



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

**“CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO PARA LA ELABORACIÓN DE
BANCOS DE GENES”**

ESTANCIA DE TITULACIÓN

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO BIOTECNOLÓGO

ELABORADO POR:

- **HUGO GERARDO LAZCANO RAMÍREZ**

REVISADO POR:

- **RODOLFO MARSCH MORENO**



Contenido

1.-Introducción:	2
1.1.-Biblioteca genómica.....	2
1.2.-Sistema Cre/ <i>loxP</i>	2
1.3.- Gen de resistencia a kanamicina.....	3
1.4.- Gen <i>lacZα</i>	3
1.4 El plásmido del grupo de investigación biotecnología del CINVESTAV	4
1.5 El plásmido comercial pUC18.....	5
1.5 El plásmido diseñado para la construcción de bancos de genes	6
2. Planteamiento del problema:	6
3. Justificación:.....	6
4. Objetivo General del trabajo	7
5. Objetivos específicos.....	7
6. Metas.....	8
7. Materiales y métodos.....	8
7.1. Materiales.....	8
7.2 Métodos.....	8
7.3. Metodología experimental	9
7.3.1. Preparación de los plásmidos pUC18 y pUIRM2303	9
7.3.2. Construcción del plásmido pMHGL2301.....	10
7.3.3. Construcción del plásmido pMHGL2302	112
8. Resultados y discusión.....	15
8.1. Obtención y purificación de plásmidos de trabajo.....	15
8.2. Construcción de pMHGL2301	16
8.3. Construcción de pMHGL2302	200
8.4. Conclusiones y Bibliografía	201

1.-Introducción:

1.1.-Biblioteca genómica

Una biblioteca genómica es un conjunto de fragmentos clonados de DNA genómico que, en teoría, representan el genoma completo de un organismo. La primera biblioteca genómica de un genoma complejo fue construida en vectores derivados del fago λ y clonados en *Escherichia coli*. Este sistema era perfecto para el manejo de fragmentos pequeños de hasta 22 kb por vector, esto fue seguido por la introducción de los vectores cósmidos capaces de aceptar sin problemas fragmentos de 40 kb, más recientemente se han adicionado sistemas de producción de librerías genómicas como los basados en BACs (Bacterial Artificial Chromosome) propagados en *E. coli* y YACs (Yeast Artificial Chromosome) en *Saccharomyces cerevisiae* (Brown, 2001).

Cada nuevo vector ofrece un incremento significativo en el tamaño del inserto que puede ser insertado, desde 300 kb para BACs y 1 Mb para YACs, esto facilita la construcción de mapas ordenados de clonas, con la desventaja notoria del bajo número de copias que presentan estos sistemas. Entre otras dificultades de la construcción de una biblioteca con esas características, está la alta calidad que debe poseer un fragmento de alto peso molecular antes de la clonación, debido a la tendencia del DNA de presentar deleciones.

1.2.-Sistema Cre/*loxP*

El sistema proveniente del bacteriófago P1 consta de la enzima Cre, que es una DNA recombinasa de sitio específico, la cual puede recombinar una doble cadena de DNA, Cre es capaz de mediar en una unión sistemática de dos sitios *loxP* (Locus de X-sobre P1). Cuando dos sitios *loxP* están en la misma molécula de DNA lineal, Cre une los dos sitios para formar un complejo proteína-DNA. Estos complejos se pueden resolver en una molécula de DNA lineal y una molécula de

DNA circular cerrado, los productos finales de recombinación sitio-específica (Hamilton, 1984).

El sitio *loxP* consta de dos regiones palindrómicas de 13 pb en los extremos y una región intermedia de 8 pb:

ATAACTTCGTATA ATGTATGC TATACGAAGTTAT

El sistema es muy utilizado para el control de la expresión de genes para la terapia génica no basada en sistemas virales.

1.3.- Gen de resistencia a kanamicina

La kanamicina es un miembro de la familia de los antibióticos aminoglucósidos. Se ha encontrado resistencia cruzada entre todos estos antibióticos y efecto en común, al producir inhibición de la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad 50S del ribosoma (Onaolapo, 1994).

El gen derivado de Tn5 codifica la enzima neomicin-fosfotransferasa (*neo*), la cual confiere resistencia a los antibióticos aminoglucósidos kanamicina, neomicina y geniticina entre otros y es normalmente utilizado como marcador selectivo para los organismos genéticamente modificados.

1.4.- Gen *lacZ* α

El gen *lacZ* α es derivado de *lacZ* del operón de lactosa de *E. coli*, está truncado y codifica para un fragmento del extremo amino terminal de la enzima β -galactosidasa, que cataliza la hidrólisis de la lactosa en sus componentes glucosa y galactosa, y es normalmente utilizado para el marcaje para la selección de colonias de bacterias genéticamente modificadas con la ayuda de medios de cultivo que contengan X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido), ya que este péptido complementa (complementación α) a la enzima truncada codificada

en el genoma de la bacteria. El gen *lacZ α* en el plásmido ha sido modificado con un 'polilinker', en el cual la inserción de una secuencia, interrumpe la síntesis del fragmento α de la enzima.

Cuando se insertan fragmentos en el sitio de clonación múltiple y después de la transformación, aquellas colonias que en medio X-gal presenten una coloración azul, poseen el gen sin interferencia de un inserto, debido a que la β -galactosidasa es capaz de hidrolizar el complejo del que el grupo indol, en su forma soluble y en contacto con el aire, presenta el color antes mencionado. Aquellas colonias sin coloración presentan una interrupción del gen *lacZ α* por el inserto, por lo que no llevan a cabo la hidrólisis del compuesto X-gal.

Normalmente se utiliza este marcaje junto a uno relacionado a la resistencia a antibióticos para evitar la presencia de colonias blancas no transformadas.

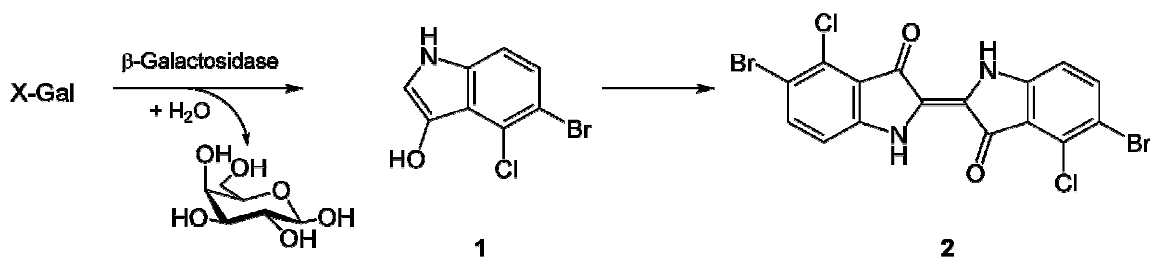


Fig.1: hidrólisis de X-Gal por la β -galactosidasa

1.4 El plásmido del grupo de investigación biotecnología del CINVESTAV pUIRM2303

El plásmido pUIRM2303 posee un origen de replicación derivado pBR322, el gen *neo* que proporciona resistencia cruzada con algunos antibióticos aminoglucósidos

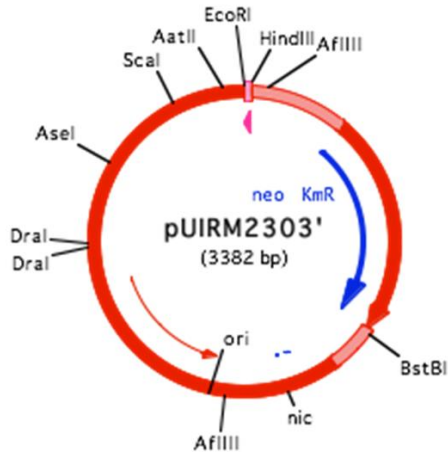


Fig. 2: plásmido pUIRM2303

1.5 El plásmido comercial pUC18

El plásmido pUC18 es un plásmido artificial derivado del plásmido pBR322 posee un gen de resistencia a ampicilina (ApR) que le proporciona resistencia a antibióticos betalactámicos y el gen *lacZ α* .

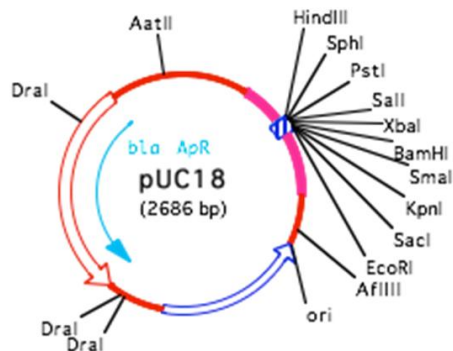


Fig. 3: plásmido pUC18

1.5 El plásmido diseñado para la construcción de bancos de genes pMHGL2302

El plásmido pMHGL2302 diseñado a partir de los plásmidos pUC18 y pUIRM2303 posee el origen de replicación derivado de pBR322, el gen *lacZ α* , el gen *neo* y una secuencia *loxP*.

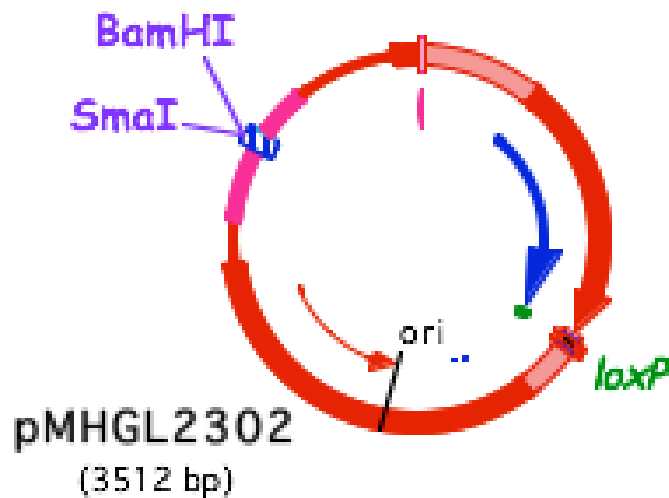


Fig. 4: plásmido pMHGL2302

2. Planteamiento del problema:

En las líneas de investigación del departamento de biotecnología del CINVESTAV se requiere hacer bancos genéticos de bacterias con interés industrial potencial, con fragmentos de tamaños entre 50 kb y 100 kb.

3. Justificación:

En la actualidad los sistemas derivados de pUC18 usados para la construcción de bibliotecas genómicas no son utilizados para la clonación de fragmentos de DNA genómico mayores a 20 kb y aquellos basados en sistemas YACs y BACs son de bajo número de copias y difíciles de manejar.

La construcción de un vector que facilite la inserción del DNA genómico y la selección de clonas, facilitaría la construcción de bancos de genes para el departamento de biotecnología del CINVESTAV y posiblemente de otras entidades dedicadas a la investigación.

En experiencia del grupo de investigación, un origen de replicación derivado de pBR322, que se ha usado en herramientas moleculares transponibles, permite la clonación de fragmentos de al menos 80 kb, por lo cual, éste será utilizado para la construcción de un vector de clonación para la elaboración de bancos de genes.

4. Objetivo General del trabajo

Construir un vector de clonación (pMHGL2302) que permita clonar fragmentos de 50 a 100 kb y de alto número de copia, para la elaboración de bancos genómicos de bacterias de interés industrial

5. Objetivos específicos

Construir el plásmido pMHGL2301 derivado de pUIRM2303 y pUC18

Construir el plásmido pMHGL2302 insertando la secuencias *loxP* en pMHGL2301.

Comprobar la funcionalidad del plásmido pMHGL2302

6. Metas

Construcción del plásmido pMHGL2301

Comprobar el plásmido pMHGL2301

Construcción del plásmido pMHGL2302

Comprobación del plásmido pMHGL2302

7. Materiales y métodos

7.1. Materiales

Durante el trabajo práctico se utilizaron reactivos grado analítico de las marcas Sigma y J. T. Baker para la preparación de soluciones y medios de cultivo, así como reguladores marca Invitrogen y New England Biolabs.

Se utilizó agua destilada grado inyectable libre de pirógenos marca Pisa para la resuspensión de DNA

Antibióticos kanamicina (50 ng/μL; Bristol) y carbenicilina (100 ng/μL; Pfizer)

Se utilizaron enzimas de restricción, DNA ligasa de fago T4, de marcas Invitrogen y New England Biolabs; utilizando el regulador universal nombrado "Cuts all" (Tris.HCl (pH 7.6 20.00 mM), MgCl₂ (7.00 mM), KCl (100.00 mM), 2 β-mercaptoetanol (1.96 mM), BSA (100.00 μg/ml).

La cepa bacteriana *E. coli* Top10 de genotipo; F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 araD139* Δ(*ara-leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG* λ (Sambrook,2001).

Los plásmidos pUC18 y pUIRM2303 previamente mencionados.

7.2 Métodos

Durante la parte preliminar al trabajo práctico, se utilizó el programa de computadora Gene Construction Kit™ versión 2.5.13, Textco, Inc. 2002, para realizar el análisis de las secuencias de DNA y diseñar la estrategia a seguir.

Se utilizó una técnica para la preparación de células quimiocompetentes por CaCl_2 (Sambrook 2001).

La extracción y purificación de DNA plasmídico se realizó siguiendo la técnica de Birnboim y Doly (Birnboim and Doly, 1979; Birnboim, 1989; Sambrook, 2001) modificada (Croase, 1987; Le Gouill y col, 1994; Stemmer, 1991; Tartof y Hobbs, 1987). Realizándose a dos escalas diferentes; pequeña escala para el escrutinio de las colonias transformadas que poseían el vector de interés y mediana escala para la obtención de alta concentración de plásmidos con alta pureza para ser utilizados en el trabajo práctico.

En ambos casos, las suspensiones de plásmidos fueron almacenadas a -20°C y descongeladas.

Para el análisis de DNA se utilizó siempre electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en regulador TAE 1X (Sambrook, 2001); con voltaje constante de 120V. Utilizando digestión con Styl de DNA del bacteriófago λ como marcador de tamaño molecular.

La solución de carga utilizada fue preparada con naranja G (0.025%), glicerol (30%) y EDTA (25.0 mM).

7.3. Metodología experimental

7.3.1. Preparación de los plásmidos pUC18 y pUIRM2303

Se preparan células competentes *E. coli Top10* con una solución de cloruro de calcio 0.05 M.

Se transforman células competentes de *E. coli Top10* y se cultivan placas de medio LB selectivo, adecuadas para la identificación de células transformadas y se incuban por 24 h a 37 °C.

Se seleccionan de 6 a 12 colonias transcurrido el tiempo de incubación y se resiembran por estría en medio selectivo fresco.

Se realiza extracción de plásmidos a pequeña escala por la técnica modificada de Birnboim y Doly (Birnboim y Doly 1979).

Se comprueba la extracción por electroforesis en gel de agarosa.

Se comprueban los plásmidos por restricción enzimática y electroforesis en gel de agarosa usando como patrón de referencia de tamaños de DNA genoma de λ cortado con *StyI*.

Se selecciona una estría con el plásmido de interés y se traspara a medio LB selectivo líquido y se incuba no más de 16 h a 37 °C.

Se realiza extracción y purificación de plásmidos a mediana escala por la técnica modificada de Birnboim y Doly (Birnboim y Doly 1979)

Se almacenan los plásmidos a -20 °C hasta su uso.

7.3.2. Construcción del plásmido pMHGL2301

Se construirá el plásmido pMHGL2302 a partir de los plásmidos pUC18 y pUIRM2303:

Se corta el plásmido pUIRM2303 con la enzima de restricción *DraI*.

Se corta el plásmido pUC18 con la enzima de restricción *AflIII*.

Se inactivan las enzimas por acción de temperatura a 65 °C y 80 °C según corresponda.

Se comprueba la restricción por electroforesis en gel de agarosa usando como patrón de referencia de tamaños de DNA genoma de λ cortado con Styl.

Se rellena el plásmido pUC18 cortado con la enzima de restricción AflIII con dNTPs y Klenow a 37 °C por 20 minutos.

Se *realiza* una mezcla equimolar de los plásmidos linealizados y se ligan con T4 DNA Ligasa.

Se realiza un corte con AatII del producto de ligación.

Se inactivan las enzimas 65 °C

Se ligan los productos de la restricción con AatII usando T4 DNA Ligasa.

Se transforman células competentes de *E. coli* Top10 y se cultivan en placas de medio LB-Km₅₀-X-gal para la identificación de células transformadas, que posean un plásmido que contengan el gen *lacZ* α y el gen *neo*, y se incuban por 24 h a 37 °C.

Se seleccionan de 6 a 12 colonias azules transcurrido el tiempo de incubación y se resiembra por estría en medio LB-Km₅₀-X-gal y en medio LB-Cb₁₀₀-X-gal.

Se seleccionan las estrías de células resistentes a kanamicina y no resistentes a carbenicilina.

Se realiza extracción de plásmidos a pequeña escala por la técnica modificada de Birnboim y Doly (Birnboim y Doly 1979).

Se comprueba la extracción por electroforesis en gel de agarosa.

Se comprueban los plásmidos por restricción enzimática y electroforesis en gel de agarosa usando como patrón de referencia de tamaños de DNA genoma de λ cortado con Styl.

Se selecciona una estría con el plásmido de interés y se traspassa a medio LB selectivo líquido y se incuba no más de 16 h a 37 °C.

Se realiza extracción y purificación de plásmidos a mediana escala por la técnica modificada de Birnboim y Doly (Birnboim y Doly 1979).

Se almacenan los plásmidos a -20 °C hasta su uso.

7.3.3. Construcción del plásmido pMHGL2302

Se disuelven cada uno de los *oligonucleótidos* complementarios que conforman el sitio *loxP* en el doble de su peso de μl de agua para obtener la misma concentración en ambos.

Se realiza una dilución 1:50 de cada *oligonucleótido*.

Se mezclan los oligonucleótidos y se les aplica un gradiente de temperatura de 90 a 40 °C para llevar a cabo la alineación.

Se corta el plásmido pMHGL2301 con la enzima de restricción Bstbl.

Se comprueba la restricción por electroforesis en gel de agarosa usando como patrón de referencia de tamaños de DNA genoma de λ cortado con Styl.

Se añade al producto de restricción la solución del sitio *loxP* y se ligan con T4 DNA Ligasa.

Se corta el producto de ligación con la enzima de restricción Bstbl.

Se transforman células competentes de *E. coli* Top10, se cultivan en placas de medio LB-Km₅₀-X-gal y se incuban por 24 h a 37 °C.

Se seleccionan de 6 a 12 colonias transcurrido el tiempo de incubación y se resiembra por estría en medio LB-Km₅₀-X-gal y en medio LB-Cb₁₀₀-X-gal.

Se realiza extracción de plásmidos a pequeña escala por la técnica modificada de Birnboim y Doly (Birnboim y Doly 1979)

Se comprueba la extracción por electroforesis en gel de agarosa.

Se selecciona una estría con el plásmido de interés, se traspara a medio LB selectivo líquido y se incuba no más de 16 h a 37 °C.

Se realiza extracción y purificación de plásmidos a mediana escala por la técnica modificada de Birnboim y Doly (Birnboim y Doly 1979)

Se almacenan los plásmidos a -20 °C hasta su uso.

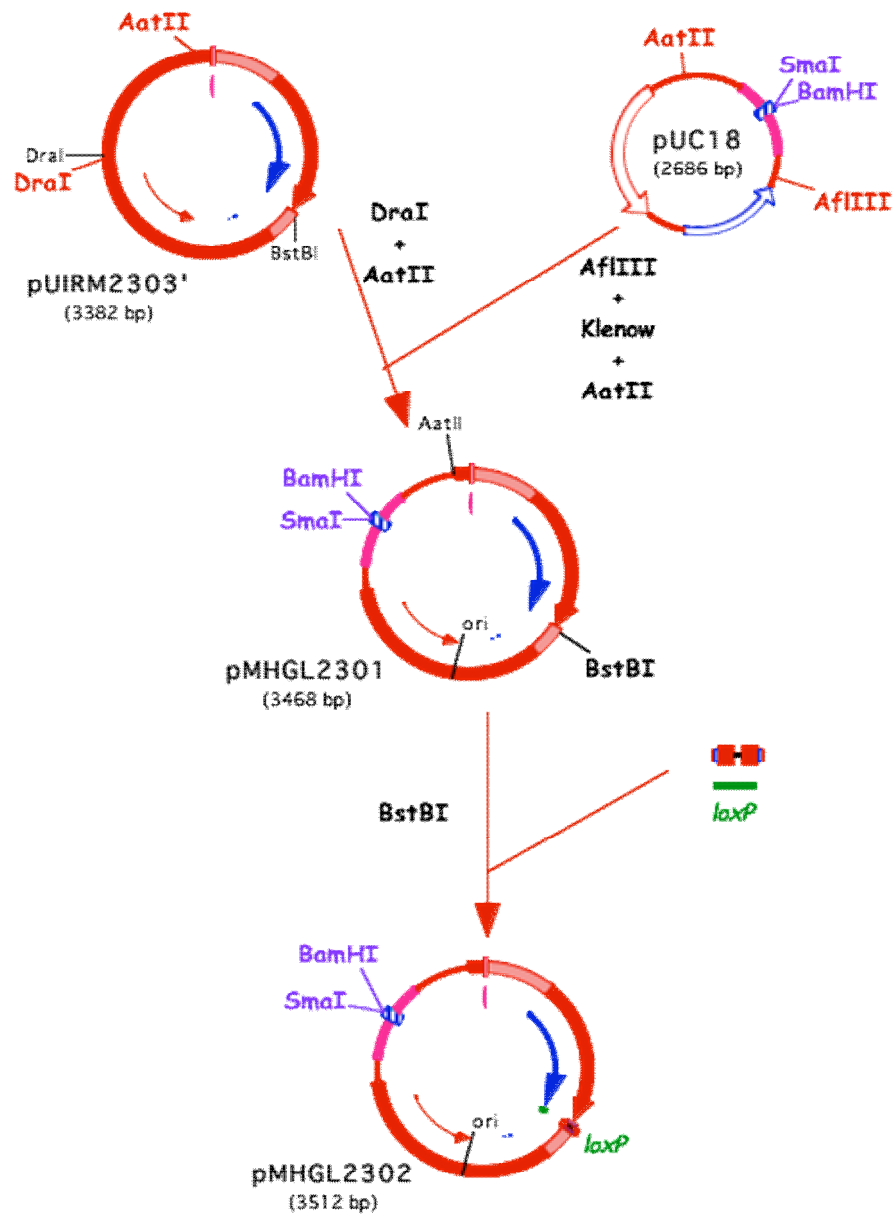


Fig. 5: Estrategia para la construcción de los plásmidos pMHGL2301 y pMHGL2302

CGCGTATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATAGCG

Fig. 6: Oligonucleótido superior diseñado para la construcción del sitio *loxP*

CGCGCTATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATACGC

Fig. 7: Oligonucleótido inferior diseñado para la construcción del sitio *loxP*

8. Resultados y discusión

8.1. Obtención y purificación de plásmidos de trabajo

De las colonias obtenidas de la transformación de células químicamente competentes de *E.coli* Top10 con los plásmidos pUC18 (2686 pb) y pUIRM2302 (3382 pb), sembradas en cajas Petri con medio LB selectivo según la resistencia conferida por cada plásmido, se procedió a una extracción a pequeña escala mediante la técnica modificada de Birnboim y Doly, y posteriormente a partir de una colonia transformada se traspasó a medio líquido para preparaciones a mediana escala de los plásmidos.

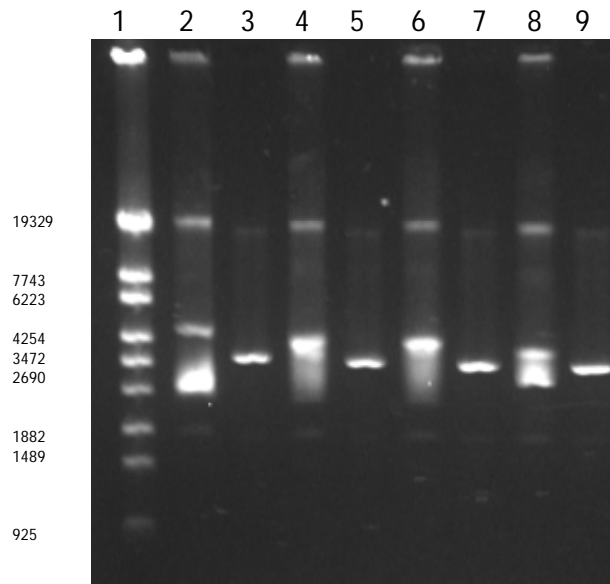


Fig.8: Purificaciones a pequeña escala de pUIRM2303 y comprobación por restricción; 1.-Lambda(Styl), 2,4,6 y 8.- pUIRM2303, 3,5,7 y 9.- pUIRM2303 (HindIII),

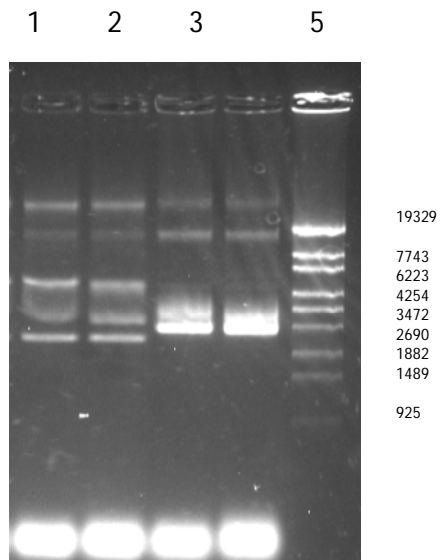


Fig.9: extracciones a mediana escala del plásmido pUC18 y comprobación por restricción; 1 y 2.-pUC18, 3 y 4.- pUC18 (HindIII), 5.-Lambda(Styl),

8.2. Construcción de pMHGL2301

Con los plásmidos purificados a mediana escala se procedió a cortar pUIRM2303 con Dral y pUC18 con AflIII.

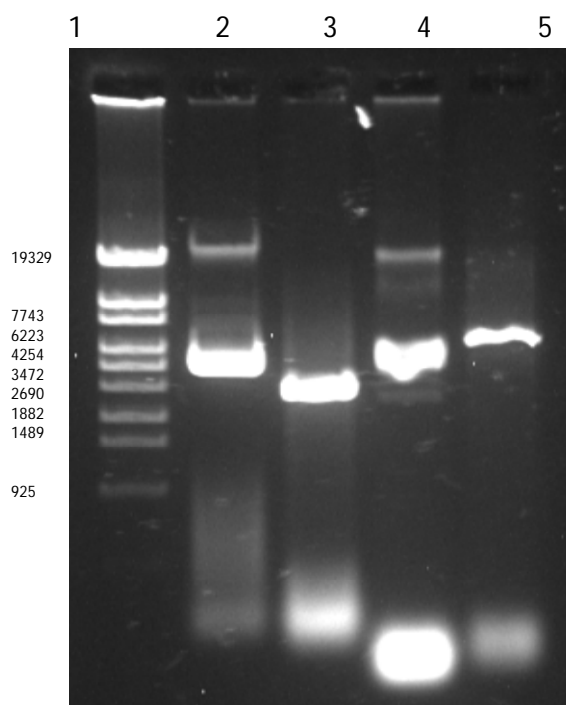


Fig.10: plásmidos pUC18 y pUIRM2303 y sus respectivas restricciones; 1.- Lambda (Styl), 2.-pUC18, 3.- pUC18 (AflIII), 4.-pUIRM2303, 5.-pUIRM2303 (DraI).

Se procedió a rellenar los extremos cohesivos dejados por AflIII en pUC18 con Klenow y dNTPs, posterior a esto se realizó la primera ligación de una mezcla equimolar de los plásmidos en alta concentración con T4 DNA ligasa durante toda una noche, el producto de esta ligación fue cortando con la enzima AatII para llevar a cabo una resolución en forma de monómeros lineales se finalizó la estrategia con una ligación.

El producto de la ligación final se utilizó para transformar células químicamente competentes de *E.coli* Top10 y se sembraron en medio LB-Km₅₀-X-gal para llevar a cabo la selección de colonias poseedoras del gen *lacZ* y *neo*, se realizó una extracción a pequeña escala mediante la técnica modificada de Birnboim y Doly de las colonias obtenidas con las características antes mencionadas y del DNA plasmídico obtenido se realizó un análisis de restricción con la enzima HindIII y se encontró que se obtuvieron tres construcciones diferentes con los genes de interés.

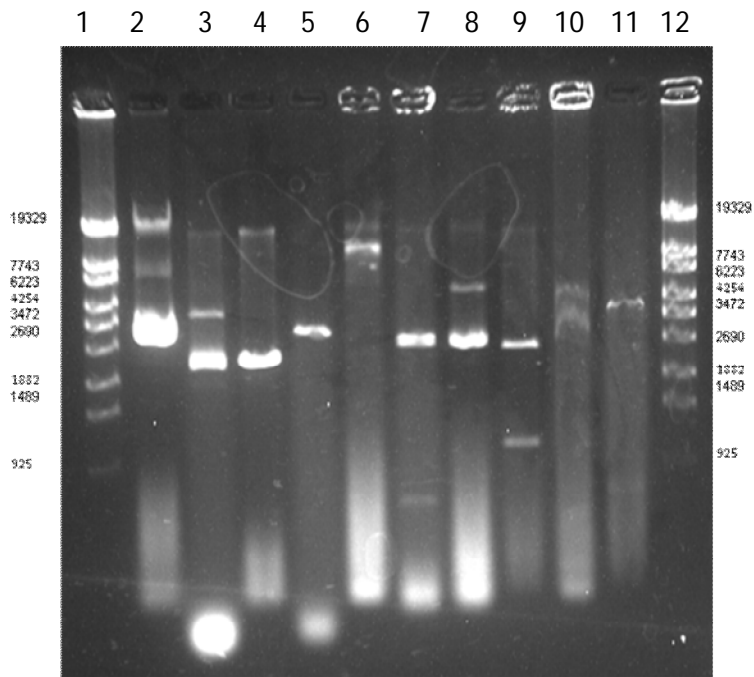


Fig.11: 1.-*Lambda(Styl)*, 2.-pUC18, 3.- pUIRM2303, 4.- pUC18(*HindIII*), 5.- pUIRM2303 (*HindIII*), 6.-pMHGL2301(a), 7.-pMHGL2301(a)(*HindIII*), 8.-pMHGL2301(b), 9.- pMHGL2301(b)(*HindIII*), 10.-pMHGL2301(b), 11.-pMHGL2301(b)(*HindIII*), 12. - *Lambda(Styl)*.

Parte de las colonias fue traspasada a un medio LB-Cb₁₀₀ para distinguir aquellas que no poseyeran la resistencia a antibióticos betalactámicos.

Se realizó un análisis de restricción más detallado de las construcciones que no poseían el gen de resistencia a antibióticos betalactámicos.

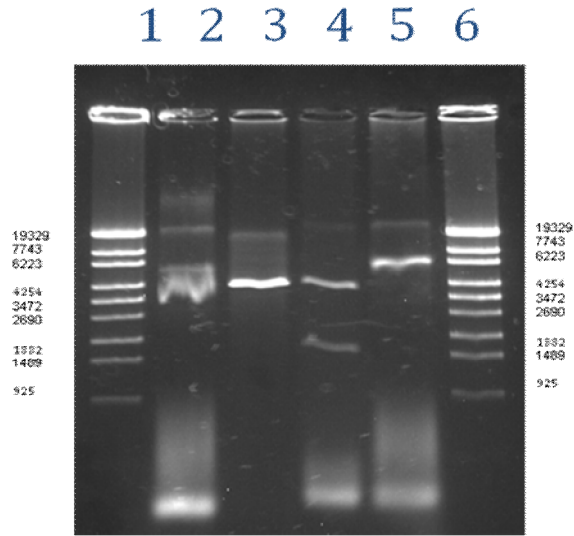


Fig.12: 1.-*Lambda(Styl)*, 2.-pMHGL2301(b), 3.- pMHGL2301(b)(*BstBI*), 4.- pMHGL2301(b)(*EcoRI*), 5.- pMHGL2301(b)(*AatII*)6.- *Lambda(Styl)*.

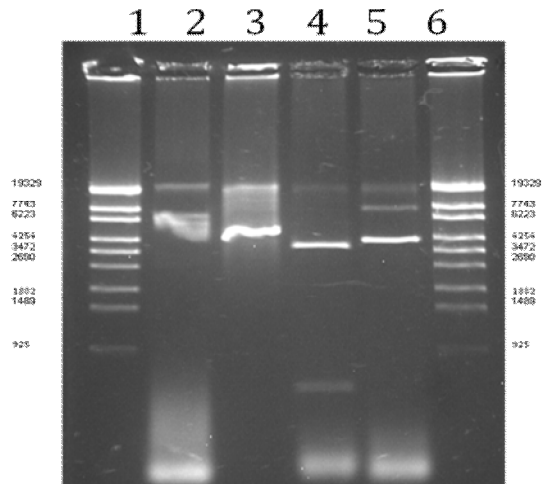


Fig.13: 1.-*Lambda(Styl)*, 2.-pMHGL2301(c), 3.- pMHGL2301(c)(*BstBI*), 4.- pMHGL2301(c)(*EcoRI*), 5.- pMHGL2301(c)(*AatII*)6.- *Lambda(Styl)*.

Se seleccionó la tercera construcción obtenida debido a que el análisis de restricción en base a sus tamaños indica una menor probabilidad de poseer el origen de replicación de pUC18.

8.3. Construcción de pMHGL2302

Se llevo a cabo la hibridación de los oligonucleótidos que conforman el sitio LoxP y se insertaron en el sitio Bstbl del plásmido pMHGL2301 seleccionado.

Se comprobó la inserción del sitio LoxP verificando la presencia del sitio Stul incluido con la secuencia.

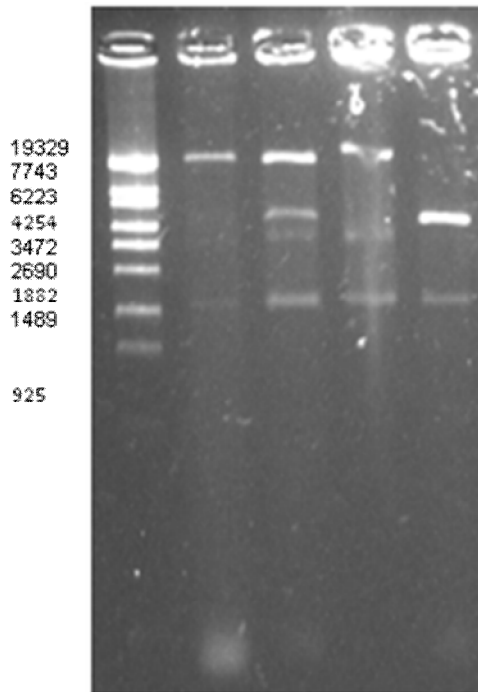


Fig.14: 1.-Lambda (Styl), 2.-pMHGL2302(1), 3.- pMHGL2302 (1)(Stul), 4.- pMHGL2302 (2), 5.- pMHGL2301 (2)(Stul).

Posterior mente se llevo a cabo una PCR utilizando como iniciadores el oligonucleótido LoxP-inf constitutivo del sitio LoxP como primer reverse y el oligonucleótido A32 utilizado para la amplificación del gen *neo* como primer forward (CCCGAGATCTGATGAGGATCGCCACCATGGTTGAACAAGATGGATT) y se obtuvieron como productos de PCR fragmentos aproximados de 850 pb correspondientes al peso del este gen.

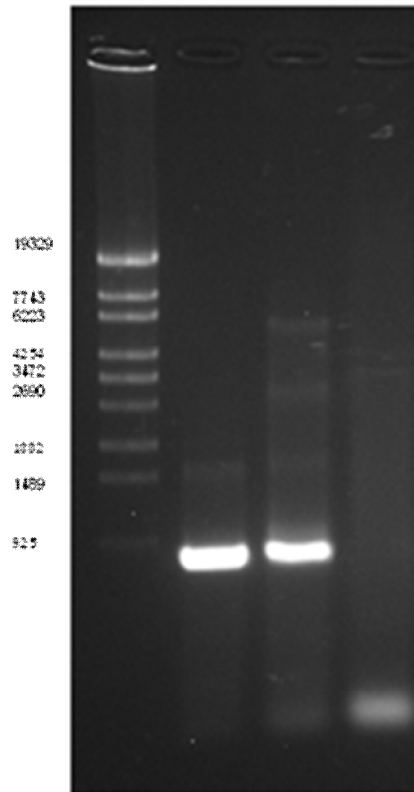


Fig.15: 1.-Lambda (Styl), 2 y 3.-amplificaciones del gen *neo* con los primers LoxP-inf y A32, 4.- control negativo

8.4. Conclusiones

Se construyo el plásmido pMHGL2302

Se requiere analizar la secuencia del plásmido construido para conocerla más detalladamente.

8.3. Bibliografía:

- Onalapo, J., 1994 Cross-resistance between some aminoglycoside antibiotics, 23,215-9.
- Devlin, T. M., 2006 Bioquímica libro de texto con aplicaciones clínicas, 8, 332-337
- Hamilton, D. L., Abremski, K., 1984, Site-specific recombination by the bacteriophage P1 *lox*-Cre system: Cre-mediated synapsis of two *lox* sites, J Mol Biol., 178(2):481-486

- New England Biolabs.2006. Catalog.
- Sambrook J. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. 3ra. Edición. Cold Spring Harbor , New York, USA.
- Stemmer, W.P.C. 1991. A 20 mininute ethidium bromide/high-salt extraction protocol for plasmad DNA BioTechniques. 10(6):726.
- Le Gouill, C., Parent, J.L.,Rola-Pleszczynski, M.,Stankova, J. 1994. Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. Anal. Biochem. 64 219:164.
- Birnboim, H.C., and Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523.
- Birnboim, H.C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Meth. Enzymol. 100:243-247.
- Brown, T. A., 2001. Essential molecular biology: a practical approach, Volume two, 2, 15-18