuación los pasos realizados.

- 1.- Se descongelan las células electro-competentes en un baño de hielo; una vez descongeladas se mezclan con 1  $\mu\text{L}$  de ADN (alrededor de 25 ng).
- 2.- Inmediatamente después de mezclar se deposita la mezcla ADN-células en una cubeta para electroporación fría (0-4°C). A continuación, la cubeta se inserta en el equipo de electroporación programado para 1250 volts y 10  $\mu\text{F}$  de capacitancia, aplicándose una descarga eléctrica durante aproximadamente 5 milisegundos.

---

<sup>1</sup> La concentración final de los antibióticos en el medio de cultivo para poder seleccionar transformantes fue descrita por Sambrook y Russell (2001); 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la ampicilina, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la kanamicina, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el cloranfenicol y 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el caso de la tetraciclina.

5.- Se adicionan de forma inmediata a la cubeta de electroporación 800  $\mu$ L de medio LB y toda la mezcla se deposita en un microtubo de 1.5 mL, incubándose a 37°C durante un tiempo máximo de 1 hora, con una agitación de 250 r.p.m.

6.- Una alícuota de la transformación se extiende en una placa de Petri que contiene medio LA con antibiótico y las cajas son incubadas a 37°C durante aproximadamente 12 horas.

## 6.2.- EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN DE PLÁSMIDOS Y CÓSMIDOS.

El desarrollo de la Biología Molecular es tal que para la extracción de ácidos nucleicos existen una amplia gama de métodos. Los métodos más empleados son los que utilizan ciertos detergentes o los que usan calor combinado con ciertas enzimas (Sambrook y Russell, 2001).

**Materiales y equipo:** Guantes de látex, Matraz Erlenmeyer de 500 mL, tubos de centrífuga de 50 mL, tubos Eppendorf de 1.5 mL, palillos estériles, gradillas de ebullición, centrífuga Eppendorf 5415C, gradilla plástica para tubos de 1.5 mL, embudo, filtro Nytal o franela de cocina, puntas de 200 y 1000  $\mu$ L y micropipetas P20, P200 y P1000 (Gilson).

### 6.2.1.- LISIS ALCALINA.

La lisis alcalina en combinación con el SDS (dodecil sulfato de sodio) ha sido utilizada durante más de 20 años en el aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli* (Birnboim y Doly, 1979). La exposición de una suspensión celular a un detergente con un alto poder aniónico en un ambiente de pH alto provocan que la pared celular se fracture, y que posteriormente se dé la desnaturalización del ADN cromosómico y las proteínas, quedando el ADN plasmídico en solución (Ish-Horowicz y Burke, 1981).

Este procedimiento fue empleado para realizar extracciones de ADN a gran escala. El método utilizado también es el descrito por Sambrook y Russell (2001). Los pasos del protocolo son (todos los medios y soluciones empleados se detallan en el apartado 6.7):

1.- Se inocula un matraz con 100 mL de medio TB-antibiótico con células de *E. coli* portadoras del plásmido del cual se quiere obtener el ADN.

2.- El cultivo se incuba a 37°C durante 12 a 16 hrs con una agitación de 250 r.p.m.



- 3.- Se recogen las células por centrifugación a 5,000 r.p.m. (2,350 x g) durante 5 minutos en un rotor Beckman F0650, se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células en 3 mL de solución GTE con una concentración de lisozima de 10 mg/mL. Se mezcla bien y se mantiene durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 4.- Posteriormente se agregan 6 mL de la solución NS, la cual se debe preparar en el momento. Se mezcla suavemente (ya que una agitación vigorosa rompería el ADN genómico de la bacteria, lo que se traduciría en una contaminación del ADN plasmídico con ADN genómico) y se mantiene en hielo durante 10 minutos.
- 5.- Se agregan 4.5 mL de una solución, previamente enfriada a 4°C, de acetato potásico. Se mezcla fuertemente y se mantiene a 4°C durante 10 minutos.
- 6.- Se centrifuga a 15,000 r.p.m. (21,100 x g) a 4°C en un rotor Beckman F0650 durante 20 minutos. Se recupera el sobrenadante y se pasa a través de un filtro Nyltal de 25 µm de diámetro de poro, una franela de cocina ó un filtro de papel de cafetera (manual megaPrep extraction Kit, Promega), estéril (independientemente del material empleado). Se recoge el filtrado en un tubo de vidrio ó plástico. El ADN plasmídico se precipita añadiendo 0.6 volúmenes de isopropanol y manteniendo la mezcla a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- 7.- Por último, se centrifuga a 8,000 r.p.m. (6,000 x g) en un rotor F0650 a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación se lava el precipitado con etanol al 70% (v/v). Se seca el precipitado y se resuspende el ADN en 1 mL de solución TE.

### 6.2.2.- MINIPREPARACIONES.

El protocolo para obtener ADN a pequeña escala fue reportado por Holmes y Quigley (1981) y modificado por Fernández (1997). Está basado en la resuspensión de las bacterias en un tampón que contiene Tritón X-100 y lisozima, lo que provoca la debilitación de la pared celular y una lisis total en presencia de calor, por lo que las proteínas, el ADN cromosómico y el plasmídico fluyen hacia el exterior de la célula. Las proteínas y el ADN cromosómico se desnaturalizan por la temperatura y precipitan cuando se someten a centrifugación.

Este procedimiento se emplea cuando se trabaja con plásmidos pequeños, menores de 15 kpb. Es un método no recomendado para algunas cepas de *E. coli*, que se sabe que liberan

grandes cantidades de carbohidratos cuando se las coloca en presencia de detergentes, lisozima y calor. Los carbohidratos que no son eliminados de la solución de ADN plasmídico pueden inhibir las enzimas de restricción y las polimerasas. Este método tampoco es recomendado para el aislamiento de plásmidos de cepas de *E. coli* que expresan la endonucleasa A (*endA*<sup>+</sup>), porque la endonucleasa A<sup>+</sup> no es inactivada totalmente con el calor y el ADN plasmídico es degradado después en presencia de Mg<sup>2+</sup> (Sambrook y Russell, 2001).

Los pasos del método son los siguientes:

1.- Se pica una colonia con un palillo estéril y se inocula en un microtubo de 1.5 mL que contiene 1 mL de medio TB-antibiótico. Se incuban las colonias a 37°C con una agitación de 250 r.p.m. durante un tiempo mínimo de 6 hrs y un máximo de 24 hrs, con el fin de permitir el crecimiento de la bacteria. Cuando el antibiótico utilizado es el cloranfenicol el tiempo de crecimiento de la bacteria se incrementa alrededor de 10 horas.

2.- Después del crecimiento de las bacterias, éstas se recogen mediante una centrifugación a 5,000 r.p.m. (2,300 x g) en una centrífuga Eppendorf 5415C durante 3 minutos. Se desecha el sobrenadante y las células se resuspenden en 350 µL de STET, añadiéndose a continuación 10 µL de una solución de lisozima preparada en una concentración de 10 mg/mL en agua destilada estéril.

3.- Se mezcla durante 30 segundos por inversión y se sumerge en un baño de agua en ebullición durante 45 segundos. Las proteínas, restos celulares y el ADN cromosómico bacteriano se precipitan por centrifugación a 14,000 r.p.m. (18,000 x g) durante 10 minutos y se eliminan con la ayuda de un palillo estéril. El ADN plasmídico se precipita después de añadir 40 µL de acetato sódico 3 M pH 5.2 y 600 µL de isopropanol, mezclar y mantenerse a temperatura ambiente durante 15 minutos.

4.- El ADN plasmídico se centrifuga a 14,000 r.p.m. (18,000 x g) durante un tiempo de 5 minutos y el precipitado se lava con etanol al 70% (v/v). Tras desechar el etanol, el precipitado se seca y el ADN se resuspende en 30 µL de solución TE.

### 6.2.3.- MEGAPREPARACIONES.

Cuando el ADN plasmídico es extraído por lisis alcalina pueden presentarse problemas a la hora de tratar el ADN con endonucleasas de restricción, debido principalmente a la gran concentración de sales que están presentes con el ADN extraído por lisis alcalina. El ADN de las minipreparaciones no presenta los problemas antes mencionados, por lo que se ha escalado un método para extraer grandes cantidades de ADN por éste protocolo (Fernández, 1997).

Este método se utilizó cuando se necesitaba obtener grandes cantidades de ADN, pudiéndose obtener alrededor de 1-3 mg de ADN cuando se trabaja con plásmidos con un número de copias (Sambrook y Russell, 2001). Los pasos de este método se describen a continuación:

- 1.- Se inocula un matraz de 500 mL con 100 mL de medio TB-antibiótico, con una colonia de *E. coli* que contenga al plásmido que se quiere amplificar.
- 2.- El cultivo se incuba durante 12 hrs, aproximadamente, a 37°C y con una agitación de 250 r.p.m. Transcurrido el tiempo se recogen las células por centrifugación a 5,000 r.p.m. (2,350 x g) durante 3 minutos. Se desecha el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 6 mL de STET. Una vez resuspendidas las células se reparten en alícuotas de 350 µL en tubos Eppendorf de 1.5 mL.
- 3.- A cada tubo se le agregan 20 µL de una solución de lisozima con una concentración de 10 mg/mL. Se mezcla por inversión durante 30 segundos y se introduce a un baño de agua en ebullición durante 45 segundos.
- 4.- Las proteínas, restos celulares y el ADN cromosómico bacteriano se separan del ADN plasmídico por centrifugación a 14,000 r.p.m. (18,000 x g) durante 15 minutos, el precipitado se elimina con la ayuda de un palillo estéril.
- 5.- El ADN plasmídico se precipita tras añadir 40 µL de acetato sódico 3M pH 5.2 y 600 µL de isopropanol, se mezcla y se mantiene a temperatura ambiente durante 15 minutos. Este tiempo puede reducirse, debido a la gran cantidad de ADN obtenido por este método.
- 6.- El ADN se centrifuga a 14,000 r.p.m. (18,000 x g) durante 5 minutos y el precipitado se lava con etanol al 70% (v/v). Posteriormente se seca el precipitado y se resuspende en 100 µL de solución TE. Después de la resuspensión del ADN, se juntan todas las fracciones en un mismo tubo y se limpia el ADN mediante tratamientos con fenol (ver anexo 2).

## 6.2.4.- PURIFICACIÓN DEL ADN.

### 6.2.4.1.-ELIMINACIÓN DE ARN.

Una vez extraído el ADN, por cualquiera de los métodos antes descritos, es necesario eliminar el ARN que se encuentra junto con el ADN.

Para eliminar el ARN, el ADN extraído debe tratarse con una solución de ARNasa. Se agrega la cantidad suficiente para alcanzar una concentración final de 20-100  $\mu\text{g/mL}$ , incubando la reacción durante 90 minutos. Posteriormente se tiene que tratar con fenol para eliminar el ARN degradado, así como la ARNasa.

### 6.2.4.2.- ELIMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

Hay muchas proteínas que acompañan al ADN, algunas de ellas (proteasas, enzimas de restricción o endo y exonucleasa), pueden interferir de forma negativa con los procedimientos posteriores, por lo que es conveniente eliminarlas. Para ello se usa fenol neutro a pH de 7-7.8 (Sambrook y Russell, 2001). El protocolo se realiza como a continuación se describe:

- 1.- Se añade un volumen de fenol neutro a la solución de ADN, mezclando por inversión durante 5 minutos y centrifugando a 14,000 r.p.m. (18,000 x g) en una centrifuga Eppendorf 5415C durante el mismo tiempo.
- 2.- Se extrae la parte superior (fase acuosa, que es la que contiene el ADN) y se pone en un tubo limpio estéril, posteriormente se agrega un volumen de fenol-CIA (50% fenol y 50% CIA), se mezcla durante 4 minutos y se centrifuga durante el mismo tiempo a 14,000 r.p.m. Normalmente no son necesarias más de dos extracciones en este paso, pero debe quedar una interfase limpia.
- 3.- Por último se agrega un volumen de CIA, mezclando durante 3 minutos y centrifugando a 14,000 r.p.m. durante el mismo tiempo. Para precipitar el ADN se agrega 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).

## 6.3.- ELECTROFORESIS y EXTRACCIÓN DE ADN EN GELES DE AGAROSA.

El uso de la agarosa como material para la separación del ADN se remonta a mediados del siglo pasado (el primero en hacerlo fue Vin Thorne). Los trabajos de Thorne fueron tomados en cuenta a principios de los años 70 del siglo pasado con el inicio del uso de las

enzimas de restricción y la posibilidad de analizar fragmentos grandes de ADN. El uso del bromuro de etidio para la visualización del ADN en geles de agarosa se debe a Sharp *y col.*, (1973), quienes describieron la técnica que hasta hoy en día se sigue empleando. El primer equipo moderno de electroforesis fue desarrollado por Walter Schaffner (Sambrook y Russell, 2001).

La agarosa es un material que al fundirse y enfriarse forma una matriz (gel) que se estabiliza por puentes de hidrógeno. Los fragmentos de ADN se mueven a través de la matriz de agarosa bajo la influencia de un campo eléctrico, en el que las moléculas de ADN (cargadas negativamente bajo la influencia del pH del tampón de electroforesis) se dirigen hacia el ánodo. La velocidad de su movimiento depende casi exclusivamente del tamaño, siendo las moléculas más grandes las que menos migran. La concentración de agarosa en el gel determina el tamaño del poro, por lo que un determinado fragmento de ADN migrará de distinta forma en geles de concentraciones diferentes. Existe una relación directa entre el logaritmo de la movilidad del ADN y la concentración de agarosa en el gel para un cierto rango de tamaños de fragmento (Becker, 1999; Sambrook y Russell, 2001).

**Equipo:** cámara de electroforesis, cubeta de electroforesis, peine, fuente de poder, Tubos de 1.5 mL, lana de vidrio estéril, transiluminador de luz UV, Navaja tipo cutter, gradillas plásticas para tubos de 1,5 mL, micropipetas P2, P20, P200 y P1000 (Gilson) y puntas de plástico desechables para dichas pipetas.

### 6.3.1.- ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

Para realizar las pruebas electrofóreticas se usó el método descrito por Sambrook y Russell (2001), el cual consiste en los siguientes pasos:

1.- La cantidad de agarosa empleada para la elaboración del gel va a depender del tamaño del ADN que se quiera analizar; pudiendo ir la concentración de agarosa desde el 0.3 hasta el 2% (p/v).

**TABLA 6.** Concentración de agarosa utilizada en los geles de acuerdo al tamaño del ADN.

Concentración de Agarosa (% p/v)	Tamaño de los fragmentos de ADN
0.3	5-60 kpb
0.5	1-30 kpb
0.7	0.8-12 kpb
1.0	0.5-10 kpb
1.2	0.4-7 kpb
1.5	0.2-3 kpb
2.0	0.05-2 kpb

2.- Para elaborar el gel, la agarosa se disuelve en tampón TAE 1X, calentando hasta ebullición en un microondas. Una vez que la agarosa alcanza una temperatura aproximada de 45°C se vierte en el molde donde se solidifica el gel.

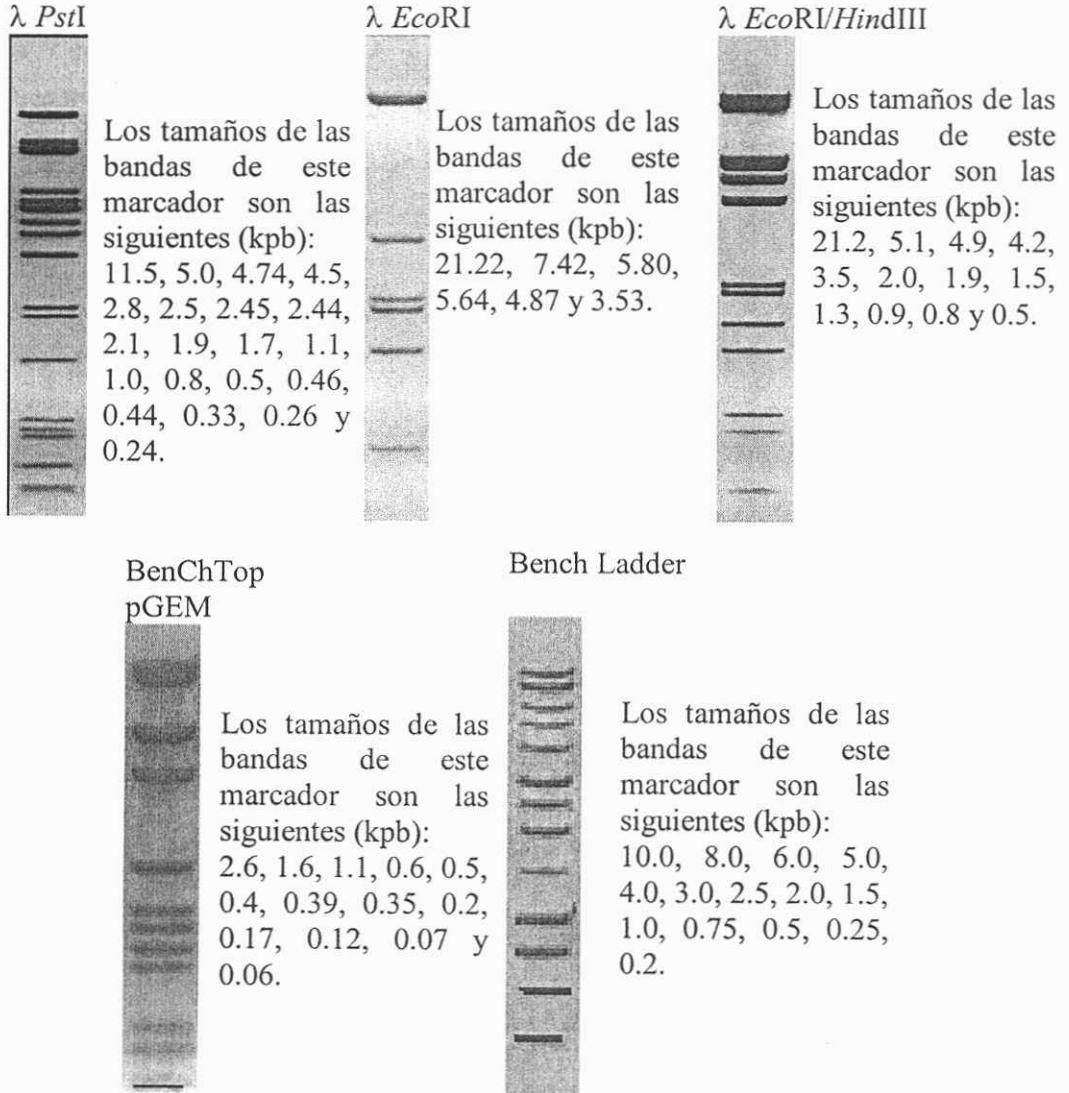
3.- A la muestra de ADN se le añade 1/10 de volumen de tampón de carga concentrado 6X, se calienta durante 10 minutos a 65°C (en un Thermomixer 5436 Eppendorf), enfriando posteriormente en un baño de hielo durante 3 minutos.

4.- El ADN se carga en el gel y la electroforesis se desarrolla usando como tampón TAE 1X o TBE 0.5X. Siempre se debe tener en cuenta que la carga eléctrica del ADN es negativa y por lo tanto migrará hacia el polo positivo. El voltaje que se aplica para el corrimiento electrofóretico es de 5 volts/cm, tomando como referencia la distancia que existe entre el polo positivo y el negativo en la cámara de electroforesis.

5.- La tinción del ADN se realiza en una solución de bromuro de etidio con una concentración final de 0.5 µg/mL. El bromuro de etidio se intercala entre las cadenas de ADN y al exponer éste a luz ultravioleta se genera fluorescencia detectable que permite visualizar el ADN.

6.- El ADN en los geles se visualizó con un transiluminador Gel-Doc (Bio-Rad 2000).

Los marcadores de tamaño que se usaron como referencia para determinar el tamaño del ADN plasmídico, o de fragmentos resultantes de cortes con enzimas de restricción, fueron cinco:  $\lambda$ EcoRI,  $\lambda$ HindIII y  $\lambda$ PstI, BenchTop pGEM y BenchTop Ladder, estos dos últimos de la marca Promega.



**Figura 5.** Marcadores de tamaño para ADN. Todos los marcadores fueron corridos en geles de agarosa al 0.7%.

### 6.3.2.- EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.

Para realizar esta tarea se usaron dos métodos, el sistema Qiaex II Gel Extraction Kit (Cat. No. 20021, Qiagen) y el de congelación y extracción por lana de vidrio.

#### 6.3.2.1.- EXTRACCIÓN POR QIAEX.

Este método se empleó cuando se requiría purificar fragmentos de tamaños inferiores a 500 pb. Se basa en la unión específica y reversible del ADN a partículas de sílica-gel. Se realizó siguiendo los siguientes pasos:

1.- Después de que se fotografía el gel, se procede a cortar la banda de interés del gel de agarosa. Dicho fragmento se deposita en un microtubo de 1.5 mL previamente pesado.

2.- A continuación se pesa el microtubo de 1.5 mL con el trozo de agarosa y dependiendo del peso del fragmento se le agrega al tubo la cantidad de tampón Qx1:

a.- Si el fragmento de ADN tiene un tamaño menor a 100 pb se añaden 6 volúmenes de este tampón por volumen de gel (ejemplo, por cada 100 mg de gel se agregan 600  $\mu$ L de tampón). El mismo volumen de tampón se añade cuando el gel contiene una concentración de agarosa superior al 2%.

b.- Para todos aquellos fragmentos con tamaños comprendidos entre 100 pb y 4 kpb se añaden 3 volúmenes de tampón QX1 por volumen de gel.

c.- Para fragmentos con tamaño superior a 4 kpb se agregan 3 volúmenes del tampón QX1 y dos volúmenes de agua destilada estéril por volumen de gel.

3.- Si después de agregar el tampón QX1 la coloración cambia del amarillo al violeta (esto ocurre cuando el pH de la reacción tampón-agarosa se encuentra por arriba de pH 7.5) se agregan 10  $\mu$ L de acetato sódico 3M pH 5.0, debido a que la unión ADN-sílicagel está mediada por el pH. Se resuspende la emulsión en la resina Qiaex2 mediante un vortex, durante 30 segundos. Al tubo con el trozo de agarosa y el tampón QX1 se le añaden 10  $\mu$ L de la emulsión QIAEXII (para cantidades de ADN superiores a los 2  $\mu$ g se deben agregar 30  $\mu$ L).

4.- Se mezcla bien con un vortex y se incuba a 50°C durante 10 minutos, mezclando cada 2 minutos.

5.- Se centrifuga la muestra durante 30 segundos a 14,000 r.p.m. (18,000 x g) en una centrífuga Eppendorf 5415C, eliminándose con mucho cuidado el sobrenadante. El precipitado



se lava con 500  $\mu$ L de tampón QX1, para eliminar los contaminantes de agarosa que queden en el tubo.

6.- Se centrifuga a 14,000 r.p.m. durante 30 segundos y se desecha el sobrenadante. El precipitado se lava con 500  $\mu$ L de Tampón PE. Se centrifuga a 14,000 r.p.m. durante 30 segundos y se lava con el mismo tampón. El precipitado obtenido se deja secar, tras eliminar el sobrenadante. El tiempo de secado no debe exceder de 15 minutos, ya que esto hace que el rendimiento disminuya. Si se usan 30  $\mu$ L de la suspensión Qiaex2 el tiempo de secado aumenta aproximadamente hasta 30 min. Los proveedores recomiendan no usar durante el proceso de secado una centrífuga de vacío.

7.- El ADN se eluye añadiendo 20  $\mu$ L de Tris HCl 10 mM pH 8.5 ó H<sub>2</sub>O estéril e incubando la solución, tras mezclarla en un agitador, en las siguientes condiciones:

- a) Fragmentos de ADN menores o iguales a 4 kpb: se incuba a temperatura ambiente durante 5 min.
- b) Fragmentos de ADN de entre 4 y 10 kpb: se incuba a 50°C durante 5 minutos
- c) Fragmentos de ADN mayores a 10 kpb: se incuban a 50°C durante 10 minutos

8.- Se centrifuga a 14,000 r.p.m. durante 30 segundos y se recoge el sobrenadante en un tubo limpio estéril. El sobrenadante contiene el ADN de interés, listo para ser usado. Si se quiere aumentar el rendimiento de la extracción se debe repetir el paso número 7.

#### **6.3.2.2.- EXTRACCIÓN POR CONGELACIÓN Y CENTRIFUGACIÓN CON LANA DE VIDRIO.**

Este método es rápido y sencillo y no requiere del uso de agarosa de bajo punto de fusión, aunque el porcentaje de recuperación no supera el 70% del ADN cargado en el gel (Polman y Larkin, 1989). El protocolo se describe a continuación:

- 1) A un microtubo de 1.5 mL se le realiza un orificio en el fondo y se agrega una pequeña porción de lana de vidrio estéril dentro del tubo, tratando de que la lana de vidrio tapone el orificio realizado. Una vez fotografiado el gel e identificada la banda que se quiere aislar, ésta se corta y se separa del gel poniéndola en el tubo que contiene la lana de vidrio.

- 2) El tubo, con el trozo de agarosa en su interior, se coloca a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos o  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, Transcurrido ese tiempo se centrifuga a 14,000 r.p.m. (18,000x g) durante 5 minutos en una centrifuga Eppendorf 5415C, colocándose debajo del tubo con el orificio un tubo sin perforar. El tampón que atraviesa la lana de vidrio contiene el ADN disuelto y será recuperado en el tubo inferior, mientras que la agarosa se queda retenida en la lana de vidrio. Después de la centrifugación se agregan 100  $\mu\text{L}$  de solución TE y se centrifuga de nuevo a 14,000 r.p.m. durante 1 minuto.

La solución obtenida se limpia con fenol-CIA y CIA y el ADN se precipita a  $-20^{\circ}\text{C}$  con un décimo del volumen final de acetato sódico 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol frío.

#### 6.4.- MANIPULACIÓN DEL ADN.

La manipulación del ADN es la base de la Ingeniería Genética, pudiendo unir fragmentos obtenidos con otros, cambiar algunas de las bases que lo componen o incluso amplificar y tener un gran numero de copias de fragmentos de ADN de nuestro interés.

La fragmentación del ADN se realiza por medio de enzimas de restricción, que reconocen secuencias específicas de nucleótidos en el ADN de doble cadena. En las células procarióticas, existen enzimas que funcionan de forma natural como un sistema que degrada todo aquél ADN foráneo que entra a la célula, no atacando el suyo propio (al contar con un sistema de metilacion que protege el ADN de la digestión con estas enzimas). La mayoría de las enzimas de restricción hidrolizan el ADN de un modo reproducible, en un punto concreto dentro de una secuencia de reconocimiento. Generalmente, enzimas diferentes reconocen secuencias diferentes, con una longitud promedio de 4 a 6 nucleótidos. Esta precisión en el corte es esencial en la manipulación del ADN (Becker, 1999).

**Equipo:** Guantes de látex, incubadora, vortex, tubos Eppendorf de 1.5 mL, centrífuga Eppendorf 5415C, gradilla plástica, Pipetas P2, P20, P200 y P1000 (Gilson) y puntas de plástico desechable para dichas pipetas.

### 6.4.1.- CORTE DEL ADN.

- 1.- Se coloca en un microtubo de 1.5 mL un décimo del volumen total de la reacción de digestión de ADN.
- 2.- Se agrega la cantidad necesaria de tampón para la enzima de restricción en cuestión, para obtener una concentración final de 1X.
- 3.- Se añade la cantidad de agua destilada o desionizada estéril necesaria para alcanzar el volumen final de reacción.
- 4.- Por último, se agrega una cantidad de enzima (de acuerdo a la cantidad de ADN que se quiera cortar). A continuación, el tubo se centrifuga durante 15 segundos a 14,000 r.p.m. (18,000 x g). Se mezcla en el vortex y se vuelve a centrifugar durante 4 segundos. El ó los tubos se incuban a la temperatura óptima de la enzima (normalmente 37°C), sin agitación, durante 3 horas.

Trascurrido el tiempo, se analiza una pequeña alícuota de la digestión (alrededor de 5 a 8  $\mu\text{L}$ ) en un gel de agarosa (la concentración de ésta dependerá del tamaño de los fragmentos que queramos visualizar en la prueba electroforética).

### 6.4.2.- RELLENADO.

1. Se disuelven de 1 a 2  $\mu\text{g}$  de ADN en un volumen de agua estéril que no rebase los 15  $\mu\text{L}$  y se añaden 2  $\mu\text{L}$  de tampón de reacción 10X para el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I.
2. Se agrega 1  $\mu\text{L}$  de una mezcla de nucleótidos 10 mM y a continuación se añaden 0.5 unidades del fragmento Klenow (es importante que la dilución del fragmento Klenow se realice en un tampón especial para la dilución de esta enzima).
3. Se mezcla bien y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente y la reacción se para calentándola a 65°C durante 10 min. Posteriormente, el ADN se limpia mediante tratamientos con fenol y se precipita agregando un décimo de volumen de acetato sódico 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol frío. Se incuba a -20°C durante un tiempo mínimo de 1 hora y posteriormente se centrifuga a 14,000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se desecha y el precipitado se lava con 600  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto al 70% (v/v). Tras secar el precipitado, el ADN está listo para usarse.

### 6.4.3.- LIGACIÓN.

La unión de dos o más fragmentos de ADN se da en presencia de la enzima ADN ligasa, la cual forma enlaces fosfodiéster entre el extremo 3' OH y el 5' P de las moléculas de ácidos nucleicos. *In vivo*, la ADN ligasa sirve para la síntesis completa de la cadena retrasada de ADN durante la replicación del ADN, estando también relacionada con la recombinación genética y la reparación del ADN (Gottesman *y col.*, 1973, Horiuchi *y col.*, 1975; Waga *y Stillman*, 1994). *In vitro*, tiene una amplia variedad de aplicaciones, como la unión de ADN a vectores de clonación o expresión, el rellenado de mellas en la creación de ADNc, la amplificación de segmentos por PCR inverso (Triglia *y col.*, 1988), la detección de mellas en el ADN por liberación de AMP (Weiss *y col.*, 1968), la detección de puntos de mutación en el ADN y en la reacción en cadena de la ADN ligasa (Landegren *y col.*, 1988; Wu *y Wallace*, 1989; Barany, 1991a *y b*; revisado por Sambrook *y Russell*, 2001). El protocolo seguido es el siguiente:

- 1) A 0.5 µg de ADN se le agrega una cantidad de agua destilada estéril que nos permita un volumen final de reacción de 20 µL, se mezcla y se coloca a 65°C durante 5 min. Cuando se quiere integrar un fragmento de ADN a un plásmido es conveniente añadir cuatro veces más inserto que vector, en una relación molar.
- 2) Después de calentar se enfría en un baño de hielo y se agregan 4 µL de tampón de reacción 5X (para alcanzar una concentración final de 1X) de la enzima que se vaya a utilizar. Cuando los extremos a unir son romos se agregan 5 unidades de ADN ligasa del bacteriófago T4, y 1 unidad cuando son extremos cohesivos, para que se lleve a cabo la reacción.
- 3) La reacción se mezcla bien y se mantiene a 14°C durante toda la noche. 5 µL de esta reacción son suficientes para realizar experimentos de transformación.

## 6.5.- REACCIÓN EN CADENA DE LA ADN POLIMERASA (PCR, por Polymerase Chain Reaction)

Este método fue propuesto a principio de los años 70 del siglo pasado por H. Ghobind Khorana y sus colegas, como una estrategia para eliminar el arduo trabajo en la síntesis química de genes. Después de 15 años, Kary Mullis y sus colegas lograron la amplificación de un fragmento de ADN usando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Saiki y col., 1985; Mullis y col., 1986; Mullis y Faloona 1987). El uso de polimerasas termoestables de *Thermus aquaticus* incrementó en un alto grado la eficiencia de la PCR y abrió el camino hacia la automatización del método (Saiki y col, 1988).

Esta técnica, universalmente empleada para la amplificación de ácidos nucleicos, se basa en el proceso natural de la replicación del ADN. Este método consta principalmente de 3 pasos, que se describen a continuación:

- a) *Desnaturalización*: para realizar la amplificación de un ADN necesitamos un fragmento de ADN blanco o molde, el cual debemos someter a una temperatura de 92 a 95°C con el fin de que las cadenas de ADN se separen y puedan hibridar los cebadores. Las hebras separadas se mantendrán disociadas hasta que la temperatura baje lo suficiente para que se dé el proceso de hibridación.
- b) *Hibridación de los cebadores*: los cebadores son oligonucleótidos sintéticos que se unen al ADN blanco en puntos distintos y son los que delimitan el fragmento que se quiere amplificar. Cada uno de los cebadores es complementarios a una de las cadenas del ADN blanco y su diseño es tal que quedan enfrentados por sus extremos 3' tras la unión a la molécula de ADN molde.

La asociación de los cebadores a la cadena de ADN blanco se ve favorecida sobre la renaturalización de la doble cadena de ADN, en el momento del descenso de la temperatura, por la mayor concentración de los dos cebadores. La temperatura óptima para la hibridación está determinada por la composición de nucleótidos de los dos cebadores (por esto es importante el equilibrio porcentual en la composición de los mismos).

- c) *Elongación a partir de los cebadores*: el último de los pasos consiste en la polimerización del fragmento que queremos amplificar. Las condiciones en las cuales

se desarrolla este proceso dependen de la ADN polimerasa empleada para la amplificación. El resultado de este proceso es una cadena de ADN que en sus extremos contiene las secuencias de los cebadores. La velocidad de elongación depende estrictamente de la enzima utilizada, de manera normal se necesitan 2 minutos de amplificación para una kpb.

En la técnica de reacción en cadena de la ADN polimerasa los tres pasos anteriormente descritos conforman un ciclo, el cual se repite de 20 a 30 veces a lo largo de un proceso completo de amplificación. A partir del tercer ciclo se empieza a acumular, en forma exponencial, el producto de interés. Esto es así porque, a medida que aumenta el número de ciclos, el producto amplificado pasa a ser también una molécula blanco a la que se unirán preferentemente los cebadores. Durante la reacción se obtienen también otros productos distintos, los denominados productos largos pero éstos no interfieren al no estar sujetos a la amplificación exponencial.

**Equipo:** Termociclador Eppendorf Mastercycler Personal, guantes de látex, tubos de plástico de 200  $\mu\text{L}$ , micropipetas P2, P20 y P200 (Gilson), y puntas de plástico desechables para dichas pipetas, gradillas de plástico, baño de hielo.

### 6.5.1.- PCR ESTANDAR

Para la amplificación de un fragmento de ADN se toma un microtubo de 200  $\mu\text{L}$ , el cual debe ponerse en un baño con hielo, y se le agregan los siguientes reactivos:

31.5 $\mu\text{L}$	H <sub>2</sub> O desionizada estéril
5 $\mu\text{L}$	Tampón de reacción
1.5 $\mu\text{L}$	Cloruro de magnesio 50 mM
1 $\mu\text{L}$	Mezcla de nucleótidos 10 mM
1 $\mu\text{L}$	Cebador no. 1 20 $\mu\text{M}$
1 $\mu\text{L}$	Cebador no. 2 20 $\mu\text{M}$
10 $\mu\text{L}$	ADN (aproximadamente 20-30 ng)
0.5 $\mu\text{L}$	DNA Polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ )

A continuación, el microtubo de 0.2 mL se mezcla bien mediante un vortex y se coloca en un termociclador Mastercycler Personal Eppendorf<sup>MR</sup> con el siguiente programa

Paso 1: 94°C	10 minutos
Paso 2: 94°C desnaturalización	1 minutos
Paso 3: 53°C hibridación	1 minutos
Paso 4: 72°C elongación	2 minutos

Del paso número 2 al 4 se repite de 20 a 30 veces. Después de terminada la amplificación, los productos se pueden identificar mediante electroforesis.

## 6.6.- MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.

La mutagénesis dirigida *in vitro* es una técnica invaluable para el estudio de la función estructural de proteínas, la identificación de aminoácidos y la modificación de vectores o de fragmentos de ADN de interés. Se han publicado múltiples aprovechamientos de esta técnica, pero el método generalmente requiere ADN de cadena sencilla como molde para la amplificación, lo que hace que este proceso se dificulte. El desarrollo de sistemas comerciales ha traído la solución a este problema, existiendo una amplia gama de productos en el mercado con los cuales se puede realizar mutagénesis dirigida con ADN de cadena doble, como es el caso del Kit Quick-Change<sup>TM</sup> de Stratagene (cat. 200516). La mayoría de los sistemas comerciales presentan las mismas alternativas en cuanto al tipo de mutación que se quiere realizar, ya sea eliminar, sustituir o añadir una sola base, un codón completo o una región de ADN relativamente grande.

**Equipo:** Termociclador Eppendorf Mastercycler Personal, guantes de látex, tubos de microcentrifuga de 200  $\mu$ L, centrifuga Eppendorf 5415C, micropipetas P2, P20 y P200 (Gilson), y puntas de plástico desechables para dichas pipetas, gradillas de plástico, baño de agua, palillos estériles, pipetas Pasteur, incubadora, baño maría, campana de flujo laminar.

La reacción se realiza de la siguiente manera (es muy importante homogenizar o mezclar las soluciones usadas en la reacción antes de su uso):

Tampón de reacción 10X	5 $\mu$ L
Cebador Iniciador	125 ng
Cebador Finalizador	125 ng
Mezcla de dNTP's	1 $\mu$ L
ADN	15-50 ng
Polimerasa <i>Pfu</i>	2.5 unidades
ddH <sub>2</sub> O	Llevar la reacción a 50 $\mu$ L

2.- Centrifugar durante 10 segundos, mezclar en vortex y volver a centrifugar durante 4 segundos. Colocar después en el termociclador.

3.- Se programa el termociclador con el siguiente programa:

1 ciclo	95°C	30 segundos
12-18 ciclos	95°C	30 segundos
	55°C	1 minuto
	68°C	2 minutos/cada kpb a amplificar

Para realizar el ajuste correcto, en cuanto al número de ciclos, es indispensable tener en cuenta qué tipo de mutación se quiere realizar.

Tipo de mutación	Número de ciclos
Eliminación de un par de bases	12
Cambio de un aminoácido	16
Eliminación de varios aminoácidos	18



- 3.- Una vez terminada la reacción, se debe enfriar la misma por debajo de los 4°C.
- 4.- Opcionalmente puede analizarse por electroforesis una alícuota de 10  $\mu\text{L}$ , para verificar la polimerización. De todas formas, si no se observa claramente ningún fragmento de ADN, debe continuarse con el protocolo de digestión y transformación.
- 5.- A la reacción completa de PCR se le agrega 1  $\mu\text{L}$  de la enzima de restricción *DpnI* (10 U/ $\mu\text{L}$ ), mezclando vigorosamente y centrifugando durante 4 segundos, incubándose posteriormente la reacción a 37°C durante 1 hora.
- 6.- Se adiciona 1  $\mu\text{L}$  de la reacción de digestión a 100  $\mu\text{L}$  de células competentes, mezclando el ADN y las células fuertemente e incubando en hielo durante 30 minutos.
- 7.- Se coloca la mezcla células-ADN en un baño de agua a 42°C durante 45 segundos e inmediatamente se coloca el tubo en hielo, manteniéndose así durante 2-3 minutos. Después de transcurrido este tiempo se adicionan 0.5-0.9 mL de medio NZY<sup>+</sup> y se incuba durante un tiempo máximo de 1 hora a 37°C, con agitación de 225-250 r.p.m.
- 8.- Se adiciona un pequeño volumen de la transformación en una caja de Petri con medio LA con el antibiótico, de acuerdo al plásmido con que se esté trabajando.
- 9.- Una vez que se obtiene un transformante debe confirmarse mediante el análisis de la secuencia de nucleótidos la presencia o ausencia de la mutación.

## 6.7. TRANSFORMACIÓN DE HONGOS.

### 6.7.1.- ELABORACIÓN DE ESPORAS ELECTROCOMPETENTES.

La electroporación es un método alternativo de transformación que ha sido probado en diferentes tipos de hongos (Sánchez y col., 1993; Vann, 1995; Xoconostle-Cazares y col., 1996). Sin embargo, el método en un principio fue reportado para *Aspergillus nidulans* y requería la elaboración de protoplastos. Sánchez y Aguirre (1998), reportaron la electroporación de esporas pregerminadas, obteniendo eficiencias de transformación similares a las obtenidas con protoplastos. Este método fue modificado durante el presente trabajo de Maestría, para su aplicación a *Penicillium chrysogenum*.

**Equipo:** Guantes de látex, tubos de centrifuga de 50 mL, tubos Eppendorf de 1.5 mL, matraz Erlenmeyer de 250 mL, incubadora, balanza granataria, centrifuga refrigerada Beckman Avanti™ 30, espátula, cajas de Petri, electroporador Gene-Pulser II o electroporador Eppendorf 2510, cubetas de electroporación de 0.1 y 0.2 cm (Bio-Rad), tubos de 10mL, campana de flujo laminar, micropipetas P2, P20 y P200 (Gilson) y puntas de plástico desechables para dichas pipetas

El procedimiento se describe a continuación:

- 1.- Se inocula una caja de Petri o matraz Erlenmeyer de 250 mL con 35 mL de medio Power con 1 mL de esporas de *Penicillium chrysogenum* (con una concentración aproximada de  $1 \times 10^8$  esporas/mL), extendiendo las esporas sobre la superficie de la caja o del matraz.
- 2.- Se incuban durante 8 días a 25°C, posteriormente se recogen las esporas con la ayuda de una espátula pequeña estéril o con un agitador magnético estéril, tratando de extraer las esporas de la superficie de la caja con movimientos lentos. La espátula con esporas es introducida en un tubo de 10 mL que contiene Tween 80 al 0.1% (v/v).
- 3.- Una vez que se tiene la solución de esporas, éstas se pasan por un filtro de gasa para eliminar los residuos del medio de cultivo u otras impurezas. A continuación se hace pasar por el filtro de gasa una pequeña cantidad de Tween 80 al 0.1%, para arrastrar algunas esporas que se hayan quedado atrapadas en la gasa.
- 4.- Se calcula la concentración de esporas que se tiene en la suspensión con la ayuda de una cámara de Neubauer.
- 5.- Una vez conocida la concentración de las esporas, éstas se pueden almacenar a -20°C con una concentración final de glicerol al 40% o bien pueden ser usadas inmediatamente.
- 6.- Si las esporas están conservadas en glicerol, éstas se deben lavar con solución de lavado tres veces, antes de su utilización. Cada lavado se realiza a 6,418 r.p.m. (3,500 x g) en una centrifuga Beckman Avanti™ 30 con el rotor F1010, a una temperatura de 4°C. Una vez terminado el lavado se resuspenden las esporas en 1 mL de medio Czapeck líquido y se inoculan en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 40 mL del mismo medio, tratando de obtener una concentración final de  $1.35 \times 10^6$  esporas/mL.
- 7.- Se incuba durante 6 horas a 37°C y 300 r.p.m., centrifugándose a 6,040 r.p.m. (3,100 x g) en un rotor Beckman Avanti™ F1010 durante 10 minutos a 4°C.

8.- Se procede a realizar un tratamiento con solución de lavado y se centrifuga en las mismas condiciones antes mencionadas.

9.- Las esporas son resuspendidas en 25 mL de medio YED en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. El matraz se incuba a 30°C durante 1 hora con una agitación de 100 r.p.m.

10.- Se recogen las esporas por centrifugación a 4°C y 6,040 r.p.m. durante 10 minutos, se desecha el sobrenadante y se agregan 30 mL de solución de lavado. Se vuelve a centrifugar a 4°C y 6,040 r.p.m., repitiéndose este proceso dos veces más.

11.- Las esporas son resuspendidas en 650  $\mu$ L de tampón de electroporación, para obtener una concentración final de  $1 \times 10^6$  esporas/mL. Se reparten en alícuotas de 50  $\mu$ L en microtubos de 1.5 mL.

#### 6.7.2.- ELECTROPORACIÓN DE *Penicillium chrysogenum*.

La electroporación es un método físico, en el cual se aplica al organismo a transformar un alto voltaje durante un tiempo muy corto, con el objetivo de provocar la formación de poros a nivel de pared celular. Este método es empleado para la transformación de organismos eucarióticos y procarióticos con fragmentos de ADN de gran tamaño. Los pasos a seguir para llevar a cabo la transformación de *Penicillium chrysogenum* son los siguientes:

1.- Se agrega una cantidad de ADN de 50-1000 ng a 50  $\mu$ L de esporas electrocompetentes, se mezcla vigorosamente para tratar de homogenizar la suspensión y se incuba en hielo durante 30 minutos.

2.- Transcurrido este tiempo, la mezcla ADN-esporas electrocompetentes se pasa a una cubeta de electroporación de 0.1 cm previamente enfriada, tratando de no dejar burbujas (ya que éstas reducen la eficiencia de transformación).

3.- La cubeta es insertada en el electroporador Gene Pulser II (Bio Rad, previamente programado a 250 voltios y 25  $\mu$ F de capacitancia), e inmediatamente después se proporciona la descarga eléctrica.

4.- A continuación se agrega a la cubeta de electroporación 1 mL de medio YED frío (4°C), tratando de mezclar lo mejor posible. El medio es pasado a continuación a un microtubo de 1.5 mL e incubado durante 15 minutos en hielo.

5.- Las esporas electrocompetentes transformadas son incubadas durante 90 minutos a 30°C y 100 r.p.m.

6.- Pasado este tiempo una alícuota de la transformación es puesta en el fondo de un tubo de 10 mL, se coloca en la boca del tubo la cantidad adecuada de antibiótico<sup>2</sup>. Con mucho cuidado se agrega a continuación el medio Czapecck a una temperatura de 45°C, tratando de bajar hacia el fondo del tubo el antibiótico con el mismo medio de cultivo. Se cierra el tubo y se procede a mezclar lentamente para no formar burbujas, vertiendo el medio en una caja de Petri de 50 mm nivelada.

7.- Las cajas son incubadas a 30°C durante 2 a 3 días.

## 6.8.- REACTIVOS, SOLUCIONES Y CEPAS.

### 6.8.1.- CEPAS:

#### 6.8.1.1.- CEPAS BACTERIANAS.

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1983). Cepa bacteriana empleada para la transformación, debido principalmente a la alta eficiencia que puede conseguirse con su uso (5 x 10<sup>8</sup> transformantes por microgramo de ADN). Entre sus características más sobresalientes está la de poseer una deleción en el gen Z del operón *lac*, que hace que se puedan seleccionar fácilmente con ella aquellos transformantes que posean un plásmido capaz de originar la  $\alpha$ -complementación de dicha mutación. Adquirida de Invitrogen<sup>TM</sup> (# Cat. 18263-012).

**Genotipo:** F<sup>-</sup>  $\phi$ 8 $\alpha$ lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$  (*lacZYA-argF*) U169 *deoR recA1 end A1 hsdR17* ( $r_K^-$ ,  $m_K^+$ ) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1*  $\lambda^-$ .

*Escherichia coli* XL1-Blue MR. Cepa utilizada para la transformación por el método de electroporación, pudiéndose obtener con ella eficiencias de 1 x 10<sup>10</sup> transformantes por  $\mu$ g de ADN. Adquirida con el SuperCos<sup>®</sup> I Cosmid Vector Kit (cat. # 251301) de Stratagene.

**Genotipo:** (*mcrA*) 183 (*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac*.

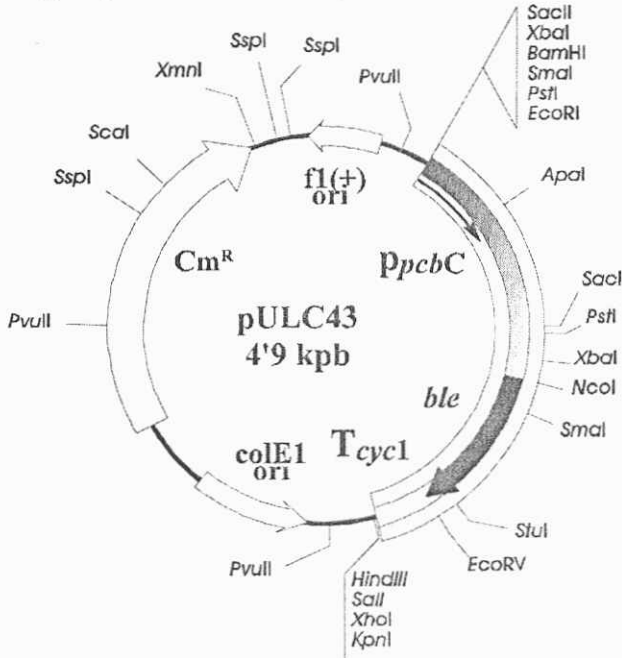
<sup>2</sup> Para el caso de *Penicillium chrysogenum* la concentración mínima inhibitoria es de 40  $\mu$ g de fleomicina/mL.

### 6.8.1.2.- CEPAS FÚNGICAS.

*Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255. Cepa silvestre de baja producción de penicilina (600 µg/mL). Obtenida de la Universidad de León, España.

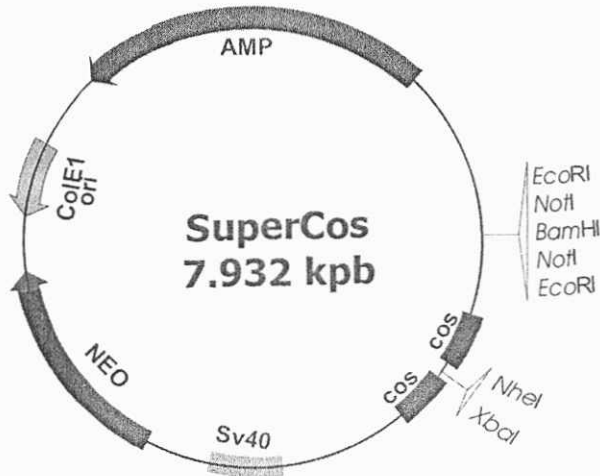
### 6.8.2.- VEHÍCULOS DE CLONACIÓN:

**pULC43.** Plásmido de 4.9 kpb, derivado del pBluescript SK de Stratagene construido por S. Gutiérrez en la Universidad de León, España. Contiene el gen de resistencia a cloranfenicol, origen de replicación para *E. coli*, origen de replicación para fagos filamentosos y el gen de resistencia a fleomicina de *Streptoalloteichus hindustanus* bajo el control del promotor del gen *pcbC* de *Penicillium chrysogenum* y la región terminadora de la transcripción del gen *cycl* de *Saccharomyces cerevisiae*.



**Figura 6.** Plásmido pULC43. *ColE1*: origen de replicación para *E. coli*; *Orif1*: origen de replicación para bacteriófagos filamentosos, sirve para obtener ADN de una sola hebra; *Cm<sup>R</sup>*: gen que confiere resistencia al cloranfenicol; *ble*: gen que confiere resistencia a la fleomicina; *PpcbC*: promotor del gen *pcbC* de *Penicillium chrysogenum*; *Tcycl*: terminador del gen *cycl* de *Saccharomyces cerevisiae* (Fernández, 1997).

**SuperCos<sup>®</sup> I.** Cósmido de 7.9 kpb, que contiene un origen de replicación para *E. coli*, un origen de replicación para células de mamíferos, un gen de resistencia a neomicina y un gen de resistencia a ampicilina. Tiene una zona de clonación flanqueada por los promotores del fago T3 y T7 y contiene dos secuencias *cos*. Este cósmido fue adquirido como parte del SuperCos<sup>®</sup> I Cosmid Vector Kit (cat. # 251301) de Stratagene.



**Figura 7.** Cósmido SuperCos<sup>®</sup>. *ColE1*: origen de replicación para bacterias; *AMP*: gen que confiere resistencia a ampicilina; *NEO*: gen que confiere resistencia a neomicina, marcador empleado en células de mamífero; *SV40*: origen de replicación para células de mamífero; *cos*: secuencias provenientes de bacteriófago, que tienen la función de permitir el empaquetamiento *in vitro* y que dan el nombre a este tipo de vehículos de clonación.

### 6.8.3.- MEDIOS DE CULTIVO.

#### 6.8.3.1.- MEDIOS PARA BACTERIAS

Los medios empleados en este trabajo para el cultivo de *E. coli* fueron: el medio LB, NZY+Broth, SOB y TB (para una mayor descripción de estos medios, ver el anexo 1).

### **6.8.3.2.- MEDIO DE CULTIVO PARA HONGOS.**

Los medios empleados se utilizaron para crecer a *Penicillium chrysogenum*, entre estos medios tenemos: el medio Czapeck, Power y YED (para una mayor descripción de estos medios, ver el anexo 1).

### **6.8.4.- SOLUCIONES.**

Pasar al anexo 2.

### **6.8.5.- REACTIVOS:**

Ir al anexo 3.

### **6.8.6.- APARATOS.**

Ver el anexo 4.

---

## VII.- RESULTADOS.

### 7.1.- MUTACIÓN DEL PLÁSMIDO pULC43.

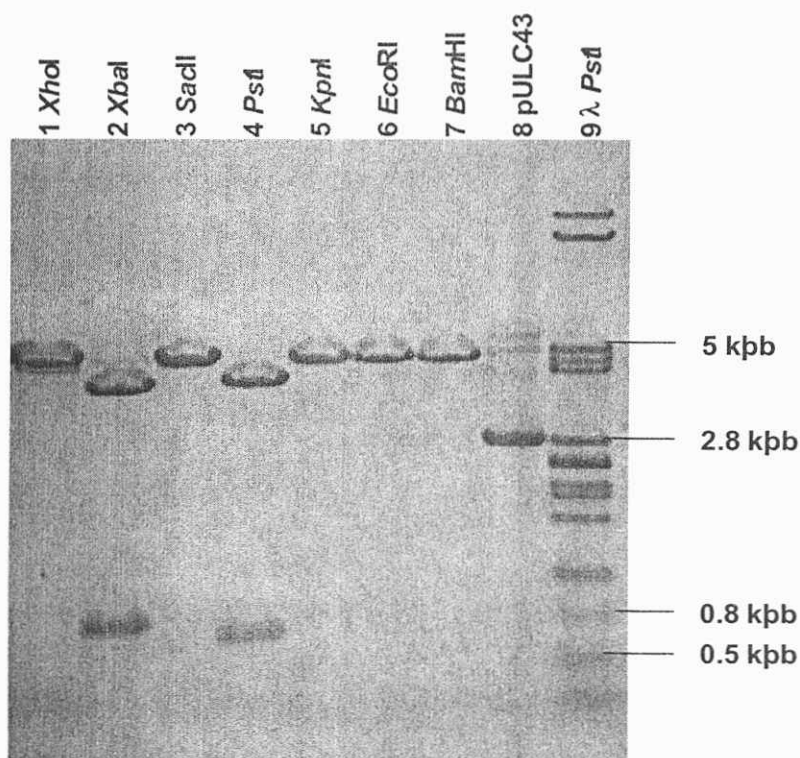
En la mayoría de las ocasiones, la construcción de un nuevo vehículo de expresión y clonación parte de los vehículos ya existentes. Nuestro caso no es la excepción y la base para construir el nuevo cósmido fue el plásmido pULC43 (Fernández, 1997), aunque existían ciertos sitios de reconocimiento y corte para endonucleasas de restricción en el plásmido que eran indeseables para llevar a cabo el proceso.

El plásmido pULC43 es interesante para usarlo como base del cósmido por las características que presenta. El plásmido pULC43 presenta marcadores de selección ideales para trabajar con hongos filamentosos; el cloranfenicol, que es el marcador de selección para bacterias, es de gran utilidad para seleccionar cada uno de los transformantes que se obtendrían. La presencia de una beta lactamasa activa (como podría ocurrir con el uso de los marcadores habituales de resistencia a ampicilina) no era recomendada en este caso, al poder ser una aplicación directa del cósmido su utilización en el mejoramiento de la producción de antibióticos del tipo beta-lactámicos. El gen de resistencia a fleomicina (*ble*), que es el marcador de selección de hongos, es un elemento funcional de suma importancia por lo que los cambios a realizar en el promotor (PpcbC) que expresa este gen tenían que abordarse con una estrategia que ocasionara un cambio mínimo en la secuencia nucleotídica y en la funcionalidad de dicho promotor. La mutagénesis dirigida era, por lo tanto, la mejor opción. La comprobación de las mutaciones se realizó de forma rápida y sencilla, ya que bastó digerir el ADN de los transformantes con cada una de las endonucleasas (según fuera el caso de que se tratara), para poder identificar qué transformantes habían perdido el sitio de corte para la endonucleasa en cuestión.

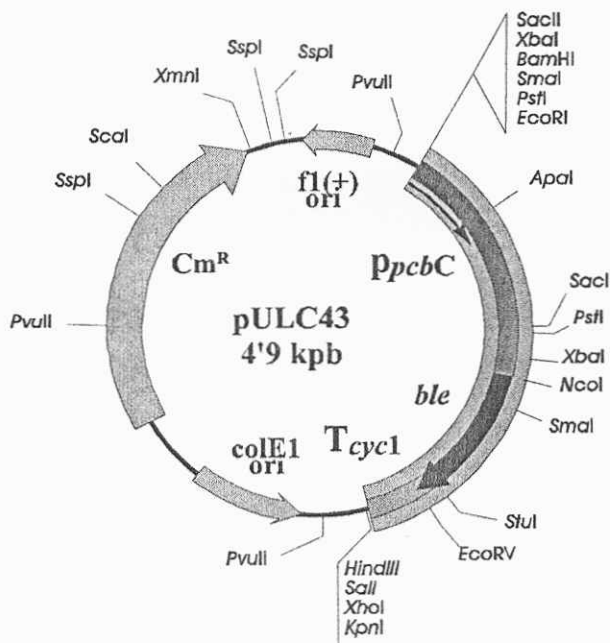


### 7.1.1.- AMPLIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO pULC43.

Para poder realizar la mutación del plásmido se necesitaba una cantidad considerable de ADN plasmídico. Por ello, se amplificó el plásmido transformándolo en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  e incubándolas en medio de cultivo líquido con cloranfenicol. Una vez extraído el ADN y purificado, éste se puso a digerir con varias endonucleasas de restricción. Terminada la reacción, se realizó la electroforesis en gel de agarosa para comprobar que el plásmido poseía los cortes teóricamente esperados (figura 8A).



**Figura 8A.** Análisis electroforético del plásmido pULC43 con varias endonucleasas de restricción. Los cortes con las distintas endonucleasas aparecen en los carriles enumerados del 1 al 7. El carril 8 contienen el plásmido sin digerir (pueden apreciarse las tres conformaciones del mismo). El marcador de tamaño aparece en el último carril.



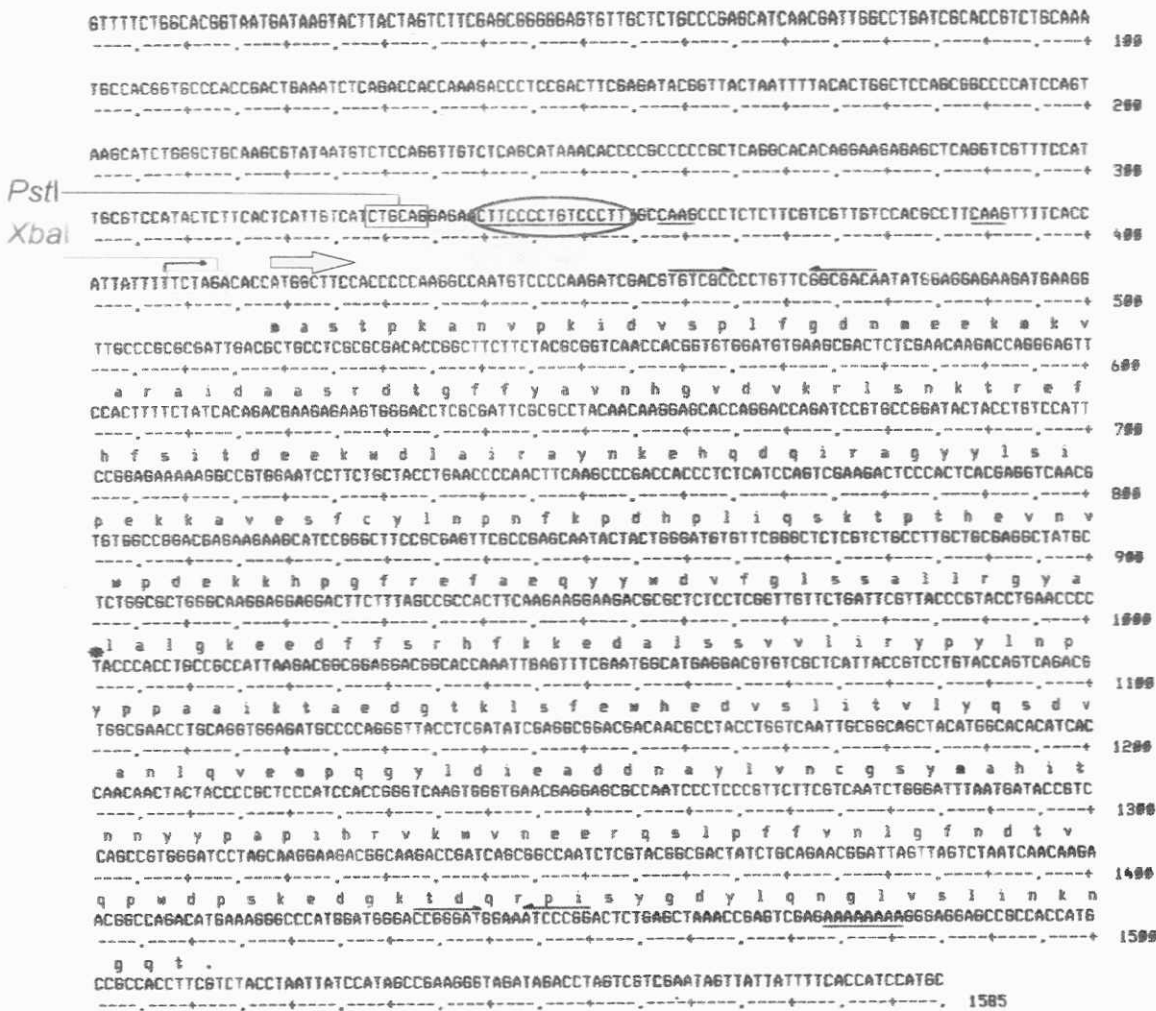
**Figura 8B.** Mapa de restricción simplificado del plásmido pULC43. *ColE1*: origen de replicación para *E. coli*; *Orifl*: origen de replicación para bacteriófagos filamentosos, sirve para obtener ADN de una sola hebra; *Cm<sup>R</sup>*: gen que confiere resistencia al cloranfenicol; *ble*: gen que confiere resistencia a la fleomicina; *PpcbC*: promotor del gen *pcbC* de *Penicillium chrysogenum*; *Tcyc1*: terminador del gen *cyc1* de *Saccharomyces cerevisiae* (Fernández, 1997).

Como se observa en la figura 8A, el número de cortes obtenidos en el gel para cada una de las endonucleasas de restricción utilizada coincide totalmente con el número de cortes indicados en el mapa de restricción del plásmido (figura 8B). Para el caso de las endonucleasas de restricción *XhoI*, *SacII*, *KpnI*, *EcoRI* y *BamHI* sólo se generó una banda, mientras que cuando se emplearon las endonucleasas de restricción *XbaI* y *PstI* se generaron dos bandas (figura 8A).

## 7.1.2.- MUTAGÉNESIS DEL PLÁSMIDO pULC43.

### 7.1.2.1- MUTAGÉNESIS DIRIGIDA PARA EL SITIO DE CORTE *Pst*I DEL PLÁSMIDO pULC43.

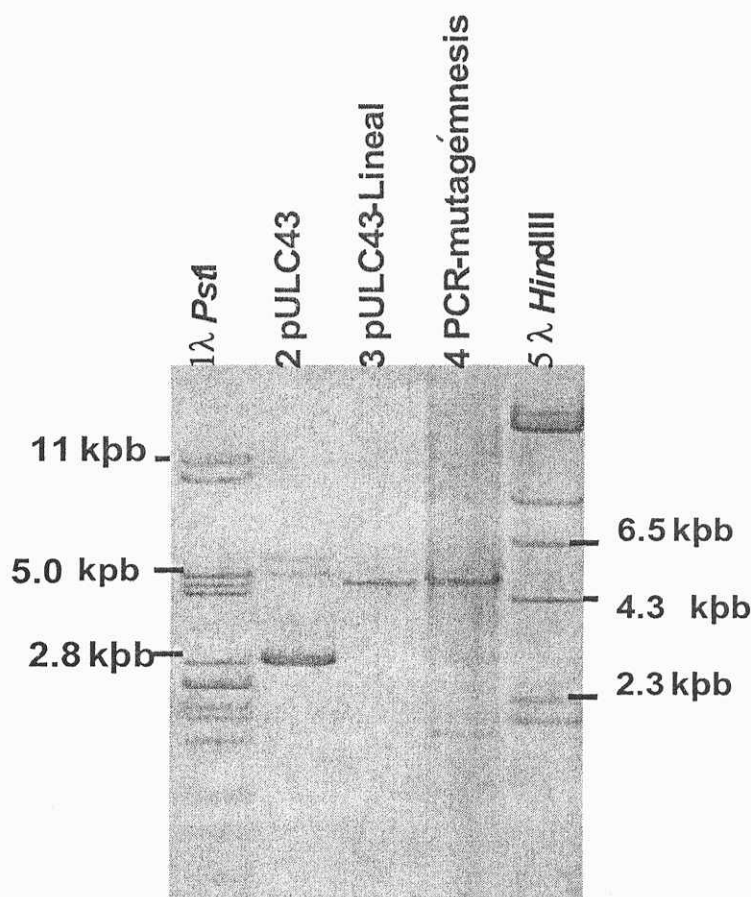
Para la construcción del cósmido (ver figura 28) se requiere que el plásmido de partida no posea sitios de reconocimiento y corte para las endonucleasas de restricción *Pst*I y *Xba*I (la construcción final exigía que el plásmido tuviese como máximo un solo sitio de corte para la enzima de restricción *Pst*I, y éste debía estar ubicado en el policonector). Sin embargo, en el promotor que se utiliza en el plásmido pULC43 para expresar en hongos el gen de resistencia a fleomicina aparecen los dos tipos de secuencia. Deben ser eliminados, pero una estrategia sencilla como la digestión y el rellenado pueden traer como consecuencia la alteración de la eficiencia del promotor, lo que traería consigo una menor eficiencia (e incluso la eliminación) del marcador de selección. Esta posibilidad se veía reforzada porque uno de los sitios de corte (el correspondiente a *Xba*I) se encontraba muy cerca del inicio del gen de resistencia a fleomicina (*ble*) y el otro (el correspondiente a *Pst*I) se encontraba junto a una región rica en pirimidinas (figura 9), importante para la transcripción (Barredo *et al.*, 1989). Esto llevó a contemplar una estrategia de mutagénesis dirigida (kit Quick Change), diseñando la eliminación de los sitios de corte (sin alteración de tamaños o distancias en el ADN circundante) mediante sustituciones puntuales en cada uno de los sitios de corte para las enzimas de restricción.



**Figura 9.** Secuencia nucleotídica del promotor *PpcbC*. La flecha amarilla indica el sitio de inicio el gen de resistencia a fleomicina (*ble*). El rectángulo azul enmarca al sitio de corte para la endonucleasa *PstI* y el círculo en color verde contiene una secuencia rica en pirimidinas.

En la figura 9 se observa que el sitio de corte para la endonucleasa de restricción *XbaI* está a sólo 4 bases corriente arriba del inicio del gen, por lo que este punto puede ser importante para la transcripción del mismo. La importancia del sitio de corte para *PstI* radica en que a 6 pares de bases corriente arriba de él existe una secuencia rica en pirimidinas, importante para la transcripción.

Para eliminar el corte *Pst*I se diseñaron los siguientes cebadores: PstA, cuya secuencia nucleotídica es la siguiente: 5'-GTC ATC **TGC AC**\*G AGA ACT TCC-3 y PstB, cuya secuencia es: 5'-GGA TGT TCT **CG**\*T **GCA GAT** GAC-3'. La base que se cambió es la que aparece en cursiva y con un asterisco, mientras que las letras en negrita son las bases que componen la secuencia de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *Pst*I. Después de realizarse la reacción de PCR, el producto de la amplificación fue sometido a electroforesis en gel de agarosa (figura 10).

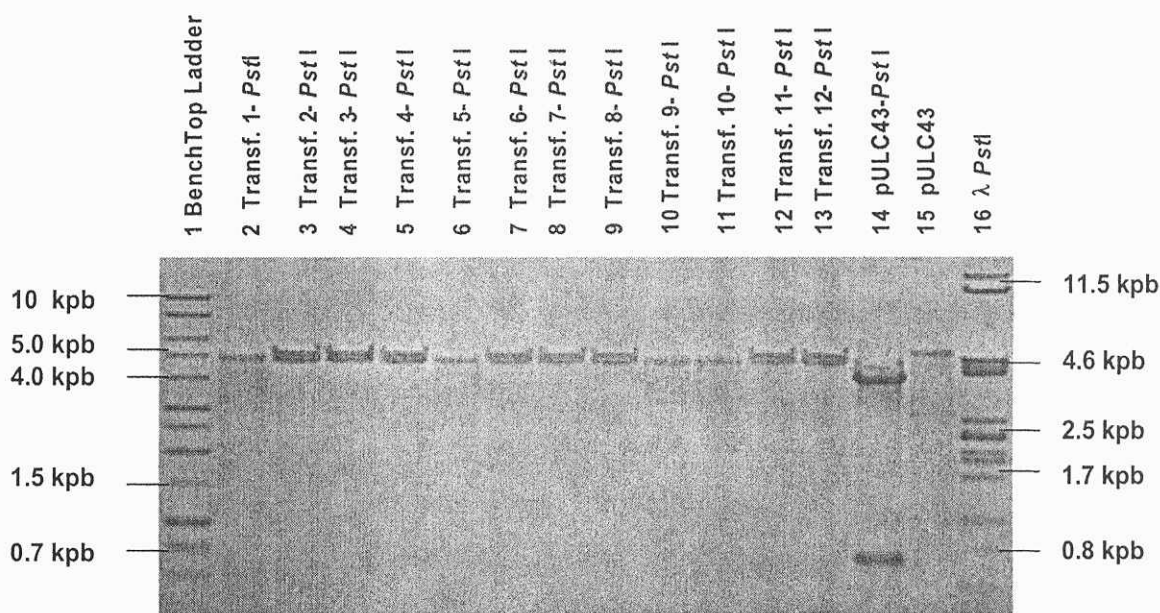


**Figura 10.** Electroforesis del producto de PCR realizado para la mutagénesis dirigida que elimina el sitio de corte para la endonucleasas de restricción *Pst*I.

En la figura 10 carril 4 podemos observar que la polimerización en la reacción de PCR fue correcta, por lo que el producto del PCR se digirió con la endonucleasa de restricción *Dpn*I responsable de seleccionar sólo las moléculas amplificadas en la reacción de PCR

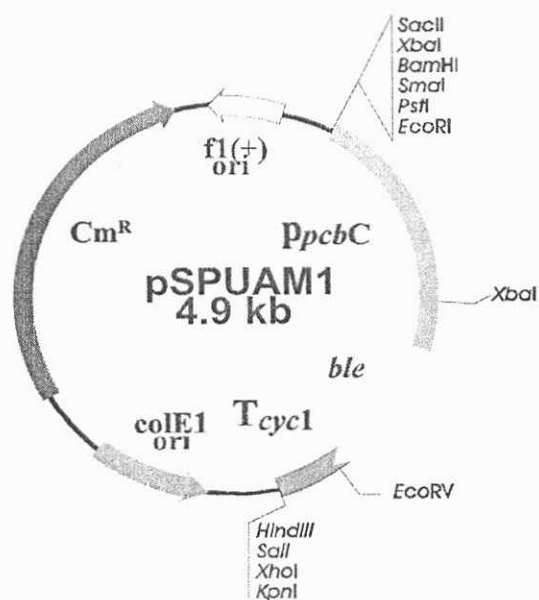
(presuntamente, mutadas). *DpnI* usa como sustrato el ADN metilado y el ADN empleado como molde en la reacción de PCR es una molécula metilada. Al tratarse el producto de PCR con esta enzima se eliminan, por lo tanto, las moléculas usadas como molde por lo que sólo nos quedan moléculas de ADN producto de la polimerización debida a la reacción en cadena de la ADN polimerasa.

Terminada la digestión con la enzima *DpnI* se procedió a transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , seleccionándose al azar 15 transformantes. Se extrajo el ADN plasmídico de los mismos y se procedió a digerirlo con la endonucleasa de restricción *PstI*. Los transformantes que interesaban eran aquellos que sólo presentaran un solo sitio corte para esta endonucleasas (el correspondiente al policonector localizado al principio del modulo de resistencia a fleomicina). Los resultados de la digestión se analizaron en electroforesis en gel de agarosa al 0.7% (figura 11).



**Figura 11.** Análisis electroforético de los transformantes mutados en el sitio de corte *PstI*. Los transformantes digeridos con *PstI* se localizan del carril numero 2 al 13, en el carril 14 observamos al plásmido sin mutar (que presenta dos sitios de corte para *PstI*), el carril numero 15 corresponde al plásmido sin digerir y en los carriles de los extremos aparecen los marcadores de tamaño.

En la figura 11 se observa que los 15 transformantes seleccionados al azar presentan sólo un sitio para la endonucleasa de restricción *PstI*, por lo que han incorporado la mutación que se pretendía, eliminándose el sitio de reconocimiento y corte para *PstI* que se localizaba dentro del promotor *PpcbC*. Al plásmido mutado se le nombró pSPUAM1 y su mapa se muestra a continuación (figura 12).



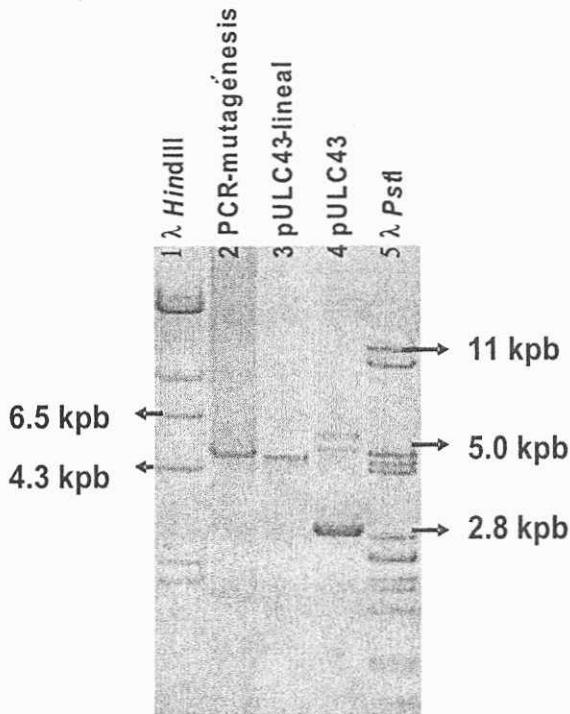
**Figura 12.** Mapa parcial de restricción del plásmido pSPUAM1.

### 7.1.2.2- MUTAGÉNESIS DIRIGIDA PARA EL SITIO DE CORTE *XbaI* DEL PLÁSMIDO pSPUAM1.

Como se mencionó anteriormente, el protocolo de construcción del vector obligaba también a la eliminación del sitio de reconocimiento y corte para la endonucleasa *XbaI* del promotor *PpcbC*. Para este fin, se siguió la misma estrategia metodológica que para el caso anterior, provocándose la sustitución de uno de los nucleótidos que conforman al sitio de reconocimiento de la enzima. Se diseñaron dos cebadores:

Al primero se le nombró XbaA y su secuencia es: 5'-CCA TTA TTT TA\***C** TAG ACA CCA-3' y el segundo XbaB, 5'-TGG TGT\***C**TA GTA AAA TAA TGG-3'.

Las letras en **negrita** son las bases que normalmente reconoce la endonucleasa de restricción *Xba*I, la letra en *cursiva y con asterisco* señala la base que se cambió. Estos cebadores se emplearon junto con el sistema Quick Change (Stratagene). Terminada la reacción de polimerización, el producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa, mostrándose los resultados en la figura 13. En dicha figura, en el carril 2, podemos comprobar que se dio una polimerización correcta, ya que observamos una banda bien definida a la altura de 4.9 kpb (el tamaño original del plásmido pSPUAM1).

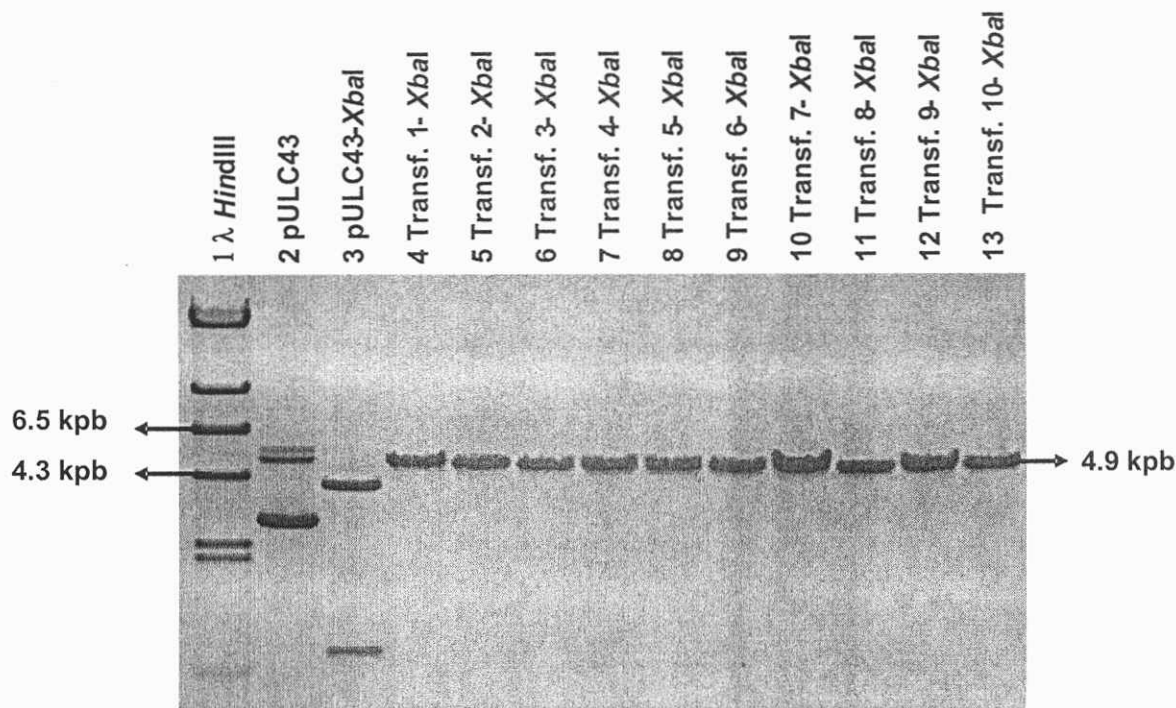


**Figura 13.** Análisis electroforético del producto de la mutagénesis dirigida para eliminar el sitio de corte para la endonucleasa *Xba*I del promotor *PpcbC* contenido en el plásmido pSPUAM1. En el carril número 2 se muestra el producto de la mutagénesis, en el carril 3 se muestra el plásmido en su forma lineal y en el carril 4 se muestra al plásmido pSPUAM1 sin digerir (se observan sus tres formas estructurales: circular abierta, lineal y superenrollada).

Una vez comprobada la polimerización, el producto de PCR fue digerido con la endonucleasa *Dpn*I, como en el caso anterior. Terminada la reacción de digestión con la enzima *Dpn*I se procedió a transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ ; de los

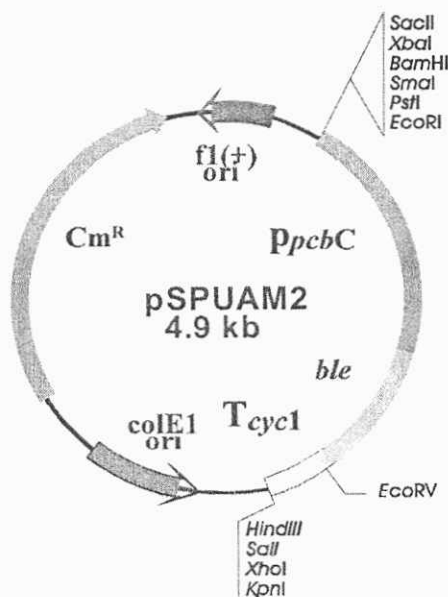


transformantes resultantes solo se seleccionaron al azar 10 de ellos. A cada uno de los transformantes se les extrajo el ADN plasmídico, que se puso a digerir con la endonucleasas de restricción *Xba*I. Los resultados de estas digestiones se comprobaron en electroforesis en gel de agarosa, los resultados se muestran a continuación (figura 14).



**Figura 14.** Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.7% del ADN plasmídico de cada uno de los transformantes mutados en el sitio de corte para la enzima *Xba*I del promotor *PpcbC* contenido en el plásmido pSPUAM1 y digeridos con *Xba*I. En el carril 1 se incluyó un marcador de tamaño, en el carril 2 se observa el plásmido pSPUAM1 sin digerir, en el carril 3 se muestra el plásmido pSPUAM1 digerido con la endonucleasas *Xba*I (podemos comprobar que dicha enzima corta este plásmido en dos sitios), en el carril 4 al 13 se muestran los transformantes digeridos con la enzima *Xba*I.

En este caso también se debía seleccionar sólo los transformantes que presentaran un solo sitio de corte para la endonucleasas de restricción *Xba*I. Como vemos en el gel de agarosa de la figura 14, todos los transformantes elegidos presentaron esta característica. A este plásmido mutado se le nombró pSPUAM2 y su mapa se muestra a continuación.



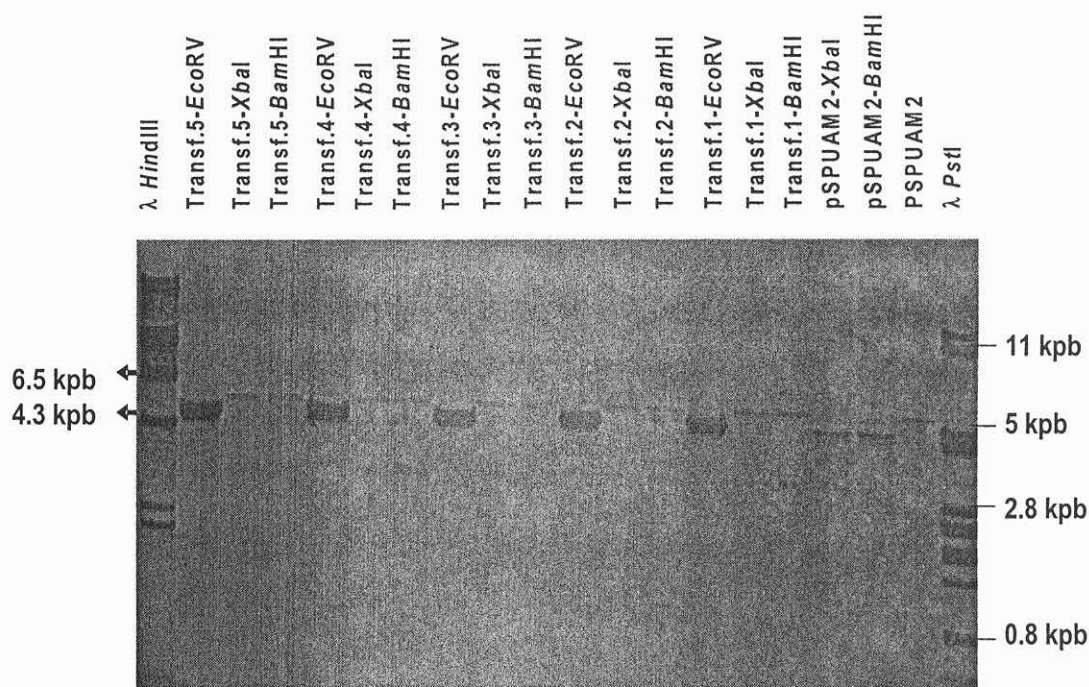
**Figura 15.** Mapa parcial de restricción del plásmido pSPUAM2.

### 7.1.2.3- ELIMINACIÓN DE LOS SITIOS DE CORTE PARA *Xba*I y *Bam*HI DEL PLÁSMIDO pSPUAM2.

Una vez eliminados los cortes *Pst*I y *Xba*I del promotor *PpcbC*, debíamos eliminar los sitios de cortes para las enzimas *Xba*I y *Bam*HI del plásmido pSPUAM2. Estos sitios de corte aparecen también en el fragmento de ADN que se unirá posteriormente con este plásmido, y se necesita que una vez unidos los dos fragmentos de ADN exista un solo sitio de corte para estas dos enzimas de restricción.

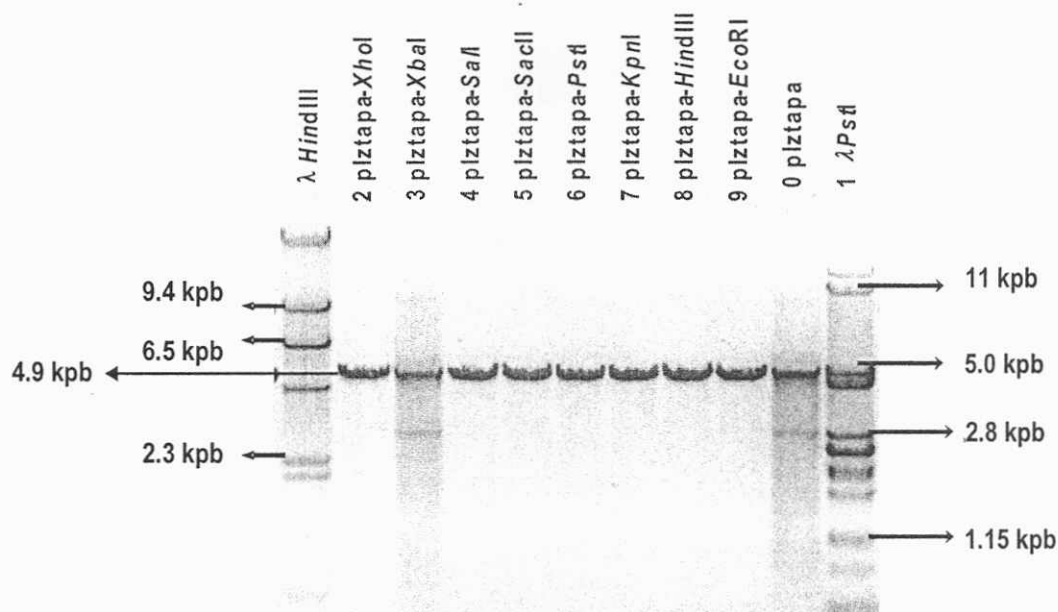
La eliminación de estos cortes no representa ninguna complicación de carácter funcional (como en el caso de la eliminación de los sitios de corte del promotor), por lo que se decidió eliminarlos mediante digestión y posterior rellenado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (posibilidad factible dejar las dos enzimas extremos 5' protuberantes). Además, al encontrarse juntos los dos sitios de corte el trabajo de eliminación de los cortes se

hizo en un sólo paso. Se digirió el plásmido pSPUAM2 con las dos enzimas y posteriormente se incubó con el fragmento Klenow en presencia de nucleótidos. Una fracción de la ligación se empleó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  y de los transformantes obtenidos se seleccionaron al azar cinco de ellos. A cada uno de los transformantes seleccionados se les extrajo el ADN plasmídico. Para comprobar la doble eliminación de los sitios de corte en el plásmido, se procedió a realizar digestiones del ADN de cada uno de los transformantes seleccionados con las endonucleasas *EcoRV*, *Bam*HI y *Xba*I. Se suponía que las dos últimas endonucleasas no debían de cortar el ADN plasmídico, mientras que *EcoRV* sirve como un control positivo de la calidad del ADN (esperándose un único corte según el mapa de restricción del plásmido). El resultado se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% (figura 16).

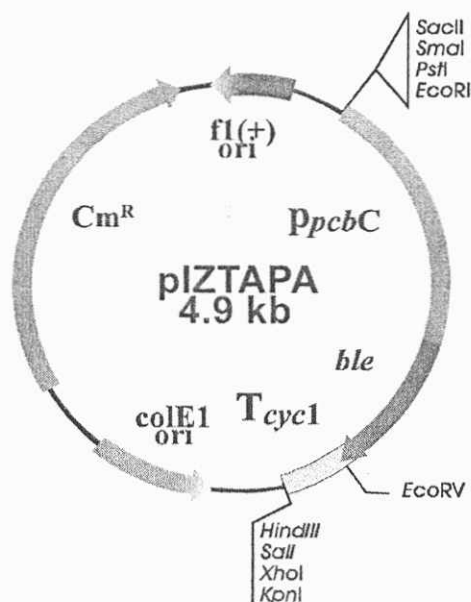


**Figura 16.** Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.7% del ADN plasmídico de los transformantes a los que se les eliminaron los sitios de corte para las endonucleasas de restricción *Xba*I y *Bam*HI en el policonector del plásmido pSPUAM2.

En los 5 transformantes analizados se observa la eliminación de los sitios de corte *Bam*HI y *Xba*I. Al nuevo plásmido obtenido se le designó con el nombre pIZTAPA. El mapa y el análisis de restricción de este plásmido se presenta a continuación (figura 17A y 17B).



**Figura 17A.** Análisis de restricción del plásmido pIZTAPA con varias endonucleasas de restricción en un gel de agarosa al 0.7%.



**Figura 17 B.** Mapa parcial de restricción del plásmido pIZTAPA.

## 7.2.- OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS COS.

Para la construcción de cualquier cósmido es esencial contar con al menos una secuencia *cos*. Esta secuencia consta de 12 pares de bases (AGGTCGCCGCC) que tienen la función de permitir el empaquetamiento *in vitro*. Al obtener estas secuencias (junto con el sitio múltiple de clonación) de un cósmido comercial se pretendía evitar problemas con la estabilidad u otro tipo de problemas debidos a la estructura y acomodo de los elementos de interés. El cósmido SuperCos<sup>®</sup> (Stratagene) presentaba otra ventaja adicional, ya que al poseer dos secuencias *cos* hacia que el trabajo o las operaciones realizadas durante la construcción de bibliotecas genómicas se reduzcan y simplifiquen. El tener dos secuencias *cos* proporciona la opción de no tener que realizar forzosamente una selección por tamaño del ADN genómico, ya que esto asegura que las moléculas concatémicas presenten una secuencia *cos* en cada uno de los extremos (Evans *et al.*, 1989).

Después de analizar la forma en cómo se obtendrían los elementos estructurales del cósmido SuperCos<sup>®</sup>, se llegó a la conclusión de que la forma más rápida y sencilla de hacerlo sería el utilizar la amplificación mediante PCR.

### 7.2.1.- AMPLIFICACIÓN DEL CÓSMIDO SuperCos<sup>®</sup>.

Para lograr los objetivos fijados era necesario obtener, en primer lugar, una cantidad adecuada de ADN del cósmido SuperCos<sup>®</sup> (Stratagene).

En primer lugar se transformó el cósmido en células de *E. coli* DH5 $\alpha$ , a continuación se realizó la extracción y purificación del ADN. Para comprobar que el ADN pertenecía efectivamente al cósmido SuperCos<sup>®</sup>, se procedió a digerirlo con varias endonucleasas de restricción reportadas en el mapa de restricción del cósmido (figura 18A). Una vez terminadas las digestiones, se realizó un análisis electroforético para poder observar los resultados de dicha prueba (figura 18B).

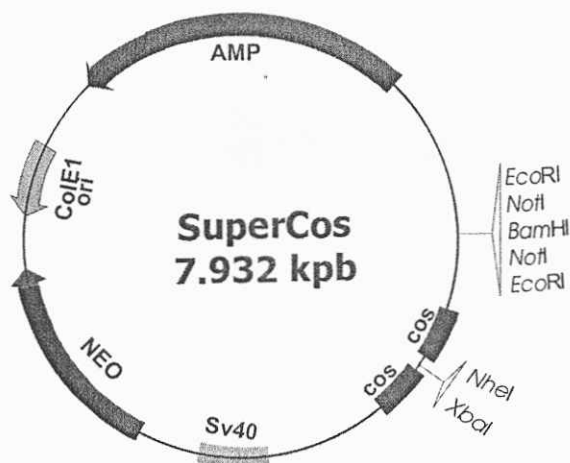


Figura 18A. Mapa parcial de restricción del cósmido SuperCos<sup>®</sup>.

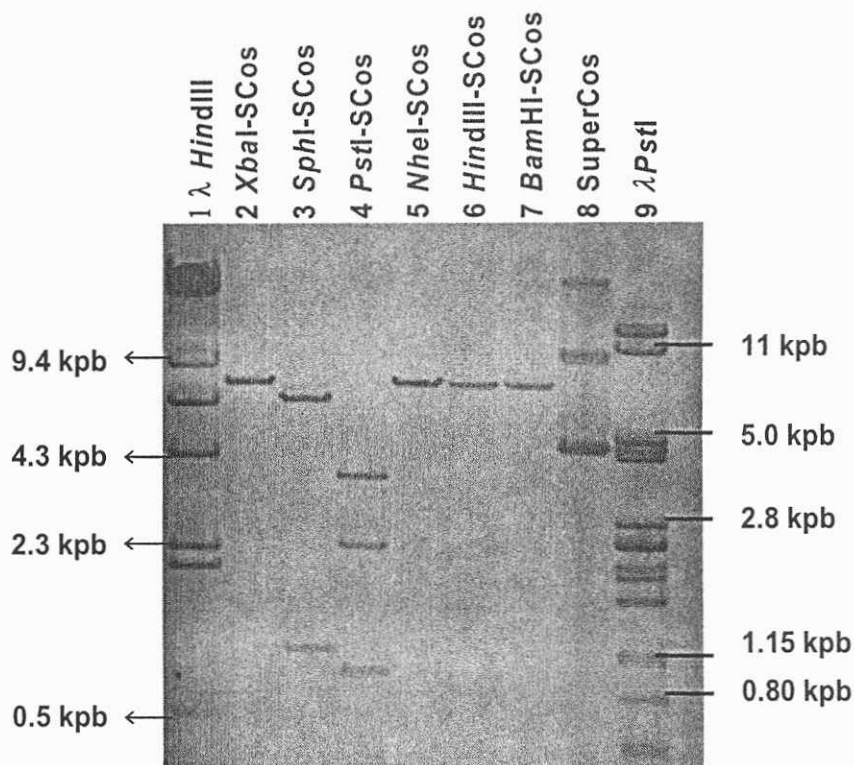


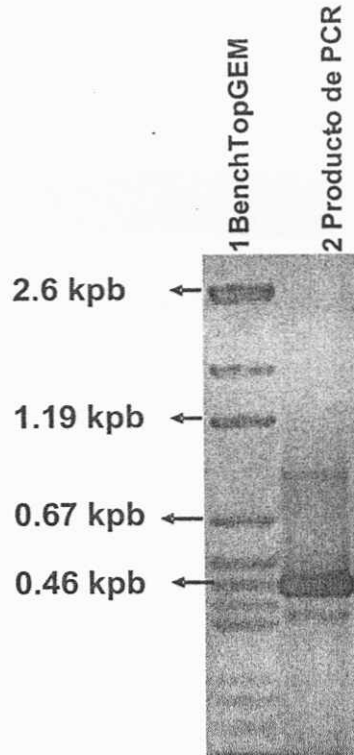
Figura 18 B. Análisis de restricción del cósmido SuperCos<sup>R</sup> con varias endonucleasas en un gel de agarosa al 0.7%.

En la figura 18B se observa una coincidencia total con lo que se esperaría del mapa de restricción. Esto nos aseguró que el ADN con el que se contaba pertenecía al cósmido SuperCos<sup>®</sup>.

### 7.2.2.- OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS *COS* DEL CÓSMIDO SuperCos<sup>®</sup> POR MEDIO DE LA AMPLIFICACIÓN POR PCR (Reacción en cadena de la ADN Polimerasa I).

En el caso del cósmido SuperCos<sup>®</sup> las secuencias *cos* se encuentran separadas por aproximadamente 1,069 pb. Sin embargo, de este cósmido también es interesante el sitio múltiple de clonación (el cual comienza en la posición número 1 de la secuencia nucleotídica del cósmido SuperCos<sup>®</sup> y presenta sitios de corte para las endonucleasas de restricción *Bam*HI, *Not*I y *Eco*RI). Las secuencias *cos* junto con el policonector abarcan una longitud de 1392 pb, por lo que se decidió diseñar unos cebadores que hibridaran 30 pares de bases corriente arriba de donde comienza el policonector y 57 pares de bases corriente abajo de la segunda secuencia *cos* (posición 1392 de la secuencia del cósmido). Dichos cebadores recibieron la nomenclatura *cos*1 (5'-CAG CCG CGG TAA AAA TAG GCG TAT CAC-3') y *cos*2 (5'-ATA CTG CAG AGC AGT GCC GTC GAT AGT-3'), respectivamente.

El fragmento final a amplificar era de 1495 pb. Se realizó la reacción de PCR y el producto obtenido se analizó en un gel de agarosa al 0.7%, lo que se muestra en la figura 19.



**Figura 19.** Electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% del producto de PCR con los cebadores *cos1* y *cos2*. En el carril número 2 se muestra la reacción de PCR. El carril 1 corresponde a un marcador de tamaño.

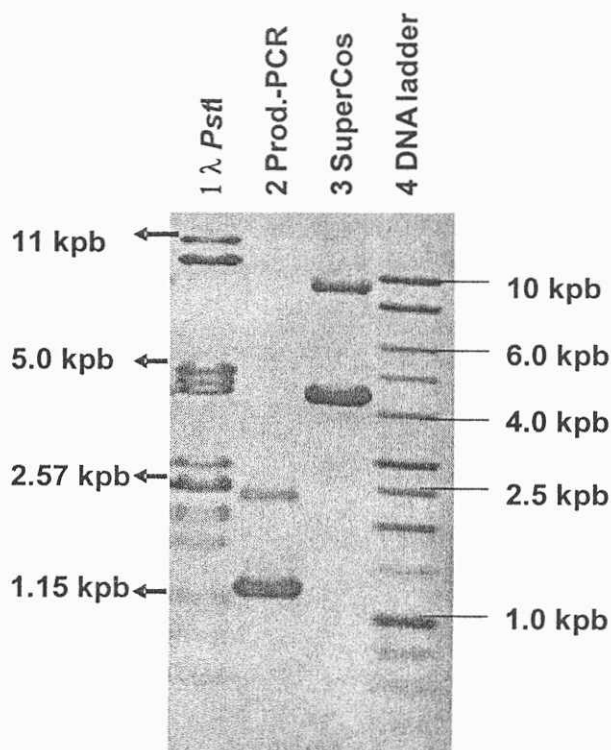
En la figura 19 se observa que aunque existen varias bandas en el producto de amplificación, ninguna coincide con la esperada. La hibridación de los cebadores *cos1* y *cos2* proporciona una banda mayoritaria de alrededor de 460 pb y en ningún momento se observa ningún producto de 1495 pb, como se esperaba. En vista del resultado, se analizó la secuencia del cósmido SuperCos<sup>®</sup> con el paquete DNASTar, encontrándose que dentro del cósmido existía una secuencia de alrededor de 1 kpb que se repetía, como se puede observar en la figura 20.



1	GAATTGCGG	CCGCAATTAA	CCCTCACTAA	AGGATCCOCTA	TAGTGAGTCCG
51	TATTATGCGG	CCGCGAATTC	TCATGTTTGA	CCGCTTATCA	TGGATAAAGCT
101	GTGCTTTTG	TTGACTTCCA	TTGTTTATTC	CAGGCACAAA	AACAGAGAAA
151	GGAAACGACA	GAGGOCBABA	AGCTGACTTT	CAGCACCTGT	CGTTTCCCTT
201	CTTTTCAGAG	GGTATTTTAA	ATAAAAACT	TAAGTTATGA	CGAAGAAGAA
251	CGGAAACGCC	TTAAACCGGA	AAATTTTCAT	AAATACCGAA	AAACCGCGAG
301	GTCCGCGCCG	CGTAAACAGG	CGGATGGCCG	GAAAGGACCC	GCAAATGATA
351	ATAATTATCA	ATTGCATACT	ATCGAAGGCA	GTGCTTCCAG	ATAACACCCG
401	CGGGGAAACA	TTCCATCATG	ATGGCCCTCG	GGACATAGGA	AGCCAGTTCA
451	TCCATGCTT	TCTTGTCTGC	TGCCATTTCG	TTTGTACAT	CCAGCGCCGC
501	ACATTCAGCA	GCGTTTTTCA	GCGCCTTTTC	GATCAGCTT	TCAATGTTGG
551	TATCAACACC	AGGTTTAACT	TTGAACCTAT	CGGCACCTGAC	GGTTACCTTG
601	TTCTGCGCTG	GCTCATCAGC	CAGGATACCA	AGCCTGATGT	TGTAGATATT
651	GGTCACCGCG	TGAGCGTTTT	CGATTCGCGC	TGCGTGGATA	GCACGTTTTG
701	CGATCAGCCN	GTCCCTGATG	AATGACACTC	CATTCGCAAT	AGTTGCGAAG
751	GAGACGGTGT	CACGAATGCG	GTGCTCCAGC	TGGCTCGATT	GCCTTTTGTG
801	CAGCAGAGGT	ATCAATCTCA	ACGOCAGAGC	TCATCGAAGC	GCAATATTGC
851	TGCTCACCAA	AAAGCCATAT	GACCAGGTGT	TCAACGGCAA	ATTCGCGCCG
901	TTCTGATGTC	AGAAAGGCAA	AGTGATTTTC	TTCTGCTAT	TCAGTTGCTG
951	TGTGTGCGT	TCAGCAAAAC	GAAGCTGCGC	CAATTCGGCT	GTGCAGATTT
1001	AGAAGCCACA	TCACCTGACA	GCAACGGCCA	ACGGAAAACA	GCCATACAG
1051	AACATCCGTC	GCCGCGCGCA	CAACGTGATA	ATTTTTATGA	CCATGATTT
1101	ATTTGCTTTT	AGACCTCAGC	CTGTCGCACA	GCAAGCCGCG	CGAAAGTTCC
1151	TCGAAGCTAG	CTTCAGACGT	GTCTAGATAC	GTCTGCTTTT	TGTTGACTTC
1201	CATTGTTTAT	TCCACGGACA	AAAACAGAGA	AAGGAAACGA	CAGAGGCCAA
1251	AAAGCTCGCT	TTCAGCACCT	GTCTTTTCT	TTCTTTTCAG	AGGTATTTT
1301	AAATAAAAC	ATTAAGTTAT	GCGAAGAAG	AACGGAAACG	CGTTAAACCG
1351	GAAAATTTTC	ATAAATAGCG	AAAACCCGCG	AGGTGCGCGC	CCGTAACAA
1401	GGCGGATCGC	CGGAAAGGAC	CCGCAAATGA	TAAATAATTAT	CAATTCGATA
1451	CTATCGACCG	CAGCGCTGCC	AGATAACACC	AACGGGGAAA	CATTCCATCA
1501	TGATGGCCGT	GCGGACATAG	GAAGCCAGTT	CATCCATCGC	TTTCTTGTCT
1551	GCTGCCATTT	GCTTTGTGAC	ATCCAGCGCC	GCATATCAG	CAGCGTTTTT
1601	CAGCGGTTTT	TCCATCAACG	TTTCAATGTT	GGATCAACA	CCAGGTTTTAA
1651	CTTTGAACTT	ATCGGCACTG	ACGGTTAACC	TGTTCTGCGC	TGGCTCATCA
1701	CGCAGGATAC	CAAGGCTGAT	GTTGTAGATA	TTGGTCACCG	GCTGAGGTTT
1751	TTGATTTGCC	GCTGCGTGG	TAGCAACATT	TGCGATCAGG	CNGTCCCTGA
1801	TGAATGACAC	TCCATTGCGA	ATAAGTTTGA	AGGAGACGTT	GTCCAGAAATG
1851	CGCTGTTCCA	GCTCGTTCGA	TTGCCTTTTG	TGCATCAGAG	GTATCAATCT
1901	CAAGGOCBAAG	GCTCATCGAA	GCGCAATATT	GCTGCTCACC	AAAACGCGTA
1951	TTGACCAGGT	GTTC AACGGC	AAATTTCTGC	CCTTCTGATG	TCAGAAAGGC
2001	AAAGTGATTT	TCTTTCTGGT	ATTGAGTTGC	TGTGTGTCGG	TTTCAGCAAA
2051	ACCAAGCTCG	CGCAATTCGG	CTGTGCAGAT	TTAGAAGGCA	GATCACCCAGA
2101	CAGCAACGCG	CAACGGAAAA	CAGGCATAC	AGAACATCCG	TCCCGCGGCC
2151	GACAACTGA	TAATTTTTAT	GACCCATGAT	TTATTTCTTT	TTAGAAGTGA
2201	GCTGTGCGCA	CAGCAAAGCC	GCCGAAAGTT	CCTCGACCGA	TGCCCTTGAG
2251	AGCCTTCAAC	CCAGTCAGCT	OCTTCCGGTG	GGCGGGGGC	ATGACTATCG
2301	TGCGCGCACT	TATGACTGTC	TTCTTTATCA	TGCAACTCGT	AGGACAGGTG

**Figura 20.** Secuencia nucleotídica repetida en el cósmido SuperCos<sup>®</sup>. En color azul y verde las secuencias repetidas, en gris se marcan las secuencias *cos*, en naranja el corte para la enzima *NheI* y en amarillo el corte para la enzima *XbaI*. En color rojo, en la posición 1450, aparece la secuencia usada para diseñar el cebador *cos2*. También en color rojo, en la posición 367, aparece el sitio donde el cebador *cos2* hibridó de forma “inespecífica”, dando como producto una banda de alrededor de 460 pb.

Del estudio teórico pudo deducirse que el tamaño de la banda amplificada era de 425 pb. Una vez conocido de qué punto a qué punto se repetían las secuencias dentro del cósmido SuperCos<sup>®</sup>, se diseñó otro cebador, que ahora hibridaría con la región 2254-2272 de la secuencia del SuperCos<sup>®</sup>: Dicho cebador fue designado como cos2A y su secuencia es 5'TAT CTG CAG GGA GCT GAC TGG GTT GAA-3'. El cebador cos1 se conservó. Una vez realizada la reacción de PCR, se analizó el producto por electroforesis (figura 21).

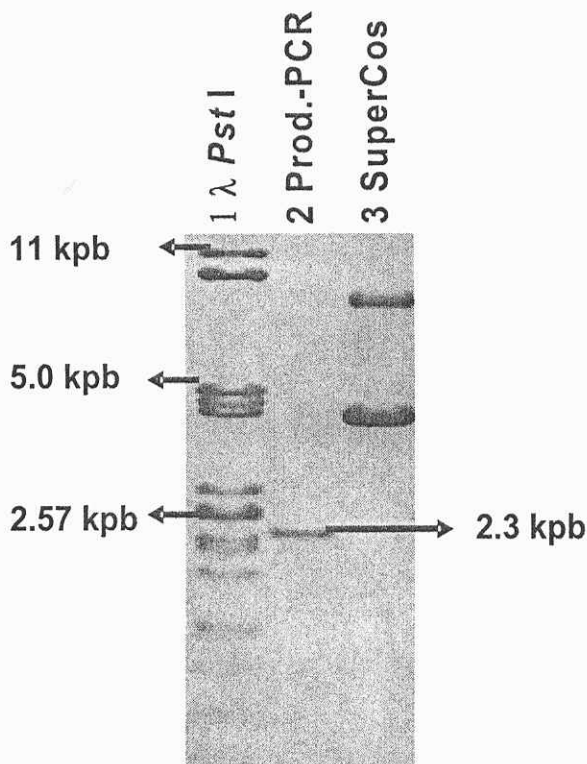


**Figura 21.** Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.7% del producto de PCR con los cebadores cos1 y cos2A. En el carril 1 y 4 se muestran los marcadores de tamaño, en el carril 2 se muestra el producto de la reacción de PCR y en el carril 3 el cósmido SuperCos<sup>®</sup> sin digerir.

La banda de mayor intensidad es de alrededor de 1200 pb, cuando la banda de interés posee un tamaño de 2312 pb (también aparece, aunque en menor concentración). Se trató de optimizar la reacción de PCR sin conseguirlo y se buscaron puntos de hibridación inespecífica

del cebador cos2A, pero no se pudo encontrar ningún indicio de secuencias repetidas aparte de las que se habían encontrado previamente.

Ante estos resultados se diseñó un tercer cebador, denominado cos2B, cuya secuencia es 5'-CAG CTG CAG AAA TTA GTC AGC CAT GGG-3'. La hibridación de este nuevo cebador se da en la región 3267-3281 de la secuencia del cósmido SuperCos<sup>®</sup> y el producto de PCR esperado es de 3300 pb. La reacción de PCR con este nuevo cebador y con el cos1 se realizó en condiciones óptimas y el producto fue analizado en electroforesis (figura 22).



**Figura 22.** Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.7% del producto de PCR con los cebadores cos1 y cos2B. En el carril 1 aparece el marcador de tamaño  $\lambda$  PstI, en el carril 2 se tiene el producto de la reacción de PCR y en el carril 3 se aprecia el ADN del cósmido SuperCos<sup>®</sup> sin digerir.

Como se puede observar en la figura 22, tampoco en este caso se obtuvo el resultado esperado: la banda mayor intensidad en este caso es de alrededor de 2400 pb, al compararla

con el marcador de tamaño del carril 1. Ante esta situación decidimos secuenciar el producto obtenido.

Al ser una banda relativamente grande, decidimos sólo secuenciar las primeras 1000 bases y las últimas 800 pares de bases del fragmento. La secuencia obtenida (figura 23A) fue analizada en el paquete computacional DNASTar: al principio de la secuencia aparecen los sitios de corte para *Bam*HI y *Not*I, que son cortes que aparecen en el policonector del cósmido SuperCos<sup>®</sup> y que eran secuencias que se habían contemplado que estuvieran al principio del fragmento amplificado. Con esto se comprobó que el cebador cos1 no está hibridando inespecíficamente corriente abajo del punto para el cual se había diseñado. Al analizar la secuencia de la parte final del fragmento de 2.4 kpb (figura 23B) encontramos que dicha secuencia concordaba con la región 2850-3230 del cósmido SuperCos<sup>®</sup>.

A)

```

                                     Bam HI
                                     |
ATTTGAACACCCNNTTCTTAAACNACCACAAAGAAATNMCGGCCGNAATTAAACCTCACTAAAGGGATCCCTATAGNG 220
-----
TAAACTTGTGGNAAGGATTGNTGGTCTTCTTAAAMGCCGGCCTTAAATGGGAGTGATTTCCCTAGGGATATCMC

```

```

NotI   EcoRI
|       |
AGTCGNATTATCGGGCCCGGAATTCTCATGTTGACCGCTTATCATCGAT AAGCTCTGCTTTTGTTGACTTCCATTGNTCATTCCACGGACAAAAACAGACAAAGGAAA 330
-----
TCAGCNTAATACGCCGGCCTTAAGAGTACAABCTGGCGAATAGTAGCTATTCCGAGACGAAAAACAACCTGAAGGTAAACNAGTAAGGTGCCTGTTTTGTCTCTTTCCCTT

CGACAGAGGCCAAAAAGCTCNGCTTTCACGCMACCTGTGCTATTCTTTCTTTTCANGAGGGTATTTTAAATAAAACACTTAAAGTTATGACCAANTAACNAACTGGAT 490
-----
GCTGTCTCCGGTTTTTCGAGNCGAAAGTGCNTGGACAGCATAAGGAAAGAAAAGTCTCCCATAAAATTTATTTTTGTGAATCAAACTACTGGTTNATTGTTGACCTA

ANCCGCCCTTAAACCNGNAAAAAATTTCCATAAATTAGCNMMAAAAACCCNNTGAGAGTCHNCNGCTCCCGCTAACACAGGGCGNHNATTNMGNACNGAAAGTGACCC 550
-----
TMGGCGGGAATTTGCNCNTMTTTTTAAAGGTATTTAATCGNNTMTTTTGGNHNACTCTCAGNCGCGAGGGGCATTGTCTCCCGCNDNTAAMNCTGNCCTTCACTGGG

GCAAAATGATAAATAAANTATTCAAAATATGCATNACTTATCTMNACNGCCCTTGCNTGCCNNAACAATAAACAAACCCACCTGNGGGNAAACATNTTCCAMTTNAT 660
-----
CGTTTTACTATTNATTTNAATAAGCTTATACGTANTGAATAGAMNTGNCGGGAACGNACGGGNTTGTATTNGTGGGTGGGACNCCCTTTGGGTANAAGGGTAAANTA

```

**Figura 23A.** Análisis de la secuencia de la banda de 2.3 kpb producto del PCR con los cebadores cos1 y cos2B. La secuencia inicial de nucleótidos del fragmento de 2.3 kpb amplificado por PCR, donde se observa las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *Bam*HI, *Eco*RI y *Not*I.

B).-

## Resultado del análisis de secuenciación

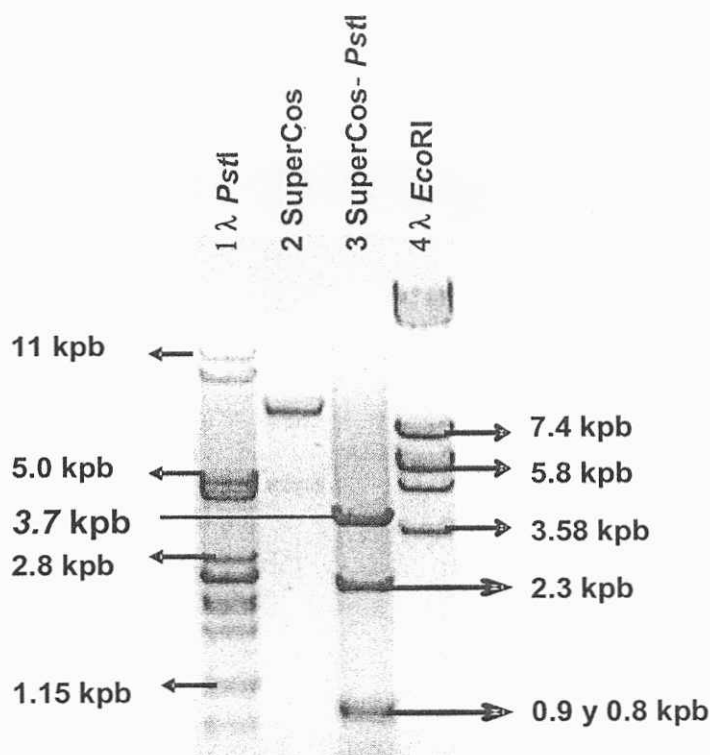
----->-----  
T N A T A N G G A A M C M T G M A T A C C N M T T T T G A A A A A A C C C C A A C N G G G C C T T G T T A G N G C C G G M C N G G G C C G A G T T A G G G G M G G G A C T A T G G T T G C T G A C T A A T T G A G A T G C T 110  
A M T A T M C C T T N G M A C M T A T G G M A A A A C T T T T T T T G G G G T T G M C C C G C A A C A A T C M C C C C N G M C C G C C T C A A T C C C C M C C C T G A T A C C A A C G A C T G A T T A A C T C T A C G A  
-----  
T G C T T T G C A T A C T T C T G C C T G C T G G G G A G C C N G G G G A N T T T C C A C A C C T G G T T G C M G A C T A A T T G A G A T G C A T G C T T T G C A T A C T T C T G C C T G C T G G G G A G C C T G G G G A C 220  
A C G A A A C G T A T A A G A C G G A C G A C C C C T C G G M C C C T N A A A G G T G T G G A C C A A C G M C T G A T T A A C T C T A C G T A C G A A A C G T A T G A A G A C G G A C G A C C C C T C G G A C C C T G  
-----  
T T T C C A C A C C C T A A C T G A C A C A C A T T C C A C A G C C G G A T C T G M A G G A C C C A A C G C T G T C M A G A T G C C C C G C T G C G G C T G C T G G A G A T G G M G G A C G C G A N G G A T A T G T T C 330  
A A A G G T G T G G G A T T G A C T G T G T A A G G T G T C G G C C T A G A C M T C C T G G G T T G C G A C A G G M T C T A C G C G C C A C G C C G A C G A C C T C A C C M C C T G C G C T M C C T A T A C A A G  
-----<-----  
T G C C A A G G G T T G G T M T T G C C C A N T T A C A G T T C T C C G C A A G A A T T G A T T G G C C C A A T T C T T G A N T G G M A A T M C M T T A A C G A G G T G C C G M C G G T T C C A A T T M A N G T C M A 440  
A C G G T T C C C A A C C A M A A C G G G T N A G T G T C A A G A G C C G T T C T T A A C T A A C C G A G G T T A A G A A C C T M A C M T T A N G M A A T T G C T C C A C G G C N G C C A A A G G T A A A M M C A G M T

## Secuencia del cósmido SuperCos

----->-----  
C A G G C A G G T A G A T G A C G A C C A T C A G G G A C A G C T T C A A G G A T C G C T C G C G C C T C T T A C C A G C C T A A C T T C G A T C A T T G G A C C G C T G A T C G T C A C G G C G A T T A T G C C C C T 2750  
G T C C G T C C A T C T A C T G C T G G T A G T C C C T G T C G A A G T T C C T A G C G A G C C C G A G A A T G G T C G G A T T G A A G C T A G T A A C C T G C C G A C T A G C A G T G C C G C T A A A T A C G G C G G A  
-----<-----  
C G G C G A G C A C A T G G A A C G G G T T G C C A T G G A T T G T A G C C G C C C C C T A T A C C T T G T C T G C C T C C C C G C G T T G C G T C G C G G T G C A T G G A G C C G G G C A C C T C G A C C T G A A T G 2860  
G C C C C T C G T G T A C T T G C C A A C C G T A C C T A A C A T C C G C G C C G G G A T A T G G A C A G A C G G A G G G C C A A C G C A G C C C A C G T A C C T C G G C C C G G T G G A G C T G G A C T T A C  
----->-----  
G A A G C C G G C G C A C C T C G C T A A C G G A T T C A C C A C T C C A A G A A T T G G A G C C A A T C A A T T C T T G C G G A G A A C T G T G A A T G C G C A A A C C A A C C C T T G G C A G A A C A T A T C C A T C 2970  
C T T C G C C C G C G T G G A G C G A T T G C C T A A G T G G T G A G G T T C T T A A C C T C G G T T A G T T A A G A A C G C C T C T T G A C A T T A C G C G T T G G T T G G G A A C C G T C T T G T A T A G G T A G  
-----<-----  
G C G T C C G C C A T C T C C A G C A G C C G C A C G C G G C G C A T C T C G G G C A G C G T T G G G T C C T G C A G A T C C G G C T G T G G A A T G T G T G T C A G T T A G G G T G T G G A A A G T C C C C A G G C T C C 3080  
C G C A G G C G G T A G A G G T C G T C G G C G T G C G C C G C G T A G A G C C C G T C G C A A C C A G G A C G T C T A G G C C G A C A C C T T A C A C A C A G T C A A T C C C A C A C C T T T C A G G G G T C C G A G G  
-----<-----  
C C A G C A G G C A G A A G T M G C A A A G C A T G C A T C T C A A T T A G T C A G C A A C C A G G T G T G G A A A G T C C C C A G G C T C C C C A G C A G G C A G A A G T A T G C A A A G C A T G C A T C T C A A T T A 3190  
G G T C G T C C G T C T T C A T A C G T T T C G T A C G T A G A G T T A A T C A G T C G T T G G T C C A C A C C T T T C A G G G G T C C G A G G G G T C G T C C G T C T T C A T A C G T T T C G T A C G T A G A G T T A A T  
----->-----  
G T C A G C A A C C A T A G T C C C G C C C C T A A C T C C G C C C A T C C C G C C C T A A C T C C G C C C A G T T C C G C C C A T T C T C C G C C C C A T G G C T G A C T A A T T T T T T T A T T T A T G C A G A G G 3300  
C A G T C G T T G G T A T A G G G C G G G G A T T G A G G C G G G T A G G G C G G G A T T G A G G C G G G T C A A G G C G G G T A A G A G G C G G G T A C C G A C T G A T T A A A A A A A A T A A A T A C G T C T C C

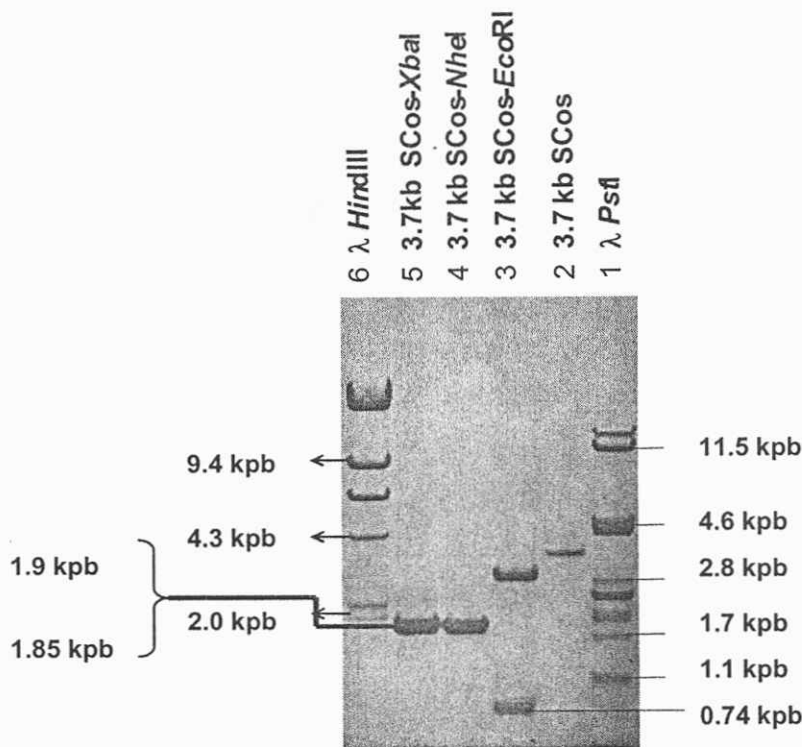
**Figura 23B.** Análisis de la secuencia de la banda de 2.3 kpb producto del PCR con los cebadores cos1 y cos2B. Comparación de secuencias entre la secuencia final del fragmento de 2.3 kpb amplificado por PCR y la región 2850 a 3230 de la secuencia nucleotídica del cósmido SuperCos®.

La estrategia de amplificación por PCR en la práctica no fue la mejor, ya que se encontró que el cósmido SuperCos<sup>®</sup> presenta una serie de secuencias internas repetidas, lo que no permite la amplificación de sus elementos estructurales. Con todos estos distintos análisis que se efectuaron, no se pudo llegar a encontrar una explicación que fuera coherente y que explicara los resultados inespecíficos obtenidos, por lo que se decidió utilizar una estrategia alternativa. Así, se encontró, que la endonucleasa de restricción *Pst*I cortaba el cósmido en 4 distintos puntos y generaba cuatro bandas (al ser un círculo cerrado) de 0.884, 0.923, 2.357 y 3.775 kpb. Esta última banda de 3.775 kpb contiene el sitio múltiple de clonación y las secuencias *cos*, siendo un fragmento útil para nuestros objetivos. Por ello, se digirió el cósmido SuperCos<sup>®</sup> con la endonucleasa de restricción *Pst*I para comprobar el número de cortes y los tamaños de los fragmentos, analizándose la digestión en electroforesis en gel de agarosa (figura 24). El obtener las secuencias *cos* por digestión con la endonucleasa de restricción *Pst*I proporcionó un fragmento relativamente grande, desde la percepción del tamaño final óptimo del cósmido, pero esta estrategia fue sencilla y rápida, ya que el corte para *Pst*I aparecía como un sitio único de corte en el plásmido pIZTAPA, lo que facilitó la construcción final.



**Figura 24.** Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.7% de la digestión del cósmido SuperCos<sup>®</sup> con la endonucleasa de restricción *PstI*. En los carriles 1 y 4 se muestran los marcadores de tamaño, en el carril 2 se aprecia el ADN del cósmido SuperCos<sup>®</sup> sin digerir y en el carril 3 se tiene el patrón de bandas generado por la digestión del ADN del cósmido SuperCos<sup>®</sup> con la endonucleasas de restricción *PstI*

El cósmido SuperCos<sup>®</sup> presentaba los 4 sitios de corte teóricos para la endonucleasa de restricción *PstI* y también generaba el fragmento de 3.7 kpb de interés. Una vez aislada está banda de 3.7 kpb a partir del gel de agarosa, el fragmento de ADN se digirió con las endonucleasas *XbaI*, *NheI* y *EcoRI* para comprobar que efectivamente contenía las secuencias *cos* y el policonector del cósmido SuperCos<sup>®</sup>. Para poder observar el patrón de bandas que se formaba con cada una de las endonucleasas de restricción, se analizaron todas las reacciones de restricción en un gel de agarosa al 0.7% (figura 25).



**Figura 25.** Análisis electroforético de la digestión del fragmento de 3.7 kpb con varias endonucleasas de restricción. Los carriles 1 y 6 corresponden a los marcadores, el carril 2 corresponde al fragmento de 3,7 kpb de ADN aislado del gel de agarosa y en los carriles 3, 4 y 5 se presenta los productos de digestión con las enzimas *EcoRI*, *NheI* y *XbaI*, respectivamente. En el caso de *EcoRI* (carril 3), se genera una banda de 64 pb que es imposible visualizar en este gel.

De acuerdo al manual del SuperCos<sup>®</sup> 1 Cosmid Vector Kit el fragmento de 3.7 kpb que nos interesa se localiza entre las posiciones 7192 y 3025. Los sitios de corte reportados para la endonucleasa *EcoRI* están localizados en las posiciones 1 y 65; para *NheI* en la 1156 y para *XbaI* en la 1172. Con estos datos se pudo estimar los fragmentos esperables con cada una de las enzimas de restricción: en el caso de la digestión *EcoRI* debían aparecer tres fragmentos, con tamaños de 2963, 747 y 64 pb; en el caso de *NheI* tendrían que aparecer dos fragmentos, uno de 1903 y otro de 1872 pb, y para el caso de *XbaI* deberían generarse dos fragmentos, también de tamaño muy similar: uno de 1919 y otro de 1856 pb. Los resultados obtenidos (figura 25) concuerdan con los datos teóricos esperados.

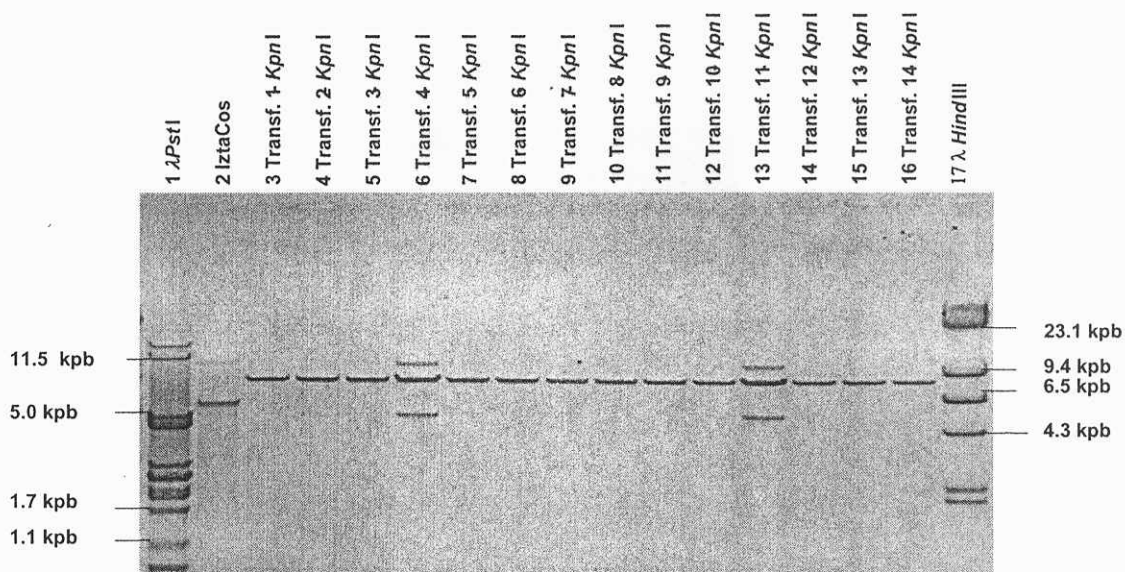


---

### 7.3.- CONSTRUCCIÓN FINAL DEL CÓSMIDO IZTAPACOS.

#### 7.3.1.-ENSAMBLE DEL CÓSMIDO IztapaCos.

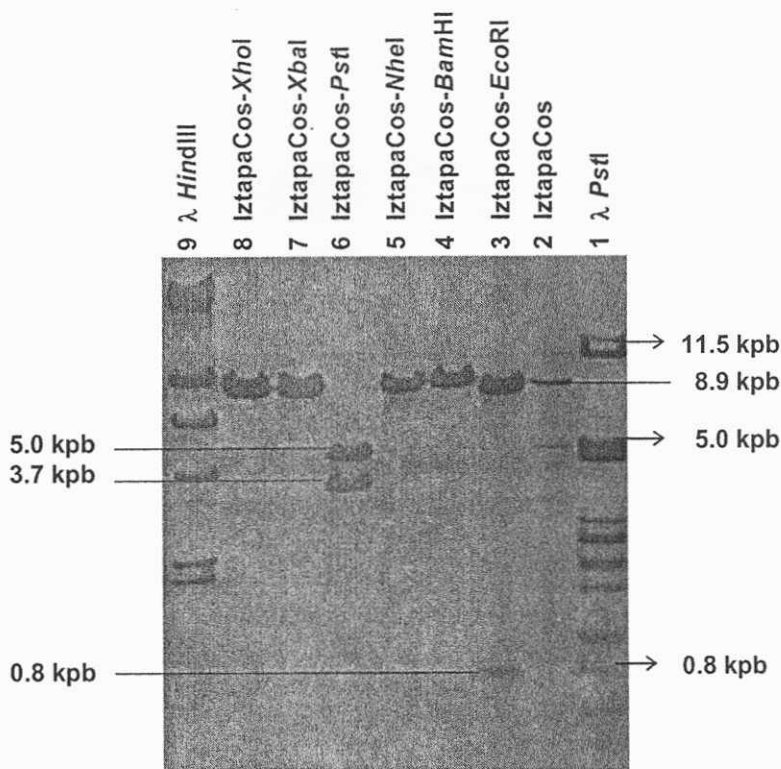
Para poder obtener el cósmido final, se digirió por un lado el plásmido pIZTAPA con la endonucleasa de restricción *Pst*I (el sitio de corte *Pst*I aparece como un sitio único en éste plásmido y se localiza en el policonector). Tras linealizar el plásmido pIZTAPA, se procedió a unirlo al fragmento de 3.7 kpb procedente del cósmido SuperCos<sup>®</sup> que contiene las secuencias *cos* y el sitio múltiple de clonación. Esta unión se pudo llevar a cabo con la ayuda de la ADN ligasa del fago T4. Una parte de la reacción de ligación se empleó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . De todos los transformantes obtenidos, se seleccionaron al azar 14. Se extrajo el ADN plasmídico a cada transformante, y se digirió con la endonucleasa *Kpn*I esta enzima sólo corta en un sitio en el plásmido pIZTAPA y no presenta ningún sitio de corte en la secuencia nucleotídica del cósmido SuperCos<sup>®</sup>, por lo que los transformantes digeridos deberían presentar una sola banda de 8.7 kpb). De acuerdo al tamaño de las bandas obtenidas se descartarían los transformantes no deseados (figura 26). Al tener cada uno de los fragmentos de ADN usados para la ligación extremos idénticos existe la posibilidad de religación del plásmido pIZTAPA, pero el tamaño de esos plásmidos sería de 4.9 kpb.



**Figura 26.** Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.7% de la digestión de los transformantes IztapaCos con la endonucleasa de restricción *KpnI*. Del carril 3 al 16 se presentan los productos de digestión de cada uno de los transformantes seleccionados, en el carril 2 aparece el ADN del transformante 1 sin digerir y en los carriles 1 y 17 se incluyen los marcadores de tamaño.

De acuerdo a lo observado en la figura 26, la mayoría de los transformantes tienen el tamaño apropiado del cósmido que se pretendía conseguir.

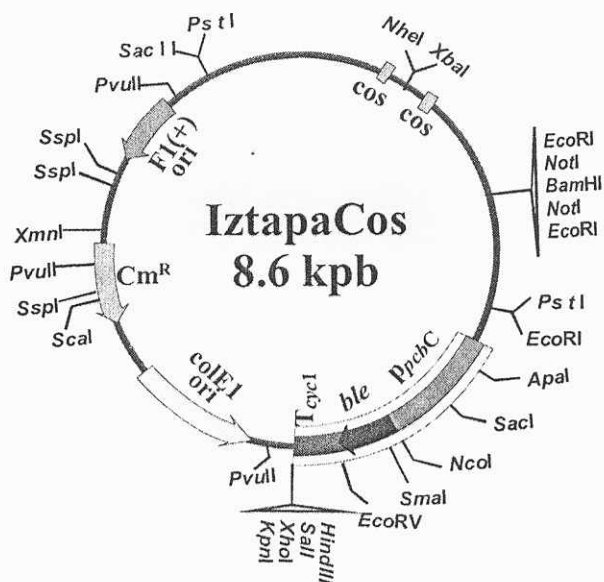
Una vez comprobado el tamaño de cada uno de los transformantes, se seleccionó solo a uno de ellos (el transformante número 1) para elaborar el mapa de restricción del cósmido IztapaCos. Para ello se puso a digerir el ADN de este cósmido con varias endonucleasas de restricción, con el fin de poder comprobar el número y tamaño de los fragmentos generados por cada una de las mismas. La comprobación final se realizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% (figura 27)



**Figura 27.** Electroforesis para el análisis de restricción del cósmido IztapaCos. En los carriles 1 y 9 aparecen los marcadores de tamaño, en el carril 8 está representado el ADN del cósmido IztapaCos sin digerir, del carril 2 al 7 se incluyen los productos generados por cada una de las endonucleasas de restricción.

Debido a que el fragmento de 3.7 kpb tiene el mismo corte en ambos extremos, resultaba interesante determinar cuál era la orientación en la que éste fragmento de 3.7 kpb se había ligado al plásmido pIZTAPA. Para determinarlo basta con observar el corte del cósmido IztapaCos con la endonucleasa de restricción *EcoRI*.

En función del corte *EcoRI* existente en el policonector del plásmido IZTAPA y de las dos posibles orientaciones que se podrían obtener al insertarse el fragmento de 3.7 kpb en el mismo, el resultado observado en el carril 7 de la figura 27 nos permite descartar una de las dos opciones y asegurar un mapa de restricción del cósmido final con las siguientes características (figura 28).



**Figura 28.** Mapa parcial de restricción del cósmido IztapaCos. *ColE1*: origen de replicación para bacterias; *Cm<sup>R</sup>*: gen que confiere resistencia a cloranfenicol; *ble*: gen que confiere resistencia a fleomicina, marcador empleado en hongos; *FI*: origen de replicación para bacteriófagos filamentosos, sirve para obtener ADN de una sola hebra; *cos*: secuencias provenientes de bacteriófago, que tienen la función de permitir el empaquetamiento *in vitro* y que dan el nombre a este tipo de vehículos de clonación.

El tamaño final del cósmido construido al unir el fragmento de 3.7 kpb y el plásmido pIZTAPA es de 8.6 kpb. Si comparamos el tamaño de este cósmido con otros vectores similares se podría pensar que su tamaño está por arriba, pero se debe tener en cuenta que en éste vehículo de clonación se pueden insertar fragmentos de ADN que son de 4-5 veces su tamaño (entre 30 y 40 kpb). Además, muchos de los cósmidos existentes tienen tamaños comprendidos entre 7 y 12 kpb, por ejemplo, Osiewacz, (1994) reporta el cósmido pANsCos1 con 11.9 kpb; Orbach (1994) reporta al cósmido pMOCosX con 8.6 kpb; Zhiqiang *et al.*, (1996), reportan los cósmidos pMLF2, pANUMV1 y pANUMV2 con 9.2, 8.4 y 8.7 kpb, respectivamente.

El que el cósmido IztapaCos tenga como marcador de selección el gen que confiere resistencia a fleomicina hace que lo podamos emplear en un amplio espectro de organismos

fúngicos, ya que Berdy (1980) reportó que una cantidad importante de organismos fúngicos son sensibles a la fleomicina. El hecho de que el gen que confiere resistencia a la fleomicina esté bajo el control del promotor fúngico *PpcbC* nos permite garantizar que será activo en un amplio rango de hongos.

Las dos secuencias *cos* permitirán la opción de no seleccionar tamaños de ADN genómico para elaborar bibliotecas genómicas, además de que el policonector contiene las secuencias de los promotores T7 y T3, que permiten realizar pruebas de transcripción *in vitro* y poder secuenciar cualquier inserto empleando cebadores universales (Evans, 1989).

El policonector del cósmido contiene sitios de corte para tres endonucleasas de restricción, estos sitios de corte son útiles para realizar una serie de operaciones técnicas: el sitio de corte para *Bam*HI sirve para clonar los fragmentos de ADN genómico, el sitio *Eco*RI permite digerir el inserto clonado con una alta frecuencia (con el objetivo de extraer secuencias pequeñas de genes ó ciertos fragmentos de ADN) y el sitio de corte para *Not*I se utiliza para extraer el inserto clonado completo (debido a que la enzima *Not*I tiene una baja frecuencia de corte). Estas tres características son de gran ayuda en el mapeo de genomas.

Por su parte los elementos estructurales que son funcionales en bacterias y que están presentes en el cósmido Iztapacos, son esenciales para la amplificación y elaboración de bibliotecas genómicas en *E. coli* (Luria y Suit, 1987).

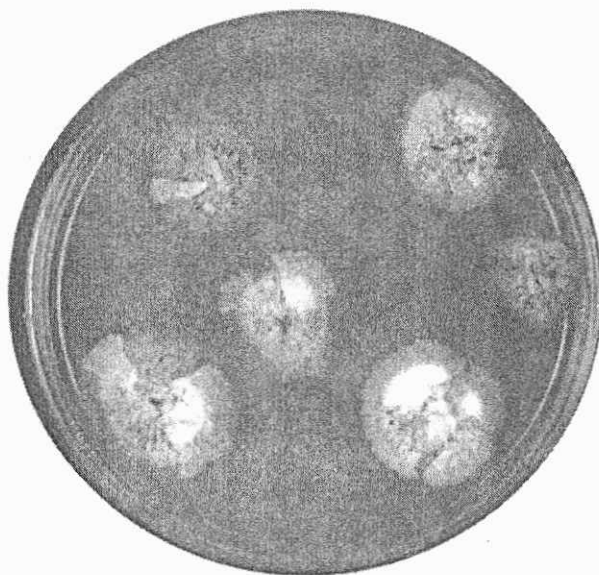
### 7.3.2.-COMPROBACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DEL CÓSMIDO IztapaCos.

La funcionalidad del cósmido en *E. coli* fue buena, en la figura 27, carril 2, se aprecia que el cósmido amplificado presenta tres bandas bien definidas, correspondientes a cada una de las distintas conformaciones que debe presentar un cósmido (circular abierto, lineal y superenrollado). Dichas tres bandas aparecen sólo en aquellos vehículos de clonación que tienen una estructura circular y una replicación correcta.

Debido a las mutaciones realizadas al plásmido que sirvió de base para construir el cósmido IztapaCos, era de suma importancia verificar que la expresión del gen que confiere

resistencia a la fleomicina era correcta. Este análisis de funcionalidad se realizó transformando *Penicillium chrysogenum* cepa Wisconsin 54-1255 y recuperando transformantes resistentes al antibiótico.

Para transformar a *P. chrysogenum* se tomaron esporas pregerminadas del hongo y se pusieron en contacto con el ADN del cósmido IztapaCos, sometiéndose la mezcla a una descarga eléctrica (electroporación). Después de este tratamiento las esporas se sembraron en medio Czapeck suplementado con 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de fleomicina. Se obtuvieron  $2 \times 10^3$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN del cósmido IztapaCos (figura 29), con lo que se comprobó que el cósmido construido era funcional en hongos.



**Figura 29.** Transformantes de *P. chrysogenum* con el cósmido IztapaCos sembrados en medio Czapeck con 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de fleomicina.

La funcionalidad del cósmido fue buena, ya que el número de transformantes que se logro obtener es similar a lo que reportan Sánchez y Aguirre (1996) para ( $1.189 \times 10^3$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN) *Aspergillus nidulans* [empleando este mismo método de transformación]. Del mismo modo, el método supera los resultados descritos para la transformación usando protoplastos (Casselton y de la Fuente, 1989; Berges y Barreau, 1989; Turcq y col., 1990) y Cantoral y col., (1987).

---

---

## VIII.- DISCUSIÓN

La construcción de cósmidos de utilización en hongos es relativamente baja, la mayoría de los cósmidos existentes derivan de plásmidos o cósmidos ya existentes. Los plásmidos que se han utilizado hasta la fecha como base para la construcción de cósmidos son principalmente el pBR322 y el pJB8; otro plásmido utilizado en menor medida es el pAN-7 (Vollmer y Yanfsky, 1986; Orbach, 1994; Osiewacz, 1994).

Los cósmidos que se han utilizado hasta el momento para crear nuevos vehículos de este tipo son el SuperCos<sup>®</sup> I, el pMOcox, el pDVcos134. Algunos bacteriófagos, como el  $\phi$ 80 y el lambda, también han sido utilizados a este respecto (Steven y Yanfsky, 1986; Orbach, 1994).

El esquema de construcción de la mayoría de estos cósmidos, partiendo de dichos "vectores base", consiste en la adición de secuencias que confieren resistencia a ciertos antibióticos, las secuencias *cos* y promotores para la transcripción *in vitro* (como los promotores SP6, T7 y T3). También es común agregar sitios de corte para ciertas endonucleasas de restricción, de forma que se favorezcan los procesos de clonaje. El marcador de selección que más se ha empleado para cósmidos fúngicos es el gen que confiere resistencia a higromicina y no existe, hasta este trabajo, ningún cósmido para hongos que utilice como marcador de selección resistencia a fleomicina y a cloranfenicol. El cósmido IztapaCos, por lo tanto, aparece como una herramienta invaluable que permitirá desarrollar procesos de Ingeniería Genética en varios hongos de interés industrial.

## XI.- CONCLUSIÓN.

El cósmido IztapaCos de 8.7 kpb es un vehículo de clonación y expresión bifuncional, ya que puede utilizarse en bacterias y hongos filamentosos, proporcionando el fenotipo de resistencia a cloranfenicol en las primeras y resistencia a fleomicina en los últimos. Este cósmido tiene dos sitios *cos* y una capacidad para incorporar insertos de ADN entre 42,000 y 29,000 pares de bases.



---

**X.- BIBLIOGRAFIA.**

- Amann, E. y Brosius, J.** 1985. "ATG vectors" for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* 40(2-3):183-190.
- Arber, W. y Linn, S.** 1969. DNA modification and restriction. *Annual Review of Biochemistry* 38:467-500.
- Archer, D. B. y Peberdy, J. F.** 1997. The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17(4):273-306.
- Archer, D. B.** 1994. Enzyme production by recombinant *Aspergillus*. *Bioprocess Technol.* 19:373-393.
- Balbás, P., Soberon, X., Merino, E., Zurita, M., Lomeli, H., Valle, F., Flores, N y Bolivar, F.** 1986. Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives--a review. *Gene* 50(1-3):3-40.
- Barany, F. 1991a.** Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 189-193.
- Barany, F. 1991b.** The ligase chain reaction in a PCR world [published erratum appears in *PCR Methods Appl* 1991 Nov;1(2):149]. *PCR Methods Appl.* 1: 5-16.
- Barredo, J. L., Díez, B., Alvarez, E. y Martín, J. F.** 1989a. Large amplification of a 35-kpb DNA fragment carrying two penicillin biosynthetic genes in high penicillin producing strains of *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* 16(5-6):453-459.
- Barredo, J. L., Cantoral, M. J., Alvarez, E., Díez, B. y Martín, J. F.** 1989b. Cloning, sequence analysis and transcriptional study of the isopenicillin N synthase of *Penicillium chrysogenum* AS-P-78. *Mol. Gen. Genet.* 216: 91-98.

---

**Bates, P.** 1987. Double *cos* site vectors: simplified cosmid cloning. *Methods Enzymol.* 153:82-94.

**Becker, J. M.** 1999. Biotecnología: curso de prácticas de laboratorio. Ed. Acribia.

**Berdy, J.** 1980. Bleomycin-type antibiotics. in *Amino Acid and Peptide Antibiotics. handbook of antibiotic compounds*, IV (1). Editado por Berdy, J. Boca Raton, FL: CRC Press.

**Berges, T. y Barreau, C.** 1989. Heat shock at an elevated temperature improves transformation efficiency of protoplasts from *Podospora anserina*. *J. Gen. Microbiol.* 135:601-604.

**Bickle, T. A y Krüger, D. H.** 1993. Biology of DNA restriction. *Microbiol. Rev.* 06 57(2): 434-450.

**Birnboim, H. C. y Doly, J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513.

**Bolivar, F., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Shine, J., Rodriguez, R. L. y Boyer, H. W.** 1977a. Origin of replication of pBR345 plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12):5265-5269.

**Bolivar, F., Rodríguez, R. L., Betlach, M. C. y Boyer, H. W.** 1977b. Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* 2(2):75-93.

**Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L. y Boyer, H. W.** 1977c. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2(2):95-113.

- Bull, J. H., Smith, D. J. y Turner, G.** 1988. Transformation of *Penicillium chrysogenum* with a dominant selectable marker. *Curr. Genet.* 13(5):377-382.
- Connerton, I. F., Kaur, J. S., Rogers, S. y Park, R. W.** 1991. Isolation and characterization of a cryptic plasmid from mesophilic aeromonads: potential as a cloning vector. *Lett. Appl. Microbiol.* 12(1):16-19.
- Cantoral, J. M.; Díez, B.; Barredo, J. L.; Álvarez, E. y Martín, J. F.** 1987. High-frequency transformation of *Penicillium chrysogenum*. *Bio/technology.* 5 (5): 494-497.
- Cantwell, C. A., Beckmann, R. J., Dotzlaf, J. E., Fisher, D. L., Skatrud, P. L., Yeh, W. K. y Queener, S. W.** 1990. Cloning and expression of a hybrid *Streptomyces clavuligerus* cefe gene in *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* 17(3):213-221.
- Casselton, L. A. y De la Fuente, H.** 1989. Heterologous gene expression in the basidiomycete fungus *Coprinus cinereus*. *Curr. Genet.* 16: 35-40.
- Christensen, T., Woeldike, H., Boel, E., Mortensen, S. B., Hjortshoej, K., Thim, L. y Hansen, M. T.** 1988. High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzae*. *Bio/technology* 6:1419-1422.
- Clewell, D. B.** 1972. Nature of ColE1 plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of the chloramphenicol. *J. Bacteriol.* 110(2):667-676.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, W. H y Helling, R. B.** 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. . *Proc Natl Acad Sci U S A.* 70 (11): 3240-3244.
- Cohen, S. N. y Chang, A. C.** 1973. Recircularization and autonomous replication of a sheared R-factor DNA segment in *Escherichia coli* transformants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 70(5):1293-1297.

---

**Cohen S. N. y Chang, A. C.** 1977. Revised interpretation of the origin of the pSC101 plasmid. *J. Bacteriol.*, 132: 734-737.

**Collins, J. y Hohn, B.** 1978. Cosmids: a type of plasmid gene-cloning vector that is packageable *in vitro* in bacteriophage heads. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75 (9): 4242-4246.

**Dente L., Cesareni G. y Cortese R.** 1983. pEMBL: a new family of single stranded plasmids. *Nucleic Acids Res.* 11(6):1645.

**Dhawale, S. S. y Marzluf, G. A.** 1985. Transformation of *Neurospora crassa* with circular and linear DNA and analysis of the fate of the transforming DNA. *Curr. Genet.* 10:205-212.

**Dower, W. J., Miller, J. F. y Ragsdale, C. W.** 1988. High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16(13):6127-6145.

**Esser, K. y Kempken, F.** 1986. Structure and function of linear extrachromosomal DNA in eukaryotes. *Proc. biochem* 21:69-76.

**Evans, G. A., Lewis, K. y Rothenberg, B. E.** 1989. High efficiency vectors for cosmid microcloning and genomic analysis. *Gene* 79(1):9-20.

**Baneyx, F.** 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotech.* 10:411-421.

**Fernández, F. J.** 1997. Caracterización de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina: Reacción enzimática catalizada por el producto del último gen (*penDE*) de la ruta de biosíntesis de penicilina. Tesis Doctoral, Universidad de León, España.

**Foster, T. J.** 1983. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol. rev.* 47(3): 361–409.

**Gibson, T. J., Rosenthal, A. y Waterston, R. H.** 1987. Lorist6, a cosmid vector with *Bam*HI, *Not*I, *Sca*I and *Hind*III cloning sites and altered neomycin phosphotransferase gene expression. *Gene* 53(2-3):283-286.

**Goeddel, D. V., Heyneker, H. L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura, D. G., Ross, M. J., Miozzari, G., Crea, R. y Seeburg, P. H.** 1979a. Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature* 281(5732):544-548.

**Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K. y Riggs, A. D.** 1979b. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(1):106-110.

**Gorodezky, C.** 2000. Notas del curso de genética molecular. Hospital General de México. México, D. F.

**Gottesman, M. M., Hicks, M. L. y Gellert, M.** 1973. Genetics and function of DNA ligase in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 77(4):531-547.

**Gwynne, D. I., Buxton, F. P., Sibley, S., Davies, R. W., Lockington, R. A., Scazzocchio, C. y Sealy-Lewis, H. M.** 1987. Comparison of the *cis*-acting control regions of two coordinately controlled genes involved in ethanol utilization in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 51(2-3):205-216.

**Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166(4):557-580.

**Hanahan, D.** 1985. In: DNA cloning, vol. 1. Ed. Glover, D. IRL Press, Ltd.,109–135.

**Helinski, D. R. y Clewell, D. B.** 1971. Circular DNA. *Annu. Rev. Biochem.* 40:899–942.

**Hendrix, R., Roberts, J., Stahl, F. y Weisberg, R.** 1983. Lambda II. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

**Holmes, D. S. y Quigley, M.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114: 193–197.

**Horiuchi, T., Sato, T. y Nagata, T.** 1975. DNA degradation in an amber mutant of *Escherichia coli* k12 affecting DNA ligase and viability. *J. Mol. Biol.* 95(2):271-287.

**Ikehara, E., Ohtsuka, T., Tokunaga, Y., Taniyama, S., Iwai, K., Kitano, S., Miyamoto, T., Ohgi, Y., Sakuragawa, K., Fujiyama, T., Ikari, M., Kobayashi, T., Miyake, S., Shibahara, A., Ono, T., Ueda, T., Tanaka, H., Baba, T., Miki, A., Sakurai, T., Oishi, O., Chisaka, D. y Matsubara, K.** 1984. Synthesis of a gene for human growth hormone and its expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81 (19): 5956–5960.

**Ish-Horowicz, D. y Burke, J. F.** 1981. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9:2989–2998.

**Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F. y Boyer, H. W.** 1977. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science.* 198(4321):1056-1063.

---

Ikehara, M., Ohtsuka, E., Tokunaga, T., Taniyama, Y., Iwai, S., Kitano, K., Miyamoto, S., Ohgi, T., Sakuragawa, Y. y Fujiyama, K. 1984. Synthesis of a gene for human growth hormone and its expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81(19):5956-5960.

Jeenes, D. J., Mackenzie, D. A., Roberts y Archer, D. B. 1991. Heterologous protein production by filamentous fungi. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 1991; 9:327-67.

Kameyama, L., Oviedo, N. y Guarneros, G. 2000. Bacteriófago lambda en: *Microbios en línea* eds. Dra. Esperanza Martínez Romero y Julio César Martínez Romero. UNAM.

Kart, G. 1996. *Biología celular y molecular*. McGram Hill Interamericana. México.

Keasling, J. D. y Cooper, S. 1994. Analysis of plasmid replication during the bacterial division cycle. *Methods Mol. Genet.* 3:380-388.

Kessler, C. y Manta, V. 1990. Specificity of restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. a review (edition 3). *Gene* 92:1-248.

Kessler, C., Neumaier, P. S. y Wolf, W. 1985. Recognition sequences of restriction endonucleases and methylases. A review. *Gene* 33: 1102.

Kelly, J. M. y Hynes, M. J. 1985. Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* 4: 475-479.

Kinghorn, J. R. y Turner, G (eds.). 1992. *Applied molecular genetics of filamentous fungi*. Chapman & Hall, New York.

**Landegren, U., Kaiser, R. y Sanders, J.** 1988. A ligase-mediated gene detection technique. *Science* 241: 1077-1080.

**Lederberg, J.** 1998. Plasmid (1952-1997). *Plasmid*. 39(1):1-9.

**López-Nieto, M. J., Ramos, F. R., Luengo, J. M. y Martín, J. F.** 1985. Characterization of the biosynthesis *in vivo* of  $\alpha$ -aminoadypil-cysteinyl-valine in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 343-351.

**Luria, S. E. y Suit, J. L.** 1987. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: molecular and cellular biology (Eds: Neidhardt, FC., Ingraham, JL., Low, KPB., Magasanik, B., Schaechter, M y Umberger, HE.) pp.1615-1624, American Society For Microbiology, Washington, DC.

**Mandel, M. y Higa, A.** 1992. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Biotechnology* 2(24):198-201.

**Maras, M., De Bruyn, A., Vervecken, W., Uusitalo, J., Penttila, M., Busson, R., Herdewijn, P. y Contreras, R.** 1999. *In vivo* synthesis of complex N-glycans by expression of human N-acetylglucosaminyltransferase in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *FEBS Lett.* 452: 365-370.

**Marmur, J., Rownd, R., Falkow, S., Baron, L. S., Schildkraut, C. y Doty, P.** 1961. The nature of intergeneric episomal infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 47:972-979.

**Mertz, E. J. y Davis, W. R.** 1972. Cleavage of DNA by restriction endonuclease generates cohesive ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69 (11): 3370-3374.

**Meselson, M. y Yuan, R.** 1968. DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 217: 1110-1114.



**Messing, J.** 1983. New M13 vectors for cloning. *Meth. Enzymol.* 101: 20-78 .

**Moser, R., Frey, S., Munger, K., Hehlgans, T., Klauser, S., Langen, H., Winnacker, E. L., Mertz, R. y Gutte, B.** 1987. Expression of the synthetic gene of an artificial DDT-binding polypeptide in *Escherichia coli*. *Protein engineering* 1: 339-343.

**Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H.** 1986. Specific amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 260.

**Mullis, K. P. B. y Faloona, F.** 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.

**Murray, N. E., Brammar, W. J. y Murray, K.** 1977. Lambdoid phages that simplify the recovery of *in vitro* recombinants. *Mol. Gen. Genet.* 150:53-61.

**Murray, N. E. y Murray, K.** 1974. Manipulation of restriction targets in phage lambda to form receptor chromosomes for DNA fragments. *Nature* 251(5475):476-481.

**Murray, K. y Murray, N. E.** 1975. Phage lambda receptor chromosomes for DNA fragments made with restriction endonuclease III of *Haemophilus influenzae* and restriction endonuclease I of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 98(3):551-564.

**Natt, E. y Scherer, G.** 1986. EMBL 12, a new lambda replacement vector with sites for *SalI*, *XbaI*, *BamHI*, *SstI* and *EcoRI*. *Nucleic Acids Res.* 14(17):7128-713.

**Neuman, E. y. Rosenheck, K.** 1972. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J. Membrane Biol.* 10:279-290.

**Neuman, E. M., Schaefer-Riddler, Y. W. y Hofschneider, P. H.** 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation. *EMBO J.* 1:841-845.

---

**Norrande, J., Kempe, T. y Messing, J.** 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* 26(1):101-106.

**Old, R. W. y Primrose, S. B.** 1998. *Principles of gene manipulation*. Blackwell Science, UK.

**Orbach, M. J.** 1994. A cosmid with a *Hyr* marker for fungal library construction and screening. *Gene* 150:159-162.

**Osiewacz, H. D.** 1994. A versatile shuttle cosmid vector for the efficient construction of genomic libraries and for the cloning of fungal genes. *Curr. Genet.* 26:87-90.

**Polman, J. K. y Larkin, J. M.** 1989. Purification of DNA from agarose gels. *Biotechnol. Tech.* 3:329-332.

**Pühler, A.** (Ed). 1993. *Biotechnology volume: genetic fundamentals and genetic engineering*. VCH Press. Germany.

**Punt, P. J., Van Biezen, N., Conesa, A., Albers, A., Mangnus, J y Van Denhondel, CAMJJ.** 2002. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol.* 20:200–206.

**Rodriguez, R. L. y Denhardt, D. T.** 1988. *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*. Eds. Butterworth. Boston. 85-102.

**Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, C., Erlich, H. y Arnheim, N.** 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analyses of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350 – 1354.

---

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharff, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. P. B. y Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-492.

Sambrook, J. y Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sánchez, M., Iglesias, F. J., Santamaría, C. y Domínguez, A. 1993. Transformation of *Kluyveromyces lactis* by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2087-2092.

Sánchez, O. y Aguirre, J. 1998 Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. *Fungal Genet. Newsl.* 43: 48-51.

Sharp, P. A., Sugden, B. y Sambrook, J. 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12: 3055.

Smith, H.O. y Birnstiel, M. L. 1976. A simple method for DNA restriction site mapping. *Nucleic Acids Res.* 3(9):2387-2398.

Smith, H. O. y Nathans, D. 1973. A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes. *J. Mol. Biol.* 81(3):419-423.

Summers, D. K. 1996. Biology of plasmids. Blackwell Science Ltd.

Triglia, T., Peterson, M. G. y Kemp, D. J. 1988. A procedure for *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.* 16: 8186.

---

**Turcq, B., Denayrolles, M. y Bégueret, J.** 1990. Isolation of the two allelic incompatibility genes *s* and *S* of the fungus *Podospora anserina*. *Curr. Genet.* 17:297-303.

**Vann, D. C.** 1995. Electroporation based transformation of freshly harvested conidia of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Newsl.* 42A:53.

**Vieira, J. y Messing, J.** 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing synthetic universal primers. *Gene* 19: 259-268.

**Vollmer, J. S. y Yanofky, C.** 1986. Efficient cloning of genes of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83 (13): 4869-4873.

**Waga, S. y Stillman, B.** 1994. Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of sv40 DNA replication *in vitro*. *Nature* 369: 207-212.

**Watson, D. J. y Cric, C. H. F.** 1953a. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, vol. 171. no.4356.pp: 737-738.

**Watson, D. J. y Cric, C. H. F.** 1953b. Genetical implication of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171 (4361): 964-967.

**Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T. R., Fareed, G. C. y Richardson, C. C.** 1968. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* 243: 4543-4555.

**Willets, N. y Skurray, R.** 1980. The conjugation system of f-like plasmids. *Annu. Rev. Genet.* 14: 41-76.

- Winnacker, E. L.** 1987. From genes to clones. introduction to gene technology. VCH Press. Weinheim, Germany.
- Wu, D. Y. y Wallace, R. B.** 1989. Specificity of the nick-closing activity of bacteriophage T4 DNA ligase. *Gene* 76: 245-254.
- Xoconostle-Cazares, B., León-Ramírez, C y Ruiz-Herrera, J.** 1996. Two chitin synthase genes from *Ustilago maydis*. *Microbiology* 142:377-387.
- Yanish-Perron C., Viera, J y Messing, J.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-199.
- Yelton, M. M., Hamer, J. E y Timberlake, W. E.** 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpc* plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:1470-1474.
- Yelton, M. M., Timberlake, W. E y Vanden Hondel, C. A. M. J. J.** 1985. A cosmid for selecting genes by complementation in *Aspergillus nidulans*; selection for the developmentally regulated locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:834-838.
- Yuan, R.** 1981. Structure and mechanism of multifunctional restriction endonucleases. *Annu Rev Biochem.* 50:285-319.
- Yuan, R. y Hamilton, D. L.** 1984. Type I and type III restriction-modification enzymes. in *DNA methylation, Biochemistry and biological significance*. IRS Press.
- Zhiqiang, A.; Farman, M. L., Budde, A.; Taura, S. y Leong, S. A.** 1996. New cosmid vectors for library construction, chromosome walking and restriction mapping in filamentous fungi. *Gene* 176(1): 93-96.

## ANEXO 1

## MEDIOS DE CULTIVO

## A.1.- MEDIOS PARA BACTERIAS

**Medio LB.**

Es un medio de cultivo para *E. coli*. Los componentes que lleva son:

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de Sodio	10 g

Se mezclan todos los componentes hasta que estén totalmente disueltos. Se ajusta el pH a 7.0 con NaOH 5 N y se afora a un litro con agua destilada. Seguidamente se esteriliza durante 20 minutos a 15 psi (1.05 kg/cm<sup>2</sup>). Cuando se agregan 20 g de agar bacteriológico se denomina **medio LA**.

**Medio NZY+ Broth.**

Medio empleado para la recuperación de células de *E. coli* después de la transformación en el proceso de mutagénesis dirigida. Está compuesto por los siguientes reactivos:

NZAmina	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g

Se ajusta el pH a 7.5 con NaOH. Antes de usar se agregan 12.5 mL de MgCl<sub>2</sub> 1 M, 12.5 mL de MgSO<sub>4</sub> 1 M, 10 mL de glucosa 2 M esterilizada por filtración, posteriormente se afora a 1 litro con agua destilada. A continuación se esteriliza con calor a 15 psi (1.05 kg/cm<sup>2</sup>) de presión.

**Medio SOB.**

Hanahan (1983). Medio utilizado para el crecimiento de *E. coli* durante la elaboración de células competentes. Sus componentes son los siguientes:

Triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	0.5 g

Se ajusta el pH a 7.5 con KOH, se afora a 1 litro con agua desionizada y se esteriliza a 15 psi (1.05 kg/cm<sup>2</sup>) durante 20 minutos. Antes de usarlo se agregan 20 mL de una solución de MgSO<sub>4</sub> 1 M esterilizada por filtración con una membrana estéril de 0.22 µm de diámetro de poro.

**Medio TB.**

Sambrook y Russell (2001). Medio de cultivo para *E. coli*, se emplea cuando se quiere obtener ADN plasmídico. Sus componentes son:

Triptona	12 g
Extracto de levadura	24 g
Glicerol	4 mL

Se mezclan todos los componentes y se disuelven totalmente, aforándose a 900 mL. Se esteriliza durante 20 minutos a 15 psi (1.05 kg/cm<sup>2</sup>) con calor húmedo. Antes de emplearse el medio, se añaden 100 mL de una solución estéril de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.17 M y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.72 M. Esta última solución puede ser hecha si se toman 2.31 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 12.54 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y se agregan a 90 mL de agua desionizada (una vez disueltas las sales, se afora a 100 mL para esterilizar con calor a 15 psi (1.05 kg/cm<sup>2</sup>) de presión).

## A.2.- MEDIO DE CULTIVO PARA HONGOS.

### Medio Czapeck.

Medio empleado para la germinación de esporas y para la selección de transformantes.

Este medio se prepara de la siguiente manera:

Sacarosa	30 g
NaNO <sub>3</sub>	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01 g

Estos componentes se disuelven totalmente, aforándose a 1 litro con agua desionizada.

Cuando se usó este medio para la regeneración de esporas electrocompetentes de *Penicillium chrysogenum* se añadió sorbitol a una concentración de 1 M como estabilizador osmótico.

### Medio Power.

Medio para la esporulación de *Penicillium chrysogenum*. Sus componentes son:

Este medio se preparo en dos partes, la primera:

Sacarosa	30 g
NaNO <sub>3</sub>	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01 g
KCl	52.18 g (este compuesto se utiliza sólo cuando el medio requiere un estabilizador osmótico, si se utiliza la fleomicina como marcador de selección, este compuesto se sustituye por sorbitol 1 M).



Estos componentes se disuelven y se aforan a 1 litro con agua desionizada.

La segunda parte se preparó de la siguiente manera (López-Nieto *y col.*, 1985):

Bacto-triptona	5 g
Lactosa	5 g
NaCl	4 g
Sólidos de maceración de maíz	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60 mg
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	50 mg
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	3 mg
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1 mg

Se disolvieron los componentes y se ajustó el pH a 5.5 con HPO<sub>4</sub>. A continuación se afora a 1 litro con agua desionizada.

Posteriormente se mezclan 500 mL de la primera solución con 500 mL de la segunda y se añaden 20 g de agar. Se esterilizó durante 20 minutos a 15 psi.

### **Medio YED.**

Medio empleado en la germinación de esporas y para la recuperación de esporas electrocompetentes.

Su composición es la siguiente:

Extracto de levadura	1% (p/v)
Glúcica	1% (p/v)
HEPES	20 mM pH 8.0, ajustado con Tris.

Una vez disueltos los compuestos se aforó a un volumen adecuado y se esterilizó con calor a 15 psi durante 20 minutos.

**ANEXO 2****SOLUCIONES.****Solución RF1.**

Esta solución se prepara de la siguiente forma:

Acetato potásico	30 mM
Cloruro de calcio	10 mM
Glicerol	15 % (p/v)
Cloruro de manganeso	50 mM
Cloruro de rubidio	100 mM
Ácido acético	0.2 M para ajustar el pH a 5.8.

Se esteriliza por filtración, a través de un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

**Solución RF2.**

Los componentes de esta solución son los siguientes:

Cloruro de calcio	75 mM
Glicerol	15 % (p/v)
MOPS	10 mM pH 7.0
Cloruro de rubidio	10 mM

Se ajusta el pH a 6.8 con NaOH y se esteriliza por filtración con un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

**Solución de lavado para electroporación de *E. coli*.**

Glicerol al 10% (v/v); para realizar esta solución se requiere de agua desionizada.

**Solución STET.**

EDTA	50 mM pH 8.0
Sacarosa	8 % (p/v)
Tris-HCl	10 mM pH 8.0
Tritón X-100	0.5 % (v/v)

**Solución de lisozima.**

Esta solución se prepara a 10 mg/mL en agua destilada estéril. Se conserva a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Solución TE.**

EDTA	1 mM pH 8.0
Tris-HCl	10 mM pH 8.0

**Solución de ARNasa.**

Se prepara la solución a 10 mg/mL en un tampón que contiene 15 mM de NaCl y 10 mM de Tris-HCl pH 7.5, la mezcla se mantiene durante 15 minutos en baño de agua en ebullición y se deja enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se alícuotea y se conserva a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Fenol Neutro.**

Antes de usar el fenol debe equilibrarse a pH mayor de 7.8, si el pH es ácido el ADN es degradado y se queda dentro de la fase fenólica.

El fenol bidestilado se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$  y cuando se va a preparar se funde en un baño de agua a  $68^{\circ}\text{C}$ .

Poner un volumen adecuado de fenol líquido (80-130 mL) en un frasco y agregar un volumen de Tris-HCl 0.5 M pH 8.0 a temperatura ambiente. Agitar con una barra magnética durante 15 minutos, permitir que se separen las dos fases y eliminar la fase superior.

Adicionar a la fase inferior (fenólica) un volumen igual de Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 y agitar en la misma forma descrita anteriormente, eliminándose la fase acuosa. Repetir esta actividad hasta que la parte fenólica alcance un pH de 7.8.

Después de que el fenol esta equilibrado, eliminar la fase acuosa y agregar 1/10 del volumen de Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 y guardar en un frasco ámbar o recubierto con papel aluminio a  $4^{\circ}\text{C}$  (Gorodezky, 2000).

**Solución CIA.**

Se ponen 24 partes de cloroformo y una parte de alcohol isoamílico, se mezcla y se guarda a  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Solución GTE.**

EDTA	10 mM pH 8 (ajustado con NaOH)
Glucosa	50 mM
Tris-HCl	25 mM pH 8.0

**Solución NS.**

NaOH	0.2 N
SDS	1 % (p/v)

Se coloca el volumen total a preparar con agua destilada estéril y se retira el volumen correspondiente a la suma que se vaya a agregar de la solución de SDS y NaOH. Posteriormente se agrega primero el SDS seguido del NaOH, para favorecer la solubilidad de la solución.

**Solución de acetato potásico para lisis alcalina.**

Se agregan los siguientes reactivos:

Acétato potásico 5 M	60 mL
Ácido acético glacial	11.5 mL
Agua destilada	28.5 mL

**Solución TAE 50X.**

Se agrega:

Acido acético glacial	57.1 mL
EDTA 0.5 M pH 8.0	100 mL
Tris-Base	242 g

Se afora a 1 litro con agua destilada.

**Tampón de carga 6X.**

Sacarosa	40 % (p/v)
Azul de bromofenol	0.25 % (p/v)
Xilenocianol	0.25 % (p/v)

---

Se esteriliza a  $1.05 \text{ kg/cm}^2$  durante 20 minutos y se conserva a  $4^\circ\text{C}$ , para evitar la contaminación con microorganismos.

**Solución de electroporación para hongos.**

Tris-HCl pH 7.5	10 mM
Sacarosa	270 mM
Acetato de litio	1 mM

Se esteriliza a  $1.05 \text{ kg/cm}^2$  durante 20 minutos y se conserva a  $4^\circ\text{C}$ .

**Solución de lavado para esporas electrocompetentes.**

Consiste en agua desionizada con una alta pureza (Millipore 18 M $\Omega$ .CM) conservada a  $4^\circ\text{C}$ .

**Solución de Tween 80 al 0.1%.**

Tween 80	100 $\mu\text{L}$
----------	-------------------

Se afora con agua destilada estéril a 100 mL.

## ANEXO 3

## REACTIVOS.

Ácido acético glacial, Baker.

Acetato de potasio, Baker.

Acetato de amonio, Baker.

ADN del bacteriófago  $\lambda$ , Invitrogen<sup>TM</sup>.

Agar bacteriológico, Bioxon.

Agarosa LE, SeaKem<sup>R</sup>, FMC

Alcohol absoluto, Baker.

Alcohol isoamílico, Baker.

Antibióticos

Ampicilina, fórmula farmacéutica Pretencyl<sup>MR</sup>.

Cloranfenicol, fórmula farmacéutica Cloranfexyl<sup>MR</sup>.

Fleomicina, CAYLA.

Azul de bromofenol, Sigma.

Bacto peptona, Bioxon.

Bacto triptona, Bioxon.

Bromuro de etidio, Sigma.

Cloruro de calcio, Baker.

Cloroformo, Baker.

Sulfato de Cobre, Baker.

Dextrosa, Baker.

EDTA, USB<sup>TM</sup>.

Enzimas:

Enzimas de restricción (Invitrogen)

*Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Nhe*I, *Bcl*I, *Pst*I, *Xba*I, *Sal*I, *Not*I, *Sac*II, *Sph*I, *Xho*I.

Fragmento Klenow de la ADN Polimerasa I, Invitrogen.

*Taq* ADN polimerasa, Invitrogen.

T4 ADN ligasa, Invitrogen.

*Pfu* polimerasa, Stratagene.

*Proof Star* Polimerasa, Quiagen.

RNasa A, Sigma.

Etanol industrial, Alcomex.

Extracto de levadura, Bioxon.

Fenol sólido, Gibco BRL.

FeCl<sub>3</sub> (Cloruro férrico), Baker.

FeSO<sub>4</sub> (Sulfato de Hierro), Baker.

Glicerol, Sigma.

HEPES, Baker.

HCl (ácido clorhídrico), Baker.

KCl (Cloruro de potasio), Baker.

KOH (Hidróxido de potasio), Baker.

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fosfato potásico monobásico), Baker.

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fosfato potásico dibásico), Baker.

Lactosa, Baker.

MES, Sigma

MgSO<sub>4</sub> (Sulfato de magnesio), Baker.

MnCl<sub>2</sub> (Cloruro de manganeso), Baker.

MnSO<sub>4</sub> (Sulfato de manganeso), Baker.

MOPS, Sigma.

NaCl<sub>2</sub> (Cloruro de sodio), Baker.

NaOH (Hidróxido de sodio), Baker.

NaNO<sub>3</sub>, (Nitrito de Sodio), Baker.

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sulfato de amonio), Baker.

PEG 8000, Sigma.

Nucleótidos (100 mM dNTP set PCR grade), Invitrogen.

Cebadores

Cos1, Cos 2, Cos 2B, Invitrogen.

Cos 2A, Sigma.

Quikchange Site Directed Mutagenesis kit, Stratagene

RbCl (Cloruro de rubidio), Sigma.

Sacarosa, Baker.

SDS, Sigma.

Sorbitol, Sigma.

Sólidos de maceración de maíz, Fersinsa Gist-Brocades S.A. de C.V.

Tris base, Baker.

Tris-HCl, Baker.

Tritón X-100, Sigma.

Xilenocianol, Sigma.



---

**ANEXO 4****APARATOS.**

- Analizador de imagenes GEL DOC 2000, Bio Rad.
- Autoclave, All American.
- Balanza analítica, Sartorius.
- Balanza granataría, Sartorius.
- Centrifuga AVANTI™ 30, Beckman.
- Centrifuga 5415C, Eppendorf.
- Centrifuga 5417R, Eppendorf.
- Cámara de Neubauer, Boeco.
- Cámaras de electroforesis EC370M, Minicell<sup>R</sup>.
- Electroporador 2510, Eppendorf.
- Electroporador Gene Pulser II, Bio-Rad.
- Estufa, Binder.
- Espectrofotómetro 10e, Cintra.
- Fuente de poder para electroforesis Power PAC 300 y 3000, Bio Rad.
- Incubadoras, Lab-Line Instruments.
- Microscopio CH30, Olympus.
- Potenciómetro, Jenco.
- Refrigerador -20°C, Revco.
- Refrigerador 4°C, Daewoo.
- Termociclador personal Mastercycler, Eppendorf.
- Thermomixer 5436, Eppendorf.
- Ultracongelador (-80°C), Bio-Freezer.