



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**CLONACIÓN DEL GEN *vhb* PROVENIENTE DE *Vitreoscilla stercoraria*
Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE RIFAMICINA B
POR *Amycolatopsis mediterranei*..**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

BIOL. PRISCILA GUERRA RAMÍREZ

DIRECTOR: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Co-DIRECTOR: Dr. Armando Mejía Alvarez

ASESOR: Dr. Javier Barrios González

México, D.F.

Mayo de 2006

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Genética del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa.

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa, se encuentra inscrita en el Padrón de Programas de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Este trabajo fue parcialmente financiado por el CONACYT:

Beca de Maestría No. **127838**

Además, se recibió apoyo con material y equipo proporcionado por el proyecto de convenio SEP-2003-C02-44911: Papel de los citocromos P450 en la biosíntesis de rifamicina por *Amycolatopsis mediterranei*.

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA

**CLONACIÓN DEL GEN *vhb* PROVENIENTE DE *Vitreoscilla stercoraria*
Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE RIFAMICINA B
POR *Amycolatopsis mediterranei*.**

Vo. Bo.

Comité tutorial:

Dr. Francisco José Fernández Perrino
(Director)

Dr. Armando Mejía Álvarez
(Co-Director)

Dr. Javier Barrios González
(Asesor)

Miembros del jurado:

Dr. Javier Barrios González (Presidente)

Dr. Octavio Loera Corral (Secretario)

Dra. Laura Kawasaki Watanabe (Vocal)

Dr. César Hugo Hernández Rodríguez (Vocal)

A **Román**, mi amor y compañero de la vida

A **Yoalli y Centli**

Todos fruto paralelo a la maestría

A mis padres:
Irene y Ricardo
por inculcarnos el estudio y el amor a la vida

A mis hermanos:
Ricardo Arturo (†), Patricia, Juan Carlos, Diana y María Irene
por lo que hemos compartido

A mis amigos
por los buenos viejos y nuevos tiempos

Agradecimientos

Primeramente quiero agradecer de manera muy especial a la Universidad Autónoma Chapingo por todo el apoyo recibido tanto durante los estudios de maestría como a lo largo de mi vida profesional y personal.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Francisco J. Fernández Perrino por su amistad y constante apoyo, de verdad un asesor inigualable

Agradezco al Dr. Armando Mejía Álvarez por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

Gracias a mis compañeros y amigos del laboratorio con los que compartí técnicas y pláticas, consejos y regaños, la emoción de los resultados y la frustración del “no sale”, especialmente a Juan Carlos, Edgar, Edmundo, Tania y Rosa.

Así mismo agradezco a la Dra Beatriz Xoconostle Cázares del CINVESTAV por las facilidades brindadas para la realización de la Biobalística, y a Rocío Suárez y Angel Absalón por sus valiosas colaboraciones.

Agradezco enormemente a las muchas otras personas que van conmigo en el río de la vida y que sin darse cuenta me han brindado su amistad y apoyo solidario, a los de la FES-Zaragoza, a los de la UAM, y a los de Chapingo, gracias.

Finalmente quiero agradecer muy especialmente a Román todo el apoyo que siempre me ha brindado y que no escatima en ningún momento. Sin su amor, paciencia y solidaridad nunca hubiera terminado este trabajo.

RESUMEN

La rifamicina es un antibiótico ansamicínico naftalénico producido por la bacteria Gram positiva *Amycolatopsis mediterranei*, que pertenece al orden de los Actinomycetales. Este antibiótico se usa contra los patógenos *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* (causantes de la tuberculosis y lepra, respectivamente), *Mycobacterium avium* (asociado con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, SIDA) y *Pneumococcus*, entre otros, y actúa inhibiendo específicamente la síntesis de ARN al unirse a la subunidad β de la ARN polimerasa. Debido a la amplia demanda de la rifamicina, por su gran valor práctico contra este tipo de enfermedades, se han desarrollado diversas estrategias para incrementar su producción, como la obtención de cepas mejoradas mediante mutagénesis clásica, la modificación en la composición del medio de cultivo (adición de Barbitol, por ejemplo), la recombinación genética, y, recientemente, la utilización de métodos de clonación génica. Un problema recurrente en la producción de rifamicina a nivel industrial ha sido que las cepas de alta producción tienden a producir caldos extremadamente viscosos, lo que ocasiona una gran dificultad para proporcionar un adecuado mezclado y aporte de oxígeno en el biorreactor; esta viscosidad es consecuencia de la forma filamentosa y ramificada (micelias) en que crece *A. mediterranei*. La menor transferencia de oxígeno en edades avanzadas del cultivo provoca el cese de la producción de rifamicina. En este trabajo se plantea, como posible solución a este problema de demanda de oxígeno, la introducción de un gen bacteriano que codifica para la síntesis de una proteína (hemoglobina bacteriana) con capacidad de transporte de oxígeno.

En la producción de otros antibióticos como la cefalosporina, se ha demostrado que la expresión intracelular del gen de la hemoglobina bacteriana (*vhb*, aislado de *Vitreoscilla stercoraria*) en *Acremonium chrysogenum* incrementa la captación de oxígeno, también considerado uno de los principales factores limitantes de la producción de este antibiótico. El gen de hemoglobina bacteriana ha sido expresado también en *E. coli* y en *Saccharopolyspora erythraea*, que al igual que *Amycolatopsis mediterranei* pertenece al grupo de los actinomicetos.

La introducción del gen *vhb* con el promotor constitutivo P_{ermE} en *A. mediterranei* se realizó utilizando el plásmido pUAMSAG1 como vehículo de clonación. Este es un plásmido construido a partir del plásmido pULVK2, un plásmido bifuncional *A. mediterranei-E. coli*, y del plásmido pIJ4026, del que se tomó el marcador de resistencia a eritromicina.

Se probaron diferentes metodologías para transformar *A. mediterranei*, como la transformación por electroporación, con protoplastos y utilizando cationes alcalinos y polietilenglicol, así como combinaciones de las mismas sin lograr obtener transformantes. Finalmente, resultó exitoso el método de transformación por biobalística. Dos de las diez transformantes seleccionadas por resistencia a eritromicina y mayor captación de oxígeno se evaluaron en condiciones de baja aireación. Para la cuantificación de rifamicina B se utilizó el método espectrofotométrico, observándose un incremento estadísticamente significativo en la producción de rifamicina B de la transformante BII10 de 13.9% en la fermentación con barbital y de 29.5% en la fermentación sin barbital.

La utilización de técnicas moleculares dirigidas, en este caso la expresión heteróloga de un gen para una hemoglobina bacteriana, permitió aumentar la producción de rifamicina B por *A. mediterranei* en condiciones limitantes de oxígeno.

La producción preliminar de rifamicina B obtenida en este experimento probablemente no refleja la producción potencial de esta nueva cepa; será necesario optimizar las condiciones de cultivo para esta cepa en particular.

ÍNDICE

| | Página |
|--|---------------|
| I. ANTECEDENTES | |
| 1.1) RIFAMICINA B | 1 |
| 1.2) <i>Amycolatopsis mediterranei</i> | 5 |
| 1.3) GEN <i>vhb</i> | 8 |
| 1.4) PROMOTOR DEL GEN | 10 |
| 1.5) VECTOR DE CLONACIÓN | 11 |
| II. JUSTIFICACIÓN | 14 |
| III. HIPÓTESIS | 15 |
| IV. OBJETIVO | 15 |
| V. MATERIALES Y METODOS | |
| 5.1) MICROORGANISMOS UTILIZADOS | 16 |
| 5.1.2) CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS | 16 |
| 5.2) APARATOS Y REACTIVOS | 17 |
| 5.2.1) APARATOS | 17 |
| 5.2.2) REACTIVOS PARA BIOLOGIA MOLECULAR | 18 |
| 5.2.3) OTROS SISTEMAS PARA LA MANIPULACIÓN DE ADN | 18 |
| 5.3) VECTORES UTILIZADOS | 19 |
| 5.4) MEDIOS DE CULTIVO | 22 |
| 5.5) SECUENCIA DEL GEN <i>vhb</i> DE <i>Vitreoscilla stercoraria</i> Y DEL PROMOTOR P_{ermE} DE <i>Saccharopolyspora erythraea</i> | 26 |
| 5.6) DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS | 27 |
| 5.7) ESQUEMA GENERAL DE LA CLONACIÓN DEL GEN <i>vhb</i> Y DEL PROMOTOR P_{ermE} EN EL PLÁSMIDO pULVK2, CON EL QUE SE LLEVÓ A CABO LA POSTERIOR TRANSFORMACIÓN DE <i>A.mediterranei</i> | 29 |
| 5.7.1) EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE <i>V. stercoraria</i> | 30 |
| 5.7.2) EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE <i>S. erythraea</i> | 30 |
| 5.7.3) REACCIÓN EN CADENA DE LA ADN POLIMERASA (PCR) | 32 |
| 5.7.4) ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA | 33 |
| 5.7.5) EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA UTILIZANDO EL SISTEMA QUIAEXII | 34 |
| 5.7.6) DIGESTIÓN | 35 |

| | |
|--|----|
| 5.7.7) LIGACION | 36 |
| 5.7.8) PREPARACION DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>E. coli</i> | 37 |
| 5.7.9) TRANSFORMACIÓN DE <i>E.coli</i> POR ELECTROPORACIÓN | 39 |
| 5.7.10) AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO DE <i>E. coli</i> (MINIPREPARACIONES) | 39 |
| 5.7.11) ELIMINACIÓN DE ARN Y PROTEINAS DEL ADN | 40 |
| 5.7.12). SECUENCIACIÓN | 41 |
| 5.8) MUTAGÉNESIS DIRIGIDA | 42 |
| 5.9) CLONACIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA A ERITROMICINA COMO MARCADOR DE SELECCIÓN ALTERNO (CONSTRUCCIÓN DEL PLASMIDO pUAMSAG1) | 44 |
| 5.10) TRANSFORMACIÓN DE <i>A. mediterranei</i> | |
| 5.10.1) PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>A. mediterranei</i> | 44 |
| 5.10.2) TRANSFORMACIÓN DE <i>A. mediterranei</i> POR ELECTROPORACIÓN | 45 |
| 5.10.3) TRANSFORMACIÓN DE <i>A. mediterranei</i> POR BIOBALÍSTICA | 48 |
| 5.11) EXTRACCIÓN DE ADN DE TRANSFORMANTES DE <i>A. mediterranei</i> | 50 |
| 5.12) COMPROBACIÓN DE TRANSFORMANTES | 51 |
| 5.13) FERMENTACIÓN (PRODUCCION DE RIFAMICINA) | 51 |
| 5.14) CUANTIFICACIÓN DE RIFAMICINA | 52 |
| 5.15) DETERMINACIÓN DE BIOMASA (peso seco) | 54 |
| VI. RESULTADOS | |
| 6.1) OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO DE <i>V. stercoraria</i> , Y <i>S. erythraea</i> | 55 |
| 6.2) DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA OBTENCIÓN POR PCR DEL PROMOTOR P_{ermE} (de <i>S. erythraea</i>) Y DEL GEN <i>vhb</i> (de <i>V. stercoraria</i>) | 55 |
| 6.3) OBTENCIÓN DEL PROMOTOR P_{ermE} Y DEL GEN <i>vhb</i> POR PCR | 56 |
| 6.4) EXTRACCIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE INTERES DEL GEL DE AGAROSA CON QUIAEXII | 57 |
| 6.5) CLONACIÓN Y COMPROBACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE INTERES EN EL PLASMIDO pULVK2 | 58 |

| | |
|---|----|
| 6.6) CLONACIÓN DEL FRAGMENTO DE 809 pb EN EL PLÁSMIDO pBKS+ PARA REALIZAR SU SECUENCIACIÓN | 60 |
| 6.7) SECUENCIA DEL FRAGMENTO DE 809 pb INSERTADO en pULVK2 y en pBKS+ | 61 |
| 6.8) CORRECCIÓN DE LA DELECIÓN DE DOS BASES EN EL PUNTO DE FUSIÓN DE LOS FRAGMENTOS CORRESPONDIENTES AL PROMOTOR P_{ermE} Y AL GEN <i>vhb</i> MEDIANTE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA | 64 |
| 6.9) INSERCIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA A ERITROMICINA COMO MARCADOR DE SELECCIÓN ALTERNO | 67 |
| 6.10) REINSERCIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA A ERITROMICINA PARA CONSERVAR LA REGION MINIMA REQUERIDA PARA LA REPLICACIÓN | 68 |
| 6.11) ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DEL pUAMSAG1 | 70 |
| 6.12) TRANSFORMACIÓN DE <i>A. mediterranei</i> | 71 |
| 6.13) DETERMINACIÓN DE LA DOSIS DE ERITROMICINA PARA SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES | 72 |
| 6.14) TRANSFORMACIÓN POR BIOBALÍSTICA | 72 |
| 6.15) EXTRACCIÓN DE ADN DE POSIBLES TRANSFORMANTES | 73 |
| 6.16) COMPROBACIÓN DE TRANSFORMANTES POR PCR | 74 |
| 6.17) FERMENTACIÓN (PRODUCCIÓN DE RIFAMICINA) | 76 |
| 6.18) CUANTIFICACIÓN DE RIFAMICINA | 77 |
| 6.19) DETERMINACIÓN DE BIOMASA (peso seco) | 81 |
| 6.20) ANALISIS ESTADÍSTICO | 82 |
| VII. DISCUSIÓN | 84 |
| VIII. CONCLUSIÓN | 89 |
| IX. PERSPECTIVAS | 90 |
| X. REFERENCIAS | 91 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura de la rifamicina B | 2 |
| Figura 2. Etapa final de la biosíntesis de rifamicina B sin ramificaciones | 4 |
| Figura 3. Morfología filamentosa y ramificada que adopta el micelio de <i>Amycolatopsis mediterranei</i> | 5 |
| Figura 4. Estructura tridimensional de la hemoglobina Bacteriana de <i>Vitreoscilla</i> | 8 |
| Figura 5. Mapa del plásmido pULVK2 | 19 |
| Figura 6. Mapa del plásmido pBluescript KS (+) (pBKS+) | 20 |
| Figura 7. Mapa del plásmido pIJ4026 | 21 |
| Figura 8. Secuencia del gen <i>vhb</i> , acceso M27061 | 26 |
| Figura 9. Secuencia del promotor P_{ermE} , acceso M11200 | 27 |
| Figura 10. Esquema general de clonación del gen <i>vhb</i> y del promotor P_{ermE} en pULVK2 | 29 |
| Figura 11. Digestión de los plásmidos pBluescript KS+ y pUAMPG2 con las enzimas <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III, | 42 |
| Figura 12. Obtención de ADN genómico de (A) <i>V. stercoraria</i> , y (B) <i>S. erythraea</i> | 55 |
| Figura 13. Amplificación por PCR del promotor P_{ermE} de <i>S. erythraea</i> y del gen <i>vhb</i> de <i>V. stercoraria</i> | 57 |
| Figura 14. Extracción de los fragmentos correspondientes al gen <i>vhb</i> y al promotor P_{ermE} directamente del gel de agarosa con QuiaexII | 57 |
| Figura 15. Minipreps con los plásmidos linearizados con <i>Bam</i> HI | 59 |
| Figura 16. Análisis de las 3 transformantes que probablemente poseen el inserto | 59 |
| Figura 17. Minipreps de la clonación del fragmento de 809 pb en el plásmido pBKS+ | 60 |
| Figura 18. Comprobación de la presencia del inserto mediante la liberación de éste | 61 |

| | |
|--|----|
| Figura 19. Secuencia obtenida con el cebador GV3 | 61 |
| Figura 20. Secuencia obtenida con el cebador PV5 | 62 |
| Figura 21. Comparación entre la secuencia esperada y la secuencia obtenida. | 63 |
| Figura 22. PCR para la Mutagénesis Dirigida con el plásmido pUAMPG2 | 64 |
| Figura 23. PCR para la Mutagénesis Dirigida con el plásmido pVKSVH | 65 |
| Figura 24. Secuenciación de la fusión P_{ermE} - <i>vhb</i> en donde se observa la repetición del cebador en tandem | 65 |
| Figura 25. Plásmido pBKS VH amplificado por una reacción de PCR para Mutagénesis Dirigida | 66 |
| Figura 26. Secuenciación del fragmento mutado con temperatura de hibridación de 65 °C | 67 |
| Figura 27. Minipreps de la clonación del gen de resistencia a eritromicina en pUAMPG1 | 68 |
| Figura 28. Mapa de la construcción del plásmido pUAMPG2 y pUAMSAG1 | 69 |
| Figura 29. Análisis de restricción del pUAMSAG1 | 70 |
| Figura 30. Extracción de ADN de posibles transformantes de <i>A. mediterranei</i> | 73 |
| Figura 31. Comprobación de transformantes por PCR | 75 |
| Figura 32. Comprobación de transformantes por PCR | 75 |
| Figura 33. Comparación del color del caldo de fermentación | 76 |
| Figura 34. Comparación del color de la fermentación | 76 |
| Figura 35. Gráfica de la curva patrón obtenida | 78 |
| Figura 36. Concentración de rifamicina B en los tratamientos con barbital | 79 |
| Figura 37. Concentración de rifamicina B en los tratamientos sin barbital | 80 |
| Figura 38. Concentración de rifamicina B en los tratamientos con y sin barbital | 80 |
| Figura 39. Valores promedio de biomasa (peso seco) en los diferentes tratamientos | 81 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Concentraciones de agarosa utilizadas en los geles para la resolución de los tamaños de fragmentos de ADN | 33 |
| Tabla 2. Resultados del crecimiento de <i>A. mediterranei</i> con dosis de eritromicina de 1 a 10 µg/mL | 72 |
| Tabla 3. Absorbancias obtenidas a 425 nm de soluciones de rifamicina B de concentración conocida para la elaboración de la curva patrón. | 77 |
| Tabla 4. Valores promedio de las absorbancias obtenidas a 425 nm y concentración de rifamicina B (µg/mL), calculada a partir de la ecuación de la curva) del caldo de fermentación al T1 y T2. | 79 |
| Tabla 5. Valores promedio de biomasa (peso seco) determinada al T2 | 81 |
| Tabla 6. Análisis estadístico de la comparación de la producción de rifamicina B (valores en la última columna menores de 0.05 indican diferencia significativa) | 82 |
| Tabla 7. Análisis estadístico de la comparación de la biomasa obtenida (valores en la última columna menores de 0.05 indican diferencia significativa). | 83 |

I. ANTECEDENTES

1.1) RIFAMICINA B.

Las ansamicinas son una clase muy importante de antibióticos producidos por varios actinomicetos. Estructuralmente, se caracterizan por contener un macrociclo compuesto de un cromóforo bencénico o naftalénico unido por una cadena alifática ansa, que finaliza en el cromóforo mediante un enlace amida. Entre las características que distinguen a los diferentes tipos de estos antibióticos se encuentran la longitud de la cadena macrocíclica, el tipo de cromóforo y el grado de modificación post-sintética. Ejemplos de ansamicinas incluyen las ansamitocinas, geldanamycinas estreptovaricinas y naftomicinas (Rinehart y Shields, 1976). La rifamicina B producida por *Amycolatopsis mediterranei*, es uno de los miembros más notables de la familia de las ansamicinas. Se ha usado clínicamente en una forma sintética modificada llamada rifampicina desde mediados de la década de los 60's y se considera todavía una de las terapias más efectivas en el tratamiento de la tuberculosis y de otras infecciones micobacterianas (Sepkowitz *et al.*, 1995) como la lepra (enfermedades que en los últimos años han resurgido con gran fuerza, ya que además la tuberculosis es muy frecuente en enfermos con Síndrome de Inmuno-Deficiencia Adquirida, SIDA). En nuestro país se estima que el 12% de los casos de SIDA también presentan tuberculosis (Ferreira, 1995). También es usado contra *M. avium* y *Pneumococcus* resistentes a penicilina, principalmente, además de ser activo contra una gran variedad de otros organismos, incluyendo muchas bacterias, y algunos eucariontes y virus (Lal *et al.*, 1995).

La rifamicina B y su derivado sintético, la rifampicina, inhiben específicamente la transcripción por ARN polimerasas procarióticas. Aunque tienen una marcada preferencia por la enzima bacteriana, también inhiben la ARN polimerasa de los cloroplastos y mitocondrias de algunos eucariontes (Madigan, 1997). Esta selectividad, y su elevada potencia (la ARN polimerasa bacteriana es inhibida en un 50% por concentraciones 2×10^{-8} M de rifampicina), han hecho de estos dos antibióticos agentes bactericidas de aplicación médica contra un gran número de enfermedades, como las mencionadas anteriormente. El aislamiento de mutantes resistentes a la rifamicina que tenían subunidades β de movilidad electroforética modificada

indica que esta subunidad contiene el sitio de unión a rifamicina. Las rifamicinas no inhiben la unión de la ARN polimerasa al promotor, ni tampoco evitan la formación del primer enlace fosfodiéster, sino que bloquean el alargamiento posterior de la cadena. La ARN polimerasa inactivada queda unida al promotor, bloqueando en consecuencia la iniciación por otra molécula de enzima activa. Sin embargo, una vez que ha tenido lugar la iniciación de la síntesis de la cadena de ARN, las rifamicinas no tienen efecto alguno sobre el proceso de alargamiento posterior (Voet y Voet, 1990).

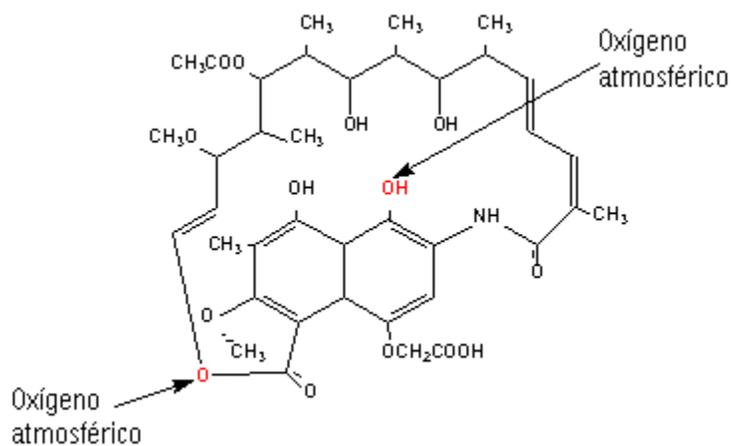


Figura 1. Estructura de la rifamicina B

En la Fig. 1 se puede observar que la estructura de la rifamicina B está constituida de dos partes básicas, una de ellas es un grupo aromático con un anillo naftalénico conocida como cromóforo y la otra es una cadena alifática también conocida como cadena ansa. Esta cadena forma un puente entre dos posiciones no adyacentes del grupo aromático (Brufani *et al.*, 1964).

La biosíntesis de la rifamicina comienza en la vía HMP (ciclo de las pentosas o de la hexosa monofosfato), en donde por cada dos moléculas de glucosa se producen una eritrosa-4-fosfato y una fructosa-6-fosfato. Esta última puede ser incorporada a la glucólisis o vía EMP (Emden-Meyerhoff-Parnas) para producir fosfoenolpiruvato, que posteriormente es

condensado con eritrosa-4-fosfato para formar 3-desoxi-D-arabinoheptuloso (DAH). El DAH pertenece a la tercera ruta del metabolismo primario, la vía del sikimato, que conduce por un lado hacia la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y por el otro al metabolismo secundario (para la biosíntesis del cromóforo o núcleo central de la rifamicina). Particularmente, la ruta se desvía en el ácido 3-desoxi-D-arabinoheptulosónico 7-fosfato (DAHP), lo cual fue demostrado por Gyax *et al.* en 1990. Posteriormente este aminoácido aromático es convertido en 3-amino 5-hidroxi-benzil-CoA (Becker *et al.*, 1983; Gyax *et al.*, 1990), por transferencia del grupo amino de la glutamina, originando glutamato que queda disponible para captar otro grupo amino (generalmente a partir de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o de NH_4OH). En una etapa siguiente se sintetiza la mencionada cadena ansa, mediante la incorporación sucesiva de dos moléculas de malonato y ocho de metilmalonato a través de malonil-CoA y metil-malonil-CoA, las cuales son generadas por isomerización enzimática de succinil-CoA (Karlsson *et al.*, 1974; Weiwen y Ruishen, 1996), cuyo origen es la vía EMP y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

La Fig. 2 muestra los últimos pasos de la biosíntesis de rifamicinas. En esta etapa final es importante resaltar la incorporación de un átomo de oxígeno como grupo éter vinílico, en el carbono 29 de la molécula de rifamicina S. Este oxígeno, al igual que el del carbono 1 del grupo aromático, proviene del oxígeno atmosférico, como demostraron Anderson *et al.* (1989) mediante estudios en atmósfera artificial con oxígeno radiactivo ($^{18}\text{O}_2$). La rifamicina S, por su parte, es transformada en rifamicina SV por reducción NADH+H dependiente (Ghisalba *et al.*, 1982), y ésta es finalmente convertida en rifamicina B. Esta última transformación aun no está muy clara, sin embargo, mediante estudios con isótopos radiactivos ((1- ^{14}C)-glicerol), se ha demostrado que el grupo acetato esterificado en el hidroxilo del carbono 4 del anillo aromático proviene de un compuesto de 3 átomos de carbono relacionado con el glicerol (Ghisalba *et al.*, 1982).

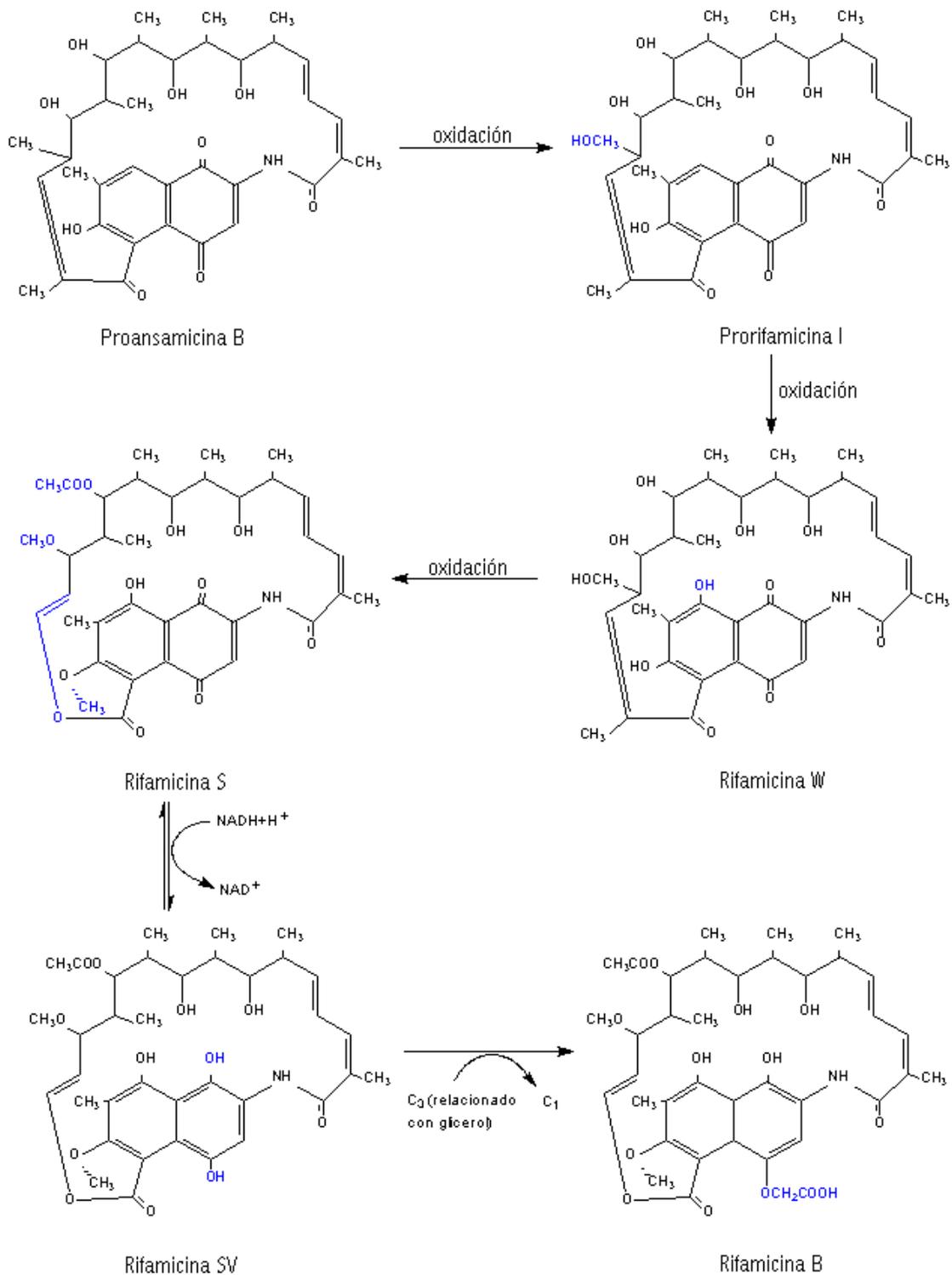


Figura 2. Etapa final de la biosíntesis de rifamicina B sin ramificaciones (White *et al.*, 1973), los cambios se muestran en color azul.

1.2) *Amycolatopsis mediterranei*.

Amycolatopsis mediterranei se aisló en 1957 del suelo de un bosque de pino francés. Aunque otras cepas bacterianas, como *Streptomyces tolypophorus* o *Micromonospora lacustris* sp., también producen rifamicina se considera a *Amycolatopsis mediterranei* como la cepa industrial, debido a su capacidad para producir grandes cantidades de dicho compuesto. La morfología de esta bacteria es filamentosa (Fig. 3) y presenta una amplia gama de colores en sus colonias, que van de gris a amarillo y naranja, dependiendo del medio. En medio líquido, *A. mediterranei* produce al menos 5 diferentes fracciones de rifamicina. Inicialmente, cuando fue descubierta la cepa se le llamó *Streptomyces mediterranei*, sin embargo, debido a su pobre esporulación y a la tendencia del micelio a fragmentarse en pequeñas unidades en forma de bastoncillos, posteriormente se reexaminó su posición taxonómica clasificándola por la composición de su pared como *Nocardia mediterranei*. Un criterio morfológico y bioquímico más estricto, basado tanto en la composición de su pared como en la ausencia de ácido micólico, reclasificaría nuevamente a esta bacteria como *Amycolatopsis mediterranei* (Lal *et al.*, 1995).

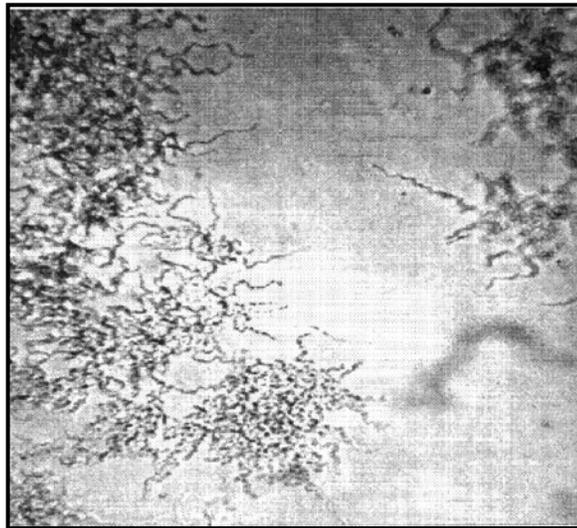


Figura 3. Morfología filamentosa y ramificada que adopta el micelio de *Amycolatopsis mediterranei*.

Un problema recurrente en la producción de rifamicina a nivel industrial ha sido que las cepas de alto rendimiento tienden a generar caldos extremadamente viscosos, lo que dificulta un adecuado mezclado y aporte de oxígeno en el biorreactor (Mejía, 1998). Esta viscosidad también es consecuencia de la forma filamentosa y ramificada (miceliar) en que crece *A. mediterranei*.

La menor transferencia de oxígeno en edades avanzadas de cultivo provoca el cese de la producción de rifamicina B, con la consiguiente acumulación de rifamicina W (intermediario de la ruta biosintética inmediatamente anterior a la incorporación de O₂ atmosférico para la creación del grupo eter vinílico en el carbono 29 de la molécula de ansamicina). También resulta importante considerar que *A. mediterranei* es un microorganismo aeróbico, por lo que la demanda de oxígeno durante la idiofase depende no sólo de los requerimientos biosintéticos del antibiótico, sino también de los energéticos a través de la actividad de su cadena respiratoria (Mejía *et al.*, 1998).

Se han empleado diferentes métodos para mejorar la producción industrial de rifamicina (Lal *et al.*, 1995), entre ellos, se pueden destacar:

- 1) Modificaciones en la composición del medio de cultivo. Por ejemplo, Margalith y Pagani (1961) encontraron que ciertas sustancias pueden causar un cambio en el medio que se refleja en un incremento en la producción de rifamicina B. El dietilbarbiturato de sodio tiene este efecto, al actuar inhibiendo el consumo de oxígeno en cadena respiratoria para que de esta manera se permita la utilización del oxígeno en la biosíntesis de rifamicina. De esta manera se han obtenido mutantes sensibles a 0.5% de barbital con una capacidad de producción de rifamicina B superior en casi 200% con respecto a la cepa progenitora (Mejía, 1998).
- 2) Mutaciones. En general, la cepa productora se somete a radiación U.V. o tratamiento con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina y las colonias mutantes que producen mayor cantidad de antibiótico se seleccionan. De esta manera, mientras que en el año de 1957, la producción era de 500 mg/L, actualmente se ha incrementado hasta 15 g/L en cepas altamente mejoradas mediante esta técnica.

- 3) Recombinación génica. En este método, clones parentales se cultivan por separado y posteriormente se realiza una mezcla con sus micelios, que se plaquea sobre agar suplementado con diferentes aminoácidos, a los cuales son deficientes las cepas parentales. De esta manera, por ejemplo, Schupp *et al.* (1981) fueron capaces de aislar la cepa recombinante R-21 (fototrófica y resistente a eritromicina), a partir de la cruce intraespecífica de dos cepas de *A. mediterranei* (T-104 y F-191). Esta cepa produjo nuevas rifamicinas, aparte de la rifamicina B, las rifamicinas O, S, W y P. Además de que la mayoría de las cepas recombinantes muestran un incremento en los niveles de producción en comparación con las cepas parentales
- 4) Métodos de clonación génica. *A. mediterranei* posee una naturaleza compleja que dificulta extremadamente su manipulación genética. Inicialmente, algunos grupos de investigación aplicaron los métodos de clonación usados para *Streptomyces* en *A. mediterranei* por las similitudes entre los dos microorganismos, aunque no se logró obtener un vector de clonación adecuado, debido principalmente a:
- la no disponibilidad de un plásmido que pudiera usarse como vector de clonación,
 - que los vectores de clonación de *Streptomyces* como el pIJ61, pIJ922 o pIJ702 no son estables en *A. mediterranei*,
 - la no aplicabilidad de los métodos de clonación génica de *Streptomyces* para *A. mediterranei*.

La presencia de plásmidos nativos de *A. mediterranei* no es muy común. Solamente un plásmido, el denominado pMEA100, ha sido aislado de esta bacteria, pero presenta bajo número de copias, se integra al cromosoma y es difícil de aislar (Madon *et al.*, 1987). Por otro lado, Schupp y Divers (1986), desarrollaron un método de preparación y regeneración de protoplastos para *A. mediterranei*, con la finalidad de transformar el microorganismo utilizando un método similar al usado para *Streptomyces*, aunque no lograron su transformación con plásmidos derivados de éste último.

Finalmente, Lal *et al.* (1995), mencionan que su equipo logró aislar el plásmido pA387 de *Amycolatopsis* sp.; plásmido que presenta un tamaño de 29.6 Kpb y está presente en forma libre. A partir de éste se seleccionó el plásmido recombinante pRL1 que pudo ser usado para transformar *Amycolatopsis orientalis* por electroporación. Este es el primer vector de clonación que se ha logrado usar con éxito para transformar *A. mediterranei*, lo cual marcó el primer paso para el posterior mejoramiento mediante clonación génica.

1.3) GEN *vhb*

La bacteria filamentosa Gram-negativa *Vitreoscilla*, un miembro de la familia Beggiatoa, es un aerobio estricto que se encuentra en ambientes pobres en oxígeno, tales como aguas estancadas y materia orgánica en descomposición. El crecimiento de esta bacteria bajo condiciones hipóxicas da como resultado la inducción de la síntesis de una hemoproteína homodimérica soluble que tiene una extraordinaria similitud con la hemoglobina eucariótica (Khosla y Bailey, 1988a). Esta hemoglobina producida por *Vitreoscilla* es una molécula homodimérica constituida por dos subunidades idénticas, de 15.7 kDa junto con dos grupos protohemo IX por molécula (Fig. 4).

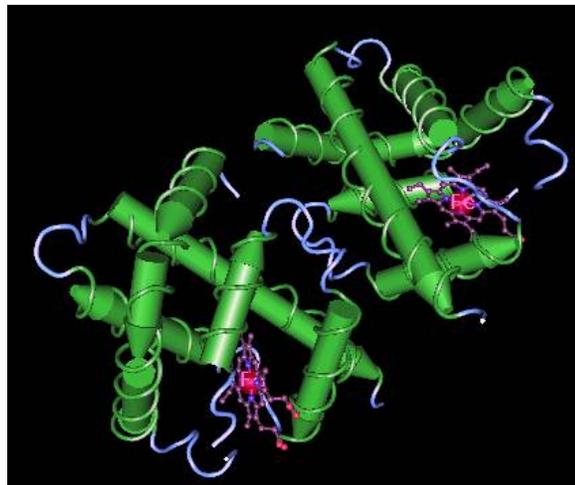


Figura 4. Estructura tridimensional de la hemoglobina bacteriana de *Vitreoscilla* (Joshi, M. *et al.*, 1998).

La secuencia de aminoácidos de la hemoproteína soluble muestra homología con otras hemoglobinas, por lo que se le designó con el nombre de *Vitreoscilla* Hb (o VtHb, abreviado). Bajo condiciones de laboratorio, la concentración del grupo hemo en la célula de *Vitreoscilla* se incrementa de 20 a 40 veces cuando la concentración de oxígeno disminuye por debajo del nivel crítico o cuando el organismo se expone a condiciones hipóxicas. Esto se debe a un incremento en la concentración de la VtHb, lo cual demuestra su capacidad de captación de oxígeno y de transferencia a las membranas respiratorias bajo estas condiciones de limitación de oxígeno (Dikshit y Webster, 1988).

La expresión intracelular de esta hemoproteína bacteriana ha provocado incrementos tanto en la productividad como en el crecimiento de un gran número de organismos de interés industrial. La introducción y la expresión intracelular del gen *vhb* que produce la VtHb se estudió primero en *E. coli*, en donde su expresión provocó un incremento en el crecimiento celular, realizó la síntesis proteica y mejoró la producción derivada de genes clonados, tales como el de la cloranfenicol acetiltransferasa, la β -galactosidasa, la catecol-2,3-dioxigenasa y la α -amilasa, en cultivos con limitación de oxígeno. Investigaciones bioquímicas posteriores mostraron que la expresión del gen *vhb* en *E. coli* incrementa el número neto de protones transferidos del citoplasma por oxígeno reducido, el incremento del pH transmembranal y el contenido de ATP con respecto a las células sin dicho gen (Khosla y Bailey, 1988b).

El gen *vhb* ha sido introducido y expresado también en varios microorganismos y en eucariontes con importancia industrial. La introducción de la VtHb en *Acremonium chrysogenum* incrementa la producción de cefalosporina C de 2 a 3 veces con respecto a la cepa control (DeModena *et al.*, 1993), por ejemplo.

En *Streptomyces coelicolor*, la expresión del gen *vhb* mejoró el rendimiento específico del antibiótico policétido aromático actinorrodina hasta en 10 veces, en cultivo en lote (Magnolo *et al.*, 1991).

Sander *et al.* (1994) introdujeron y expresaron el gen *vhb* en una cepa de *Corynebacterium glutamicum* que produce elevados niveles de L-lisina. La expresión del gen

incrementó la concentración y el rendimiento final de L-lisina en cerca de un 30% en un biorreactor.

Chen *et al.* (1994) han expresado constitutivamente el gen *vhb* en el citoplasma de *Saccharomyces cerevisiae*. Las células de levadura con VtHb crecieron hasta una densidad óptica menor pero produjeron más etanol que la cepa control cuando la concentración de oxígeno disuelto fue más baja que el 10% de saturación de aire en el biorreactor. Los autores propusieron que la posible acción de la VtHb está ligada a la transferencia de electrones en *S. cerevisiae*, de la misma manera en que lo hace en *E. coli*.

En *Saccharopolyspora erythraea*, la expresión del gen *vhb* incrementó aproximadamente en un 60% la producción de eritromicina (Brünker *et al.*, 1998).

Por último, en plantas de tabaco transgénicas, la expresión del gen *vhb* tiene un efecto positivo en un paso dependiente de oxígeno de la síntesis de nicotina. Se ha observado que en las plantas de tabaco recombinantes se produce un incremento del 34% en el contenido de nicotina y que también muestran mayor facilidad para germinar y florecer, y son capaces de producir biomasa (peso seco) relativamente más rápido que el control (Holmberg *et al.*, 1997).

1.4) PROMOTOR DEL GEN.

El inicio de la síntesis de ARN en puntos al azar de la molécula de ADN sería un proceso sumamente antieconómico. En lugar de ello, la ARN polimerasa se une a secuencias específicas de ADN denominadas promotores, las cuales dirigen la transcripción de segmentos adyacentes de ADN (los genes). En *E. coli*, la ARN polimerasa se une a una región que se extiende desde unos 70 pares de bases antes del sitio de iniciación de la transcripción hasta unos 30 pares de bases más allá. Por convención, los pares de bases del ADN que corresponden al principio de la molécula de ARN reciben números positivos y los que preceden al sitio de inicio del ARN reciben números negativos. La región del promotor se extiende, pues, de -70 a +30. El análisis y la comparación de las secuencias de la clase más

común de promotores bacterianos ha puesto de manifiesto similitudes en dos cortas secuencias centradas alrededor de las posiciones -10 y -35. Las secuencias no son idénticas en todos los promotores bacterianos, pero los nucleótidos que se encuentran con mucho más frecuencia que otros en cada posición forman una secuencia consenso. En la región -10 es (5')TATAAT(3'); en la región -35 es (5')TTGACA(3'). Un tercer elemento de reconocimiento rico en AT, denominado elemento UP (por las siglas en inglés de promotor corriente arriba), se encuentra en los promotores de algunos genes con un nivel de expresión elevado entre las posiciones -40 y -60. La subunidad α de la ARN polimerasa se une al elemento UP. La eficiencia de la unión de la ARN polimerasa y del inicio de la transcripción en un promotor depende en buena medida de estas secuencias, del espacio entre ellas y de su distancia al sitio de inicio de la transcripción (Nelson y Cox, 2000).

Rowe *et al.* (1998) mencionan que el promotor P_{ermE} (promotor del gen de resistencia a eritromicina, aislado de *S. erythraea*) es un promotor constitutivo fuerte, que se ha utilizado para la sobreexpresión de genes nativos y heterólogos en actinomicetos. Así, P_{ermE} se ha usado en *S. erythraea* para la expresión estable del gen *vhb* aislado de *Vitreoscilla*; también se ha usado para la producción de hemoglobina químicamente activa en *Streptomyces lividans* TK24 transformada con vectores que presentan el gen *vhb* bajo el control de P_{ermE} (Brünker *et al.*, 1998).

1.5) VECTOR DE CLONACION

Los plásmidos se utilizan ampliamente como vehículos o vectores de clonación. Son replicones que se heredan de manera estable en estado extracromosómico, y se encuentran ampliamente distribuidos en los procariontes. Su tamaño varía desde menos de 1×10^5 hasta más de 200×10^6 daltons. Los plásmidos se pueden clasificar en dos grupos principales – conjugativos y no conjugativos- según lleven o no un conjunto de genes (llamados genes *tra*) que promueven la conjugación bacteriana. También se pueden clasificar según se mantengan múltiples copias por célula (plásmidos relajados) o un número limitado de copias en cada

célula (plásmidos restringidos). La replicación de los plásmidos restringidos va necesariamente ligada a la replicación cromosómica, de ahí el bajo número de copias (Sambroock y Russell, 2001)

Un vector de clonación ideal debe tener las tres propiedades siguientes:

- 1) Bajo peso molecular
- 2) Capacidad de conferir caracteres fenotípicos fácilmente seleccionables en las células huésped
- 3) Puntos de corte único para un gran número de endonucleasas de restricción, preferentemente en genes con un fenotipo fácilmente identificable (Sambroock y Russell, 2001).

Como ya se comentó anteriormente, la presencia de plásmidos endógenos en las diferentes especies de *Amycolatopsis* no es muy común, además de que plásmidos como el pMEA100 aislado de *A. mediterranei* no presenta características adecuadas para ser usado como vector de clonación, pues presenta bajo número de copias y tiende a integrarse al cromosoma, lo que resulta en un bajo rendimiento en las preparaciones de plásmidos.

En investigaciones previas (Kumar *et al.*, 1994), se demostró que diferentes especies de bacterias nocardiformes (como *N. lactamdurans*) que no poseen plásmidos endógenos no pueden ser transformadas con vectores basados en replicones de *Streptomyces*, por lo que se probaron replicones de diferentes bacterias relacionadas con el grupo Nocardia, como *Corynebacterium*, *Rhodococcus fascians*, y *Amycolatopsis* sp. De esta manera, se desarrollaron varios vectores de clonación eficientes para *N. lactamdurans*, entre los que se encuentra el plásmido pULVK2. Este plásmido se origina a partir del plásmido endógeno pA387 de 29.6 Kpb, aislado de *Amycolatopsis* sp. DSM 43387. Mediante la clonación de un fragmento de 5.1 Kpb de pA387, que contiene el origen de replicación, en el vector de *E. coli* pDM10, se obtuvo el pRL1 de 10.4 Kpb (Lal *et al.*, 1991), que es un plásmido bifuncional (*Amycolatopsis-E. coli*) y que además contiene el marcador de resistencia a kanamicina (Km^r). Cuando este plásmido se introdujo en *N. lactamdurans* se mostró notoriamente inestable y

sufrió una deleción espontánea que dió origen al plásmido pULVK1 de 6.0 Kpb. Este plásmido delecionado conserva el origen de replicación para *E. coli* y *Amycolatopsis* sp, además del marcador de resistencia a kanamicina, es estable y puede replicarse tanto en *E. coli* como en *N. lactamdurans*. A partir de este plásmido se originó el pULVK2, de 5.7 Kpb, reemplazando el fragmento *EcoRV-HindIII* del pULVK1 (posición de los nucleótidos 5480 a 1) por un “polilinker” sintético con algunos sitios de corte únicos (*EcoRV*, *DraI*, *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII* y *SstI*).

Varios otros intentos con géneros relacionados, como miembros de la familia *Pseudonocardiaceae* (incluyendo especies de *Saccharopolyspora*), utilizando los plásmidos pIJ702 o PWOR120 como vectores de clonación, no tuvieron éxito debido a la rápida segregación del vector bajo condiciones no selectivas (Schupp y Divers, 1986; Yamamoto *et al.*, 1986; Matsushima *et al.*, 1987). En este contexto, el desarrollo del plásmido híbrido pRL1, a partir del cual se origina el pULVK2, capaz de replicarse en *A. mediterranei* y en *E. coli* y de provocar una eficiente transformación en el actinomiceto es muy importante, puesto que representa un prototipo de vector de clonación tanto para *E. coli* como para *A. mediterranei* (Lal *et al.*, 1991).

II. JUSTIFICACIÓN

La rifamicina es un antibiótico producido por la bacteria Gram positiva *Amycolatopsis mediterranei*, el cual se usa contra los patógenos *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* (causantes de la tuberculosis y lepra, respectivamente), *Mycobacterium avium* (asociado con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, SIDA) y *Pneumococcus*, entre otros. Un problema recurrente en la producción de rifamicina a nivel industrial ha sido que las cepas de alta producción tienden a producir caldos extremadamente viscosos, lo que ocasiona una gran dificultad para proporcionar un adecuado mezclado y aporte de oxígeno en el biorreactor; esta viscosidad es consecuencia de la forma filamentosa y ramificada (micelias) en que crece *A. mediterranei*. La menor transferencia de oxígeno en edades avanzadas del cultivo provoca el cese de la producción de rifamicina B.

Debido a la amplia demanda de la rifamicina B, por su gran valor práctico contra un gran número de enfermedades, se han desarrollado diversas estrategias para incrementar su producción. Con base en los múltiples ejemplos de los efectos positivos del gen *vhb* en una gran variedad de organismos, en este trabajo se plantea, como posible solución al problema de demanda de oxígeno que presentan sus caldos de fermentación durante la producción de rifamicina B, la introducción del gen *vhb* aislado de *V. stercoraria* que codifica para la síntesis de una de las pocas hemoglobinas procarióticas con capacidad de transporte de oxígeno.

III. HIPÓTESIS

La transformación de *Amycolatopsis mediterranei* con el gen de la hemoglobina *vhb* aislado de *Vitreoscilla stercoraria* producirá un incremento en la captación de oxígeno y por consiguiente se favorecerá la biosíntesis de rifamicina B en condiciones de baja aireación.

IV. OBJETIVO

Introducir el gen *vhb* aislado de *Vitreoscilla stercoraria* y el promotor P_{ermE} aislado de *Saccharopolyspora erytraea* en *Amycolatopsis mediterranei*, utilizando el plásmido pULVK2 como vehículo de clonación, y evaluar su efecto sobre la biosíntesis de rifamicina B.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1) MICROORGANISMOS UTILIZADOS

***Vitreoscilla stercoraria* ATCC 15218:** Cepa utilizada para la obtención por PCR del gen de la hemoglobina *vhb*. Este microorganismo se propagó a 30°C y en caso de cultivo líquido con una agitación de 250 rpm.

***Saccharopolyspora erythraea*:** Cepa utilizada para la obtención por PCR del promotor **P_{ermE}**. Este microorganismo se propagó a 34°C y en caso de cultivo líquido con una agitación de 150 rpm.

***Escherichia coli* DH5α:** Cepa utilizada en las técnicas de clonación y construcción del plásmido definitivo. Este microorganismo se propagó a 37°C y en caso de cultivo líquido con una agitación de 250 rpm.

***Amycolatopsis mediterranei* MSB:** Cepa mutante, derivada de la cepa M18 (ATCC 21789), utilizada para introducir el gen *vhb* y evaluar su efecto sobre la biosíntesis de rifamicina B. Este microorganismo se propagó a 30°C y en caso de cultivo líquido con una agitación de 200 rpm. Para evaluar el efecto de la expresión del gen *vhb* se llevó a cabo la fermentación (producción de rifamicina B) en condiciones de baja aireación según lo descrito por Krishna *et al.*, 1998.

5.1.2) CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS

Las cepas de *E. coli* (DH5α y transformantes) se conservaron a 4°C en cajas de Petri selladas con Parafilm (como máximo durante un mes). Para periodos más largos de tiempo, se conservaron a -20°C en suspensiones de glicerol con una concentración final del 20% (v/v).

Las cepas de *V. stercoraria*, *S. erythraea* y *A. mediterranei* (MSB y transformantes) se conservaron a -20°C en suspensiones de glicerol con una concentración final del 20% (v/v).

Una vez preparadas las células competentes (de acuerdo a los protocolos descritos en los apartados correspondientes) tanto de *E. coli* como de *A. mediterranei*, se utilizaron inmediatamente o bien se conservaron a -80°C, previa congelación en nitrógeno líquido.

5.2) APARATOS Y REACTIVOS

5.2.1) APARATOS

ULTRACENTRIFUGA AVANTI™ 30 BECKMAN

CENTRIFUGA 5415 D Eppendorf

Cámaras de electroforesis: Electroforetic Gel System E-C Minicell EC370M y EC350

Incubadora con agitación orbital: Environ-shaker 3597 (Lab-Line Instruments, Inc.)

GEL DOC 2000 BIO-RAD

Microscopio Olympus CH30

Potenciómetro Orion modelo 525A

Bomba de vacío

Balanza analítica OHAUS Explorer

Microondas SANYO

TERMOCICLADOR: Mastercycler Personal, Eppendorf

Estufa

Transiluminador de luz U.V.

Ultracongelador -20°C REVCO

Ultracongelador -80°C Forma Scientific

Fuente de poder: Power Pac 3000 BIO-RAD

ELECTROPORADOR 2510 Eppendorf

Sistema de biobalística (CINVESTAV)

Espectrophotometer UV-1201 SHIMADZU

5.2.2) REACTIVOS PARA BIOLOGIA MOLECULAR

Agarosa (Promega)

ADN fago λ (Gibco BRL)

Oligonucleótidos sintetizados por Invitrogen

Enzimas: ADN polimerasa *Pfu* turbo (Stratagene)

ADN polimerasa *Taq* (Promega)

ARNasa (Sigma)

Endonucleasas: *HindIII*, *BamHI*, *EcoRI*, *KpnI*, *XbaI*, *EcoRV*, *PstI* (Invitrogen).

Ligasa del fago T4 (Invitrogen)

Lisozima (Sigma)

Antibióticos: kanamicina (Sigma)

eritromicina (Sigma)

rifamicina B (Sigma)

ampicilina (Sigma)

5.2.3) OTROS SISTEMAS PARA LA MANIPULACIÓN DE ADN

Algunos de los procesos descritos en Materiales y Métodos se realizaron mediante el uso de sistemas comerciales que incluyen los componentes necesarios para las reacciones. Estos sistemas comerciales fueron suministrados por: Quiagen (sistema QUIAEXII, para la recuperación del ADN a partir de geles de agarosa), Stratagene (sistema QuikChangeTM, para mutagénesis dirigida), Promega (sistema Wizard, para purificación de ADN con minicolumnas).

5.3) VECTORES UTILIZADOS

- **Plásmido pULVK2** de 5.7 Kpb (Fig. 5). Derivado del plásmido endógeno pA387 de *Amycolatopsis* sp. cepa DSM 43387 (Lal *et al.*, 1991). Contiene los orígenes de replicación tanto para *E. coli* como para *Amycolatopsis* sp., un marcador de selección por resistencia a kanamicina y un sitio de clonación múltiple sintético con algunos sitios de corte únicos (*EcoRV*, *DraI*, *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII* y *SstI*) (Kumar *et al.*, 1994).

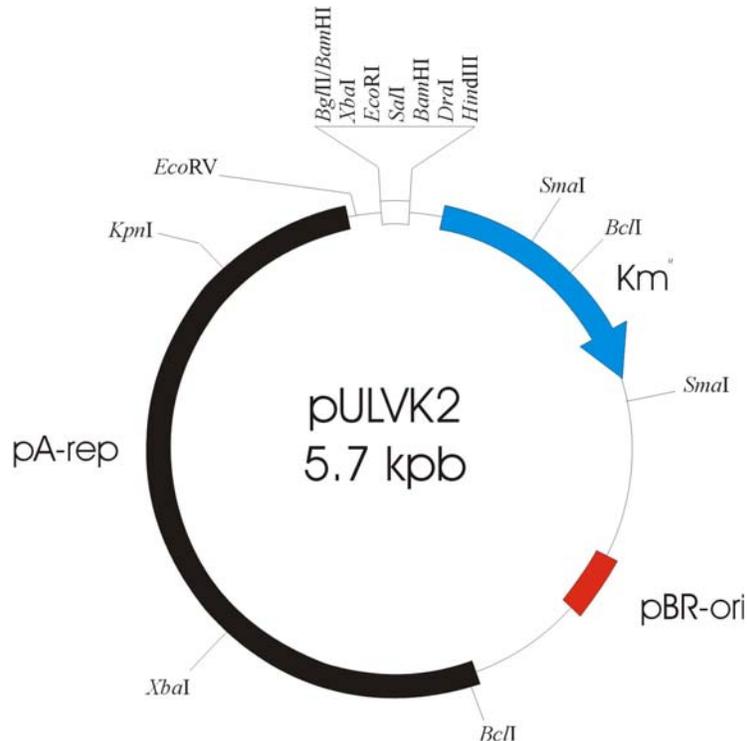


Figura 5. Mapa del plásmido pULVK2

- **Plásmido pBluescript KS (+)** de 2,961 pb (Fig. 6). Derivado de pUC19. La notación KS indica un sitio de clonación múltiple que va de 5'-*KpnI* a *SacI*-3', y la notación (+) significa que la cadena sencilla es la codificante para el fragmento del gen *lacZ*. Posee un marcador de selección de resistencia a ampicilina y el origen de replicación para *E. coli*. Este plásmido es comercializado por Stratagene y se utilizó para realizar la mutagénesis dirigida y la secuenciación del fragmento construido con el promotor P_{ermE} y el gen *vhb*.

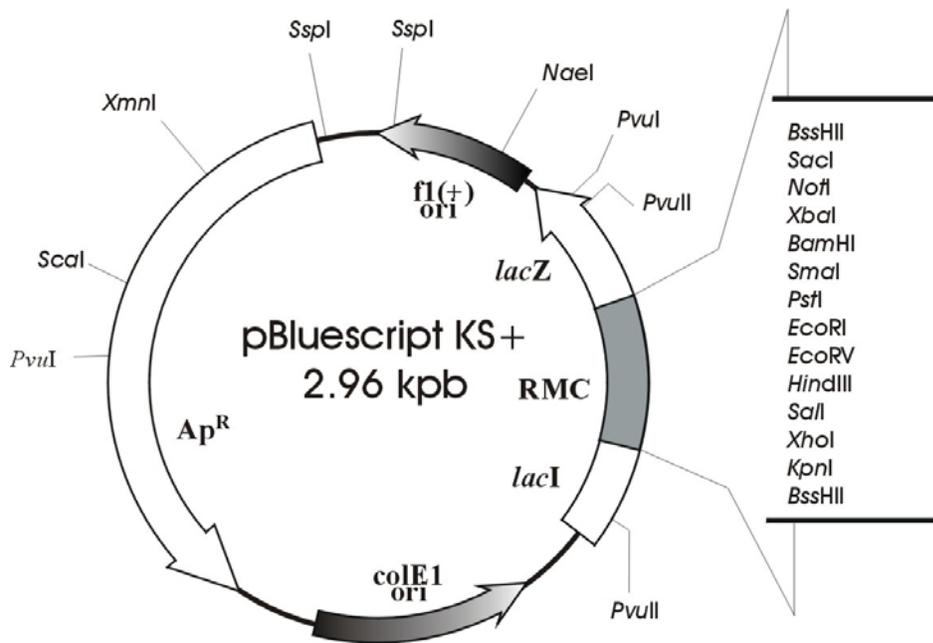


Figura 6. Mapa del plásmido pBluescript KS (+)

- **Plásmido pIJ4026** de 4,312 pb (Fig. 7). (Bibb *et al.*, 1985) Este plásmido es derivado del pGEM3Zf(+), contiene en su secuencia el gen de resistencia a eritromicina (*ermE*) de *Saccharopolyspora erythraea*, un origen de replicación para *E. coli* y un gen de resistencia a ampicilina (*amp^R*). De este plásmido se extrajo el gen de resistencia a eritromicina para clonarlo posteriormente en pUAMPG2 y pUAMSAG1.

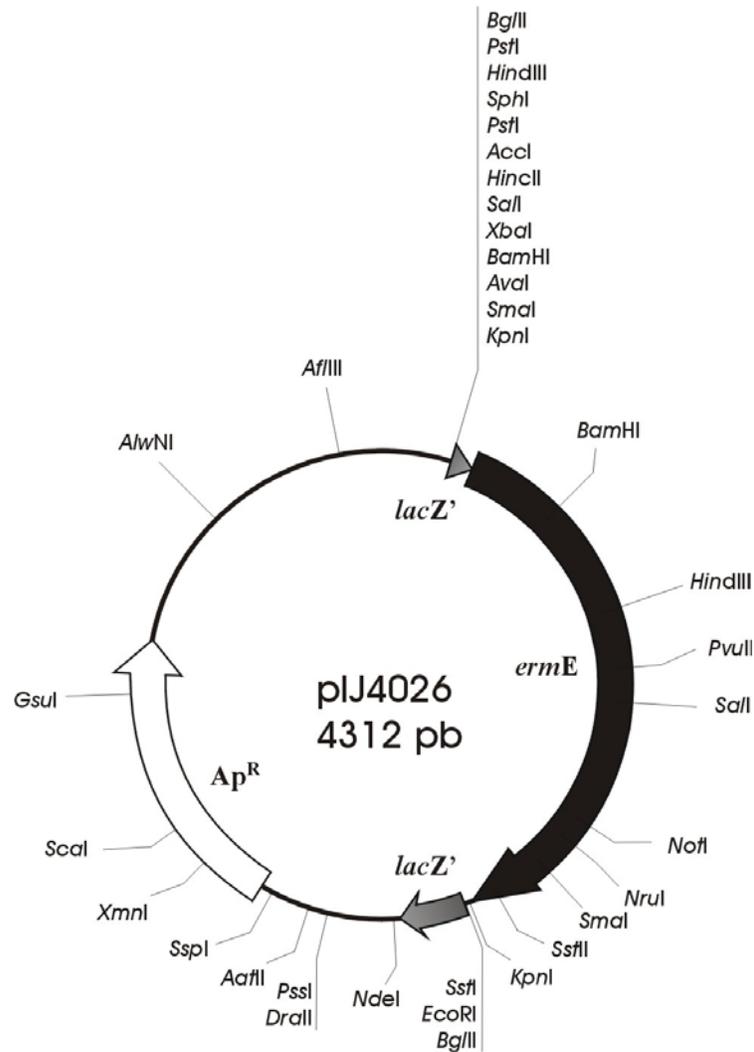


Figura 7. Mapa del plásmido pIJ4026

5.4) MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos, en botellas de vidrio con 100 mL de medio para optimizar su utilización.

Los reactivos utilizados para preparar medios son marca Bioxon excepto las sales, ácidos y solventes que son marca J. T. Baker. Se utilizaron N-Z-Amina y 5,5-dietilbarbiturato de sodio (barbital), marca Sigma.

- **Medio Luria-Bertani (LB)** (Miller, 1972): Medio de cultivo para *E. coli*.

| | |
|----------------------|------|
| Bacto-triptona | 10 g |
| NaCl | 10 g |
| Extracto de levadura | 5 g |

Se ajustó el pH a 7.5 con NaOH y se añadió agua destilada hasta 1 litro. Para su utilización como medio sólido (**Medio LA**) se añadieron 20 gramos de agar por litro antes de esterilizar.

- **Medio TB** (Maniatis *et al.*, 1982): Medio utilizado para el crecimiento de *E. coli*, con el fin de obtener el ADN plasmídico.

| | |
|----------------------|------|
| Extracto de levadura | 24 g |
| Bacto-triptona | 12 g |
| Glicerol | 4 mL |

Se añadió agua destilada hasta 900 mL y, después de esterilizar en autoclave, se añadieron 100 mL de una solución estéril de KH_2PO_4 170 mM y K_2HPO_4 720 mM.

- **Medio SOB** (Hanahan, 1983): Medio de cultivo para la obtención de células competentes de *E. coli*. (Nota: usar agua MilliQ para su preparación)

| | |
|----------------|------|
| Bacto-triptona | 20 g |
|----------------|------|

| | |
|----------------------|-------|
| Extracto de levadura | 5 g |
| NaCl | 0.5 g |

Se ajustó el pH a 7.5 con KOH y se añadió agua destilada hasta 1 litro. Para su utilización como medio sólido se añadieron 20 g de agar por litro. Se esterilizó, e inmediatamente antes de ser utilizado se añadieron 20 mL de una solución de MgSO₄ 1M esterilizada a través de un filtro estéril de 0.22µm de diámetro de poro.

- **Agar EX** (Fermic, 1997): Medio sólido utilizado para *S. erythraea*.

| | |
|---------------------------------|--------|
| Cloruro de betaína | 0.5 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.15 g |
| CaCl ₂ | 0.08 g |
| Sólidos de maceración de maíz | 0.5 g |
| Glucosa | 5.0 g |
| NaCl | 10.0 g |
| Bacto triptona | 5.0 g |
| Fécula de papa | 5.0 g |
| Solución A | 2.0 mL |
| Bacto Agar | 20.0 g |

Se ajustó el pH a 7.5 con KOH al 35% (p/v) y se añadió agua destilada hasta un litro.

Solución A:

| | |
|--------------------------------------|---------|
| MgSO ₄ | 100.0 g |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 2.0 g |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 1.0 g |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.4 g |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.1 g |
| HCl concentrado | 1.0 g |
| Se añadió agua destilada hasta | 1000 mL |

- **Medio LMD** (Fermic, 1997): medio líquido utilizado para *S. erythraea*

| | |
|----------------------|--------|
| Extracto de levadura | 4.0 g |
| glucosa | 4.0 g |
| Malta | 10.0 g |

Se ajustó el pH a 7.9 con NaOH 5 N y se añadió agua destilada hasta 1 litro

- **Medio PYA** (Khosla y Bailey, 1988a): medio líquido para *V. stercoraria*:

| | |
|----------------------|-------|
| Extracto de levadura | 15 g |
| Peptona | 15 g |
| Acetato de sodio | 0.2 g |

Se ajustó el pH a 8.0 con NaOH y se añadió agua destilada hasta 1 litro.

- **Medio sólido para *V. stercoraria*** BMYE 138 (Beggiatoa Medium Yeast Extract)

| | |
|----------------------|-----------------|
| Extracto de levadura | 2.0 g |
| Cloruro de calcio | 0.1 g |
| Acetato de sodio | 0.5 g |
| Catalasa | 10,000 unidades |
| Agar | 2.0 g |

Se ajustó el pH a 7.2. Se adicionó la catalasa estéril por filtración al medio después de esterilizar en autoclave.

- **Medio Bennet** (Margalith y Pagani, 1961): Para cultivo de *A. mediterranei*.

| | |
|----------------------|------|
| Glucosa | 10 g |
| Extracto de carne | 1 g |
| NZ-amina A | 2 g |
| Extracto de levadura | 1 g |

Se ajustó el pH a 7 y se añadió agua destilada hasta 1 litro. Para su utilización como medio sólido (Agar Bennet) se añadieron 20 gramos de agar bacteriológico por litro.

- **Medio YEME** (Hopwood *et al.*, 1985): medio utilizado para un crecimiento masivo y disgregado de *A. mediterranei*.

| | |
|----------------------|-------|
| Glucosa | 10 g |
| Sacarosa | 103 g |
| Extracto de levadura | 3 g |
| Bacto peptona | 5 g |
| Extracto de malta | 3 g |

*Se sugiere esterilizar por separado la solución de glucosa y sacarosa en ½ litro de agua.

Ajustar a pH 7 antes de esterilizar

Después de esterilizar se agregó solución estéril de $MgCl_2 \cdot H_2O$, 2mL por cada litro de medio.

Para un crecimiento disgregado se agregó también solución estéril de glicina al 20% (p/v), 25 mL por cada litro de medio

- **Medio Lee** (Lee *et al.*, 1983): para producción de rifamicina

| | |
|--------------------------------|-------|
| Glucosa | 120 g |
| Bacto peptona | 10 g |
| Extracto de levadura | 10 g |
| 5,5-dietilbarbiturato de sodio | 0.7 g |

* Se esteriliza por separado la solución de glucosa preparada en 500 mL de agua destilada, y los demás componentes en otros 500 mL. Después de esterilizar se mezclan las dos soluciones para obtener un litro.

5.5) SECUENCIA DEL GEN *vhb* DE *V. stercoraria* Y DEL PROMOTOR P_{ermE} DE *S. erythraea*.

De acuerdo con lo reportado en relación a que *V. stercoraria* posee un gen que codifica para una proteína con funcionalidad semejante a la hemoglobina, se procedió a la búsqueda de la secuencia reportada en el banco de genes tanto para el gen *vhb* de *V. stercoraria*, como para el promotor P_{ermE} de *S. erythraea*. Las secuencias se muestran a continuación (Fig. 8 y 9):

```

1 aagcttacag gacgctgggg ttaaaagtat ttgagttttg atgtggatta
51 agttttaaga ggcaataaag attataataa gtgctgctac accatactga
101 tgtatggcaa aaccataata atgaacttaa ggaagaccct atgttagac
151 cagcaaacca ttaacatcat caaagccact gttcctgtat tgaaggagca
201 tggcgttacc attaccacga cttttataa aaacttgttt gccaaacacc
251 ctgaagtacg tcctttgttt gatatgggtc gccaaagaatc tttggagcag
301 cctaaggctt tggcgatgac ggtattggcg gcagcgcaaa acattgaaaa
351 tttgccagct attttgctg cggtaaaaa aattgcagtc aaacattgtc
401 aagcaggcgt ggcagcagcg cattatccga ttgtcgggtca agaattggtg
451 ggtgcgatta aagaagtatt gggcgatgcc gcaaccgatg acattttgga
501 cgcgtggggc aaggcttatg gcgtgattgc agatgtgttt attcaagtgg
551 aagcagattt gtacgctcaa gcggttgaat aaagtttcag gccgctttca
601 ggacataaaa aacgcacat aagggtgtct ttttacgtct gatatttaca
651 cagcagcagt ttggctgttg gccaaaactt gggacaataa ttgccctgtg
701 taagagcccc ccgttgctgc gacgtcttca ggtgtgcctt ggcat

```

Figura 8. Secuencia del gen *vhb*, acceso M27061. En rojo se marca la secuencia utilizada para el oligonucleótido GV5 y en azul se marca la secuencia utilizada como base para el oligonucleótido GV3.

```

1 ggtaccagcc cgacccgagc acgcgccggc acgcctggtc gatgtcggac
51 cggagttcga ggtacgcggc ttgcaggtcc aggaagggga cgtccatgcg
101 agtgtccggt cgagtggcgg cttgcgcccg atgctagtcg cggttgateg
151 gcgatcgcag gtgcacgcgg tcgatcttga cggctggcga gaggtgcggg
201 gaggatctga ccgacgcggt ccacacgtgg caccgcgatg ctgttggtgg
251 ctggacaatc gtgccgggtt gtaggatcca gcggtgagca gttcggacga
301 gcagccgcgc ccgcgtcgcc gcaaccagga tcggcagcac cccaaccaga
351 accggccggt gctgggcccgt accgagcggg accgcaaccg gcgccagttc
401 gggcagaact tcctccgcga ccgcaagacc atcgcgcgca tcgccgagac
451 agccgagctg cggcccgate tgcccgtgct ggaagccggc cccgtcgaag
501 ggctgctcac cagggaaact gccgaccgcg cgcgtcaggt gacgtcgtac

```

```

551 gagatcgacc cccggctggc gaagtcgttg cgggagaagc tttccggcca
601 cccgaacatc gaagtcgtca acgccgactt cctcaccgcc gaaccgccgc
651 ccgagccggt cgccttcgtc ggcgcgatcc cctacggcat cacctcggcg
701 atcgtggact ggtgcctgga ggcgccgacg atcgagacgg cgacgatggt
751 cacgcagctg gagttcgccc ggaagcggac cggcgattac ggccgctgga
801 gccgcctcac ggtgatgacc tggccgctgt tcgagtggga gttcgtcgag
851 aaggtcgact cggcgatcat gcggctgcgc aggcgcgccg aaccgctgct
901 ggaaggcgcg gcgctcgaac gctacgagtc gatggtcgag ctgtgcttca
951 ccggcgtcgg cggcaacatc caggcgtcgc ttctgcgcaa gtacccgagg
1001 cgccgcgctc aggcggcgtt cgaccacgcg ggggtcgggg gcggcgccgt
1051 ggtcgcctac gtccggccgg agcagtggct ccggctgttc gagcggctgg
1101 atcagaagaa cgaaccgagg ggtgggcagc cccagcgggg caggcgaacc
1151 ggcgacggg accacgggga ccggcgaacc ggcgggcagg atcgcggcga
1201 tcggcgaacc ggcggccgcg accacaggga ccggcaagcc agcggccacg
1251 gcgatcgtcg cagcagcggga cgcaatcgcg acgacggacg aaccggcgag
1301 cgcgagcagg gggaccaagg cgggcggcgg gggccgtccg ggggtggacg
1351 gaccggcggg cgtccagggc gacgcggcgg acccgggcag cggtagtccc
1401 cggcacgcgg aacgcggcag gccgtcgagc ggcctgcccc gttctgtcga
1451 gaggaatcag aggttgatgt cggcccggag gtcgatgtcg cgcgacgacg
1501 agccgatctc caccgctcgc ttgccgcccc cgagcttcca gccgcccgcg
1551 gcttcgtccc agtgctggag ggccgctccg cgacgtgcac ccggacgcgc
1601 ttggtctcgc ccggtgcgag ttcgacctc tggtagccgg cgagctgtaa
1651 atctgccggc tcagccttc caggttcgaa tcctggcgcc

```

Figura 9. Secuencia del promotor P_{ermE} , acceso M11200. En rosa se marca la secuencia utilizada como base para el oligonucleótido PV5 y en verde se marca la secuencia utilizada para el oligonucleótido PV3.

5.6) DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS.

Tomando como base las propiedades de los oligonucleótidos que influyen en la eficiencia de la amplificación, así como las secuencias de nucleótidos del gen *vhb* y del promotor P_{ermE} se diseñaron 2 pares de oligonucleótidos para la amplificación por PCR del gen *vhb* y del promotor P_{ermE} , que cumplen con las siguientes consideraciones:

- 1) El contenido de G+C de cada par de oligonucleótidos debe ser de entre el 40 y el 60%, evitando segmentos de polipurinas y polipirimidinas.

- 2) La región del oligonucleótido complementaria a la secuencia molde debe tener entre 18 y 25 nucleótidos de longitud. Los miembros de un mismo par de oligonucleótidos no deben diferir en longitud en más de 3 nucleótidos.
- 3) Se deben evitar las secuencias complementarias a sí mismas, debido a que este tipo de secuencias tienden a formar estructuras de horquilla que pueden provocar la no hibridación del oligonucleótido con el ADN molde.
- 4) Se debe evitar que los miembros de un mismo par de oligonucleótidos presenten secuencias complementarias; la secuencia terminal 3' de un oligo debe ser incapaz de unirse a algún sitio del otro oligo. Debido a que se requiere de una concentración alta de oligonucleótidos para llevar a cabo la PCR, un poco de complementareidad entre los oligos es suficiente para producir oligos que se pueden sintetizar y amplificar, compitiendo así por la ADN polimerasa y los nucleótidos y pudiendo suprimir la amplificación a partir del ADN molde.
- 5) Los valores calculados de la temperatura de hibridación de los miembros de un par de oligonucleótidos no deben diferir en más de 5°C. La temperatura de hibridación del producto amplificado no debe diferir de los valores de la temperatura de hibridación del par de oligonucleótidos en más de 10°C. Esta propiedad asegura que el producto amplificado será desnaturalizado eficientemente durante cada ciclo de PCR.
- 6) La naturaleza del extremo 3' terminal de los oligonucleótidos es crucial. Si es posible, la base final de cada oligo 3' debe ser G ó C. Sin embargo, oligonucleótidos con una secuencia ...NNCG o ...NNGC no son recomendados debido a su inusual valor de ΔG , muy alto y que promueve la formación de horquillas, lo que puede generar dímeros de oligonucleótidos
- 7) Generalmente se adicionan secuencias no complementarias al ADN molde en el extremo 5' del oligonucleótido que son muy útiles. En general, la presencia de estas secuencias no afecta significativamente a la hibridación de los cebadores al ADN molde. La adición de nucleótidos adicionales en la posición 5', anteriores al sitio de corte para la endonucleasa de restricción, facilita el proceso de digestión para algunas enzimas que presentan impedimentos de corte cuando la secuencia que reconocen está en el extremo de un fragmento de ADN (Sambrook y Russell, 2001).

5.7) ESQUEMA GENERAL DE LA CLONACIÓN DEL GEN *vhb* Y DEL PROMOTOR P_{ermE} EN EL PLÁSMIDO pULVK2, CON EL QUE SE LLEVÓ A CABO LA POSTERIOR TRANSFORMACIÓN DE *A.mediterranei*.

Primeramente se extrajo el ADN genómico de *V. stercoraria* y de *S. erythraea* para utilizarlo como ADN molde en una reacción de PCR que tiene como finalidad amplificar el gen *vhb* y el promotor P_{ermE} . Para ello se utilizaron dos pares de oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias tanto del gen *vhb* como del promotor P_{ermE} , de tal manera que contienen en sus extremos 5' las secuencias correspondientes a las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III respectivamente. Tales cortes se utilizaron para lograr la posterior clonación de ambos fragmentos en el plásmido pULVK2, en la dirección apropiada. Finalmente, los extremos romos en 3' permitieron la unión de ambos fragmentos entre si (Fig.10).

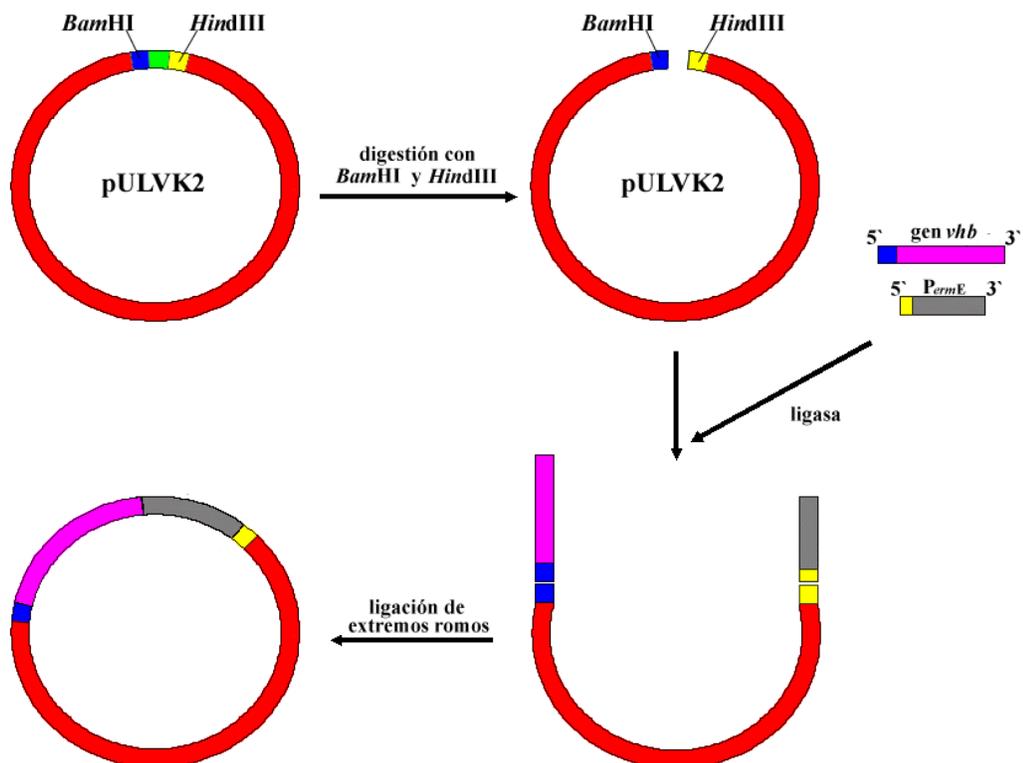


Figura 10. Esquema general de clonación del gen *vhb* y del promotor P_{ermE} en pULVK2.

5.7.1) EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE *V. stercoraria*.

1. En primer lugar se inocularon 100 mL de medio líquido para *Vitreoscilla* con 1 mL de células conservadas en glicerol al 20% (v/v) a -20°C . Se incubó durante 12 horas, a 30°C y 250 rpm.

2. De este cultivo se tomaron 10 mL y se centrifugaron a 5,000 rpm¹ durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 3.5 mL de STET². Se añadieron 100 μL de lisozima con una concentración de 10 mg/mL y se mezcló durante 5 minutos. Las proteínas, restos celulares y el ADN cromosómico bacteriano se precipitaron por centrifugación a 14,000 rpm durante 10 minutos y se eliminaron con la ayuda de un palillo estéril.

4. El sobrenadante se sometió a fenolización (ver 4.5.12) y posteriormente se precipitó el ADN total agregando 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se mezcló y se dejó precipitar a -20°C al menos durante 12 horas.

5. El ADN total se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 minutos a 4°C . El precipitado obtenido se lavó con 0.5 mL de etanol al 70%, se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y el ADN obtenido se secó con ayuda de una secadora eléctrica.

6. Finalmente se resuspendió el ADN obtenido en 100 μL de TE³ a 4°C .

5.7.2) EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE *S. erythraea*.

1. Se inoculó un matraz de 500 mL con 50 mL de medio LMD con 0.5 mL de suspensión de esporas de *S. erythraea*. Se incubó a 34°C y 150 rpm durante 48 horas.

2. El micelio resultante se recogió por filtración a través de un filtro de Nylon Nylal estéril de 30 μm de poro y se lavó con 100 mL de **Amortiguador P**, con el objetivo de

¹ Para tubos de 50 mL: 5,000, 10,000 y 14,000 rpm, equivalen a 2,348, 9,391 y 18, 407 x g respectivamente. Para tubos Eppendorf: 5,000, 10,000 y 14,000 rpm, equivalen a 2,292, 9,168 y 17, 968 x g respectivamente.

² **STET**: EDTA 50 mM pH 8.0, Sacarosa al 8% (p/v), Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y Tritón X-100 al 0.5% (v/v).

³ **TE**: EDTA 1 mM pH 8.0 y Tris-HCl 10 mM pH 8.0.

eliminar los componentes del medio de cultivo que pudieran haber quedado retenidos en el filtro junto con el micelio. Se lavó a continuación con 100 mL de **Amortiguador A**.

3. Se recogió el micelio exprimiendo el filtro Nyltal, se transfirió a un mortero estéril y se agregó nitrógeno líquido hasta que se congeló el micelio, moliéndose a continuación. (También se puede recoger el micelio por centrifugación, hacerle iguales lavados y luego transferir al mortero con ayuda de una espátula).

4. Se recogió el polvo y se transfirió a tubos Eppendorf (aprox. 100 mg de micelio pulverizado por tubo) y se añadieron 0.5 mL de **Amortiguador de rotura I** a cada tubo. Se homogenizó la mezcla y se añadieron 0.5 mL de fenol y 0.5 mL de CIA (ver 4.5.12) en cada tubo. Se mezcló con suavidad y se incubó a 50°C durante 20 minutos (mezclando suavemente cada 5 minutos).

5. Transcurridos los 20 minutos se centrifugó a temperatura ambiente y 14,000 rpm durante 5 minutos. Se recuperó la fase acuosa, que se sometió nuevamente a fenolización, y posteriormente se precipitó el ADN total añadiendo 0.7 volúmenes de isopropanol y dejando la mezcla a 4°C durante 4 horas. Se centrifugó a 4°C y 14,000 rpm durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol al 70%. Se secó el ADN obtenido con ayuda de una secadora eléctrica.

6. Finalmente se resuspendió el ADN obtenido en 0.5 mL de TE a 4°C.

Amortiguador P (Hopwood *et al.*, 1985):

| | |
|--|--------|
| Solución base: Sacarosa | 103 g |
| K ₂ SO ₄ | 0.25 g |
| Sol. de elementos traza | 2 mL |
| Aforar con agua destilada a 800 mL | |
| Dosificar en alícuotas de 80 mL y esterilizar. | |

Solución de elementos traza: (mg/L)

| | |
|--------------------------------------|-----|
| ZnCl ₂ | 40 |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O | 200 |
| CuCl ₂ ·2H ₂ O | 10 |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 10 |

| | |
|--|----|
| $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ | 10 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 10 |
|---|----|

Antes de usar adicionar a cada alícuota:

| | |
|----------------------------------|------|
| KH_2PO_4 al 0.5% | 1 mL |
|----------------------------------|------|

| | |
|--|-------|
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 3.68% (p/v) | 10 mL |
|--|-------|

| | |
|---------------------------------|-------|
| Amortiguador TES (5.73% pH 7.2) | 10 mL |
|---------------------------------|-------|

Amortiguador A: EDTA 10 mM pH 8, NaCl 150 mM y TRIS-HCl 50 mM pH 8

Amortiguador de rotura I: EDTA 100 mM pH 8, SDS al 1% (p/v) y Tris-HCl 0.2 M.

Se ajusta el pH a 8.2.

5.7.3) REACCIÓN EN CADENA DE LA ADN POLIMERASA (PCR)

Este método se utilizó para amplificar tanto el gen *vhb* como el promotor P_{ermE} a partir del ADN total de *V. stercoraria* y *S. erythraea*, respectivamente, utilizando para ello los oligonucleótidos previamente diseñados y sintetizados por Invitrogen. Esta técnica se basa en la repetición de un conjunto de tres pasos, efectuados de forma sucesiva y en condiciones determinadas de temperatura. En el primer paso se efectúa la desnaturalización o separación de la doble cadena del ADN utilizado como molde a una temperatura elevada (94°C). A continuación se realiza la hibridación de los oligonucleótidos o cebadores. Estos son un par de oligonucleótidos sintéticos capaces de unirse a secuencias de ADN que limitan físicamente con la región que se pretende amplificar. Cada uno de ellos es una réplica de una de las dos cadenas del ADN y su diseño es tal que queden enfrentados por sus extremos 3' tras la unión a la molécula de ADN molde. La distancia entre ellos en el conjunto ADN-cebadores determinará la longitud de la secuencia de ADN amplificada. La temperatura óptima para la hibridación de los oligonucleótidos se estimó en 50°C. El tercer paso en el procedimiento consiste en la elongación de los oligonucleótidos en el conjunto ADN-cebadores por la acción de la ADN polimerasa. Este último paso se lleva a cabo a 72°C y el resultado del proceso es la

formación de unas cadenas de ADN copiadas de las moléculas molde y que han incorporado en el extremo 5' de su secuencia, en virtud de haber incorporado los cebadores, los sitios de corte para la respectiva enzima de restricción, con la finalidad de poder obtener extremos cohesivos y facilitar el ligado al vector.

5.7.4) ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Se siguieron, básicamente, los métodos descritos por Maniatis *et al.* (1982) y Sambrook y Russell (2001). Se utilizó agarosa en concentraciones de entre 0.3% y 2.0% (p/v) y disuelta por calentamiento en microondas en tampón TAE⁴ La concentración de agarosa utilizada depende del rango de tamaño del fragmento de ADN a separar (Tabla 1).

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

Tabla 1.- Concentraciones de agarosa utilizadas en los geles para la resolución de los tamaños de fragmentos de ADN.

Las muestras de ADN se mezclaron con 1/10 del volumen final de amortiguador de carga⁵ concentrado y se calentaron durante 5-10 minutos a 65°C, enfriándose posteriormente en un baño de hielo y agua durante 2-3 minutos. El ADN se carga en el gel y la electroforesis se desarrolla en amortiguador TAE mediante la aplicación de una diferencia de potencial de

⁴ **TAE 50X:** 57.1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0, 242 g de Tris base y agua destilada hasta completar un litro.

⁵ **Amortiguador de carga 6X:** Azul de bromofenol al 0.25% (p/v), Sacarosa al 40% (p/v) y Xileno cianol al 0.25% (p/v). Se esteriliza en una olla a presión durante 20 minutos y se conserva a 4°C para evitar el crecimiento de microorganismos.

entre 1 y 5 V/cm. La tinción del ADN se realizó con una solución de bromuro de etidio⁶ (BrEt) en una concentración final de 0.5 µg/mL. Los geles se fotografiaron a través de un fotodocumentador GelDoc 2000 de BioRad, y las imágenes fueron procesadas mediante el software Quantity One de BioRad.

Los marcadores de tamaño usados para identificar los fragmentos de ADN se hicieron con el ADN del fago λ digerido con endonucleasas de restricción. La longitud de los fragmentos generados tras la digestión se indican a continuación:

- 1) ADN del fago λ digerido con *Hind*III (λ/*Hind*III): 23,130; 9,416; 6,557; 4,361; 2,322; 2,027; 564 y 125 pb.
- 2) ADN del fago λ digerido con *Pst*I (λ/*Pst*I): 11,509; 5,080; 4,649; 4,505; 2,840; 2,577; 2,454; 2,443; 2,140; 1,980; 1,700; 805; 516; 467; 448; 339; 265; 247 y 210 pb.

5.7.5) EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA UTILIZANDO EL SISTEMA QUIAEXII

Este método de extracción de ADN se utiliza generalmente para la extracción a partir de geles de agarosa o de soluciones de fragmentos de ADN relativamente pequeños. En este caso se utilizó para la extracción del gen y del promotor. Se basa en la solubilización de agarosa y adsorción selectiva y cuantitativa de los ácidos nucleicos a las partículas de sílica gel de QUIAEXII en presencia de un alto contenido de sales. El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. Una vez realizada la electroforesis y teñido el gel, se cortó el trozo de agarosa donde se encuentra el ADN de interés y se colocó en un tubo Eppendorf de peso conocido, pesándose a continuación el conjunto tubo-agarosa.

⁶ **Bromuro de etidio:** se prepara una solución 10 mg/mL en agua y se conserva a 4°C. Para un litro de agua destilada se requieren 50 µL de esta solución.

2. Se solubilizó el gel de agarosa adicionando 3 volúmenes de Buffer QXI por cada volumen de gel y se incubó a 50°C durante 10 minutos.
3. Posteriormente se resuspendió la emulsión de QUIAEXII mezclando en vortex durante 30 segundos y se añadieron 10 µL de esta suspensión al tubo que contiene la agarosa y el Buffer QXI (para cantidades de ADN superiores a los 2 µg se añaden 30 µL).
4. Se mezcló bien y se incubó a 50°C durante 10 minutos. Las partículas se mantuvieron en suspensión, mezclando el tubo cada dos minutos.
5. A continuación se centrifugó la mezcla 30 segundos y se desechó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 500 µL de amortiguador PE. Se repitió la centrifugación y el lavado con este buffer y el precipitado obtenido al final se dejó secar de 10-15 minutos a temperatura ambiente (o hasta que adquiere un color blanco).
6. Una vez seco el precipitado, se le añadieron 20 µL de agua destilada estéril, se resuspendió con vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.
7. Finalmente, se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 segundos y se recogió el sobrenadante en un tubo limpio estéril. Este sobrenadante contiene el ADN de interés, listo para su uso.

5.7.6) DIGESTIÓN

Las enzimas de restricción y modificación fueron usadas siguiendo las recomendaciones de los distintos proveedores. Cada enzima tiene unas condiciones óptimas de funcionamiento, en cuanto a temperatura y tiempo de digestión, concentración de sales y condiciones de pH (estas dos últimas características las proporciona el amortiguador de reacción). Como norma general el volumen de la enzima no debe superar 1/10 del volumen total de la mezcla de reacción.

Esquema general de la digestión de ADN con una endonucleasa de restricción: En un tubo Eppendorf se mezclan, en el orden mencionado, los siguientes componentes de la reacción:

- Agua destilada estéril hasta completar el volumen final de la mezcla de digestión.

- Amortiguador de digestión en la concentración óptima descrita (normalmente se requiere un volumen que sea la décima parte del volúmen final de la mezcla, debido a que el tampón se distribuye con una concentración 10 veces mayor de la recomendada para su uso).
- n μ g de ADN disuelto en agua destilada o en tampón TE (si el ADN está disuelto en tampón TE es recomendable que el volúmen utilizado en la mezcla no supere la décima parte del total de la reacción).
- $2n$ unidades de enzima.

Posteriormente se incubaba a la temperatura adecuada y el tiempo necesario. El ADN digerido se utiliza para su análisis por migración electroforética en geles de agarosa o se limpia por fenolización.

Esquema general de digestión seguido:

1. Digestión de pULVK2 con *Bam*HI y *Hind*III: primeramente se realizó la digestión con la enzima *Hind*III durante 20 horas, se fenolizó y se precipitó el plásmido digerido. A continuación se resuspendió nuevamente en 10 μ L de agua destilada y se realizó la digestión con *Bam*HI durante 3 horas, se fenolizó y se precipitó el plásmido ya digerido con ambas enzimas.
2. Digestión del gen *vhb*: el gen se digirió con *Bam*HI durante 3 horas y posteriormente se realizó su extracción utilizando QUIAEXII
3. Digestión del Promotor **P_{ermE}**: el promotor se digirió con *Hind*III durante 20 horas y posteriormente se realizó su extracción utilizando QUIAEXII.

5.7.7) LIGACIÓN

Esquema general de ligación:

1. Extremos cohesivos:

Vehículo de clonación pULVK2 digerido

| | |
|--|-------------|
| con <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III | 0.5 μ L |
| Insertos: Gen digerido con <i>Bam</i> HI | 10 μ L |
| Promotor digerido con <i>Hind</i> III | 10 μ L |
| Tampón de ligación | 2.5 μ L |
| Ligasa | 2.5 μ L |

Volumen total 25.5 μ L

Se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente.

2. Extremos romos:

| | |
|--------------------|---------------|
| Mezcla anterior | 25.5 μ L |
| Buffer de ligación | 20 μ L |
| Agua | 153.5 μ L |
| Ligasa | 1 μ L |

Volumen total 200 μ L

Se incubó un mínimo de 12 horas a aproximadamente 15 $^{\circ}$ C

Una vez realizada la ligación, tanto de extremos cohesivos como de extremos romos, el plásmido se precipita añadiendo 20 μ L de acetato de sodio y 500 μ L de etanol absoluto frío. Una vez precipitado, lavado y secado, se resuspende en 5 μ L de agua destilada estéril y a continuación se realiza la transformación por electroporación de *E. coli* con este nuevo plásmido.

5.7.8) PREPARACION DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli*.

Este método fue descrito por Hanahan (1983) y se utilizó en todos aquéllos casos en los que requería una eficiencia de transformación elevada (este es el caso de la cepa de *E.coli* DH5 α , normalmente utilizada como receptora de mezclas de ligación y que proporciona

eficiencias de transformación de hasta 5×10^8 transformantes por μg de ADN cuando se prepara siguiendo este protocolo). Se utiliza agua de calidad MilliQ (Millipore) para preparar todas las soluciones y medios de cultivo, así como para el lavado del material utilizado en la preparación y almacenamiento de soluciones y medios y en el procesamiento de las células (Fernández, 1997). Los pasos a seguir son los siguientes:

1. Se siembra una placa de medio SOB sólido con la cepa de *E. coli* DH5 α , de tal forma que se obtengan colonias aisladas, y se incuba a 37°C durante 12-14 horas.
2. Se inocula con una colonia aislada un matraz de 500 mL con 100 mL de medio SOB. Se incuba a 37°C con agitación de 250 rpm hasta que el cultivo alcance una densidad óptica a 600 nm de entre 0.4 y 0.45, manteniéndose posteriormente el matraz a 4°C durante 20 minutos.
3. Se recogen las células por centrifugación a 3,000 rpm durante 10 minutos, a una temperatura de 4°C.
4. A continuación se resuspenden las células (con suavidad y manteniendo su temperatura alrededor de 4°C) en solución RF1⁷ (un tercio del volumen inicial) y la suspensión se mantiene durante 20 minutos en hielo).
5. Se centrifuga en las mismas condiciones descritas en el paso 3, se resuspenden las células en solución RF2⁸ (1/12.5 del volumen inicial) y la suspensión 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 se pueden conservar a -80°C, previa congelación en nitrógeno líquido.

⁷ **RF1**: Acetato de potasio 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol al 15 % (p/v), MnCl₂ 50 mM y RbCl 100 mM. Se ajusta el pH a un valor de 5.8 con ácido acético 0.2 M. Se esteriliza por filtración a través de un filtro estéril de 0.22 μm de diámetro de poro.

⁸ **RF2**: CaCl₂ 75 mM, glicerol al 15 % (p/v), MOPS 10 mM pH 7.0 y RbCl 10 mM. Se ajusta el pH a 6.8 con NaOH y se esteriliza por filtración a través de un filtro estéril de 0.22 μm de diámetro de poro.

5.7.9) TRANSFORMACIÓN DE *E.coli* POR ELECTROPORACIÓN

Para realizar la transformación por electroporación se utilizó un electroporador Eppendorf modelo 2510. El procedimiento experimental se describe a continuación:

1. Se mezclan en una cubeta para electroporación fría con distancia de 0.1 cm entre electrodos, 10 μ L de plásmido ligado y 50 μ L de células competentes de *E. coli* DH5 α .
2. Se introduce la cubeta en la rejilla del electroporador y se lleva a cabo una descarga eléctrica de aproximadamente 1,250 Volts con un tiempo promedio de 5 mseg.
3. A continuación se añaden rápidamente a la cubeta 400 μ L de medio LB, se mezcla perfectamente con ayuda de una pipeta y se recupera el volumen total en un tubo Eppendorf.
4. Se incuba a 37°C y 260 rpm durante una hora para permitir que se exprese la resistencia al antibiótico.
5. Transcurrido este tiempo se siembra por extensión en medio LA adicionado con kanamicina y se incuba a 37°C durante 12 horas.
6. Las transformantes se analizan mediante minipreparaciones, y al mismo tiempo se resiembran en una placa réplica.
7. Posteriormente se realiza la extracción del plásmido y su comprobación mediante digestión con *Bam*HI y *Hind*III.

5.7.10) AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO DE *E. coli* (MINIPREPARACIONES).

El método seguido para obtener ADN plasmídico a pequeña escala fue una modificación del descrito por Holmes y Quigley (1981).

1. En primer lugar se pica una colonia con un palillo estéril y se inocula en un tubo Eppendorf estéril con 1 mL de medio TB al que se añade el antibiótico adecuado (kanamicina en este caso) para el mantenimiento del plásmido dentro de la bacteria. Se incuba el tubo a 37°C y 260 rpm durante 12 horas con el fin de permitir el crecimiento de la bacteria.

2. Tras este tiempo se recogen las células mediante centrifugación a 14,000 rpm durante 1 minuto. El precipitado obtenido se resuspende en 350 μ L de STET y se añaden en la tapa del tubo 10 μ L de una solución de lisozima preparada a una concentración de 10 mg/mL en agua.

3. Se mezcla vigorosamente durante 30 segundos y se hierve durante 45 segundos. Las proteínas, restos celulares y el ADN cromosómico bacteriano se precipitan por centrifugación a 14,000 rpm durante 10 minutos y se eliminan con la ayuda de un palillo estéril. El ADN plasmídico se precipita tras añadir 40 μ L de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 600 μ L de isopropanol, mezclar y mantener a temperatura ambiente durante 15 minutos.

4. El ADN plasmídico se centrifuga a 14,000 rpm durante 5 minutos y el precipitado se lava con etanol al 70% (v/v). Posteriormente se seca hasta evaporación total y se resuspende en 30 μ L de TE.

5.7.11) ELIMINACIÓN DE ARN Y PROTEINAS DEL ADN

Una vez extraído el ADN total, es necesario someterlo a un proceso de limpieza antes de que pueda ser utilizado en otros ensayos. El ADN obtenido se trata con ARNasa a una concentración final de 100 μ g/mL incubándose a 37°C durante 90 minutos.

Transcurrido este tiempo se añade un volumen de fenol neutro⁹, mezclándose bien durante 5 minutos y centrifugándose a 14,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se recoge la fase acuosa y se mezcla con un volumen de fenol-CIA¹⁰, centrifugándose en las mismas condiciones citadas anteriormente. Se repite este paso hasta obtener una interfase limpia. Normalmente no son necesarias mas de dos extracciones en este paso. Finalmente se

⁹ **Fenol neutro:** se mezclan por agitación 4 volúmenes de fenol ácido con 1 volumen de Tris-HCl 1M pH 8.0. Se mantiene la mezcla en reposo hasta que se separen la fase acuosa superior y la inferior fenólica. El fenol así preparado se conserva a 4°C en un recipiente opaco, manteniéndose durante al menos un mes. Para la preparación de fenol ácido se mezclan 500 mL de fenol sólido con 500 mL de agua destilada, se agita, se deja reposar y se retira parte de la fase superior acuosa. Se guarda a 4°C en un recipiente oscuro. En este estado se puede mantener hasta 3 meses.

¹⁰ **Fenol-CIA:** se prepara mezclando volúmenes iguales de fenol neutro y de CIA.

recoge la fase superior y se mezcla con un volumen de CIA¹¹ durante 5 minutos, centrifugándose en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Se transfiere la fase superior a otro tubo en donde se lleva a cabo la precipitación del ADN en la forma habitual.

5.7.12) SECUENCIACIÓN

Para secuenciar el fragmento que contiene tanto el gen *vhb* como el promotor P_{ermE} , se realizó la extracción de dicho fragmento mediante digestión con *Bam*HI y *Hind*III, que posteriormente se clonó en el plásmido pBluescript KS+, obteniéndose el plásmido pBKSVH, como se describe a continuación:

1. Se digirió el plásmido pUAMPG2 con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, obteniéndose cuatro bandas tras su electroforesis en gel de agarosa: 5.2, 1.8, 0.8 y 0.3 kpb (fig. 5). Se purificó la banda de 809 pb (fusión P_{ermE} -*vhb*) a partir del gel, utilizando el sistema de extracción de ADN a partir de geles de agarosa QUIAEXII.
2. El plásmido pBluescript KS+ se sometió al mismo tratamiento, obteniéndose una banda única de aproximadamente 2.9 kpb (Fig. 9).
3. Los fragmentos obtenidos se ligaron, dando como resultado un nuevo plásmido: pBKSVH de 3,770 pb, con resistencia a ampicilina.

El plásmido pBKSVH se mandó a secuenciar al Instituto de Fisiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), utilizándose un sistema de marcaje Dye Terminator y un analizador de secuencia ABIPRISM. En la secuencia se encontró una delección de dos nucleótidos en el fragmento correspondiente a la fusión del promotor P_{ermE} con el gen *vhb*. Las bases faltantes se corrigieron mediante mutagénesis dirigida

¹¹ CIA: se prepara mezclando 24 volúmenes de cloroformo con un volumen de alcohol isoamílico.

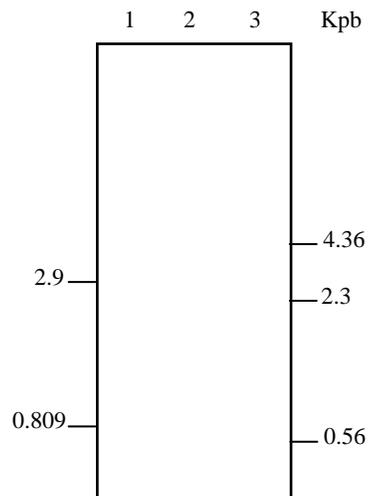


Figura 11.- Digestión de los plásmidos con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, (1) pBluescript KS+, (2) pUAMPG2 y (3) marcador de tamaño molecular λ /*Hind*III.

5.8) MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

El protocolo se desarrolló conforme a lo descrito en el sistema QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis, de STRATAGENE, con algunas modificaciones. La mutagénesis dirigida fue necesaria para corregir la falta de dos nucleótidos en la construcción que podría afectar la expresión del gen.

Se usaron cebadores con una T_m de 66.4°C, incluyéndose en su secuencia los nucleótidos faltantes en la construcción.

La primera parte de la mutagénesis dirigida se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando los cebadores PRIS1 Y PRIS2 que incluyen las bases que se quieren añadir y como ADN molde el plásmido pBKS VH. A continuación se muestra la secuencia de los cebadores mencionados:

PRIS 1: 5'- GGTAGGATCCAGCGATGTTAGACCAG-3

PRIS2: 5'- CTGGTCTAACATCGCTGGATCCTACC -3'

Inicialmente, el ADN molde se desnatura liza y se hibrida con los cebadores que llevan la mutación. La polimerización se da, incorporándose los cebadores mutagénicos, utilizando *Pfu* ADN polimerasa, una enzima termoestable y con alta fidelidad de copia.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción, probando diferentes rangos de concentración de plásmido molde:

| | |
|----------------------------|-------|
| dH ₂ O | 29 µL |
| Buffer de reacción 10x | 5 µL |
| ADN molde (0.04-1.5 ng/µL) | 10 µL |
| Cebador PRIS1 (64 ng) | 2 µL |
| Cebador PRIS2 (64 ng) | 2 µL |
| Mezcla dNTPs (10 mM) | 1 µL |
| MgSO ₄ (50 mM) | 1 µL |
| <i>Pfu</i> ADN polimerasa | 1 µL |

El producto de la PCR se sometió a continuación a digestión con la enzima *DpnI*, que reconoce la secuencia 5'-G^{m6}ATC-3' y degrada el ADN parental no mutado. El ADN plasmídico procede de cepas convencionales de *E. coli* con metilación *dam*, por lo que siempre estará metilado, mientras que el nuevo ADN sintetizado (en el que se han incorporado los cebadores mutagénicos) no lo estará y, por lo tanto, no será susceptible de ser degradado tras el corte con *DpnI*. De esta manera se selecciona sólo el ADN con la mutación para transformarlo en *E. coli*.

Las condiciones usadas para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fueron las siguientes:

- 1) Incubación: 95°C, 3:30 min.
- 2) Desnaturalización: 95°C, 30 seg.
- 3) Hibridación: 62 - 67°C, 30 seg.
- 4) Polimerización: 68°C, 8 min
- 5) Repetir 12 ciclos de 2) a 4).

5.9) CLONACIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA A ERITROMICINA COMO MARCADOR DE SELECCIÓN ALTERNO (CONSTRUCCIÓN DEL PLASMIDO pUAMSAG)

El plásmido pIJ4026 contiene el gen de resistencia a eritromicina *ermE*, flanqueado por sitios de reconocimiento y corte para las endonucleasas *EcoRI* (en 1910 pb) y *XbaI* (en 257 pb); ambas enzimas delimitan el fragmento de 1653 pb que contiene a dicho gen. Por otro lado, el plásmido pUAMPG1 contiene estos mismos sitios de corte en el sitio de clonación múltiple. Al someterse ambos plásmidos a las digestiones correspondientes se obtiene el fragmento *EcoRI-XbaI* de 1,653 pb del pIJ4026 y el plásmido pUAMPG1 linearizado, de 6,400 pb, con extremos *EcoRI-XbaI*. Tanto el plásmido linearizado como el fragmento se purificaron a partir del gel de agarosa utilizando QUIAEXII, y posteriormente se ligaron. De esta manera se obtiene el plásmido pUAMSAG de 8,162 pb.

5.10) TRANSFORMACIÓN DE *A. mediterranei*

5.10.1) PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *A. mediterranei*.

A partir de un glicerol de la cepa MSB se sembraron 2 cajas con medio Bennet (Margalith y Pagani, 1961), por estría y en césped, y se incubaron a 28°C durante 5 días. De la caja sembrada por estría se tomó una colonia aislada y se inoculó un matraz de 500 mL con 100 mL de medio YEME adicionado con MgCl₂ (400 µL de una solución 2.5 M) y glicina (2.5 mL de una solución al 20% p/v).

Adicionalmente, se colocó un resorte en el matraz antes de esterilizarlo con la finalidad de obtener un micelio mas disperso. Este cultivo se incubó a 28°C y 250 rpm durante 48 hrs (cultivo **I**). Una vez transcurrido este tiempo y solo con la finalidad de acomodar horarios se guardó el cultivo a 4°C durante 5 días. Posteriormente se inoculó un matraz preparado como se describió anteriormente, con 5 mL del cultivo **I**, y se incubó nuevamente durante 48 hrs (cultivo **II**)

Con el cultivo **II** se hicieron gliceroles para la conservación del microorganismo con una concentración final del 20% (v/v), y se inocularon matraces de 250 mL con resorte y con 50 mL de medio MYM cada uno, agregando 2.5 mL a cada matraz e incubando durante 21-24 hrs (cultivo **III**), de acuerdo con Ding *et al.* (2003). A continuación se cosechó el cultivo **III** siguiendo dos metodologías con algunas modificaciones; la descrita por Lal *et al.* (1997) y la descrita por Ding *et al.* (2003).

De acuerdo con Lal *et al.* (1997):

- Cosechar cultivo anterior de 50 mL, centrifugando durante 15 min a 5,000 rpm y 4°C
- Lavar con 10 mL de agua desionizada estéril fría (3 veces)
- Adicionar 3.9 mL de glicerol al 10% y 100 µL de lisozima (4 mg/µL) preparada en el momento (concentración final de 1mg/mL)
- Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos
- Lavar con glicerol al 10% frío
- Resuspender en 4 mL de glicerol al 10%
- Alicuotear en 400 µL y guardar estas células competentes a -80°C.

De acuerdo con Ding *et al.* (2003):

- Cosechar cultivo anterior de 50 mL centrifugando a 4,127 rpm durante 10 minutos a 4°C
- Lavar 3 veces con 30 mL de agua desionizada estéril fría
- Resuspender en 3mL de solución de electroporación (0.3 M de sacarosa y 15%, v/v, de glicerol)
- Guardar las células competentes en alícuotas de 200 y 500 µL a -80°C.

5.10.2) TRANSFORMACIÓN DE *A. mediterranei* POR ELECTROPORACIÓN.

El procedimiento de electroporación se llevó a cabo utilizando un aparato de Biorad que con un eliminador adecuado proporciona pulsos de hasta 2,500 V.

Las alícuotas guardadas a -80°C (ver 4.8.1), se descongelaron en baño de hielo y se mezclaron con el plásmido, previamente relajado a 65°C durante 10 min, en las siguientes cantidades: 60

μL de células con 0.1 μg de plásmido (esto es, de acuerdo con la concentración estimada del plásmido, equivalente a 1 μL). La mezcla se mantuvo durante 30 min en baño de hielo y a continuación se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm previamente enfriada, exponiéndose inmediatamente a un pulso sencillo. Cada cubeta así preparada fué expuesta a los siguientes voltajes: 200, 400, 600, 800, 1,000, 1,200, 1,400, 1,600, 1,800, 2,000, 2,200 y 2,500 V equivalentes a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 (Ding *et al.*, 2003), 10 (Lal *et al.*, 1997), 11 y 12 kV/cm, respectivamente. El tiempo de duración del pulso no es una variable controlable en este equipo. Se registraron tiempos promedio de 5.5 mseg.

Inmediatamente después del pulso, se agregó 1 mL de medio Bennet líquido a la mezcla de transformación, se mezcló pipeteando y esta suspensión se transfirió a un tubo Eppendorf estéril, para su incubación a 28°C y 250 rpm durante 2-3 h (Ding *et al.*, 2003) para permitir la expresión del gen de resistencia a la eritromicina. Una vez transcurrido ese tiempo, se sembraron placas de Petri con medio Bennet con y sin antibiótico (aprox. 500 μL de inóculo en cada caja) así como otra caja de Petri control con células sin electroporar, que se incubaron en las mismas condiciones que las electroporadas (control de antibiótico y control de viabilidad, respectivamente). La concentración de eritromicina usada fue de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

El método anterior se repitió con las células preparadas de acuerdo con Lal *et al.* (1997).

Todas las cajas sin antibiótico crecieron adecuadamente en un tiempo de incubación de 5-6 días, el control de viabilidad creció adecuadamente y en el control del antibiótico no se observó crecimiento alguno. Tampoco se observó crecimiento en las cajas con antibiótico. Por tal razón, se probaron dosis de eritromicina en el rango de 100 a 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con base en el artículo de Lal *et al.* (1997), en el que utilizan una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de eritromicina, sembrando por cespel 50 μL de células competentes (Ding *et al.*, 2003) en cajas con 25 mL de medio Bennet con las diferentes concentraciones de antibiótico. Después de incubar a 28°C durante 5 días solo se obtuvo crecimiento en el control sin antibiótico por lo que se utilizó la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la selección de transformantes por electroporación. Después de una serie de experimentos en los que no se obtuvieron transformantes resistentes a

eritromicina se llegó a la conclusión de que posiblemente la dosis de antibiótico para la selección era muy alta por lo que se probaron dosis menores.

Posteriormente se probaron dosis de antibiótico en el rango de 10 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, obteniéndose crecimiento solamente en el control sin antibiótico nuevamente.

Finalmente se probaron dosis de antibiótico en el intervalo de 1 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Una vez que se determinó que la concentración mas adecuada del antibiótico para la selección de transformantes era de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se llevó a cabo un segundo experimento en el que se hicieron las siguientes modificaciones: mezcla de transformación con el doble de las cantidades probadas inicialmente, esto es 120 μL de células y 2 μL de plásmido (0.2 μg), voltajes de 500, 1,000, 1,500, 2,000, y 2,500 V; después del pulso se agregaron 2 mL de medio Bennet y se incubó la suspensión en tubos de 15 mL para permitir una mejor aireación. El tiempo de incubación posterior al pulso se incrementó para lograr una expresión del gen mas confiable, probando sembrar en tres diferentes tiempos: 6 h (con y sin antibiótico), aprox. 19 h (con antibiótico), y aprox 42 h (con antibiótico). En cada tiempo se sembraron 500 μL de cultivo que fueron tomadas del tubo de 15 mL y transferidos a un tubo Eppendorf, se centrifugaron a 5,000 rpm durante 5 min, se eliminó aproximadamente 400 μL de sobrenadante con ayuda de una pipeta y el pellet se resuspendió en los 100 μL sobrantes mediante agitación suave en vortex. Estos 100 μL se sembraron en cajas Petri por césped de forma mucho mas rápida que si se siembran directo los 500 μL .

Todas las cajas sin antibiótico crecieron adecuadamente en un tiempo de incubación de 5-6 días, el control de viabilidad creció adecuadamente y en el control del antibiótico no se observó crecimiento alguno. Tampoco se observó crecimiento en las placas con antibiótico en ninguno de los tiempos.

Este segundo experimento no se probó con las células preparadas de acuerdo con Lal *et al.* (1997).

5.10.3) TRANSFORMACIÓN DE *A. mediterranei* POR BIOBALÍSTICA.

Se cultivó *A. mediterranei* a 28°C y 250 rpm durante 48 h en matraces con un resorte de 500 µL con 100 µL de medio Bennet, inoculados con 500 µL y 1000 µL de células competentes preparadas de acuerdo con Ding *et al.* (2003).

Estos cultivos se utilizaron para sembrar placas de Petri con 10 mL de medio Bennet preparado con sorbitol 0.6 M como osmoregulador. Las placas se sembraron con una alícuota de 2 mL de los cultivos anteriores y una vez secas se sometieron al bombardeo con microproyectiles **M5** (BioRad) previamente recubiertos con el plásmido pUAMSAG.

Antes de recubrir los microproyectiles con el ADN, se requiere prepararlos de la siguiente manera: se pesan 60 mg de partículas de Tungsteno **M5** (tamaño promedio de 0.4 µm) en un tubo Eppendorf y se agrega 1 mL de NaOH 0.1 N, se mezcla con Vortex, se da un pulso de centrifuga, se tira el sobrenadante y a continuación se lava 2 veces con agua destilada. Este procedimiento se repite con HCl 0.1 N. Finalmente se resuspenden las partículas ya lavadas con 1 mL de agua destilada estéril.

El recubrimiento de los microproyectiles con ADN plasmídico se realizó de acuerdo al Manual de Laboratorio proporcionado por el Laboratorio de Biología molecular y Bioingeniería del CINVESTAV. Se transfirió una alícuota de 50 µL de las partículas previamente lavadas a un tubo Eppendorf y se agregaron los siguientes componentes: ADN suficiente para obtener una concentración de 10 µg, 50 µL de CaCl₂ 2.5 M estéril, 20 µL de espermidina 0.1 M. A continuación se sonicó la mezcla brevemente y se dio un pulso de centrifuga (10 seg a 10,000 rpm), se quitó el sobrenadante y se agregaron 250 µL de etanol absoluto. Se sonicó nuevamente y se centrifugó en las mismas condiciones, se quitó el sobrenadante y se adicionaron 60 µL de etanol absoluto. Se sonicó hasta que el aspecto de las partículas fue homogéneo, se colocaron 10 µL de la mezcla en la membrana *flying disk* y se esperó hasta que el etanol se evaporó.

Los parámetros utilizados para el bombardeo fueron los siguientes:

- Dos presiones de helio: 450 p.s.i. (con una membrana) y 900 p.s.i. (con dos membranas de ruptura)

- Vacío: 20 "Hg
- Distancia al blanco: 6 cm
- Distancia gap: 1 cm

A continuación se describe brevemente el procedimiento de bombardeo:

Primeramente se colocan el número apropiado de membranas de ruptura, previamente humedecidas en etanol absoluto, en la capsula y se enrosca perfectamente. Después se coloca la membrana *flying disk* que contiene los microproyectiles recubiertos con ADN, de tal manera que la muestra quede en la parte de abajo, asegurándose de que ésta quede perfectamente centrada. Se coloca también la caja de Petri objetivo con el agar inoculado a una distancia de 6 cm. A continuación se cierra la cámara y se enciende el vacío. Cuando éste alcanza una presión de aproximadamente 20 "Hg se presiona el botón de bombardeo y se mantiene presionado hasta que se escucha la ruptura de la o las membranas. Inmediatamente después del bombardeo se presiona el boton para romper el vacío y cuando esto sucede se puede sacar la caja Petri de la cámara. Antes del siguiente bombardeo se desechan tanto las membranas de ruptura como la membrana *flying disk* ya utilizados y se repite el ciclo completo.

Este experimento se realizó con 2 repeticiones por cada una de las siguientes condiciones: 1) 450 psi, selección antibiótico; 2) 450 psi, selección mayor captación de oxígeno; 3) 900 psi, selección antibiótico; 4) 900 psi, selección mayor captación de oxígeno; 5) control bombardeo con partículas sin ADN a 450 psi, a) selección antibiótico y b) selección mayor captación de oxígeno; 6) control bombardeo con partículas sin ADN a 900 psi, a) selección antibiótico y b) selección mayor captación de oxígeno; 7) control sin bombardeo, selección antibiótico; 8) control sin bombardeo, selección mayor captación de oxígeno.

Posteriormente se incubaron las placas a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h y a continuación se utilizaron 2 opciones para la selección de las transformantes: 1) resistencia a eritromicina y 2) mayor captación de oxígeno. En la primera opción se añadió una cobertera de 20 mL de agar suave Bennet con eritromicina a una concentración final de 10 µg/mL (considerando un volumen total de 30 mL). Como segunda opción de selección se utilizó la mayor captación de oxígeno. Por ello, en este segundo mecanismo de selección se adicionó una cobertera de 20 mL de agar Bennet normal (al 2%)

sin antibiótico. Debido a la naturaleza aeróbica estricta de *A. mediterranei*, se pensó que los transformantes con el gen *vhb* podrían tener una ventaja selectiva frente a la cepa sin transformar cuando fueran recubiertos por una capa gruesa de medio

En un experimento final se probó la capacidad de crecimiento de *A. mediterranei* a través de coberteras de agar de diferentes espesores para lo cual se incubaron 9 cajas de Petri con 10 mL de medio Bennet y 50 μ L de inóculo de células competentes durante 48 h. Transcurrido este tiempo se adicionaron sobre el crecimiento 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, y 45 mL de medio Bennet con agar al 2% a aproximadamente 42°C, dejándose incubar por 10 días. En ninguno de los casos se observó crecimiento hacia la superficie de *A. mediterranei*.

5.11) EXTRACCIÓN DE ADN DE TRANSFORMANTES DE *A. mediterranei*.

Una vez obtenidas posibles transformantes por biobalística, se llevó a cabo la resiembra de 10 colonias elegidas al azar y la propagación en césped de 2 de las 10 colonias (la BII4 y la BII10) para llevar a cabo la extracción del ADN plasmídico. El método seguido es el descrito por Moretti *et al.*, (1985), con algunas modificaciones. En este artículo se describe el método utilizado para aislar el plásmido endógeno (pMEA100) de la cepa LBG A3136 de *Nocardia mediterranei*. Con este método se obtiene un ADN sumamente degradado por lo que se hicieron algunas modificaciones tomando como referencia el Manual de Laboratorio de Sambrook y Russell (2001). El método modificado es el siguiente: el micelio raspado de ¼ de caja bien crecida (3 días a 30°C) se resuspende (homogeneizando con varilla de vidrio y Vortex) en 500 μ L de solución de lisis I fría (50 mM glucosa; 25 mM tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA, pH 8). A continuación se agregan 350 μ L de solución de lisis II fría preparada en el momento (0.2 N NaOH; 1% de dodecil sulfato de sodio SDS) y se mezcla con cuidado invirtiendo el tubo Eppendorf 5 veces (¡no Vortex!), manteniendo en baño de hielo. Posteriormente se agregan 210 μ L de solución de lisis III fría (5 M acetato de potasio 60 mL; ácido acético glacial 11.5 mL; agua 28.5 mL) y se mezcla nuevamente invirtiendo el tubo 5 veces. La mezcla se mantiene en hielo de 3-5 min, se centrifuga a 14,000 rpm, 5 min a 4°C, y se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo. A continuación se fenoliza de acuerdo al

método descrito anteriormente. Se precipita el ADN agregando 2 volúmenes de etanol absoluto frío y dejando a -20°C hasta el siguiente día. Se centrifuga a 14,000 rpm, 10 min a 4°C , se tira el sobrenadante y el precipitado se lava con etanol al 70%, se seca con secadora y se resuspende en 30 μL de agua destilada estéril.

5.12) COMPROBACIÓN DE TRANSFORMANTES.

Para comprobar que las posibles transformantes de *A. mediterranei* obtenidas por biobalística son en realidad transformantes que tienen incorporado el plásmido pUAMSAG, se llevó a cabo una reacción de PCR, utilizando como ADN molde el ADN extraído de las posibles transformantes (sección 5.11) y como cebadores los mismos oligonucleótidos utilizados para la obtención de los fragmentos correspondientes al gen *vhb* y al promotor P_{ermE} (GV5 y GV3; PV5 y PV3 respectivamente), así como los cebadores PV5 y GV3, con los que se amplifica la construcción promotor-gen. El pUAMSAG utilizado como ADN molde se usó como control positivo en la reacción de PCR.

5.13) FERMENTACIÓN (PRODUCCIÓN DE RIFAMICINA).

La preparación del inóculo se llevó a cabo de la siguiente manera: se siembran en césped 2 cajas de Petri con agar Bennet, con 100 μL del glicerol correspondiente a cada cepa a probar: MSB sin transformar (control), BII4 (colonia 4 obtenida por transformación con biobalística) y BII10 (colonia 10 obtenida por transformación con biobalística). Se incuban a 30°C hasta obtener buen crecimiento (de 2 a 3 días) y se raspa con una asa una superficie de 2x2 cm de biomasa que se transfiere a un tubo Eppendorf con 400 μL de medio Bennet para homogenizar utilizando una varilla de vidrio con punta roma estéril. Una vez homogenizada la biomasa, se toman 200 μL de ésta para inocular cada matraz de 250 mL con 50 mL de medio Bennet y resorte (para un crecimiento disperso). Se inoculan 2 matraces por cada cepa. A los matraces correspondientes a BII4 y BII10 se les añade además eritromicina a una

concentración final de 10 µg/mL para la conservación del plásmido. Estos matraces se incuban a 30 °C y 150 rpm durante 72-96 h.

Una vez transcurrido este tiempo se estandariza la biomasa de la siguiente forma: primeramente se mezclan los cultivos de los 2 matraces de cada muestra para obtener un cultivo homogéneo. Se toman 10 mL de cada cultivo y se transfieren a un tubo para centrifuga cónico graduado y se centrifuga a 10,000 rpm durante 15 min en una centrifuga de rotor basculante. Se mide la biomasa empacada en el fondo del tubo y se toma como base el tubo con menor biomasa para realizar los cálculos necesarios para inocular la misma cantidad de biomasa en cada uno de los matraces de medio de producción Lee.

Para el inóculo y considerando que se requieren condiciones de baja aireación para evaluar el efecto de la expresión del gen *vhb* de las transformantes, se incrementó el volumen del medio de producción (de 20 mL a 70 mL en matraces de 250 mL), se incrementó la cantidad de inóculo (de 20% a 30%) y se mantuvo la agitación a 200 rpm (Krishna *et al.*, 1998). Con estas condiciones se inocularon 4 matraces con Barbital y 4 matraces sin Barbital por cada cepa a probar, durante un periodo de 8 días, tiempo reportado por como de máxima producción de rifamicina.

5.14) CUANTIFICACIÓN DE RIFAMICINA.

Se cuantificó la rifamicina B mediante el método espectrofotométrico reportado por Pasqualucci *et al.* (1970), con algunas modificaciones, el cual se basa en la oxidación de la hidroquinona (grupo cromóforo) del compuesto, modificando su máximo de absorción (425 nm) en el espectro de luz visible. De esta forma se obtiene una absorción diferencial de la rifamicina B contra su forma oxidada, lo cual permite restar todos los compuestos que absorben a 425 nm presentes en el caldo de fermentación. Los autores adoptan como agente oxidante una solución al 1% de NaNO₂ en buffer de acetato acuoso pH 4.63, tomando como base un tiempo de reacción de 5 minutos. La concentración de rifamicina B en un caldo de fermentación la calculan mediante la fórmula:

$$\text{Rifamicina B}(\mu\text{g} / \text{mL}) = \frac{(A_{425})(50,000)}{21.5}$$

donde:

A_{425} = valor de la absorbancia obtenida a 425nm

50,000= factor de dilución utilizado en este método

21.5= absortividad de la Rifamicina B determinada por este método.

Debido a que la fermentación se llevó a cabo en condiciones de baja aireación y la concentración de rifamicina B obtenida fue baja, se utilizó una dilución 1:2 (en lugar de la de 1:50 empleada en el artículo), por lo que se optó por realizar una curva patrón para obtener la ecuación y de allí calcular la concentración de rifamicina B, en lugar de utilizar la fórmula propuesta en el artículo mencionado.

El procedimiento general modificado se describe a continuación: primero se prepara una solución stock de rifamicina B pura con una concentración de 10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (solubilidad de rifamicina B en metanol 2.62%) a partir de la cual se preparan soluciones de rifamicina B con diferentes concentraciones para realizar una curva patrón. Dos porciones iguales de cada solución se diluyen (dilución 1:2) separadamente, una con el amortiguador de acetato acuoso pH 4.63¹² y otra con el mismo amortiguador conteniendo NaNO_2 al 1%. Las muestras se dejan reaccionar durante 5 minutos y a continuación se leen a 425 nm tomando como blanco la solución con NaNO_2 (oxidada). Con los datos de absorbancia obtenidos se realiza una curva patrón de la que se obtiene la ecuación requerida para el cálculo de la concentración de rifamicina B. Las muestras obtenidas del caldo de fermentación se someten al siguiente tratamiento antes de ser leídas en el espectrofotómetro: se centrifugan durante 10 min a 10,000 rpm. El sobrenadante se filtra con papel de filtro de 0.4 micras de tamaño de poro. Se realiza la dilución 1:2 y se continúa con el procedimiento anteriormente descrito. Los valores de absorbancia obtenidos se sustituyen en la ecuación obtenida de la curva patrón.

¹² El amortiguador de acetato se prepara con acetato de sodio 0.7413 M y ácido acético 1M, de acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

5.15) DETERMINACIÓN DE BIOMASA (peso seco).

La cuantificación de biomasa se realizó en el T2 (8 días de fermentación). Los 60 mL de cada cultivo (70 mL menos 10 mL que se utilizaron para cuantificar rifamicina en el T1, se centrifugaron, en tubos previamente pesados, a 10,000 rpm durante 10 minutos. El caldo de fermentación sin células se utilizó para la cuantificación de rifamicina B, filtrando previamente con un filtro de diámetro de poro de 0.4 μm . Las células se lavaron, resuspendiendo en 30 mL de agua destilada para eliminar los residuos de glucosa, se centrifugaron nuevamente a 10,000 rpm durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y se lavaron 2 veces más de la manera descrita. La biomasa obtenida se secó en estufa durante 48 h para obtener de esta manera el peso seco de la biomasa por diferencia de peso.

VI. RESULTADOS

6.1) OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO DE *V. stercoraria*, Y *S. erythraea*.

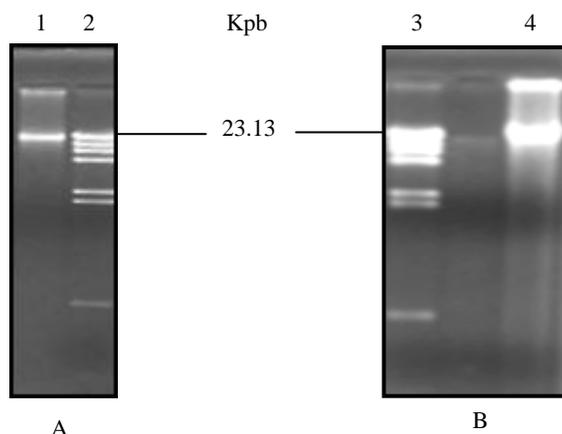


Figura 12. Obtención de ADN genómico de (A) *V. stercoraria*, carril 1 y (B) *S. erythraea*, carril 4. En el carril 2 y 3 se muestra el marcador de tamaño molecular λ HindIII.

6.2) DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA OBTENCIÓN POR PCR DEL PROMOTOR P_{ermE} (de *S. erythraea*) Y DEL GEN *vhb* (de *V. stercoraria*).

Con base en la secuencia anterior se diseñaron los oligonucleotidos o primers necesarios para la obtención por PCR de los fragmentos de interés, a los cuales se les agregaron sitios de corte para su posterior clonación en el vector pULVK2. Las bases adicionales, en 5' se las secuencias de corte, se añadieron para facilitar la posterior digestión de los fragmentos con las enzimas.

Para el promotor P_{ermE} la secuencia de los oligonucleótidos es la siguiente:

PV5: 5' **g c g a** ↓ **agctt** / **atg c g a g t g t c c g t t c g a g t g** 3'

HindIII

PV3: 3' **c g g c c a a c c a t c c t a g g t c g c** 5'

Para el gen *vhb* la secuencia de los oligonucleótidos es la siguiente:

GV5: 5' **atg tt agacc agcaaac catt** 3'

GV3 : 3' **aga agtccacac ggaaccgta / cct ag ↑ gat** 5'
*Bam*HI

6.3) OBTENCIÓN DEL PROMOTOR P_{ermE} Y DEL GEN *vhb* POR PCR.

Para la obtención por PCR de los fragmentos de interés se realizaron diferentes mezclas de reacción y se probaron diferentes temperaturas de hibridación, con el propósito de determinar las condiciones para la realización de la PCR, encontrándose como óptimas las siguientes:

| | | |
|-------------------------|----------------------------|--------------|
| Mezcla de reacción: | 25 mM de MgCl ₂ | 6 μL |
| | 10x tampón | 10 μL |
| | 10 mM Nucleótidos | 2 μL |
| | 20 μM cada oligonucleótido | 5 μL |
| | 5 U/μL de Taq polimerasa | 0.5 μL |
| | dH ₂ O | 1.5 μL |
| | DNA molde 1:100 | 10 μL |
| | Volumen total | 100 μL |
| Temperaturas por ciclo: | Desnaturalización | 94°C, 30 seg |
| | Hibridación | 50°C, 30 seg |
| | Elongación | 72°C, 1 min |

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la realización de la PCR se procedió a la realización de un gel de agarosa para la comprobación de la amplificación de los fragmentos de interés, los cuales se muestran a continuación (Fig. 13)

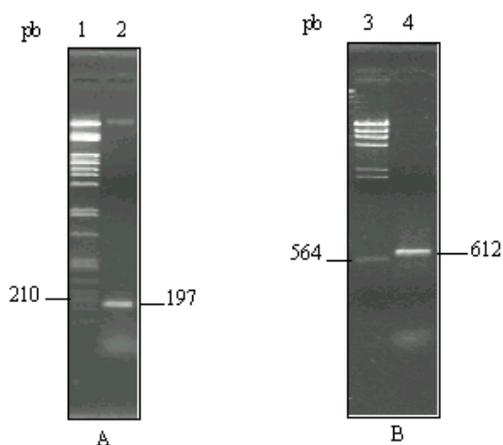


Figura 13. Amplificación por PCR del promotor P_{ermE} (carril 2) de *S. erythraea* y del gen *vhb* de *V. stercoraria* (carril 4). En carriles 1 y 3 marcadores de tamaño molecular $\lambda/PstI$ y $\lambda/HindIII$ respectivamente

6.4) EXTRACCIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE INTERÉS DEL GEL DE AGAROSA CON QUIAEXII.

Los fragmentos obtenidos se extrajeron directamente del gel de agarosa (Fig. 14) utilizando el sistema QuiaexII, que se basa en la solubilización de la agarosa y la adsorción selectiva y cuantitativa de los ácidos nucleicos a las partículas de sílica gel de Quiaex en presencia de un alto contenido de sales.

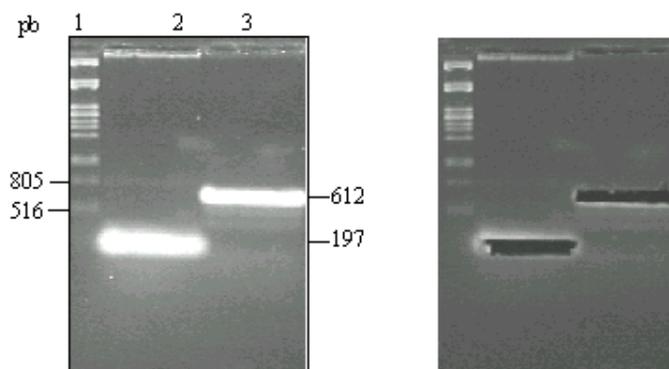


Figura 14. Extracción de los fragmentos correspondientes al gen *vhb* y al promotor P_{ermE} directamente del gel de agarosa con QuiaexII.

6.5) CLONACIÓN Y COMPROBACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE INTERÉS EN EL PLASMIDO pULVK2.

Una vez obtenidos los fragmentos de interés por QuiaexII, se sometieron a digestión con las enzimas de restricción correspondientes (el fragmento del gen con *Bam*HI y el fragmento del promotor con *Hind*III) con la finalidad de obtener extremos cohesivos. De igual modo se digirió el plásmido pULVK2 tanto con *Hind*III como con *Bam*HI. Estos tres elementos digeridos se recuperaron nuevamente con QuiaexII para su posterior ligación. Como se describe en el método, primeramente se llevó a cabo la ligación de los extremos cohesivos y posteriormente se ligaron los extremos romos. El nuevo plásmido así construido se recuperó nuevamente con QuiaexII y con él se transformó *E. coli* por electroporación. A continuación se realizaron minipreps y se linearizaron los plásmidos por digestión con *Bam*HI para analizar el tamaño de los plásmidos obtenidos. En la Fig. 15 se observan 3 transformantes con un plásmido del tamaño correspondiente al plásmido con el inserto, que es de 6,509 pb (carriles 3, 15 y 24). En los otros carriles se observa el plasmido pULVK2 original con un tamaño de 5,700 pb.

Para comprobar la clonación se realizó la digestión de los plásmidos que presentan el tamaño correspondiente a 6,509 pb con ambas enzimas (*Hind*III y *Bam*HI). Solamente en el plásmido que corresponde al carril 2 de la Fig. 16 se obtuvieron los dos fragmentos esperados, cuyos tamaños corresponden al plásmido original (5.7 kpb) y al inserto del promotor y el gen (809 pb). A este nuevo plásmido se le denominó pUAMPG1. Además se realizó nuevamente PCR utilizando como ADN molde el plásmido clonado y los oligonucleótidos correspondientes al extremo 5' del promotor y 3' del gen, obteniéndose la amplificación de un fragmento de 809 pb que corresponde a construcción promotor-gen completa.

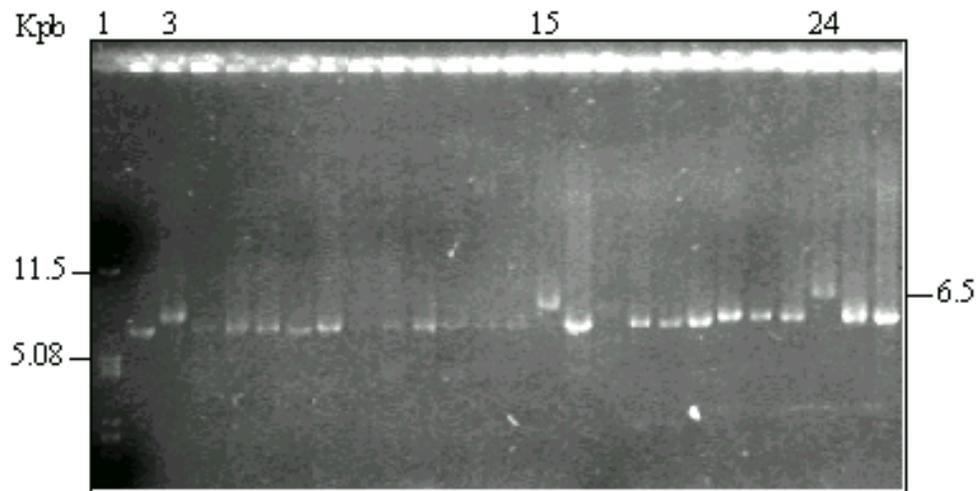


Figura 15. Minipreps con plásmidos linearizados con *Bam*HI. Los carriles 3, 15 y 24 muestran plásmidos que corresponden a un tamaño de 6.5 kpb (pULVK2 más inserto). El carril 1 muestra el marcador de tamaño λ /*Pst*I. Los carriles restantes muestran plásmidos con un tamaño correspondiente a 5.7 kpb (pULVK2).

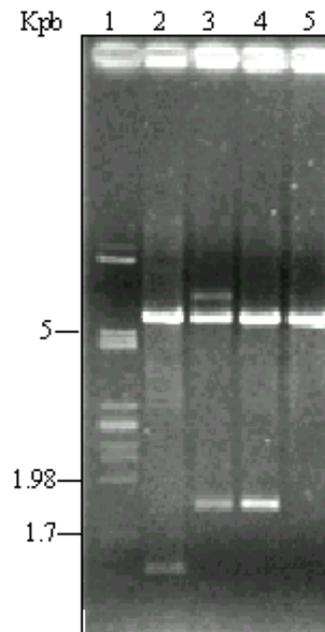


Figura 16. Análisis de las tres transformantes que probablemente poseen el inserto. El carril 2 muestra dos fragmentos que corresponden al tamaño de plásmido pULVK2 de 5.7 kpb y al tamaño del inserto (unión del gen y promotor) de 809 pb. En los carriles 3 y 4 se observa la presencia de un inserto con un tamaño que no corresponde al esperado. El carril 5 es el control (plásmido pULVK2 linearizado). En el carril 1 se muestra el marcador de tamaño λ /*Pst*I.

6.6) CLONACIÓN DEL FRAGMENTO DE 809 pb EN EL PLÁSMIDO pBKS+ PARA REALIZAR SU SECUENCIACIÓN.

Una vez construido el nuevo plásmido pUAMPG1 se procedió a extraer de este plásmido el fragmento de 809 pb que corresponde a la unión promotor-gen para clonarlo en el plásmido pBKS+ y proceder a su secuenciación. Para obtener este fragmento se digirió el plásmido pUAMPG1 con *Bam*HI y *Hind*III, se corrió un gel y se extrajo el fragmento de 809 pb con QuiaexII. También se digirió el plásmido pBKS+ con éstas 2 enzimas. Posteriormente se realizó la ligación de los extremos cohesivos de este fragmento con los del plásmido pBKS+, obteniéndose así el plásmido pBKSVH. Se efectuó la transformación de *E. coli*, se realizaron minipreps y los plásmidos obtenidos se linealizaron con *Hind*III. De esta manera se obtuvieron 9 colonias con tamaño de plásmido pBKSVH de 3,770 pb (2,961 pb del pBKS+ mas 809 pb del inserto), como se muestra en la (Fig. 17).

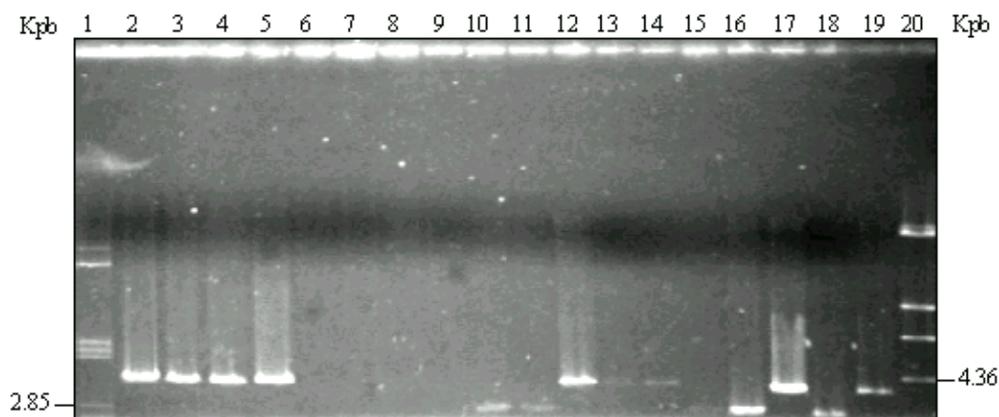


Figura 17. Minipreps de la clonación del fragmento de 809 pb en el plásmido pBKS+. En los carriles 10, 11, 16 y 18 se observa un tamaño de plásmido correspondiente al pBKS+ de 2,961 pb. En los carriles 2, 3, 4, 5, 12, 13, 14, 17 y 19 se observa un tamaño de plásmido de 3,770 pb que corresponde al pBKSVH (pBKS+ clonado con el inserto de 809 pb). El carril 1 corresponde a λ /*Pst*I y el carril 20 corresponde a λ /*Hind*III.

A continuación se realizó una digestión doble (con *Bam*HI y *Hind*III) de las colonias que presentaron el tamaño correspondiente a pBKS+ con el inserto (3.77 kpb), con la finalidad de comprobar la presencia del inserto mediante la liberación de éste (Fig. 18).

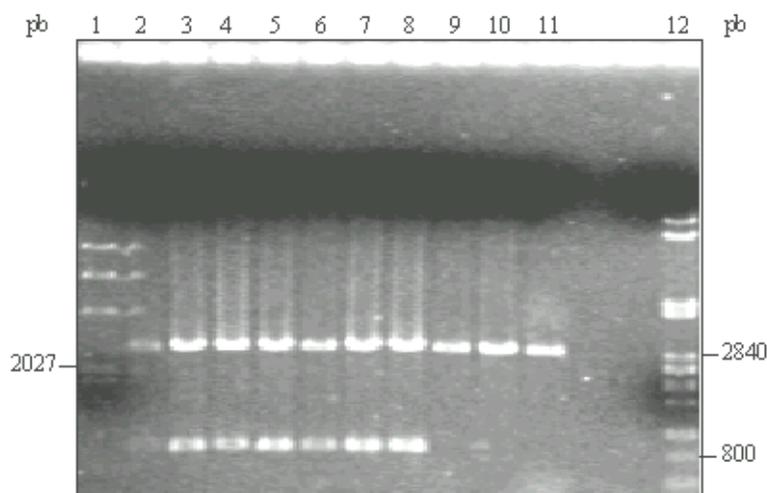


Figura 18. Comprobación de la presencia del inserto mediante la liberación de éste. Carriles 2-8 muestran 2 fragmentos, uno de 2,961 pb que corresponde al tamaño de pBKS+ y otro de 809 pb que corresponde al inserto. Los carriles 9-11 corresponden al plásmido pBKS+ sin inserto (control). En el carril 1 aparece el marcador de tamaño λ /HindIII. En el carril 12 aparece el marcador de tamaño λ /PstI.

6.7) SECUENCIA DEL FRAGMENTO DE 809 pb INSERTADO en pULVK2 y en pBKS+.

A continuación se muestra la secuencia obtenida con el cebador GV3

(3' **agaagtccacacggaaccgta/cctag** ↑ **gat** 5') (Fig. 20):

```

1  CGTNCGCAGC AACGGCGGGC TCTTACACAG GGNCAATATT TGTCCCAAGT
51  TTTGGCCAAC AGCCAAACTG CTGCTGTGTA AATATCAGAC GTAAAAAACC
101 GCACCTTATG GTGCGTTTTT TATGTCCTGA AAGCGGCCTG AAACTTTATT
151 CAACCGCTTG AGCGTACAAA TCTGCTTCCA CTTGAATAAA CACATCTGCA
201 ATCACGCCAT AAGCCTTGCC CCACGCGTCC AAAATGTCAT CGGTTGCGGC
251 ATCGCCCAAT ACTTCTTTAA TCGCACCCAA CAATTCCTGA CCGACAATCG
301 GATAATGCGC TGCTGCCACG CCTGCTTGAC AATGTTTGAC TGCAATTTTT
351 TTGACCGCAG GCAAAATAGC TGGCAAATTT TCAATGTTTT GCGCTGCCGC
401 CAATACCGTC ATCGCCAAAG CCTTAGGCTG CTCCAAGAT TCTTGGCGAC
451 CCATATCAAA CAAAGGACGT ACTTCAGGGG TGTTTGGCAA ACAAGTTTTT
501 ATAAAAAGTC GTGGTAATGG TAACGCCATG CTCCTTCAAT ACAGGAACAG
551 TGGCTTTGAT GATGTTAATG GTTTNGCTGG TCTAACATCT GGATCCTACC
601 AACCGGCACG ATTGTCCAGC CCACACG

```

Figura 19. Secuencia obtenida con el cebador GV3

A continuación se muestra la secuencia obtenida con el cebador PV5

(5' **gcga**↓**agctt**/atgcgagtggtccggttcgagtg 3') (Fig. 19) :

```

1 GCAGGCCTTT GCAGCCCCGA ATGTCCTAGN TCCGCGGTTG ATNCGGCGAT
51 CGCAGGTGCA CGCGGTCGAT ACTTGACGGC TGGCGAGCAG GTGCGGGGCA
101 GGATCTGACC GACGCGGTCC ACACGTGGCA CCGCGATGCT GTTGTGGGCT
151 GGACAATCGT GCCGGTTGGT AGGATCCAGA TGTTAGACCA GCAAACCATT
201 AACATCATCA AAGCCACTGT TCCTGTATTG AAGGAGCATG GCGTTACCAT
251 TACCACGACT TTTTATAAAA ACTTGTTTGC CAAACACCCT GAAGTACGTC
301 CTTTGTTTGA TATGGGTCGC CAAGAATCTT TGGAGCAGCC TAAGGCTTTG
351 GCGATGACGG TATTGGCGGC AGCGCAAAC ATTGAAAAT TGCCAGCTAT
401 TTTGCCTGCG GTCAAAAAAA TTGCAGTCAA ACATTGTCAA GCAGGCGTGG
451 CAGCAGCGCA TTATCCGATT GTCGGTCAAG AATTGTTGGG TGCGATTA
501 GAAGTATTGG GCGATGCCGC AACCGATGAC ATTTTGGACG CGTGGGGCAA
551 GGCTTATGGC GTGATTGCAG ATGTGTTTAT TCAAGTGGAA GCAGATTTGT
601 ACGCTCAAGC GGTGGAATAA AGTTTCAGGC CGCTTTCAGG ACATAAAAAA
651 CGCACCATAN GGTGCGTTTT TTTACGTCTG ATATTTACAC AGCAGCAGTT
701 TGGCTGTTGG CCAAACCTTG GGACAAATAT TGCCCTGTGT AAGAGCCCGC
751 CGTTGCTGCG ACGTCTTCAG GTGTGCNTGC TGGGG

```

Figura 20. Secuencia obtenida con el cebador PV5

Posteriormente se realizó una comparación entre la secuencia obtenida y la secuencia esperada, encontrándose una delección de dos bases en la secuencia obtenida, las cuales se marcan en color rosa (Fig. 21). Además, se observa una adición y el cambio de una base. Estos dos cambios se marcan en color amarillo y se encuentran fuera de la región codificante (el codón de fin del gen se marca en verde). A continuación se muestra la comparación entre la secuencia esperada y la secuencia obtenida (Fig. 21):

| | | |
|-----|---|-----------|
| 1 | C G G T T G A T C G G C G A T C G C A G G T G C A C G C G G T C G A T C T T G A | ESPERADO |
| 1 | C G G T T G A T C G G C G A T C G C A G G T G C A C G C G G T C G A T C T T G A | RESULTADO |
| 41 | C G G C T G G C G A G A G G T G C G G G G A G G A T C T G A C C G A C G C G G T | ESPERADO |
| 41 | C G G C T G G C G A G A G G T G C G G G G A G G A T C T G A C C G A C G C G G T | RESULTADO |
| 81 | C C A C A C G T G G C A C C G C G A T G C T G T T G T G G G C T G G A C A A T C | ESPERADO |
| 81 | C C A C A C G T G G C A C C G C G A T G C T G T T G T G G G C T G G A C A A T C | RESULTADO |
| 121 | G T G C C G G T T G G T A G G A T C C A G C G A T G T T A G A C C A G C A A A C | ESPERADO |
| 121 | G T G C C G G T T G G T A G G A T C C A G C G A T G T T A G A C C A G C A A A C | RESULTADO |
| 161 | C A T T A A C A T C A T C A A A G C C A C T G T T C C T G T A T T G A A G G A G | ESPERADO |
| 159 | C A T T A A C A T C A T C A A A G C C A C T G T T C C T G T A T T G A A G G A G | RESULTADO |
| 201 | C A T G G C G T T A C C A T T A C C A C G A C T T T T T A T A A A A C T T G T | ESPERADO |
| 199 | C A T G G C G T T A C C A T T A C C A C G A C T T T T T A T A A A A C T T G T | RESULTADO |
| 241 | T T G C C A A A C A C C C T G A A G T A C G T C C T T T G T T T G A T A T G G G | ESPERADO |
| 239 | T T G C C A A A C A C C C T G A A G T A C G T C C T T T G T T T G A T A T G G G | RESULTADO |
| 281 | T C G C C A A G A A T C T T T G G A G C A G C C T A A G G C T T T G G C G A T G | ESPERADO |
| 279 | T C G C C A A G A A T C T T T G G A G C A G C C T A A G G C T T T G G C G A T G | RESULTADO |
| 321 | A C G G T A T T G G C G G C A G C G C A A A A C A T T G A A A A T T T G C C A G | ESPERADO |
| 319 | A C G G T A T T G G C G G C A G C G C A A A A C A T T G A A A A T T T G C C A G | RESULTADO |
| 361 | C T A T T T T G C C T G C G G T C A A A A A A A T T G C A G T C A A A C A T T G | ESPERADO |
| 359 | C T A T T T T G C C T G C G G T C A A A A A A A T T G C A G T C A A A C A T T G | RESULTADO |
| 401 | T C A A G C A G G C G T G G C A G C A G C G C A T T A T C C G A T T G T C G G T | ESPERADO |
| 399 | T C A A G C A G G C G T G G C A G C A G C G C A T T A T C C G A T T G T C G G T | RESULTADO |
| 441 | C A A G A A T T G T T G G G T G C G A T T A A A G A A G T A T T G G G C G A T G | ESPERADO |
| 439 | C A A G A A T T G T T G G G T G C G A T T A A A G A A G T A T T G G G C G A T G | RESULTADO |
| 481 | C C G C A A C C G A T G A C A T T T T G G A C G C G T G G G G C A A G G C T T A | ESPERADO |
| 479 | C C G C A A C C G A T G A C A T T T T G G A C G C G T G G G G C A A G G C T T A | RESULTADO |
| 521 | T G G C G T G A T T G C A G A T G T G T T T A T T C A A G T G G A A G C A G A T | ESPERADO |
| 519 | T G G C G T G A T T G C A G A T G T G T T T A T T C A A G T G G A A G C A G A T | RESULTADO |
| 561 | T T G T A C G C T C A A G C G G T T G A A T A A A A G T T T C A G G C C G C T T T | ESPERADO |
| 559 | T T G T A C G C T C A A G C G G T T G A A T A A A A G T T T C A G G C C G C T T T | RESULTADO |
| 601 | C A G G A C A T A A A A A C G C A C C A T A A G G T G G T T T T T T A C G | ESPERADO |
| 599 | C A G G A C A T A A A A A C G C A C C A T A A G G T G G T T T T T T A C G | RESULTADO |
| 640 | T C T G A T A T T T A C A C A G C A G C A G T T T G G C T G T T G G C C A A A | ESPERADO |
| 639 | T C T G A T A T T T A C A C A G C A G C A G T T T G G C T G T T G G C C A A A | RESULTADO |
| 680 | C T T G G G A C A A A T A T T G C C C T G T G T A A G A G C C C G C C G T T G C | ESPERADO |
| 679 | C T T G G G A C A A A T A T T G C C C T G T G T A A G A G C C C G C C G T T G C | RESULTADO |
| 720 | T G C G A C G | ESPERADO |
| 719 | T G C G A C G | RESULTADO |

Figura 21. Comparación entre la secuencia esperada y la secuencia obtenida

6.8) CORRECCIÓN DE LA DELECCIÓN DE DOS BASES EN EL PUNTO DE FUSIÓN DE LOS FRAGMENTOS CORRESPONDIENTES AL PROMOTOR P_{ermE} Y AL GEN vhb MEDIANTE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.

Una vez que se llevó a cabo la secuenciación de la fusión del promotor P_{ermE} con el gen vhb , se encontró una delección de dos bases en el punto de la fusión que podría afectar a la expresión del gen, por lo que fue necesario insertar las bases faltantes. Esto se realizó mediante Mutagénesis Dirigida.

Se inició probando este protocolo sobre el plásmido pUAMPG2, pero la hibridación inespecífica de los cebadores provocó un barrido de bandas polimerizadas, como se observa en la Fig. 22, que imposibilitó la obtención de resultados.

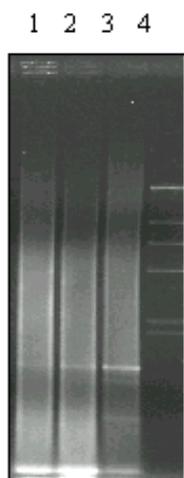


Figura 22. PCR para la Mutagénesis Dirigida con el plásmido pUAMPG2; usando 4 ng de plásmido (carril 1), con 2ng (carril 2), con 1.3 ng (carril 3) y marcador de tamaño $\lambda HindIII$ (carril 4).

Para reducir estos altos niveles de inespecificidad se utilizó el plásmido pBKSVH construido previamente para el análisis de la secuencia de nucleótidos. El uso de este plásmido para Mutagénesis Dirigida presentó hibridación específica al usar temperatura de hibridación de 62°C , concentración del plásmido de 1 ng y de 1.5 ng y suplementando el amortiguador de reacción con 1 mM de MgSO_4 (Fig. 23).

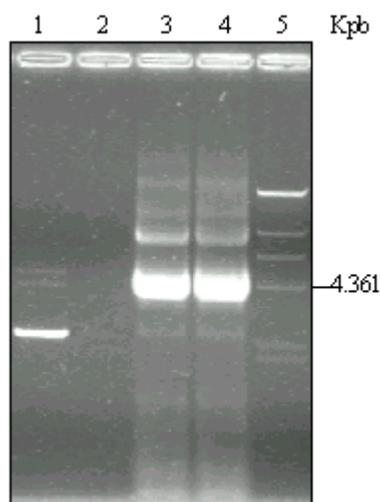


Figura 23. PCR para la Mutagénesis Dirigida con el plásmido pBKSVH. Carril 1 pBKSVH en sus diferentes conformaciones (circular abierta, circular cerrada y lineal); carril 2 control de concentración de plásmido para la concentración de 1.5 ng; carril 3 PCR con Mutagénesis Dirigida con 1.5 ng; carril 4 con 1 ng de plásmido, que muestran la polimerización del pBKSVH y carril 5 marcador de tamaño λ /HindIII.

Una vez obtenido el plásmido mutado a partir de los primeros experimentos de mutagénesis descritos en la metodología, se realizó la secuenciación del fragmento que contiene la mutación, para verificar el resultado de la Mutagénesis Dirigida. La secuenciación reveló que la deleción fue corregida satisfactoriamente por la inserción de las dos bases, pero se presentó un nuevo problema: el cebador usado para corregir la deleción se repitió en tandem, como se observa en la (Fig. 24).

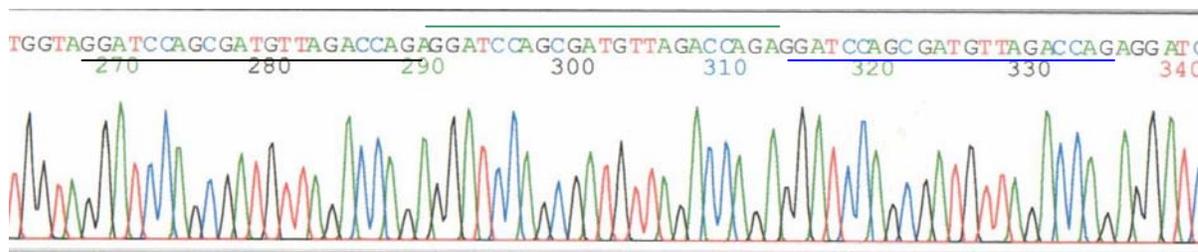


Figura 24. Secuenciación de la fusión P_{ermE} - *vhb* en donde se observa la repetición del cebador en tandem.

Por lo anterior se realizaron pruebas con diferentes concentraciones de cebadores y de $MgCl_2$. En las primeras pruebas con temperatura de hibridación a $62^\circ C$ y distintas concentraciones de Mg^{++} y cebadores, los dos mejores resultados se obtuvieron: 1) al usar $1 \mu L$ de cebadores y no suplementar con Mg^{++} , y 2) al usar $3 \mu L$ de cebadores y suplementar con $1 \mu L$ de Mg^{++} ; aunque aun se presentaba polimerización inespecífica.

Para mejorar la especificidad de la polimerización se incrementó gradualmente la temperatura de hibridación de los cebadores hasta $67^\circ C$. Se observó polimerización satisfactoria desde $65^\circ C$ con las muestras en las que se usaron $3 \mu L$ de cebadores y $1 \mu L$ de Mg^{++} (Fig. 25). Para asegurarnos la eliminación completa del ADN parental, la digestión con la enzima *DpnI* se realizó dos veces consecutivas. De esta manera se disminuye la posibilidad de tener transformantes con el plásmido parental (delecionado), imposible de distinguir del generado por mutagénesis dirigida más que por análisis de la secuencia de nucleótidos.

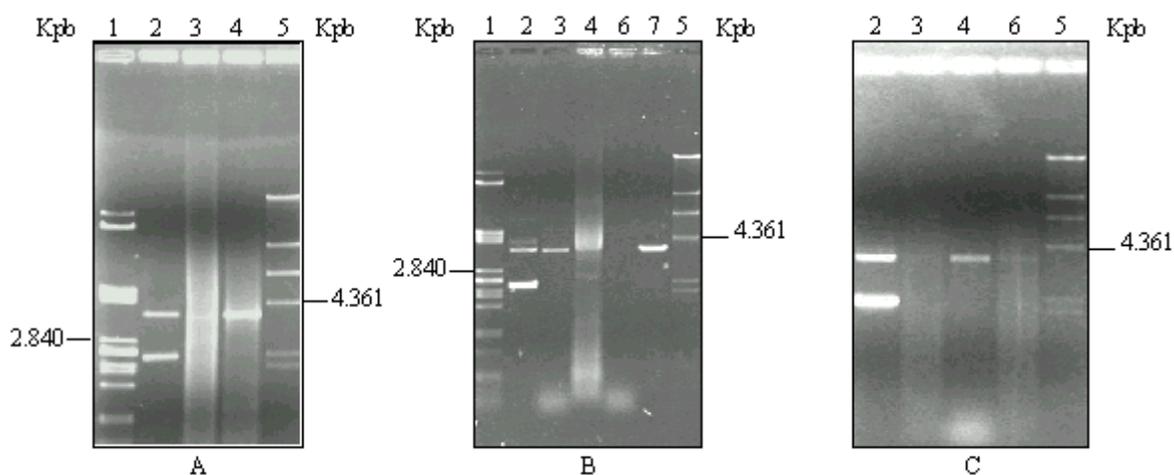


Figura 25. Plásmido pBKSVH amplificado por PCR para Mutagénesis Dirigida. (A) Hibridación a $65^\circ C$, (B) Hibridación a $66^\circ C$, (C) Hibridación a $67^\circ C$. (1) $\lambda/pstI$, (2) pBKSVH, (3), (4), (6) y (7) productos de PCR, (5) $\lambda/HindIII$.

Se realizó la secuenciación de 4 fragmentos mutados: uno con temperatura de hibridación de $65^\circ C$, otro con $66^\circ C$ y dos más con $67^\circ C$. Los resultados obtenidos son satisfactorios, ya que en esta ocasión se insertaron las bases delecionadas y no se presentó la repetición en tandem del cebador como se muestra en la (Fig. 26).

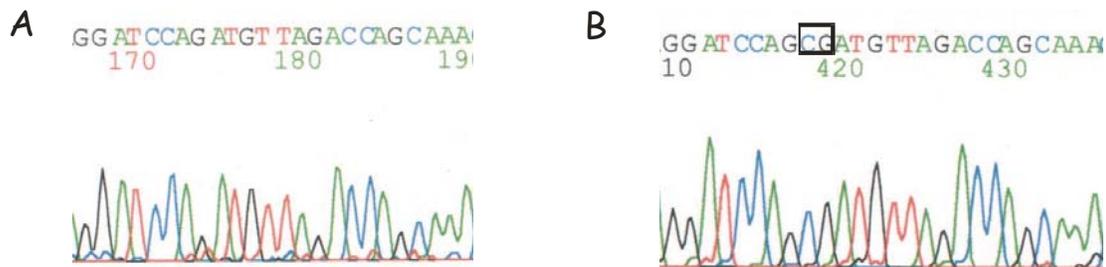


Figura 26. Secuenciación del fragmento mutado con temperatura de hibridación de 65 °C. Antes de la Mutagénesis Dirigida (A) y después de mutar (B). Nótese las bases adicionales, no presentes en el plásmido original, señaladas con un recuadro.

6.9) INSERCIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA A ERITROMICINA COMO MARCADOR DE SELECCIÓN ALTERNATIVO.

Una vez construido el pUAMPG1 corregido se encontró un problema adicional al comprobarse que las cepas M18 y MSB de *A. mediterranei* presenta resistencia a kanamicina, incluso hasta una concentración de 1,000 µg/mL. Esto concuerda con lo reportado por Lal *et al.* (1997) en relación a la aparición de mutantes espontáneas resistentes a km con una frecuencia de hasta el 80%. El marcador de selección presente en el plásmido resultaba inadecuado, por lo tanto, para la selección de transformantes de *A. mediterranei*. Como alternativa, se procedió a la clonación en el vector de un segundo marcador de selección: el gen de resistencia a eritromicina, obtenido a partir del plásmido pIJ4026. Este gen se obtuvo mediante digestión con *KpnI* (que flanquea el inicio y el término del gen), y separación de la misma en gel de agarosa, extrayéndose el fragmento liberado de 1,641 pb con QuiaexII. Por otro lado, se digirió el plásmido pUAMPG1 con *KpnI* (corte único) y se realizó la ligación de ambos fragmentos. Se transformó *E. coli* con la mezcla y se analizaron los transformantes linearizando los plásmidos resultantes con *EcoRI*. Como resultado se obtuvo solo una transformante con el plásmido del tamaño correspondiente a la unión del pUAMPG1 (6.5 kpb) con el gen de la eritromicina (1.641 kpb), esto es un tamaño final de 8.137 kpb (Fig. 27). A esta nueva construcción se le llamó pUAMPG2 (Fig. 28).

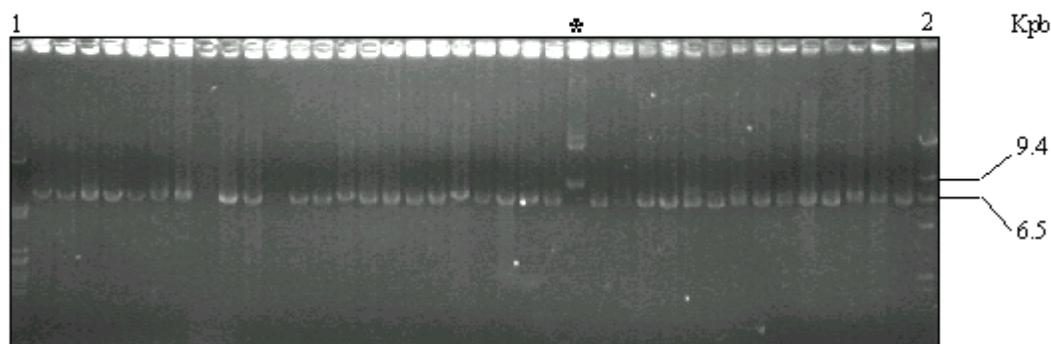


Figura 27. Minipreps de la clonación del gen de resistencia a eritromicina en pUAMPG1. En el carril marcado con asterisco se observa el plásmido con un tamaño de 8.137 kpb correspondiente a la inserción del gen de resistencia a eritromicina en el plásmido pUAMPG1. A este nuevo plásmido construido se le llamó pUAMPG2.

6.10) REINSERCIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA A ERITROMICINA PARA CONSERVAR LA REGION MINIMA REQUERIDA PARA LA REPLICACION.

Referencias recientes (Ding *et al.*, 2003) mencionan una región mínima requerida para la replicación de *Amycolatopsis mediterranei* que se interrumpe con la inserción del gen de resistencia a eritromicina en el sitio *KpnI*. Esta puede ser una causa muy importante por la cual el plásmido construido no se replicara en *Amycolatopsis mediterranei* y en consecuencia no se lograran obtener transformantes, por lo que se construyó un nuevo plásmido que conserva esta región, el pUAMSAG1, insertando el gen de resistencia a eritromicina en el sitio de corte *XbaI-EcoRI* (Fig. 28).

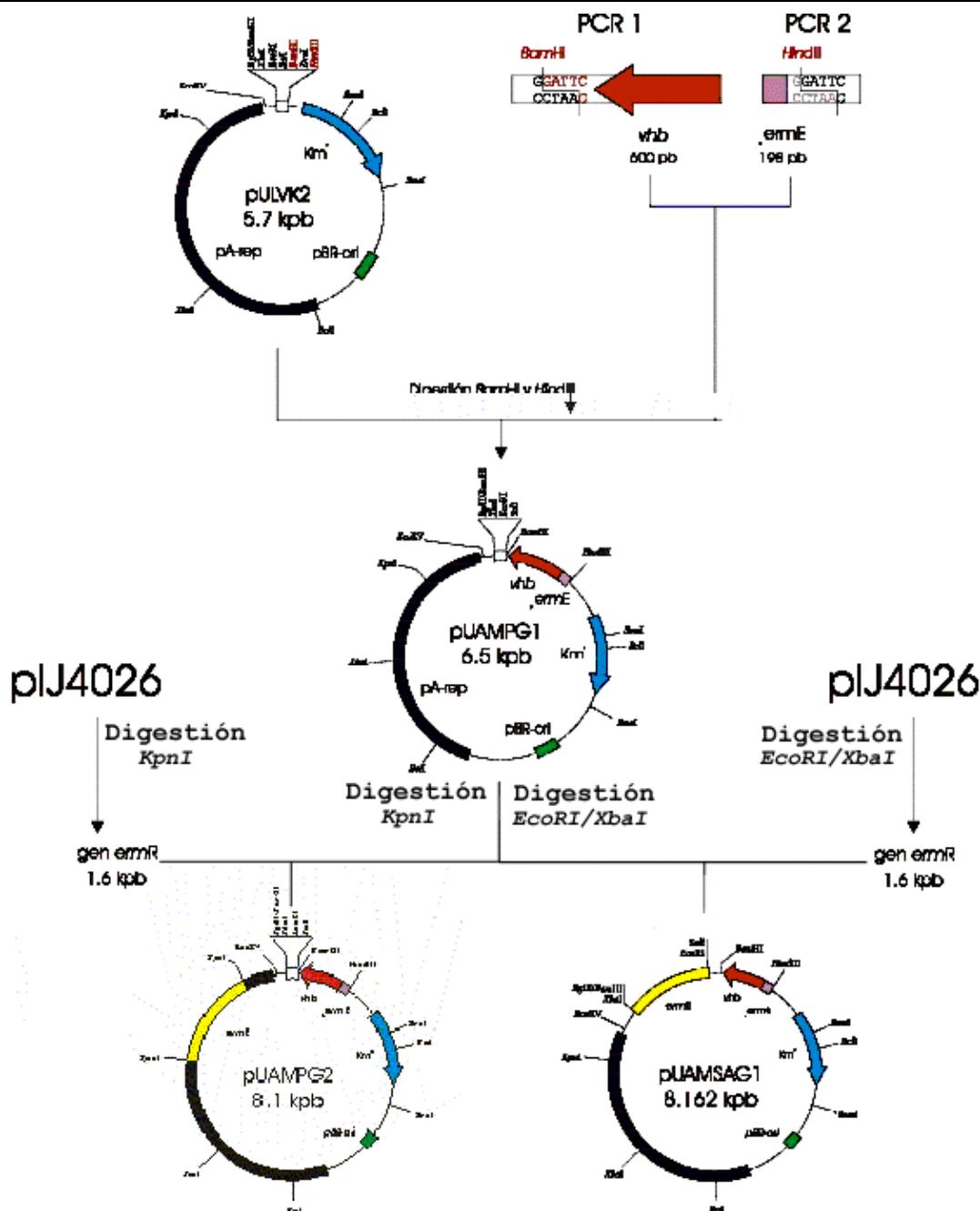


Figura 28. Mapa de la construcción del plásmido pUAMPG2 y pUAMSAG1. En el plásmido pULVK2 digerido con *Bam*HI y *Hind*III, se inserta el fragmento de 809 pb que contiene el promotor P_{ermE} y el gen *vhb* previamente obtenidos por PCR, generando así el pUAMPG1. En este último, se inserta en el sitio de corte único *Kpn*I, el promotor y gen de resistencia a eritromicina obtenido por digestión del plásmido pIJ4026 con *Kpn*I, generando así el plásmido pUAMPG2. Al insertar en el sitio de corte *Eco*RI-*Xba*I, el promotor y gen de resistencia a eritromicina obtenido por digestión del plásmido pIJ4026 con las mismas enzimas, se genera el plásmido pUAMSAG1.

6.11) ANALISIS DE RESTRICCION DEL pUAMSAG1

El pUAMSAG1, que tiene un tamaño de 8,162 pb, al ser digerido con *Hind*III (carril 6) genera 2 fragmentos, uno de aproximadamente 6,400 pb y otro de menos de 2,000 pb (aproximadamente de 1700 pb). Al ser digerido con *Hind*III y *Xba*I (carril 5) genera 4 fragmentos: uno de aproximadamente 4,000 pb, otro de aproximadamente 2,900 pb, un tercero de aproximadamente 650 pb y un último fragmento de aproximadamente 550 pb. Cuando se lineariza con *Eco*RV se comprueba el tamaño del plásmido, pues queda entre la segunda línea de λ /*Hind*III, correspondiente a 9,416 pb y la tercera que corresponde a 6,557 pb (carriles 3 y 4) (Fig. 29).

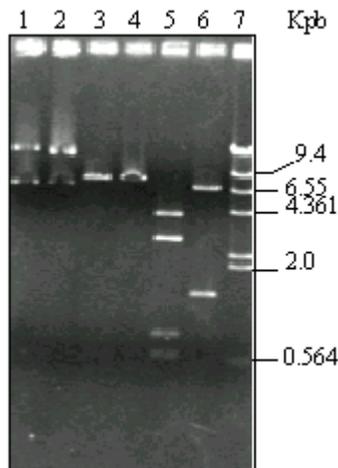


Figura 29. Análisis de restricción del pUAMSAG1. En los carriles 1 y 2 se observa el pUAMSAG1 sin digerir; los carriles 3 y 4 corresponden a pUAMSAG1 linearizado con *Eco*RV; en el carril 5 se observa el pUAMSAG1 digerido con *Hind*III y *Xba*I; el carril 6 corresponde a pUAMSAG1 digerido solo con *Hind*III; y finalmente en el carril 7 el marcador de tamaño λ /*Hind*III.

6.12) TRANSFORMACION DE *A. mediterranei*

Se probaron varios métodos descritos en la literatura para la transformación de *A. mediterranei*:

- 1) Transformación de protoplastos de *A. mediterranei*. En este caso no se obtuvieron transformantes debido a la escasa obtención de protoplastos y a la aparición de resistencia a km de la cepa de *A. mediterranei* empleada.
- 2) Transformación con PEG y cationes alcalinos. En este caso tampoco se obtuvieron transformantes con el plásmido pUAMPG2, debido muy probablemente a la inserción del gen de resistencia a eritromicina en una región importante del origen de replicación de *A. mediterranei*.
- 3) Transformación por electroporación. En este caso se probaron una gran variedad de condiciones: fuerza del campo eléctrico desde 1 KV/cm hasta 20 KV/cm, diferentes concentraciones de plásmido, diferentes edades de cultivo, realización de un pretratamiento del micelio con lisozima (100 µg/mL), adición de glicina (inhibidor de la biosíntesis de la pared celular) y/o MgCl₂ al medio de cultivo para obtener un cultivo disgregado, utilización de un resorte durante la incubación con agitación para obtener un micelio fragmentado, sin obtener en ningún caso transformantes. La utilización del plásmido pUAMSAG1, con el origen de replicación para *A. mediterranei* intacto, tampoco permitió obtener transformantes mediante electroporación.
- 4) Transformación por biobalística con el plásmido pUAMSAG1. Se utilizaron como microproyectiles partículas de tungsteno M5, que tienen un tamaño promedio de aproximadamente 0.4 µm, obteniéndose en esta ocasión transformantes de color rojizo, una característica de las hemoglobinas.

6.13) DETERMINACIÓN DE LA DOSIS DE ERITROMICINA PARA SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES.

Finalmente se probaron dosis de antibiótico en el rango de 1 a 10 $\mu\text{g/mL}$, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 2):

| Conc. de eritromicina ($\mu\text{g/mL}$) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| crecimiento | +++ | +++ | ++- | ++- | ++- | ++- | ++- | --- | --- | --- |

Tabla 2. Resultados del crecimiento de *A. mediterranei* con dosis de eritromicina de 1 a 10 $\mu\text{g/mL}$.

Con una concentración de 8 $\mu\text{g/mL}$ ya no se observa crecimiento por lo que se determinó que para dar un margen de error suficiente se utilizaría una concentración de eritromicina de 10 $\mu\text{g/mL}$ para la selección de transformantes.

6.14) TRANSFORMACIÓN POR BIOBALÍSTICA.

En un primer experimento, se utilizaron como microproyectiles, partículas de Tungsteno M17 con un tamaño promedio de 1.1 μm , el cual resultó ser demasiado grande para el bombardeo del micelio de *A. mediterranei* que tiene un diámetro aproximado de 1 μm o menos. Aún así después de 11 días se obtuvieron colonias de posibles transformantes que crecieron a través de una cobertera de agar de 20 mL sin antibiótico, lo cual indicaba la posible expresión del gen *vhb* (mayor captación de oxígeno). Se aislaron 10 de éstas colonias de las cuales sólo 2 mostraron resistencia a eritromicina. Sin embargo, el crecimiento de estas colonias fue muy lento (de hasta 10 días), además de que mostraron un color diferente al de la cepa original (crema en lugar de naranja). Lo anterior hace suponer que de alguna manera se afectó al microorganismo causando un daño debido tal vez al tamaño excesivo de los microproyectiles empleados.

Posteriormente se realizó nuevamente el experimento, utilizando en esta ocasión como microproyectiles partículas de Tungsteno M5 con un tamaño promedio de 0.4 μm . Después de 15 días se obtuvieron colonias de posibles transformantes que crecieron a través de la cobertera de agar, tanto de la suave con antibiótico, como de la cobertera de agar normal sin antibiótico. Las colonias obtenidas presentaron en ésta ocasión un color naranja más intenso que la cepa original. Se aislaron 10 colonias y todas mostraron resistencia a eritromicina. De manera aleatoria se decidió analizar en primera instancia solo 2 de las 10 colonias, con el fin de optimizar recursos. Se analizaron las colonias 4 y 10.

6.15) EXTRACCIÓN DE ADN DE POSIBLES TRANSFORMANTES.

Siguiendo la técnica de extracción de Moretti *et al.* (1985), en cuyo artículo se describe el método utilizado para aislar el plásmido endógeno (pMEA100) de la cepa LBG A3136 de *Nocardia mediterranei*, se obtiene un ADN sumamente degradado (Fig. 27 inciso A), por lo que se hicieron algunas modificaciones tomando como referencia el Manual de Laboratorio de Sambrook y Russell, 2001. Los resultados obtenidos con estas modificaciones se muestran en la Fig. 30, inciso B.

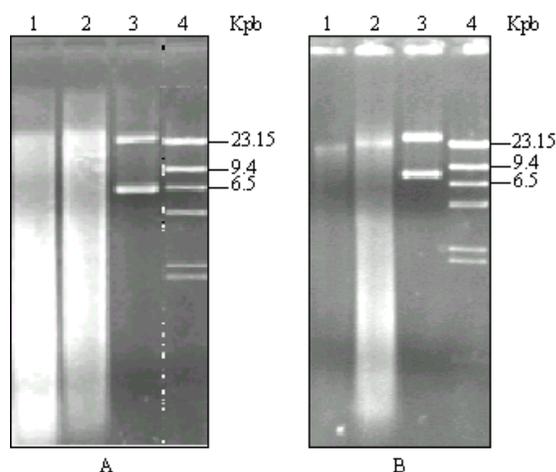


Figura 30. Extracción de ADN de posibles transformantes de *A. mediterranei*. En los carriles 1 y 2 del gel (A) se muestra el ADN degradado que se extrae de acuerdo con la técnica utilizada por Moretti *et al.* (1985) de las posibles transformantes BII4 y BII10 respectivamente; la técnica de extracción modificada, carril 1 y 2 del gel (B) muestra mejores resultados. En el carril 3 de ambos geles se observa el pUAMSAG1 sin digerir y en el carril 4 de ambos geles se observa el marcador de tamaño λ /HindIII.

Una vez realizada la extracción del ADN de las posibles transformantes BII4 y BII10 se procedió a realizar una PCR utilizando el ADN extraído como ADN molde, con la finalidad de comprobar la presencia del plásmido en estas dos posibles transformantes.

6.16) COMPROBACION DE TRANSFORMANTES POR PCR.

Utilizando los mismos oligonucleótidos previamente empleados en la clonación tanto del gen *vhb* como del promotor P_{ermE} y una mezcla de reacción como la siguiente:

| | |
|-------------------------|---------|
| 25 mM MgCl ₂ | 3 µL |
| 10x tampón | 5 µL |
| 10 mM nucleótidos | 1 µL |
| 20 mM primer 1 | 3 µL |
| 20 mM primer 2 | 3 µL |
| 5 U/µL Taq. Pol. | 0.3 µL |
| ADN molde | 5 µL |
| H ₂ O | 29.7 µL |
| Volumen total= | 50 µL |

Con los cebadores GV3 y GV5 se amplifica el fragmento correspondiente al gen *vhb* de 612 pb, tanto del ADN extraído de las colonias 4 y 10 como del plásmido pUAMSAG1, utilizado en este caso como control positivo. El fragmento total clonado (promotor + gen) de 809 pb se amplifica con los cebadores PV5 y GV3, y con los cebadores PV5 y PV3 se amplifica el fragmento correspondiente al promotor P_{ermE} de 197 pb (Fig. 31 y 32).

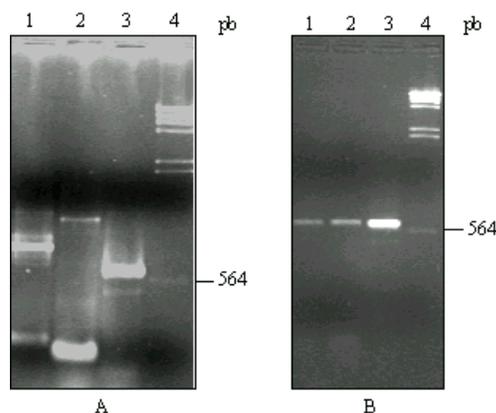


Figura 31. Comprobación de transformantes por PCR. (A) PCR con ADN molde extraído de la transformante BII10 (para la transformante BII4 se obtiene una imagen similar) en donde se observa: carril 1, fragmento de 809 pb correspondiente al inserto del prom P_{ermE} + gen *vhb*; carril 2, fragmento de 198 pb correspondiente solo al promotor P_{ermE} ; carril 3, fragmento de 612 pb correspondiente al gen *vhb*; carril 4, marcador de peso $\lambda/HindIII$. (B) fragmento amplificado de 612 pb correspondiente al gen *vhb* con ADN molde de transformante BII4 en carril 1, transformante BII10 en carril 2, y pUAMSAG1 en carril 3 (control positivo); carril 4, marcador de tamaño $\lambda/HindIII$.

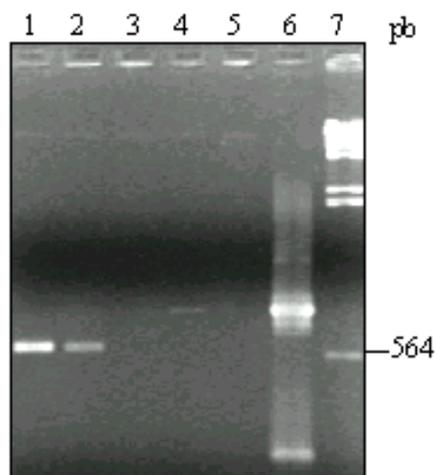


Figura 32. Comprobación de transformantes por PCR. El carril 6 muestra fragmento de 809 pb y de 197 pb amplificado con ADN molde de pUAMSAG1 (control positivo). En los carriles 4 y 5 se observa el mismo fragmento de 809 pb amplificado con ADN molde de transformante BII10 y BII4 respectivamente. En los carriles 1 y 2 se observa el fragmento de 612 pb correspondiente al gen *vhb*, amplificado con ADN molde de transformantes BII10 y BII4 respectivamente. El carril 7 corresponde al marcador de tamaño $\lambda/HindIII$.

Los resultados de PCR obtenidos confirman la presencia del gen *vhb*, del promotor P_{ermE} y del fragmento promotor + gen (y por extensión del plásmido pUAMSAG1) en el ADN extraído de las colonias transformantes BII4 y BII10.

6.17) FERMENTACION (PRODUCCION DE RIFAMICINA)

Una vez comprobada la presencia del plásmido pUAMSAG1 en las transformantes se procedió a realizar la fermentación, en condiciones de baja aireación, para probar la expresión del gen *vhb* (mayor captación de oxígeno). Primero se realizó la fermentación en las siguientes condiciones: matraz de 250 mL con 100 mL de medio, con un 20% de inóculo, cultivado a 26°C y 100 rpm. Bajo éstas condiciones de baja aireación exagerada, las mediciones espectrofotométricas arrojaron valores negativos, además de que el caldo de fermentación presentó un color vino rojizo (en lugar de amarillo-naranja), lo que indica que en este caso no se produjo rifamicina (Fig. 33).



Figura 33. Comparación del color del caldo de fermentación. A la izquierda se observa el caldo de fermentación que presenta un color vino rojizo, lo cual indica la no producción de rifamicina B debido a las condiciones de baja aireación; mientras que en el matraz de la derecha se observa el color amarillo- naranja típico que corresponde a la producción de rifamicina B.



Figura 34. Comparación del color de la fermentación. A la izquierda se observa la fermentación de la cepa control MSB. El matraz de la derecha corresponde a la fermentación de la cepa transformada BII4.

A continuación se realizó nuevamente la fermentación en las siguientes condiciones: matraz de 250 mL con 70 mL de medio de producción, con un 30% de inóculo, cultivado a 26°C y a 200 rpm (Krishna *et al.*, 1998). Con estas condiciones se inocularon 4 matraces con Barbital y 4 matraces sin Barbital por cada cepa a probar, durante un periodo de 8 días (tiempo reportado como de máxima producción de rifamicina). Bajo éstas condiciones de producción el caldo de fermentación presentó el esperado color amarillo-naranja típico de la rifamicina B. Además, la fermentación correspondiente a las cepas transformantes se observa en un tono naranja más oscuro que el correspondiente a la cepa control MSB (Fig. 34).

6.18) CUANTIFICACIÓN DE RIFAMICINA.

Las absorbancias obtenidas de la curva patrón fueron las siguientes (Tabla 3):

| Concentración (µg/mL) | Absorbancia (nm) |
|--------------------------|---------------------|
| 15 | 0.164 |
| 20 | 0.198 |
| 25 | 0.222 |
| 30 | 0.274 |
| 35 | 0.336 |
| 40 | 0.404 |
| 45 | 0.450 |
| 50 | 0.486 |
| 55 | 0.526 |
| 60 | 0.562 |

Tabla 3. Absorbancias obtenidas a 425 nm de soluciones de rifamicina B de concentración conocida para la elaboración de la curva patrón.

Los valores obtenidos anteriormente se graficaron para obtener la curva patrón (Fig. 35), y la ecuación de la recta.

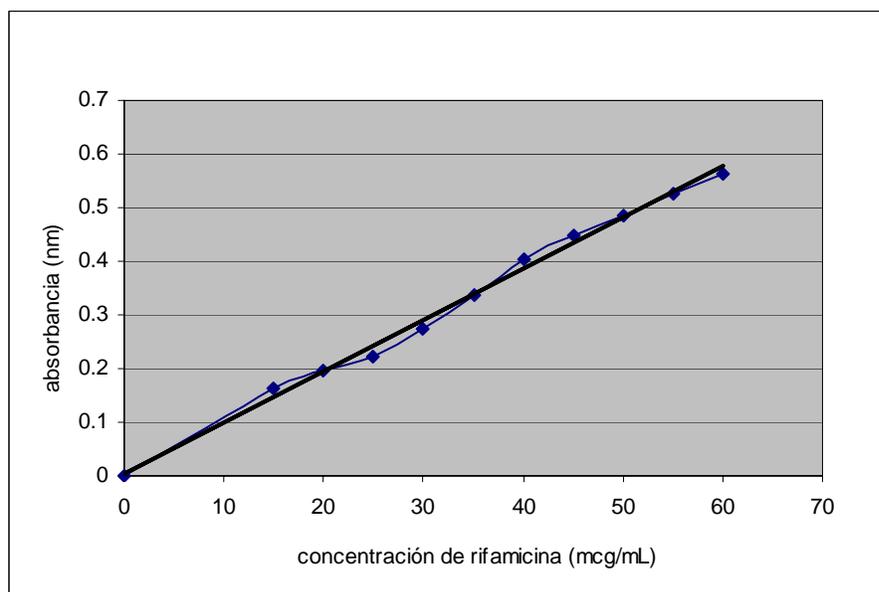


Figura 35. Gráfica de la curva patrón.

La ecuación de la curva obtenida es: $y = 0.0095x + 0.0044$

Con una R^2 de 0.9939

Despejando x

$$x = \text{Concentración de Rifamicina B} (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Absorbancia} - 0.0044}{0.0095}$$

Durante la fermentación se tomaron 2 muestras para la cuantificación de rifamicina B; una a los 5 días (tiempo 1) y otra al final, esto es a los 8 días de fermentación (tiempo 2). La concentración de rifamicina B correspondiente a cada absorbancia se obtiene utilizando la ecuación anterior.

A continuación se muestran los valores promedio de absorbancia y la concentración de rifamicina B obtenidos (Tabla 4, Figuras 36, 37 y 38):

| Muestra | Absorbancia T1 (5 días) | Conc.Rif (µg/ml) | Absorbancia T2 (8 días) | Conc.Rif (µg/ml) |
|----------------|-------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| MSB con/barb | 0.594 | 62.0631 | 0.796 | 83.3262 |
| MSB sin/barb | 0.5385 | 56.221 | 0.6375 | 66.6421 |
| BII4 con/barb | 0.2735 | 28.3263 | 0.791 | 82.7999 |
| BII4 sin/barb | 0.118 | 11.9578 | 0.6195 | 64.7473 |
| BII10 con/barb | 0.542 | 56.5894 | 0.906 | 94.9052 |
| BII10 sin/barb | 0.512 | 53.4315 | 0.824 | 86.2736 |

Tabla 4. Valores promedio de las absorbancias obtenidas a 425 nm y concentración de rifamicina B (µg/mL), calculada a partir de la ecuación de la curva) del caldo de fermentación al T1 y T2.

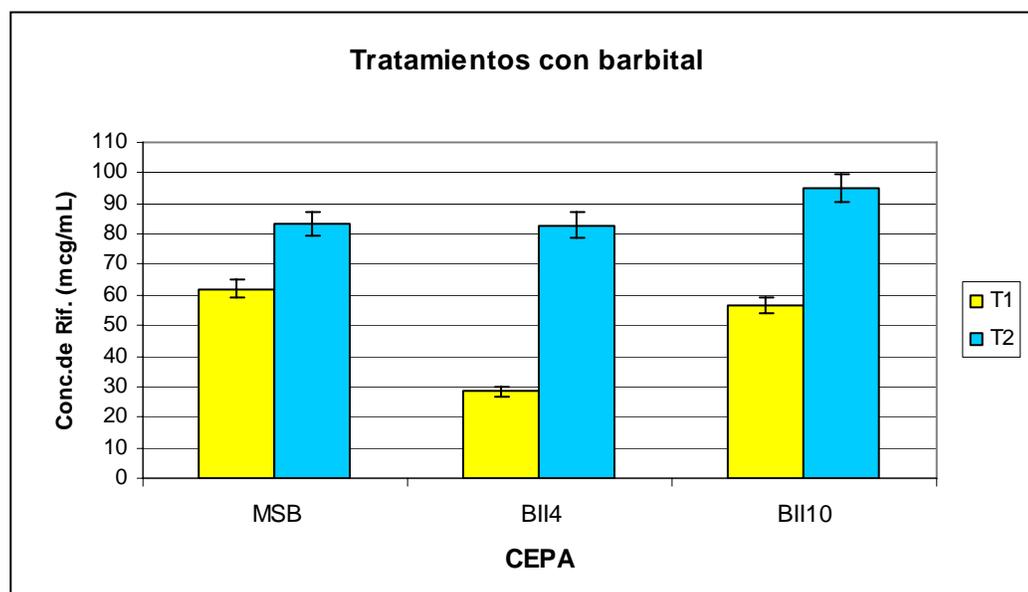


Figura 36. Concentración de rifamicina B en los tratamientos con barbital, cuantificada al tiempo 1 (5 días) y tiempo 2 (8 días) de fermentación.

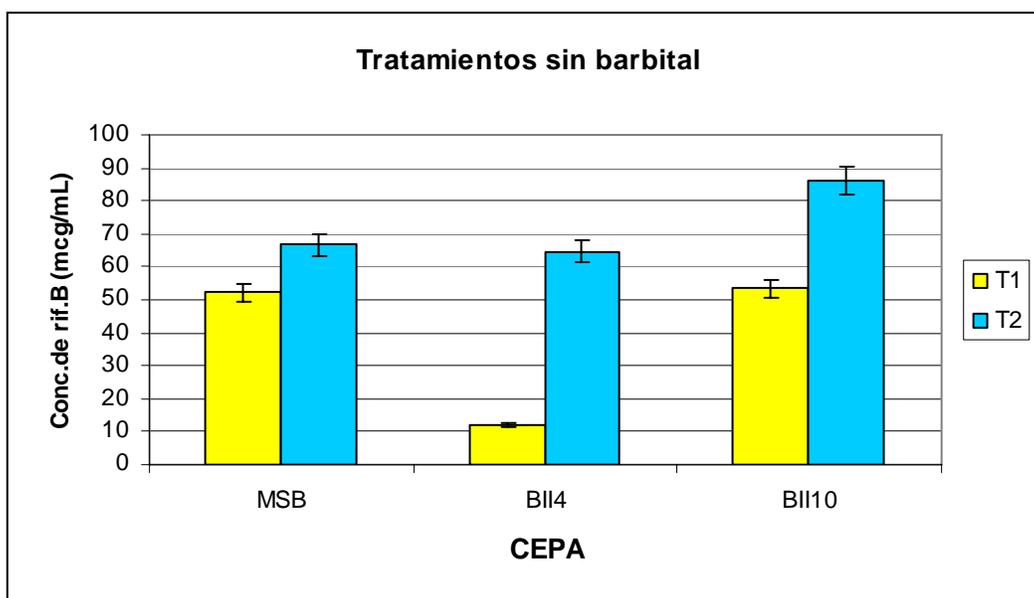


Figura 37. Concentración de rifamicina B en los tratamientos sin barbital, cuantificada al tiempo 1 (5 días) y tiempo 2 (8 días) de fermentación.

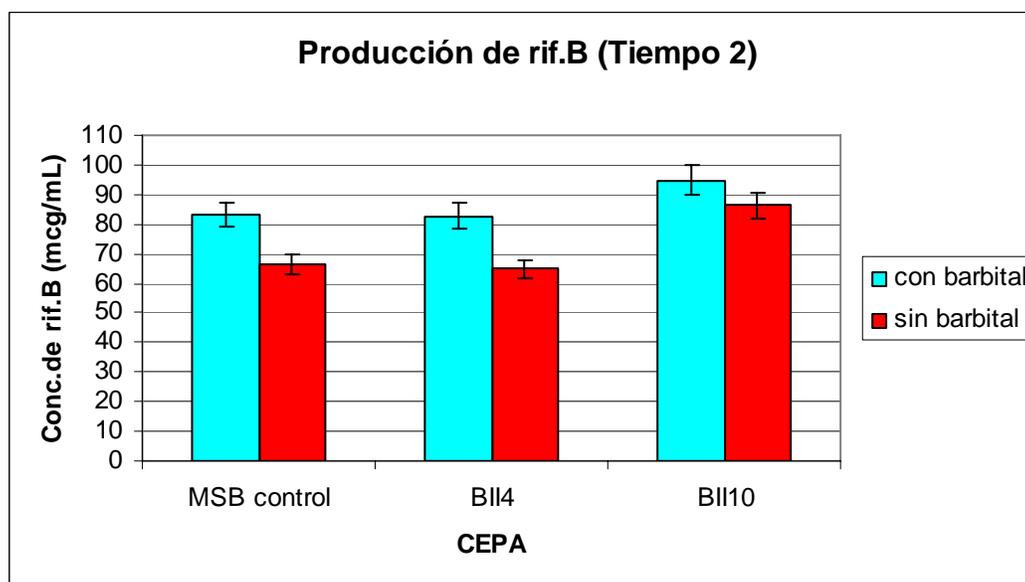


Figura 38. Concentración de rifamicina B en los tratamientos con y sin barbital, cuantificada al tiempo 2 (8 días) de fermentación.

6.19) DETERMINACIÓN DE BIOMASA (peso seco).

La cuantificación de biomasa se realizó en el T2, secando en estufa durante 48 hrs. Los resultados obtenidos se muestran a continuación (Tabla 5):

| Muestra | g/60 mL | %(g/100 mL) |
|----------------|---------|-------------|
| MSB con/barb | 0.3679 | 0.6133 |
| MSB sin/barb | 0.3578 | 0.5964 |
| BII4 con/barb | 0.3423 | 0.5705 |
| BII4 sin/barb | 0.3592 | 0.5987 |
| BII10 con/barb | 0.3668 | 0.6113 |
| BII10 sin/barb | 0.3471 | 0.5784 |

Tabla 5. Valores promedio de biomasa (peso seco) determinada al T2.

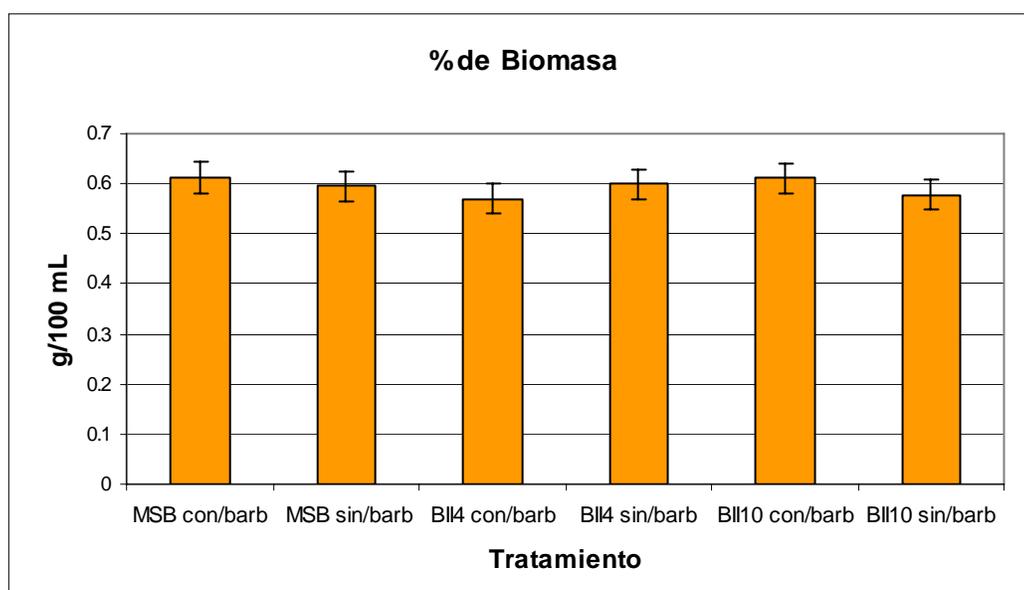


Figura 39. Valores promedio de biomasa (peso seco) en los diferentes tratamientos.

6.20) ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos tanto en la cuantificación de rifamicina B, como en la determinación de biomasa por peso seco, se analizaron utilizando el programa SPSS versión 12. Se les aplicó una prueba T de comparación de medias por pares, con un 95% de confianza. A continuación se muestran los resultados obtenidos de la comparación de la producción de rifamicina B (Tabla 6) y la comparación de la biomasa obtenida (Tabla 7):

| | | Paired Differences | | | | t | df | Sig. (2-tailed) | |
|--------|-----------------------|--------------------|----------------|-----------------|---|-----------|----------|-----------------|-------|
| | | Mean | Std. Deviation | Std. Error Mean | 95% Confidence Interval of the Difference | | | | |
| | | | | | Lower | | | | Upper |
| Pair 1 | msbcbar - msbsbar | 16.684500 | .546751 | .273375 | 15.814498 | 17.554502 | 61.031 | 3 | .000 |
| Pair 2 | msbcbar - trans4cbar | .526500 | .972835 | .486418 | -1.021498 | 2.074498 | 1.082 | 3 | .358 |
| Pair 3 | msbcbar - trans10cbar | -11.5785 | .729193 | .364597 | -12.7388 | -10.4182 | -31.757 | 3 | .000 |
| Pair 4 | msbcbar - trans4sbar | 18.579000 | 1.033457 | .516728 | 16.934539 | 20.223461 | 35.955 | 3 | .000 |
| Pair 5 | msbcbar - trans10sbar | -2.947000 | 3.160415 | 1.580208 | -7.975926 | 2.081926 | -1.865 | 3 | .159 |
| Pair 6 | msbsbar - trans4cbar | -16.1580 | .426084 | .213042 | -16.8360 | -15.4800 | -75.844 | 3 | .000 |
| Pair 7 | msbsbar - trans10sbar | -19.6315 | 2.613665 | 1.306832 | -23.7904 | -15.4726 | -15.022 | 3 | .001 |
| Pair 8 | msbsbar - trans4cbar | -16.1580 | .426084 | .213042 | -16.8360 | -15.4800 | -75.844 | 3 | .000 |
| Pair 9 | msbsbar - trans10cbar | -28.2630 | .182443 | .091221 | -28.5533 | -27.9727 | -309.829 | 3 | .000 |

Tabla 6. Análisis estadístico de la comparación de la producción de rifamicina B al T2. Valores en la última columna menores de 0.05 indican diferencia significativa en la pareja evaluada (parejas 1,3,4,6,7,8 y 9 presentan diferencia significativa).

Como se puede observar, existe diferencia estadísticamente significativa en casi todas las parejas, excepto en la pareja 2 que corresponde a la cepa control MSB con barbital vs la transformante BII4 con barbital; y en la pareja 5 que corresponde a la cepa control MSB con barbital vs la transformante BII10 sin barbital. En este último caso, la comparación de un tratamiento con barbital con otro sin barbital no tiene sentido, pues es claro que la adición de barbital al medio de cultivo incrementa la producción de rifamicina B. Por lo tanto, solo las parejas 2 (MSB con barbital vs transformante BII4 con barbital), 3 (MSB con barbital vs transformante BII10 con barbital) y 7 (MSB sin barbital vs transformante BII10 sin barbital)

resultan de interés en nuestro análisis. En ellas se observa diferencia estadísticamente significativa cuando se compara el control MSB con la transformante BII10, tanto en el tratamiento con barbital como en el tratamiento sin barbital.

Este incremento estadísticamente significativo de la producción de rifamicina B por la transformante BII10 comparada con la cepa control, no se debe a una mayor producción de biomasa, pues solo hay diferencia estadísticamente significativa en relación a la biomasa producida, en la pareja 2 de la Tabla 7, que corresponde a cepa control MSB con barbital vs la transformante BII4 con barbital. En este caso la diferencia en la biomasa puede ser la causa de que la producción de rifamicina B no sea estadísticamente significativa (ver pareja 2 en Tabla 6 y Tabla 7). Sin embargo no se puede descartar que en este caso se trate de un error experimental.

| | | Paired Differences | | | | | t | df | Sig. (2-tailed) |
|--------|---------------------------|--------------------|----------------|-----------------|---|----------|--------|----|-----------------|
| | | Mean | Std. Deviation | Std. Error Mean | 95% Confidence Interval of the Difference | | | | |
| | | | | | Lower | Upper | | | |
| Pair 1 | msbiomacbar - msbiomasbar | .0168000 | .0140873 | .0070437 | -.0056161 | .0392161 | 2.385 | 3 | .097 |
| Pair 2 | msbiomacbar - trans4cbar | .0428000 | .0170896 | .0085448 | .0156067 | .0699933 | 5.009 | 3 | .015 |
| Pair 3 | msbiomacbar - trans10cbar | .0019000 | .0031177 | .0015588 | -.0030609 | .0068609 | 1.219 | 3 | .310 |
| Pair 4 | msbiomasbar - trans4sbar | -.0022000 | .0491902 | .0245951 | -.0804727 | .0760727 | -.089 | 3 | .934 |
| Pair 5 | msbiomasbar - trans10sbar | .0180500 | .0431281 | .0215640 | -.0505764 | .0866764 | .837 | 3 | .464 |
| Pair 6 | msbiomacbar - trans4sbar | .0146000 | .0351029 | .0175514 | -.0412565 | .0704565 | .832 | 3 | .467 |
| Pair 7 | msbiomacbar - trans10sbar | .0348500 | .0290407 | .0145204 | -.0113603 | .0810603 | 2.400 | 3 | .096 |
| Pair 8 | msbiomasbar - trans4cbar | .0260000 | .0311769 | .0155885 | -.0236094 | .0756094 | 1.668 | 3 | .194 |
| Pair 9 | msbiomasbar - trans10cbar | -.0149000 | .0172050 | .0086025 | -.0422771 | .0124771 | -1.732 | 3 | .182 |

Tabla 7. Análisis estadístico de la comparación de la biomasa obtenida al T2. Valores en la última columna menores de 0.05 indican diferencia significativa (solamente la pareja 2 presenta diferencia significativa).

VII. DISCUSION.

Tanto el promotor P_{ermE} como el gen *vhb* se amplificaron por PCR utilizando ADN total de *S. erythraea* y de *V. stercoraria*, respectivamente. Los dos pares de cebadores para esta reacción de PCR se diseñaron de tal manera que contienen en sus extremos 5' las secuencias correspondientes a las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*, secuencias que se utilizaron para lograr la posterior integración de ambos fragmentos en el vector de clonación (plásmido pULVK2, previamente cortado también en *HindIII* y *BamHI*). Finalmente, los extremos 3' romos permitieron la unión de ambos fragmentos entre sí. La inserción de este fragmento de 809 pb en el plásmido pULVK2 de 5,700 pb generó el plásmido pUAMPG1 de 6,509 pb. Posteriormente se extrajo el fragmento con la fusión $P_{ermE} - vhb$, mediante digestión doble con *HindIII* y *BamHI* para clonarlo en pBKS+ y llevar a cabo su secuenciación. El análisis de la secuencia mostró una delección de dos bases en el punto de fusión de los fragmentos correspondientes al promotor P_{ermE} y al gen *vhb* que podría afectar la expresión del gen, por lo que fue necesario insertar las bases faltantes. Esto se realizó mediante un protocolo de Mutagénesis Dirigida. La secuencia mostró además otros dos cambios respecto de lo esperado (una adición y el cambio de una base); ambos se encuentran fuera de la región codificante del gen, por lo que carecen de efecto y no fue necesario corregirlos.

Por otro lado, y desafortunadamente, la cepa de *A. mediterranei* utilizada produce mutantes espontáneos resistentes a kanamicina, que es el marcador de selección presente en el plásmido pULVK2 y también en el plásmido pUAMPG1, por lo que fue necesario insertar un nuevo marcador de selección. Khanna *et al.* (1998), mencionan que cuando se probaron como marcadores de selección los genes de resistencia a tiostreptona (*tsr*) y kanamicina (*km*), se producen espontáneamente mutantes resistentes. Tuteja *et al.* (2000) mencionan además que los genes de resistencia a tiostreptona, higromicina, viomicina y gentamicina de los vectores de clonación de *Streptomyces* no se expresan efectivamente en diferentes especies de *Amycolatopsis*, lo cual los hace no aptos para su uso. En contraste, los genes *ermE* (eritromicina) y *am* (apramicina) muestran una adecuada expresión en diferentes cepas de *A. mediterranei* y no se observan mutantes espontáneas resistentes (Lal *et al.*, 1997; Tuteja *et al.*, 2000). Por este motivo se clonó el promotor y gen de resistencia a eritromicina, obtenido

mediante digestión con *KpnI* del plásmido pIJ4026, en el plásmido pUAMPG1, generando así el plásmido pUAMPG2. Sin embargo, referencias recientes (Ding *et al.*, 2003) mencionan una región mínima requerida para la replicación de *Amycolatopsis mediterranei* que se interrumpe con la inserción del gen de resistencia a eritromicina en el sitio *KpnI* del plásmido pUAMPG1. Esta puede ser una causa muy importante por la que el plásmido construido no se replique en *Amycolatopsis mediterranei* y en consecuencia no se logren obtener transformantes; por ello se construyó un nuevo plásmido que conserva esta región: el pUAMSAG1, insertando el gen de resistencia a eritromicina en una región que no presente este problema.

Se probaron diferentes metodologías para transformar *A. mediterranei* con los plásmidos pUAMPG1, pUAMPG2 y pUAMSAG1. Inicialmente se probó la transformación de protoplastos de *A. mediterranei* (Schupp y Divers, 1986; Matsushima *et al.*, 1987; Mejía, 1998) con el pUAMPG1. No se obtuvieron transformantes debido a la escasa obtención de protoplastos y a la aparición de resistencia a km de la cepa de *A. mediterranei* empleada. Una vez construido el pUAMPG2, se probaron las técnicas de transformación de protoplastos, la transformación con PEG y cationes alcalinos (Madon y Hütter, 1991) y la transformación por electroporación (Priefert *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2003), esta última con una gran variedad de condiciones: fuerza del campo eléctrico desde 1 V/cm hasta 20 KV/cm, diferentes concentraciones de plásmido, diferentes edades de cultivo, realizando un pretratamiento del micelio con lisozima (Pigac y Schrempf, 1995; Lal *et al.*, 1997) (100 µg/mL), adicionando glicina (inhibidor de la biosíntesis de la pared celular) y/o MgCl₂ al medio de cultivo para obtener un micelio disgregado, utilizando un resorte durante la incubación con agitación para obtener un micelio fragmentado, sin obtener en ningún caso transformantes. La utilización del plásmido pUAMSAG, con el origen de replicación para *A. mediterranei* intacto, tampoco permitió obtener transformantes mediante electroporación.

Posteriormente se probó el método de transformación por biobalística (Shark *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1992) en el que se utilizaron como microproyectiles partículas de tungsteno M17, con un tamaño promedio de 1.1 µm (demasiado grande, puesto que el diámetro de los filamentos del micelio de *A. mediterranei* es de 1 µm o menos). Así se obtuvieron transformantes, utilizando como selección tanto la resistencia a eritromicina, como la mayor capacidad de captación de oxígeno las transformantes, pues pudieron emerger de una

cobertera de agar cuando el control no fue capaz. Sin embargo, estas primeras transformantes presentan características que nos llevan a pensar que posiblemente sufrieron algún daño, pues mostraron un crecimiento extremadamente lento y un color crema claro muy diferente del color naranja característico de la cepa empleada.

Finalmente se repitió éste método de transformación por biobalística utilizando como microproyectiles partículas de tungsteno M5, que tienen un tamaño promedio de aproximadamente 0.4 μm (más apropiado para el diámetro de los filamentos de micelio de *A. mediterranei*), obteniéndose en esta ocasión transformantes de color rojizo.

En general, en años recientes, se ha realizado un gran esfuerzo por mejorar la tecnología de la transformación, lo cual ha generado una gran cantidad de información y muy diversas metodologías. Algunos métodos son muy sencillos pero no tienen una aplicación amplia. Otros métodos son mas ampliamente utilizados pero representan técnicas muy complejas y difíciles de seguir. Muchas bacterias Gram negativas como *E. coli*, son fácilmente transformadas cuando son sometidas a un pretratamiento con iones de metales divalentes antes de llevar a cabo la adición de ADN plasmídico. Contrariamente, muchas bacterias Gram positivas (como *A. mediterranei*) son notoriamente difíciles de transformar. Se sabe que la transformación natural de bacterias gram positivas sólo se presenta en *Bacillus subtilis* y algunas especies de *Streptococcus*. Con un esfuerzo considerable y las técnicas de transformación de protoplastos, conjugación y electroporación, entre otras, ha sido posible la manipulación genética de varios géneros de bacterias Gram positivas, incluyendo *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces* y bacterias corineformes (Trieu-Cuot *et al.*, 1987; Luchansky *et al.*, 1988; Mallonee y Speckman, 1989; Schafer *et al.*, 1990). Sin embargo, algunas especies recalcitrantes permanecen intransformables después de innumerables pruebas exhaustivas. Además, muchos protocolos deben ser cuidadosamente ajustados para cada cepa en particular con la finalidad de obtener resultados satisfactorios. Bajo ésta óptica es indiscutible la conveniencia de contar con un método de transformación de células rápido y efectivo. En este sentido, el uso de la tecnología de biobalística (inicialmente utilizada como un método para la transferencia genética a células eucarióticas), como un método expedito con el que se obtiene una alta eficiencia en la transformación, resulta sumamente valioso (Shark *et al.*, 1991). En este trabajo sólo se obtuvieron transformantes de

Amycolatopsis mediterranei cuando se utilizó la técnica de transformación por biobalística, lo cual, aunado a la relativa facilidad y rapidez con que se puede llevar a cabo ésta técnica, sugiere un uso potencialmente alto en la transformación de éste y otros organismos procarióticos difíciles de transformar.

Las transformantes de *Amycolatopsis mediterranei* obtenidas mediante la técnica de transformación por biobalística se seleccionaron tanto por su resistencia a eritromicina como por su mayor captación de oxígeno. Dos de las transformantes se evaluaron en condiciones de baja aireación. Inicialmente estas condiciones fueron: matraz de 250 mL con 100 mL de medio, con un 20% de inóculo, cultivado a 25°C y 100 rpm. Bajo éstas condiciones exageradas de baja aireación, las mediciones espectrofotométricas arrojaron valores negativos, además de que el caldo de fermentación presentó un color vino rojizo (en lugar de naranja), lo que indica que en este caso no se produjo rifamicina B.

A continuación se realizó nuevamente la fermentación en las siguientes condiciones: matraz de 250 mL con 70 mL de medio de producción, con un 30% de inóculo, cultivado a 25°C y a 200 rpm (Krishna *et al.*, 1998). Bajo éstas condiciones, con la transformante BII10 se observó un incremento estadísticamente significativo en la producción de rifamicina B con respecto a la cepa control de 13.9% en la fermentación con barbital y de 29.5% en la fermentación sin barbital (parejas 3 y 7 de la Tabla 6), mientras que la transformante BII4 no presenta una variación significativa en la producción de rifamicina B en ninguno de los 2 tratamientos, con un 95 % de confianza. Además, al comparar la transformante BII10 con la cepa control, se observa una diferencia mayor en cuanto a la producción de rifamicina B en los tratamientos sin barbital que con barbital, haciendo notorio el efecto de éste; sin barbital la limitación de oxígeno es más crítica y se nota una mayor diferencia por la expresión del gen *vhb*. Se cree que el barbital inhibe el consumo de oxígeno en cadena respiratoria para que de esta manera se permita la utilización del oxígeno en la biosíntesis de rifamicina B, lo cual no provoca un incremento en la biosíntesis de rifamicina, sino que en realidad evita que esta decaiga en condiciones de baja aireación (Mejía, 1998)

El incremento en la producción de rifamicina B observado en la transformante BII10 no se debe a una mayor producción de biomasa puesto que ésta fue similar (no hay diferencia significativa, con un 95 % de confianza) a la obtenida por el control.

La producción preliminar de rifamicina B obtenida en este experimento, sin embargo, probablemente no refleje la producción potencial de esta nueva cepa portadora del gen *vhb*; será necesario optimizar las condiciones de cultivo para esta cepa en particular para conocer su potencial. Además, debido al comportamiento diferencial encontrado en las dos transformantes evaluadas, es necesario evaluar las otras transformantes obtenidas en busca de la mejor cepa productora.

VIII. CONCLUSIÓN

Se estableció un sistema de transformación y selección de transformantes no reportado para *Amycolatopsis mediterranei*.

La transformación de *Amycolatopsis mediterranei* con el gen *vhb* de *Vitreoscilla stercoraria* que codifica para una hemoglobina bacteriana incrementó la producción de rifamicina B de la transformante BII10 en un 13.9% en los tratamientos con barbital y en un *Amycolatopsis mediterranei* 29.5% en los tratamientos sin barbital, bajo condiciones limitantes de oxígeno.

IX. PERSPECTIVAS

- 1.- Evaluar la producción de rifamicina B de la transformante BII10 a nivel industrial.
- 2.- Identificación del transcrito y de la proteína codificada por el gen *vhb*.
- 3.- Comprobar la estabilidad del plásmido sin presión selectiva
- 4.- Cuantificación de la capacidad de captación de oxígeno de las cepas transformantes.
- 5.- Evaluación de las otras transformantes obtenidas
- 6.- Realización de cinética que relacione la biomasa y el oxígeno disuelto con la producción del antibiótico.

X. REFERENCIAS

- Anderson, M.G., Monypenny, D., Rickards, R.W. y Rothschild, J.M. (1989). Biosynthetic origins of the oxygen atoms in the ansamycin antibiotics rifamycin B, O y S. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **5**: 311-313.
- Becker, A.M., Herlt, A.J., Hilton, G.L., Kibby, J.J. Y Rickards, R.W. (1983). 3-Amino-5-hidroxibenzoic acid in antibiotic biosynthesis. VI. Directed biosynthesis studies with ansamycin antibiotics. *J. Antibiot.* **36**(10): 1323-1328.
- Bibb, M.J., Janssen, G.R. Y Ward, J.M. (1985). Cloning and analysis of the promoter region of the erithromycin-resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene* **42**: E357-E362.
- Brufani, M., Fedeli, W., Giacomello, G. y Vaciago, A. (1964). X-ray analysis of the structure of rifamycin B. *Experientia* **20**: 339-342.
- Brünker, P., Minas, W., Kallio, P.T. y Bailey, J.E. (1998). Genetic engineering of an industrial strain of *Saccharopolyspora erythraea* for stable expression of the *Vitreoscilla* haemoglobin gene (*vhb*). *Microbiology* **144**: 2441-2448.
- Chen, W., Hughes, D.E. y Bailey, J.E. (1994). Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters aerobic metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* **10**: 308-313.
- DeModena, J.A., Gutiérrez S., Velasco, J., Fernández, F.J., Fachini, R.A., Galazzo, J.L., Hughes, D.E. y Martin, J.F. (1993). The production of Cephalosporin C by *Acrommonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin. *Bio/Technology* **11**: 926-929.
- Dikshit, K.L. y Webster, D.A. (1988). Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*. *Gene* **30**(2): 377-86.
- Ding, X., Tian, Y., Chiao, J., Zhao, G. y Jiang, W. (2003). Stability of plasmid pA387 derivates in *Amycolatopsis mediterranei* producing rifamycin. *Biotechnol. Lett.* **25**: 1647-1652.
- FERMIC, S. A. de C. V. Fábrica de antibióticos (México), copia oficial de septiembre 25 de 1997.
- Fernández Perrino, 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.
- Ferreira, E. (1995). Es necesaria la detección temprana de la tuberculosis. *Ciencia médica* **1**(4): 24-33.

-
- Ghisalba, O. Roos, R., Schupp, T y Nüesch, J. (1982). Transformation of rifamycin S into rifamycin B and L. A revision of the current biosynthetic hypothesis. *J. Antibiot.* **35**(1): 74-80.
- Gygax, D., Ghisalba, O., Treichler, H., y Nüesch, J. (1990). Study of the biosíntesis of the rifamycin-chromophore in *Nocardia mediterranei*. *J. Antibiot.* **43**(3): 324-326.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Holmberg, N., Lilius, G., Bailey, J.E., y Büllow, L. (1997). Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolic production. *Nat. Biotechnol.* **15**: 244-247
- Holmes, D.S. y Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J. y Kieser, H.M. (1985). Genetic manipulation of Streptomyces: A laboratory manual. *John Innes, Norwich, UK*. John Innes Foundation.
- Joshi, M., Mande, S. Y Dikshit, K. L. (1998). Hemoglobin bioynthesis in *Viteroscilla stercoraria* DW: cloning, expression and characterization of a new homolog of a bacterial globin gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(6): 2220-2228.
- Karlsson, A., Sartori, G. y White, R.J. (1974). Rifamycin biosynthesis : further studies on origin of the ansa chain and chromophore. *Eur. J. Biochem.* **47**: 251-256.
- Khanna, M., Dua, M. y Lal, R. (1998). Selection of suitable marker genes for the development of cloning vectors and electroporation in different strains of *Amycolatopsis mediterranei*. *Microbiol. Res.* **153**(3): 205-211.
- Khosla, C. y Bailey, J.E. (1988a). The *Vitreoscilla* hemoglobin gene: molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* **214**: 158-161.
- Khosla, C. y Bailey, J.E. (1988b). Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*. *Nature* **331**: 633-635.
- Krishna, P.S.M., Venkateswarlu, G. y Rao, L.V. (1998). Studies on fermentative production of rifamycin using *Amycolatopsis mediterranei*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 689-691.
- Kumar, C.V., Coque, J.J.R. y Martin, J.F. (1994). Efficient transformation of the Cephamycin C producer *Nocardia lactamdurans* and development of shuttle an promoter-probe cloning vectors. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(4): 4086-4093.

-
- Lal, R., Lal, S., Grund, E. y Eichenlaub, R. (1991). Construction of a hybrid plasmid capable of replication in *Amycolatopsis mediterranei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(3): 665-671.
- Lal, R., Khanna, M., Kaur, H., Srivastava, N., Tripathi, K.K., y Lal, S. (1995). Rifamycins: Strain improvement program. *Crit. Rev. Microbiol.* **21**(1): 19-30.
- Lal, R., Khanna, R., Dhingra, N., Khanna, M. y Lal, S. (1997). Development of an improved cloning vector and transformation system in *Amycolatopsis mediterranei* (*Nocardia mediterranei*). *J. Antibiotics.* **51**(2): 161-169.
- Lee, J.G., Choi, C.Y., Seong, B.L. y Han M.H. (1983). Optimal pH profile in rifamycin B fermentation. *J. Ferment. Technol.* **61**(1): 49-53.
- Luchansky, J.B., Suriana, P.M. y Klaenhammer, T.R. (1988). Application of electroporation for transfer of plasmid DNA to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Propionibacterium*. *Mol. Microbiol.* **2**: 637-646.
- Madigan, M.T., Martinko J.M. y Parker J. (1997). *Broock. Biología de los microorganismos*, 8ª. Edición, Editorial Prentice Hall, pág. 210.
- Madon, J. y Hütter, R., (1991). Transformation system for *Amycolatopsis* (*Nocardia mediterranei*): direct transformation of mycelium with plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **173**(20): 6325-6331.
- Madon, J., Moretti, P. y Hütter, R. (1987). Site-specific integration of pMEA100 in *Nocardia mediterranei*. *Mol. Gen. Genet.* **209**: 257-264.
- Magnolo, S.K., Leenutaphong, D.L. , DeModena, J.A., Curtis, J.E., Bailey, J.E., Galazzo, J.L. y Hughes, D.E. (1991). Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* and growth of *S. lividans* are improved by th expression of a bacterial hemoglobin. *Bio/Technology.* **9**: 473-476.
- Mallonee, D.H. y Speckman, R.A. (1989). Transformation of *Bacillus polymyxa* with plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2517-2521.
- Maniatis T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982). Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor*, New York.
- Margalith, P. y Pagani, H. (1961). Rifamycin XIV. Production of rifamycin B. *Appl. Microbiol.* **9**: 325.
- Matsushima, P., McHenney, M A. y Baltz, R.H. (1987). Efficient transformation of *Amycolatopsis orientalis* (*Nocardia orientalis*) protoplast by *Streptomyces* plasmids. *J. Bacteriol.* **165**: 2298-2300.

-
- Mejía, A. A. (1998). Efecto del dietil-barbiturato sobre la biosíntesis de rifamicina por *Amycolatopsis mediterranei*. Tesis de doctorado en biotecnología. UNAM, Facultad de Química.
- Mejía, A., Barrios, G. y Viniegra, G. (1998). Overproduction of Rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei* and its relationship with the toxic effect of Barbitol on Growth. *J. Antibiot.* **51**(1): 58-63.
- Miller, J.H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor*. New York.
- Moretti, P., Hintermann, G. y Hütter, R. (1985). Isolation and characterization of an extrachromosomal element from *Nocardia mediterranei*. *Plasmid.* **14**: 126-133.
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2000). Lehninger. Principios de bioquímica. Ediciones Omega.
- Pasqualucci, C.R., Vigevani, A., Radaelli, P. y Gallo, G.G. (1970). Improved differential spectrophotometric determination of rifamycins. *J. Pharmac. Sci.* **59**(5): 685-687.
- Pigac, J. y Scherempff, H. (1995). A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other Streptomycetes by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(1): 352-356.
- Priefert, H., Achterholt, S. y Steinbüchel, A. (2002). Transformation of the pseudonocardiaecae *Amycolatopsis* sp. Strain HR167 is highly dependent on the physiological state of the cells. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **58**: 454-460.
- Rinehart, K.L. Jr y Shields, L.S. (1976). Chemistry of the ansamycin antibiotics. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **33**: 231-273.
- Rowe, J.C., Cortés, J., Gaisser, S., Staunton, J. y Leadlay, P.F. (1998). Construction of new vectors for high-level expression in actinomycetes. *Gene* **216**: 215-223.
- Sambrook J. y Russell D. (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press., Cold Spring Harbor, Nueva York, E. U. A.
- Sander, F.C., Fachini, R.A., Hughes, D.E., Galazzo, J.L. y Bailey, J.E. (1994). Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Corynebacterium glutamicum* increases final concentration and yield of L-lysine. *Biotechnol. Prog.* **6**: 607-610.
- Schafer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A.H. y Puhler, A. (1990). High-frequency conjugal plasmid transfer from Gram-negative *Escherichia coli* to various Gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 1663-1666.

-
- Schupp, T. y Divers, M. (1986), Protoplast preparation and regeneration in *Nocardia mediterranei*. *FEMS Microbiol. Lett.* **36**: 159-162.
- Schupp, T., Traxler, P., y Auden, J.A.L. (1981). New rifamycin produced by a recombinant strain of *Nocardia mediterranei*. *J. Antibiot.* **34**: 965.
- Sepkowitz, K.A., Rafalli, J., Riley, R., Kiehn, T.E. y Armstrong, D., (1996). Tuberculosis in the AIDS era. *Clinic. Microbiol. Revs.* **8**: 180-199.
- Shark, K.B., Smith, F.D., Harpending, P.R., Rasmussen, J.L., y Sanford, J.C. (1991). Biolistic transformation of a procaryote, *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(2): 480-485.
- Smith, D.F., Harpending, P.R. y Sanford, J.C. (1992). Biolistic transformation of prokaryotes: factors that affect biolistic transformation of very small cells. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 239-248.
- Trieu-Cuot, P., Carlier, C., Martin, P. y Courvalin, P. (1987). Plasmid transfer by conjugation from *Escherichia coli* to Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**: 289-294.
- Tuteja, D., Dua, M., Khanna, R., Dhingra, N., Khanna, M., Kaur, H., Saxena, D.M. y Lal, R. (2000). The importance of homologous recombination in generation of large deletions in hybrid plasmids in *Amycolatopsis mediterranei*. *Plasmid.* **43**: 1-11.
- Voet, D. y Voet, J. G. (1990). Bioquímica. Ediciones Omega, S. A. Pág. 916.
- White, R.J., Martinelli, E., Gallo, G.G. y Lancini G. (1973). Rifamycin biosíntesis studied with ¹³C enriched precursors and carbon magnetic resonance. *Nature* **234**: 273-277.
- Weiwen, Z. y Ruishen, J. (1996). Purification and characterization of methylmalonyl-CoA mutase and methylmalonyl-CoA racemase from a rifamycin SV-producing *Amycolatopsis mediterranei* U32. *Weishengwu Xuebao* **36**(3): 199-207.
- Yamamoto, H., Maures, K.H. y Hutchinson, C.R. (1986). Transformation of *Streptomyces erythraeus*. *J. Antibiot.* **39**: 1304-1313.

