



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA

**CLONACIÓN DE LOS GENES *CDA1* Y *CDA2* DE
Saccharomyces cerevisiae EN EL VECTOR pYES6
PARA SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.**

**TITULACIÓN POR TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

INGENIERO BIOTECNÓLOGO

PRESENTA

ALDO ALEJANDRO ARVIZU FLORES

CD. OBREGÓN, SONORA

JUNIO DE 2004

DEDICATORIAS

...A mis padres

Magda y Alberto

...A mi abuelita

Noemí

...A mi(s) hermano(s)

José Alberto

Alberto (Beto), Marielena, Carmen

...A mis asesores

Dr. Rogerio Sotelo y Dra. Gaby Romo

...A mi familia

...A mis amigos y compañeros

Alejandra, Paola, Christian, Rosario, Leydi, Dulce, Ernesto, Illiana, Sonia, Paulina
y todos los demás.

...A mis maestros

A todos ellos

...Ya Dios.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo a través del proyecto 36928-B “Caracterización estructural de la Quitinasa y la Lisozima de camarón sobreexpresadas en *E. coli*”. Así como al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. por otorgar el espacio y equipo necesario para hacer posible este trabajo.

A Roger, por ser uno de mis mejores amigos y siempre estar al pendiente de nosotros. A Gaby Romo (mami-ringuís) por su gran amistad, excelente asesoría y por sus consejos tan puntuales.

A mis compañeros y extraordinarios amigos de laboratorio: Enrique, Alonso, Edgar, Diana, Daniel, Claudia, Karina, Sergio, Carmen, Mariana, Iván, Alma, Gracia, Arturo, Adriana, Alejandro, a la Dra. Yepiz, y a (Dra) Mary Islas, por compartir sus experiencias, su apoyo incondicional y hacer pasar momentos gratos e inolvidables.

A mis padres y a mi hermano por ser siempre un ejemplo excepcional en mi vida y estar a mi lado. También a toda mi familia: ¡que siempre estemos juntos! En especial a la familia Flores-Tenorio por que su apoyo y cariño han sido excepcionales en nuestra estancia.

A mis maestros Olga y Luciano por su participación como revisores de este trabajo, y en especial a Olga por impulsar mi visión hacia el CIAD y por contactarme con el Roger.

INDICE DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación.....	3
1.2 Planteamiento del Problema.....	3
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo General.....	4
1.3.2 Objetivos Específicos.....	4
II. ANTECEDENTES.....	6
2.1 Quitina y Quitosano.....	6
2.1.1 Estructura Molecular.....	7
2.1.2 Métodos de Obtención.....	8
2.1.3 Aplicaciones.....	11
2.2 Quitina Desacetilasas.....	12
2.3 La Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
2.3.1 Quitina Desacetilasas en <i>S. cerevisiae</i>	15
2.4 Biología Molecular Como Base de la Biotecnología.....	16
2.5 Sobreexpresión de Proteínas.....	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1 Reactivos.....	23
3.2 Diseño de Oligonucleótidos.....	23
3.3 Amplificación por PCR.....	24
3.4 Electroforesis en Gel de Agarosa.....	27
3.5 Purificación y Cuantificación de DNA.....	27
3.6 Digestión de DNA con Enzimas de Restricción.....	28
3.7 Obtención de Plásmidos Recombinantes.....	30

3.8 Transformación de <i>E. coli</i>	33
3.9 Análisis de Células Transformadas Positivas.....	34
3.10 Aislamiento de DNA plasmídico.....	35
3.11 Secuenciación de los Genes Clonados.....	36
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
4.1 Diseño de Oligonucleótidos Para Amplificación por PCR.....	37
4.2 Amplificación por PCR de <i>CDA1</i> y <i>CDA2</i>	40
4.3 Clonación de los Productos de PCR en el Vector pYES6.....	40
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	51
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	52

LISTA DE TABLAS

Tabla	Nombre	Página
1	Características de quitina desacetilasas de hongos.	13
2	Composición de la mezcla de reacción de PCR para amplificar <i>CDA1</i> .	25
3	Composición de la mezcla de reacción de PCR para amplificar <i>CDA2</i> .	26
4	Composición de las reacciones para la digestión enzimática doble con <i>Hind</i> III y <i>Xho</i> I del vector y los productos de PCR de <i>CDA1</i> y <i>CDA2</i> .	29
5	Condiciones de reacción para la desfosforilación enzimática del vector pYES6 digerido utilizando SAP.	30
6	Componentes de las reacciones de ligación de <i>CDA1</i> a diferentes relaciones molares.	32
7	Componentes de las reacciones de ligación de <i>CDA2</i> a diferentes relaciones molares.	32
8	Secuencia y propiedades de los oligonucleótidos para amplificar <i>CDA1</i> y <i>CDA2</i> .	39

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
1	Estructuras químicas de quitina y quitosano.	9
2	Características del vector de expresión heteróloga para levadura pYES6.	22
3	Condiciones de amplificación por PCR para <i>CDA1</i> y <i>CDA2</i> .	26
4	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la amplificación por PCR de <i>CDA1</i> y <i>CDA2</i> .	40
5	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la digestión enzimática con <i>Hind</i> III y <i>Xho</i> I del vector pYES6 y de los productos de PCR <i>CDA1</i> y <i>CDA2</i> .	41
6	Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de las reacciones de ligación de pYES6- <i>CDA1</i> , y pYES6- <i>CDA2</i> .	43
7	Análisis electroforético de los productos de la amplificación por PCR de colonias posiblemente positivos.	45
8	Análisis electroforético del aislamiento de DNA plasmídico a partir de los posibles clones del vector recombinante.	46
9	Productos de PCR de los plásmidos recombinantes utilizando un oligonucleótido antisentido específico y T7 sentido.	47
10	Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos del clon recombinante pYES6- <i>CDA1</i> .	48
11	Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos del clon recombinante pYES6- <i>CDA2</i> .	49

RESUMEN

La quitina es un homopolímero de *N*-acetil-D-glucosamina con enlaces β -(1-4), ampliamente distribuido en la naturaleza y solo es superado en volumen por la celulosa. Por otra parte, la quitina se encuentra formando parte de los desechos de las industrias camaronícolas, pero debido a su estructura altamente cristalina, este polímero no es soluble en soluciones acuosas, lo que dificulta su aprovechamiento biotecnológico.

El derivado *N*-desacetilado de la quitina, el quitosano, es un copolímero policatiónico soluble en agua y en soluciones ácidas, tiene un carácter no tóxico para animales y puede manejarse con mayor facilidad que la quitina. Al quitosano se le han encontrado una serie de aplicaciones relevantes en áreas como medicina, farmacología, alimentos, cosmetología, biotecnología, entre otras. En la actualidad, la mayor parte de la producción de quitosano se lleva a cabo mediante un proceso de desacetilación químico-térmico. Alternativamente, la desacetilación enzimática se reconoce como un proceso más controlable y menos degradativo, siendo la enzima quitina desacetilasa quien cataliza esta reacción.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* contiene en su genoma dos genes que codifican para quitina desacetilasa denominados *CDA1* y *CDA2*. En base a las secuencias nucleotídicas de estos genes reportadas en el GenBank, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificarlos mediante PCR. Los productos obtenidos se clonaron en el vector pYES6 (de 5.8 Kb) para expresión heteróloga en células de levadura, utilizando los sitios de restricción *Hind* III y *Xho* I. Las ligaciones se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa, y los plásmidos recombinantes obtenidos se transformaron en células de *Escherichia coli* JM109. Mediante la secuenciación de ambas moléculas recombinantes, se

comprobó que las clonaciones obtenidas en este trabajo son adecuadas para la sobreexpresión de ambos genes en levaduras transformadas con estos clones que resulte en cantidades suficientes de enzimas para estudios de desacetilación enzimática de quitina.

*Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos, de la Coordinación de Ciencia y Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Unidad Hermosillo, Sonora; bajo la dirección del Dr. Rogerio R. Sotelo Mundo y la Dra. Ma. Gabriela Romo Figueroa y financiado por el proyecto 36928B “**Caracterización Estructural de Quitinasa y Lisozima de Camarón Sobreexpresada en Escherichia coli**” del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).*

I. INTRODUCCIÓN

La quitina es un homopolímero compuesto de residuos de *N*-acetil-D-glucosamina con enlaces β -(1-4); es uno de los biopolímeros más abundantes en la Naturaleza, es renovable y de fácil obtención, solo superado en volumen por la celulosa. Se encuentra formando parte del exosqueleto o cutícula de un gran número de invertebrados y en la pared celular de la mayoría de los hongos. Debido a su estructura cristalina la quitina es insoluble en soluciones acuosas y solventes orgánicos (Tsigos *et al.*, 2000).

Por otro lado, el quitosano es un polímero policatiónico de D-glucosamina soluble en agua, obtenido a partir de la *N*-desacetilación de la quitina. El quitosano está constituido por una familia de polímeros con algunas fracciones acetiladas. Es biodegradable, no tóxico para animales, soluble en soluciones ácidas, puede encontrarse en varias formas y es de más fácil manejo que la quitina (Tsigos *et al.*, 2000). Por lo tanto, tiene un gran número de aplicaciones en áreas como medicina, ingeniería biomédica, alimentos, cosmetología, farmacología, biotecnología, entre otras.

Actualmente, el quitosano es producido mediante un proceso químico-térmico de desacetilación de la quitina (Martinou *et al.*, 1995; Goycoolea *et al.*, ; Tsigos *et al.*, 2000). Sin embargo, este proceso no es seguro para el medio ambiente y no es fácilmente controlado, además se obtienen productos heterogéneos de variados pesos moleculares y distintos grados de desacetilación. Alternativamente, el proceso de desacetilación enzimático se ve como un proceso más controlado y eficiente, además de ser un proceso no degradativo que resulta en la producción de oligómeros y polímeros de quitosano más definidos y con un grado de desacetilación mayor.

La quitina desacetilasa (CDA, EC. 3.5.1.41) es la enzima que cataliza la hidrólisis del grupo *N*-acetamido de la quitina para producir quitosano. Por lo que se ha postulado su aplicación para establecer un proceso enzimático para la producción de quitosano (Kafetzopoulos *et al.*, 1993; Martinou *et al.*, 1995; Tsigos y Bouriotis, 1995). Sin embargo, el proceso se encuentra influenciado por factores como las propiedades y el mecanismo de acción de la enzima, las propiedades estructurales de la quitina, y el modo de interacción entre la enzima y las moléculas de quitina. Para minimizar estos efectos, los estudios hechos con CDAs han utilizado oligómeros de quitina como sustrato y han reportado métodos para monitorear el proceso de desacetilación (Martinou *et al.*, 1995).

Por su parte, la sobreexpresión recombinante de proteínas es una herramienta básica de la biotecnología mediante la cual es posible generar grandes cantidades de proteína nativa o mutante tanto para aplicaciones diagnósticas, farmacéuticas, determinación de estructura, entre otras (Lewin, 1997). Mediante la manipulación *in vitro* del DNA es posible recombinar genes de organismos distintos y conseguir la expresión del gen de interés.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos, dentro de la Coordinación de Tecnologías de Alimentos de Origen Animal, en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. unidad Hermosillo, Sonora, México. El apoyo económico y técnico para el mismo fue otorgado por el proyecto **CONACYT 36928-B “Caracterización Estructural de Quitinasa y Lisozima de Camarón Sobreexpresada en *Escherichia coli*”**.

Los principales objetivos a corto plazo son obtener los recombinantes de *CDA1* y *CDA2* para su transformación y sobreexpresión en un sistema eucariote. De esta manera será posible que en trabajos posteriores se estudien las condiciones necesarias para establecer un proceso de desacetilación enzimática de quitina utilizando las clones recombinantes obtenidos en este trabajo. Además, se plantea el establecimiento de un protocolo para la clonación de genes encaminado a su sobreexpresión en células de levaduras.

1.1 Justificación.

La producción de quitosano a partir de quitina requiere del desarrollo de metodologías más inocuas para el medio ambiente, siendo la desacetilación enzimática una alternativa viable que aún no ha sido completamente implementada. El estudio de estas aplicaciones, mediante la producción de proteínas recombinantes, puede incidir en la generación de biotecnología aplicada para aprovechar un subproducto de la camaronicultura en el estado de Sonora, como recurso para generar un producto con alto valor agregado.

1.2 Planteamiento del Problema.

Para la sobreexpresión recombinante de las quitina desacetilasas CDA1 y CDA2 se requiere de su clonación en un vector de expresión.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Clonar los genes CDA1 y CDA2 de *Saccharomyces cerevisiae* en un vector de expresión recombinante.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Diseñar un par de oligonucleótidos iniciadores específicos para cada gen.
- Amplificar los genes CDA1 y CDA2 de *S. cerevisiae* mediante la reacción en cadena de la polimerasa.
- Clonar los productos de PCR en un vector de expresión recombinante para expresión en levaduras.
- Analizar las moléculas recombinantes obtenidas por electroforesis en gel de agarosa.
- Transformar en cepas bacterianas competentes de *E. coli*.

- Analizar células transformadas por PCR de colonias.
- Aislar DNA plasmídico y secuenciar las construcciones recombinantes para asegurar su correcta clonación.

II. ANTECEDENTES

2.1 Quitina y Quitosano.

La quitina se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. En contraste con la celulosa, la biomasa en la que se encuentra la quitina no es disponible para su utilización. La cantidad de quitina a partir de los crustáceos en todo el ecosistema marino ha sido estimada en 1,560 millones de toneladas (Goycoolea *et al.*, 2000). El exoesqueleto de los crustáceos es actualmente la mayor fuente de quitina industrial, que suma de un 14 al 27 % del peso seco de los residuos de camarón y del 13 al 15 % para los de cangrejo. Obviamente, la cantidad de quitina disponible por este medio, está restringida a la demanda de estos productos. Por otra parte, en el exoesqueleto de crustáceos, la quitina se encuentra íntimamente asociada a proteínas, sales inorgánicas como carbonato de calcio y lípidos, incluyendo pigmentos, por lo que su aislamiento requiere de varios pasos de purificación. A partir de las conchas de almejas y ostras se han obtenido bajos rendimientos de quitina y el contenido de minerales es alto en ambas (Goycoolea *et al.*, 2000).

Se ha sugerido que la quitina proveniente de los hongos tiene ciertas ventajas sobre la de crustáceos, que incluyen composición uniforme del material crudo, disponibilidad en todo el año y que no requiere desmineralización. Sin embargo, ésta se encuentra frecuentemente asociada a otros polisacáridos que deben ser removidos. Por otra parte, dos diatomeas marinas, *Cyclotella cryptica* y

Thalassiosira fluviatilis, son una fuente de quitina pura que no se encuentra asociada a proteínas, sin embargo, en cultivos por lote y continuos crecen lentamente y producen cultivos de baja densidad, siendo requeridos 50,000 litros de cultivo para producir un kilogramo de quitina (Goycoolea *et al.*, 2000). A corto plazo, se anticipa que estas fuentes novedosas de quitina no serán explotadas con fines comerciales, ya que la demanda actual de quitina es satisfecha adecuadamente por los exoesqueletos de crustáceos obtenidos como material de desecho de la industria procesadora de alimentos marinos.

2.1.1 Estructura Molecular.

Quitina. La estructura química de la quitina se describe como un polisacárido en forma de cadena lineal compuesto de residuos de *N*-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa con uniones $\beta(1-4)$. Se conocen dos formas de quitina en la naturaleza, nombradas α y β -quitina, estas se muestran en la figura 1 (panel A y B, respectivamente). En la α -quitina las cadenas están alineadas en un arreglo antiparalelo, mientras que en la β -quitina las cadenas tienen un arreglo paralelo. Cada una de estas estructuras puede ser distinguida fácilmente en base a sus patrones de difracción de rayos X, de resonancia magnética nuclear y a su espectro en la región del infrarrojo (Saito *et al.*, 1997; Goycoolea *et al.*, 2000).

La α -quitina es la forma más estable y de amplia distribución, se encuentra en el exoesqueleto de artrópodos y hongos. Mientras que la β -quitina se encuentra en la pluma del calamar, en las espinas de ciertas diatomeas y en otras especies que se encuentran en altas profundidades en el océano. Se ha sugerido la presencia en la naturaleza de una tercera forma de la quitina conocida como γ -quitina, en la cual se presenta una combinación de ambos arreglos paralelo y antiparalelo; no obstante, su existencia sigue siendo controversial (Muzzarelli, 1999). La quitina es insoluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos debido a su alto grado de cristalinidad, lo que ha limitado ampliamente su utilización directa en la industria de alimentos como hidrocoloide funcional.

Quitosano. El quitosano (figura 1, panel C), es producido por la ruptura química de los grupos *N*-acetilo de la quitina. La reacción de desacetilación raramente es llevada a su totalidad, de aquí que el quitosano sea descrito generalmente como una estructura copolimérica compuesta por residuos de D-glucosamina con cierto grado de residuos *N*-acetilados. El grado de desacetilación depende directamente de las condiciones de la reacción, y a la vez influye en las propiedades físicas, químicas y en la actividad biológica del quitosano obtenido (Goycoolea *et al.*, 2000).

2.1.2 Métodos de Obtención.

Quitina. Los desechos de exoesqueleto de crustáceos están compuestos por un 20-40% de proteína, 30-60% de sales de calcio y magnesio, 20-30% de quitina y 0-14% de pigmentos. Por tanto, el aislamiento de la quitina de estos desechos requiere de tres operaciones básicas:

1. Remoción de proteína residual
2. Remoción de materia inorgánica
3. Remoción de lípidos y pigmentos

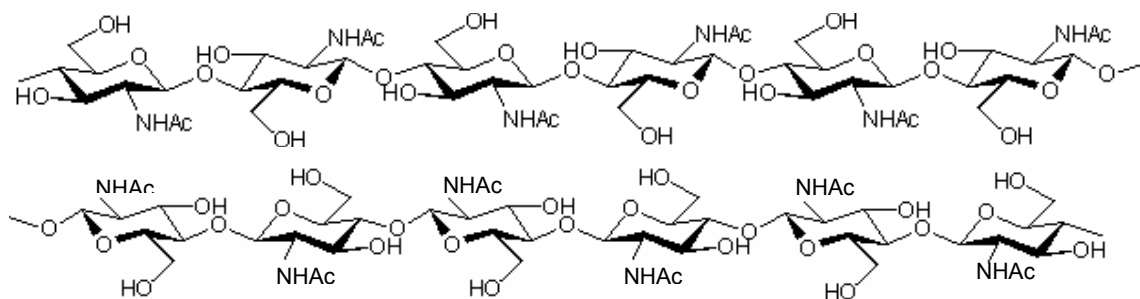
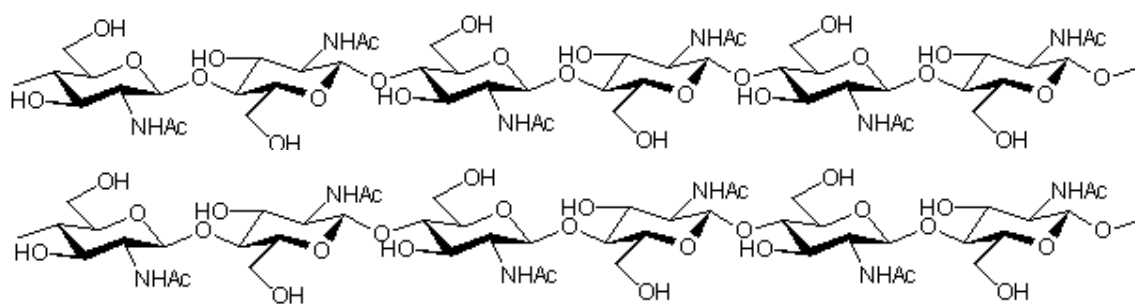
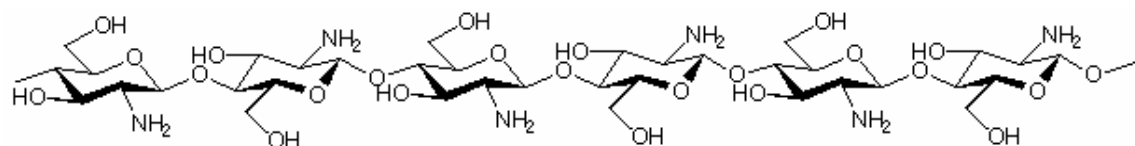
A**B****C**

Figura 1. Estructuras químicas de quitina y quitosano.

Panel A: Arreglo antiparalelo de la α -quitina.

Panel B: Arreglo paralelo de la β -quitina.

Panel C: Estructura del quitosano, la forma *N*-desacetilada de la quitina.

El proceso químico convencional para el aislamiento de la quitina incluye un tratamiento alcalino con una base diluida para la remoción de proteína y un tratamiento ácido para la remoción de sales. La decoloración es llevada a cabo por tratamientos con H_2O_2 y $NaClO$ para destruir los pigmentos carotenoides, sin embargo, si los pigmentos han de ser comercializados, pueden ser extraídos usando una fase adecuada. También se han empleado procesos biotecnológicos y enzimáticos para la obtención de quitina. La fermentación bacteriana ha sido sugerida como una tecnología alternativa para el pretratamiento de los desechos de camarón (Rao *et al.*, 2000). Por fermentación sólida, la quitina puede ser recuperada con tratamiento ácido o alcalino disminuyendo la cantidad de agentes químicos requeridos (Goycoolea *et al.*, 2000).

Quitosano. La reacción principal de la quitina para la obtención de derivados es la hidrólisis del grupo *N*-acetilo en la posición C2. Normalmente es llevada a cabo por tratamientos severos de hidrólisis alcalina, y en sí, el proceso de desacetilación puede resultar en degradación del polímero. Generalmente, los tratamientos térmicos en soluciones altamente alcalinas son requeridos para obtener quitina parcialmente desacetilada con grado de desacetilación menor al 30% considerada como quitosano. El criterio principal para diferenciar el quitosano de la quitina es su solubilidad en soluciones de ácido diluido, resultante cuando la fracción residual de grupos acetilo es baja y por tanto la fracción de grupos NH_3^+ es suficientemente alta para favorecer la disolución del polímero (Goycoolea *et al.*, 2000). En general, se conocen dos métodos principales para preparar quitosano a partir de quitina con variación en los grados de desacetilación:

1. Desacetilación heterogénea de quitina sólida en solución acuosa
2. Desacetilación homogénea de quitina pre-humedecida en solución acuosa

La desacetilación heterogénea involucra la reacción preferencial en las regiones amorfas del polímero, dejando casi intactas las impenetrables regiones cristalinas en la quitina. Este es el tratamiento industrial preferido. Alternativamente, la

modificación homogénea es llevada a cabo por uso de álcali moderadamente concentrado, cerca del 13% en peso, actuando en quitina pre-humedecida en vacío y dejando la reacción a 25-40°C por 12 a 24 horas. Esto permite el acceso del agente químico a los grupos *N*-acetilo y por tanto una modificación más uniforme a lo largo de la cadena del polímero. En cualquiera de las dos condiciones, la reacción requiere el uso de soluciones de álcali concentrado y periodos de procesamiento largos. Factores conocidos que afectan el grado de desacetilación incluyen: concentración de la base, tratamiento previo, tamaño de partícula y densidad de la quitina, que se relaciona con su porosidad. En la práctica, el nivel de desacetilación máximo que se puede obtener en un solo tratamiento de desacetilación es cercano al 75-85% (Goycoolea *et al.*, 2000).

2.1.3 Aplicaciones.

En el mercado se encuentran, desde hace 15 años, productos comerciales de quitina y quitosano preparados de desechos de cangrejos y camarones. En la industria de alimentos existe una alta demanda por polímeros de bajo costo y con propiedades funcionales deseables como espesante, gelificante y estabilizante. Por ejemplo, en Japón, el quitosano es utilizado comúnmente como aditivo para mejorar la calidad nutricional de varios alimentos, particularmente para la reducción del colesterol. El quitosano se ha utilizado en agricultura como un fuerte inhibidor de hongos. También en la postcosecha de frutas y vegetales, se han aplicado películas comestibles de quitosano para prolongar la vida de anaquel de los productos (Goycoolea *et al.*, 2000).

En el tratamiento de aguas residuales el quitosano se ha usado como agente coagulante o floculante. Esto en base en las cargas positivas del polímero que le confieren la capacidad de combinarse con una amplia variedad de moléculas cargadas negativamente. En la industria de bebidas la quitina parcialmente desacetilada, con distintos grados de desacetilación, ha sido utilizada como material adsorbente de intercambio iónico para la clarificación de jugo de piña.

Además, el quitosano se ha empleado para prevenir el oscurecimiento del jugo de manzana a niveles de 200 ppm. En la producción de vinos, el quitosano ha probado ser un adsorbente efectivo de compuestos fenólicos (Goycoolea *et al.*, 2000).

Una aplicación importante del quitosano es la microencapsulación de otras sustancias. Este término se refiere al proceso en el cual una sustancia se empaqueta dentro de partículas o membranas poliméricas, generalmente esféricas, de 2 a 50 mm de diámetro. Los requerimientos que debe cumplir el material para encapsular son: presentar propiedades sensoriales adecuadas, poseer estabilidad fisicoquímica y microbiana, estar libre de compuestos tóxicos, ser seguro para la salud y no contaminante. Al respecto, el quitosano es un polímero natural que cumple con estas cualidades.

También se ha logrado la inmovilización de enzimas de uso industrial en soportes de quitina/quitosano. Algunos ejemplos en la industria alimentaria de enzimas inmovilizadas en esta clase de soportes son: α -amilasa, glucoamilasa, D-glucosa isomerasa, D-galactosidasa, papaína, pepsina, α -quimotripsina. En otros aspectos, el quitosano se ha empleado para inhibir el crecimiento de microorganismos (Goycoolea *et al.*, 2000).

2.2 Quitina Deacetilasas.

Existe evidencia de que en ciertas bacterias y hongos ocurre la reacción enzimática de desacetilación de quitina. Quitina desacetilasa (CDA, EC. 3.5.1.41) es la enzima que hidroliza el grupo *N*-acetamido en los residuos de *N*-acetil-D-glucosamina de la quitina. Se han aislado y caracterizado quitina desacetilasas de hongos como *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea*, *Aspergillus nidulans* y de dos cepas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Kafetzopoulos *et al.*, 1993; Tsigos y Bouriotis, 1995; Tsigos *et al.*, 2000). Las características más importantes de estas enzimas se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de quitina desacetilasas de hongos.

	Fuente				
	<i>Mucor rouxii</i>	<i>Absidia coerulea</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (ATCC 56676)	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (DSM 63144)
Localización	Periplasma	Periplasma	Medio de cultivo	Medio de cultivo	Medio de cultivo
Peso molecular (kDa)	75	75	27	24	150
Punto isoeléctrico	3	ND*	2.75	ND*	3-5
pH óptimo	4.5	5.0	7.0	11.5	8.5
Temperatura óptima (°C)	50	50	50	50	50
Inhibición por acetato	Si	Si	No	No	No

Fuente: Tsigos *et al.*, 2000.

*ND: No determinado

En los organismos descritos en la tabla anterior, las CDAs son glicoproteínas que son secretadas tanto en el espacio periplásmico como en el medio de cultivo. Además, presentan una notable estabilidad térmica a su temperatura óptima de 50°C, y una marcada especificidad a polímeros de *N*-acetil-D-glucosamina solubles en agua. Sin embargo, varían considerablemente en sus pesos moleculares y contenido de carbohidratos, y el rango del pH al que presentan actividad es muy amplio (Tsigos *et al.*, 2000). Una característica deseable de las CDAs para su aplicación biotecnológica es que no presenten inhibición por acetato, que es un producto de la reacción de desacetilación.

Por otra parte, se han sugerido dos roles biológicos para las CDAs fúngicas: la formación de las paredes celulares y la formación de interacciones planta-patógeno. En el hongo *Metarhizium anisopliae* la producción de CDA se relaciona

con un proceso de invasión a insectos donde se sugiere que la enzima tiene también un rol doble. Primeramente, la enzima extracelular contribuye a la modificación de la cutícula del insecto favoreciendo la penetración del micelio; y segundo, la enzima contribuye a la modificación de las paredes celulares del hongo como un mecanismo de defensa contra quitinasas del insecto (Nahar *et al.*, 2004). También se ha identificado actividad de CDA en bacterias quitinolíticas como algunas especies de *Vibrio*, donde se postula un rol importante en la degradación de los desechos de quitina en el ambiente marino (Li y Roseman, 2004; Meibom *et al.*, 2004).

2.3 La Levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es reconocida como un microorganismo eucariota ideal para estudios biológicos. A pesar de que las levaduras tienen mayor complejidad genética que las bacterias, comparten muchas de las ventajas técnicas que permitieron un rápido avance en la genética molecular de los procariotas y sus virus. Por otra parte, *S. cerevisiae* posee una arquitectura intracelular similar a la de las células de mamíferos, lo cual favorece que la levadura sea utilizada comúnmente como un huésped sustituto para el estudio de proteínas recombinantes de otros organismos eucariotes (Guthrie y Fink, 1991; Gietz y Woods, 2001).

Algunas propiedades que hacen a *S. cerevisiae* particularmente conveniente para estudios biológicos son su crecimiento rápido, la facilidad de hacer réplica en placa, un sistema genético bien definido y un sistema de transformación de DNA altamente versátil. Además, por su carácter de no patógena, la levadura puede manejarse en el laboratorio con facilidad. El desarrollo de las técnicas de transformación genética han hecho de esta levadura particularmente accesible para la clonación de genes y para las técnicas de ingeniería genética (Guthrie y Fink, 1991).

2.3.1 Quitina Desacetilasas en *S. cerevisiae*.

En *Saccharomyces cerevisiae*, han sido identificados dos genes de quitina desacetilasa, denominados *CDA1* y *CDA2*. Se ha observado que la transcripción de estos genes se encuentra restringida a un período durante la etapa de esporulación (Christodoulidou *et al.*, 1996).

La quitina es un componente estructural de la pared de las células vegetativas, y es esencial para la viabilidad de la levadura *S. cerevisiae*; sin embargo, la pared de la ascospora presenta una estructura ordenada distinta. Ésta confiere protección mayor en condiciones de estrés en comparación con la pared de las células vegetativas y está conformada por cuatro capas. Las dos capas internas están compuestas principalmente por glucanos y mananos estrechamente yuxtapuestos. Una tercera capa que contiene 95 % de quitosano, y la capa externa proteica con un alto contenido de residuos de ditirosina. Mientras que el quitosano no es esencial para la viabilidad de la espora parece tener un rol importante en la formación de la capa de ditirosina, que finalmente protege a las esporas maduras de la acción de enzimas hidrolíticas, de agentes químicos y condiciones ambientales de estrés (Christodoulidou *et al.*, 1999).

Ambos genes, *CDA1* y *CDA2*, se encuentran codificados en el genoma de la levadura dentro del cromosoma XII. Los marcos de lectura correspondientes se encuentran separados por un intervalo de 1411 nucleótidos y se transcriben en la misma orientación. La traducción de ambas secuencias nucleotídicas muestra una identidad de 57% y una similitud de 72% entre sus secuencias de aminoácidos, con una masa molecular estimada de 34.6 y 35.6 kDa, respectivamente (Christodoulidou *et al.*, 1996). Por otra parte, se ha observado que *CDA2* lleva a cabo la mayor parte de la desacetilación, mientras que *CDA1* probablemente contribuye a perfeccionar el proceso (Christodoulidou *et al.*, 1999).

2.4 Biología Molecular Como Base de la Biotecnología.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) fue desarrollada por el investigador Kary Mullis (1986). Es una técnica que se utiliza para amplificar un fragmento de DNA que se encuentra entre dos regiones con secuencias conocidas. Se utiliza un par de oligonucleótidos como iniciadores o cebadores, para una serie de reacciones sintéticas que son catalizadas por una DNA polimerasa termoestable. Cada uno de estos oligonucleótidos es complementario a una secuencia en una cadena y se encuentran a cada lado del fragmento de interés. En la técnica, inicialmente se desnaturaliza el DNA por calentamiento, y se adiciona un exceso molar de los oligonucleótidos y de los cuatro desoxiribonucleótidos trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP). Seguidamente, la reacción se enfría hasta una temperatura que permita la hibridización de los oligonucleótidos con el DNA que contiene el fragmento a amplificar. Una vez alineados, los iniciadores son extendidos por la DNA polimerasa. Este ciclo de desnaturalización, alineación y elongación es repetido varias veces y debido a que los productos de un ciclo de amplificación son utilizados como molde para el ciclo siguiente, en cada ciclo se duplica la cantidad de DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

La clonación de un fragmento de DNA permite producir altas cantidades del mismo a partir de solamente una molécula original. Un clon se define como un conjunto de células o moléculas idénticas a una célula o molécula parental de la cual se originaron (Lewin, 1997). La tecnología de clonación incluye la construcción de nuevas moléculas de DNA uniendo secuencias de procedencias distintas. El producto obtenido es llamado comúnmente DNA recombinante, y las técnicas son conocidas como ingeniería genética. Estas técnicas son aplicables tanto a organismos procariotes como eucariotes, si bien, el potencial de su aplicación es especialmente evidente en genomas eucariotes. La clonación de un gen es posible gracias a la capacidad de los plásmidos bacterianos y de los bacteriófagos de replicarse después de haberse incorporado secuencias adicionales en sus genomas (Lewin, 1997). Las moléculas de DNA recombinante pueden ser construidas utilizando enzimas de restricción que corten el vector y el

inserto de DNA en sitios específicos y después uniéndolos con una DNA ligasa, la cual cataliza la formación de los enlaces fosfodiéster 5'-3'.

Los plásmidos se han convertido en una herramienta poderosa en la clonación de genes debido a la facilidad de ser manipulados. Un plásmido es una molécula de DNA circular de doble cadena que puede tener una longitud entre 1 Kb y hasta más de 200 Kb. Se encuentran en una variedad de especies bacterianas, donde se comportan como unidades genéticas accesorias que se replican y son heredadas independientemente del cromosoma bacteriano. Los plásmidos de expresión son aquellos que contienen elementos promotores y reguladores que generan grandes cantidades de mRNA complementarios a las secuencias del DNA recombinante introducido y que finalmente son traducidos a proteína por la maquinaria bioquímica de la célula (Sambrook *et al.*, 1989).

El DNA plasmídico puede ser introducido en bacterias mediante un proceso artificial denominado transformación. El término transformación fue usado por primera vez en el año de 1928, para describir cambios hereditarios de ciertas características en *Pneumococcus*. Actualmente, "transformación" se utiliza para describir la incorporación de DNA heterólogo en procariotes y eucariotes, que es detectada por cambios en el fenotipo (Gietz y Woods, 2001). La mayoría de los métodos para transformación bacteriana se basan en las observaciones de Mandel y Higa (1970), quienes mostraron que bacterias tratadas con soluciones de CaCl_2 enfriadas en hielo y luego calentadas brevemente podían ser transfectadas con DNA del bacteriófago lambda (λ).

El método químico fue utilizado también para transformar bacterias con DNA plasmídico por Cohen y cols. (1972). Durante este proceso las bacterias son tratadas con una mezcla de cationes divalentes para hacer sus membranas temporalmente permeables a moléculas pequeñas de DNA. Alternativamente, existe el método de transformación por electroporación; en este método las células se llevan hasta crecimiento en fase exponencial, son enfriadas, centrifugadas y lavadas varias veces con soluciones buffer de baja salinidad para reducir la fuerza iónica de la suspensión. Posteriormente se aplican unos pulsos

eléctricos para permeabilizar la membrana de las células y lograr la incorporación del DNA heterólogo (Sambrook *et al.*, 1989).

Los métodos de transformación química y la electroporación también han sido utilizados para transformar células de levadura (Ito *et al.*, 1983; Delorme, 1989). La primera transformación genética de la levadura *S. cerevisiae* fue reportada en el año de 1960 por Oppenoorth. Posteriormente, se han desarrollado y mejorado las técnicas para introducir DNA heterólogo dentro de la levadura (Gietz y Woods, 2001). Cada una de estas técnicas tiene ventajas y desventajas, y la mejor opción dependerá de las necesidades del estudio en particular y de los recursos de que se disponga. Una vez hecha la transformación, se utilizan marcadores de selección codificados por el plásmido recombinante para identificar las células transformadas, tanto en bacterias como en levaduras.

2.5 Sobreexpresión de Proteínas.

La producción de proteínas en un organismo diferente al hospedero del gen, o heteróloga, se ha implementado en diversos sistemas. Uno de los sistemas más utilizados es el sistema pET, que utiliza cepas de la bacteria *Escherichia coli* como célula “huésped”. Aquí, los genes son clonados en un plásmido bajo el control de elementos promotores de la transcripción del bacteriófago T7 (Studier y Moffatt, 1986). En este sistema, el gen heterólogo es incorporado a la bacteria en forma episomal o plasmídica y la expresión del mismo está bajo control del promotor T7 regulado por un sitio *lac*. La T7 RNA polimerasa, también regulada por *lac*, es altamente activa y selectiva, y se halla codificada por una copia cromosomal en el genoma de la célula hospedera. Normalmente, la expresión se encuentra reprimida hasta que se induce por un análogo de la lactosa no metabolizable: isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) añadido al medio de cultivo.

No obstante, la expresión de proteínas de organismos eucariotes expresadas en bacterias ocasionalmente conlleva ciertos problemas. Estas proteínas pueden

tener un plegamiento incorrecto o ineficiente que se refleja en una baja actividad específica. Además, la producción de proteínas biológicamente activas a partir de DNA recombinante, frecuentemente requiere de modificaciones postraduccionales, procesos que no son realizados por células procariotes; como por ejemplo, la formación adecuada de puentes disulfuro, glicosilación, fosforilación, o modificación proteolítica de un precursor inactivo (Sambrook *et al.*, 1989). Estas proteínas inactivas y agregadas forman los llamados cuerpos de inclusión.

La sobreexpresión de proteínas en células de levadura ha sido de importancia práctica para la industria biotecnológica y de utilidad técnica en investigación básica. Existen tres tipos de metodologías para lograr la sobreexpresión de un gen en levaduras: (1) fusión de un marco de lectura a un promotor más potente como *GAL1*, *GAL10*, y *ADH1*, (2) uso de un vector plasmídico que se replique en alto número de copias por célula, (3) uso de vectores de transposición Ty para aumentar el número de copias del gen por inserción semialeatoria de copias del gen en el genoma (Guthrie y Fink, 1991).

La preparación de un gen heterólogo para expresión en *S. cerevisiae* requiere de la construcción de un vector adecuado y de la utilización de la bacteria *E. coli* como huésped para facilitar la manipulación del DNA recombinante. El gen heterólogo debe ser situado dentro de un “casette” de expresión. Esto se refiere a que debe ser clonado entre un elemento promotor y un elemento terminador dentro del vector. Los vectores para transformar levaduras pueden ser clasificados dentro de dos categorías, como vectores integrativos o vectores plasmídicos extracromosomales. Los primeros plásmidos para transformar a la levadura *S. cerevisiae* fueron desarrollados por Struhl *et al.* (1979).

Los vectores de integración (pYI, *Yeast Integration plasmid*) se integran a un cromosoma de la levadura mediante recombinación homóloga, lo cual puede ser utilizado para integrar un gen nuevo. Estos vectores resultan en solamente una copia del gen de interés por célula y su expresión se realiza a niveles constantes. Por otra parte, son estables mitóticamente y ofrecen la mejor manera de mantener genes recombinantes, ya que menos del 0.1% del DNA recombinante se pierde

en cada generación cuando la levadura se cultiva en medio sin un agente de selección (Guthrie y Fink, 1991; Thukral *et al.*, 1993).

Además, existen tres clases de plásmidos extracromosomales denominados pYR (del inglés *Yeast Replicating plasmid*), pYC (*Yeast Centromeric plasmid*), y pYE (*Yeast Episomal plasmid*). En general, los plásmidos extracromosomales son menos estables que los plásmidos integrativos; sin embargo, algunos pueden ser mantenidos en alto número de copias dentro de la célula, lo que puede resultar en niveles de expresión altos del gen de interés. Estos vectores requieren de la presencia de un marcador de selección y de un origen de replicación de DNA que funcione en levaduras.

Los plásmidos pYR contienen la secuencia del origen de replicación cromosomal ARS (del inglés *Autonomously Replicating Segment*), así como un marcador de selección. Sin embargo, estos plásmidos son muy inestables, entre el 10-20% de las células pierden el plásmido en cada generación, y solamente del 10 al 30% de las células mantienen el plásmido. El número de copias del plásmido pYR puede variar de 0 a 100 por célula. Una variante de este tipo de plásmidos es el pYC, que contiene DNA centromérico además de la secuencia ARS. La adición de un centrómero incrementa la estabilidad mitótica de estos plásmidos (cerca del 1% del plásmido se pierde por cada generación); sin embargo, están presentes en solamente una o dos copias por célula (Guthrie y Fink, 1991; Thukral *et al.*, 1993).

Los plásmidos episomales de múltiple número de copias poseen la secuencia del origen de replicación del plásmido 2μ , que se encuentra de manera natural en levaduras y depende de proteínas codificadas por el plásmido endógeno para el mantenimiento del alto número de copias. La presencia del origen de replicación del plásmido 2μ resulta en un número de copias promedio de 10 a 40 por célula. Son estables mitóticamente, perdiendo de 0.2 a 2% del plásmido por generación. Cuando la levadura transformada se hace crecer en medio selectivo, cerca del 80 al 99% de las células contienen el plásmido. Estos vectores son ampliamente aplicados partiendo del hecho de que la gran mayoría de las cepas de laboratorio contienen el plásmido 2μ (Guthrie y Fink, 1991; Thukral *et al.*, 1993).

Otro tipo de vectores son los cromosomas artificiales de levaduras (YAC), que se utilizan cuando es necesario clonar fragmentos de DNA heterólogo de gran tamaño en la levadura. Estos vectores se replican como un plásmido circular con un centrómero y una secuencia ARS, además contienen dos marcadores de selección, dos telómeros y un sitio de clonación. El vector es linearizado por la remoción de una secuencia ubicada entre los telómeros y el gen de interés es insertado en el sitio de clonación. El resultado es un cromosoma lineal artificial con una longitud entre 100 a 1000 Kb, que se propaga mediante mitosis y meiosis (Guthrie y Fink, 1991; Gietz y Woods, 2001).

El plásmido comercial pYES6 (Invitrogen, Carlsbad, CA) utilizado como vector en este trabajo, es un plásmido episomal de 5.8 Kb y fue diseñado para la expresión inducible de proteínas recombinantes en *S. cerevisiae*. Además, contiene el origen de replicación del plásmido 2 μ para el mantenimiento episomal y la replicación en alto número de copias (de 10 a 40 copias por célula). La expresión del gen de heterólogo se encuentra regulada por el promotor de levaduras inducible por galactosa *GAL1*. Una vez introducido en bacterias o en levaduras, el plásmido confiere características fenotípicas para la selección de células transformadas, que consisten en la resistencia a los antibióticos ampicilina para *E. coli*, y blasticidina para *E. coli* y *S. cerevisiae*. En la figura 2, se muestran algunos elementos del vector pYES6 (panel A), así como la secuencia nucleotídica del sitio múltiple de clonación (panel B).

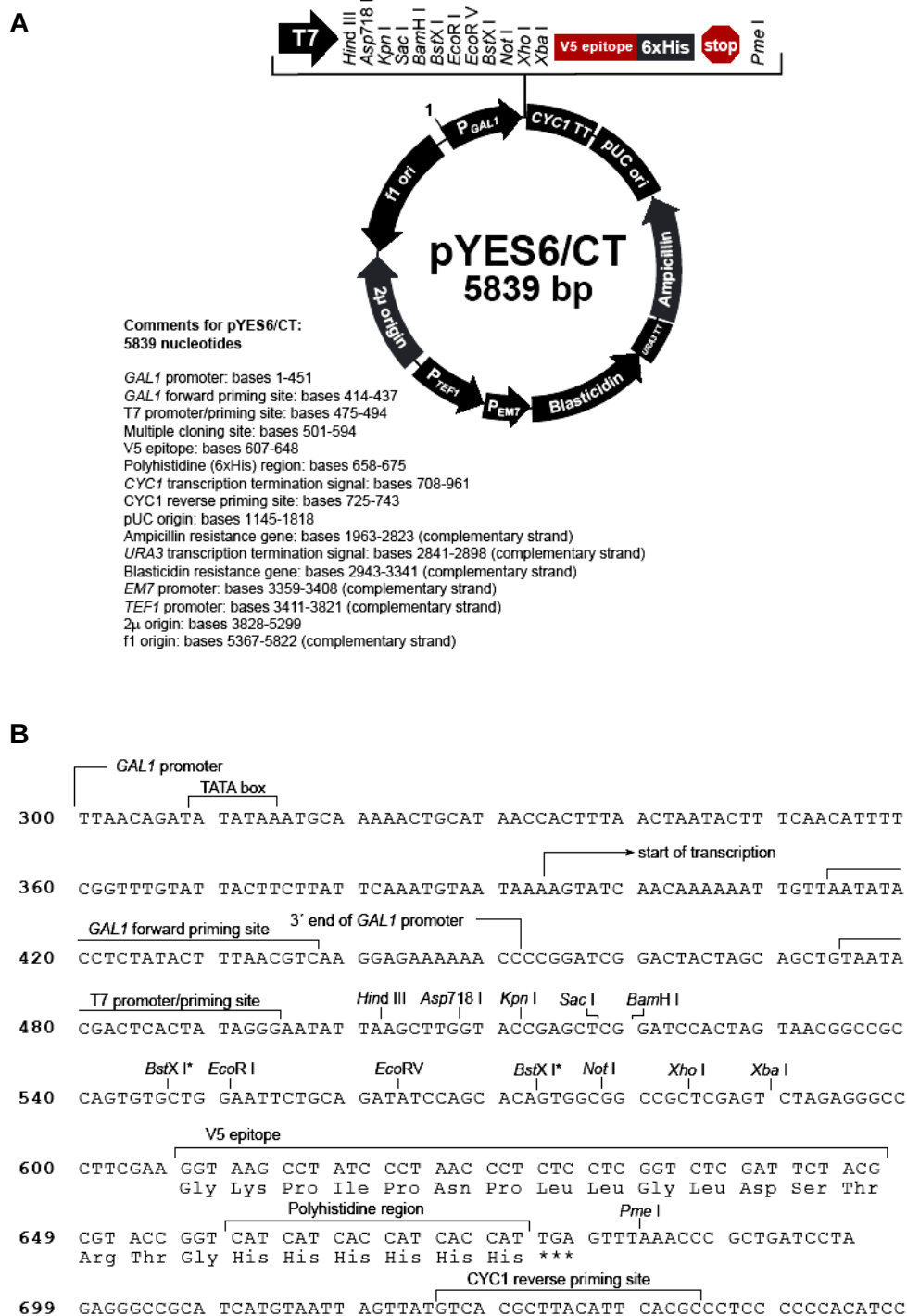


Figura 2. Características del vector de expresión heteróloga para levadura pYES6.

Panel A: mapa resumido de los elementos del vector pYES6.

Panel B: diagrama de la secuencia del sitio múltiple de clonación del vector pYES6.

Fuente: www.invitrogen.com

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Reactivos.

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Genosys (The Woodlands, TX). El vector pYES6, la *Taq* DNA polimerasa y la T4 DNA ligasa fueron de Invitrogen (Carlsbad, CA), la mezcla de desoxiribonucleótidos trifosfato, (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) fueron de Gibco-Invitrogen (Carlsbad, CA). Las enzimas de restricción *Hind* III y *Xho* I fueron de New England Biolabs (Beverly, MA). La SAP (fosfatasa alcalina de camarón) fue de MBI Fermentas (Hanover, MD). El sistema de purificación de DNA fue adquirido de Qiagen (Valencia, CA). Los demás reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado de biología molecular de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La cepa de *E. coli* JM109 fue de Promega (Madison, WI). Los medios de cultivo fueron de Difco (Detroit, MI).

3.2 Diseño de Oligonucleótidos.

Se diseñó un par de oligonucleótidos específicos para *CDA1* y otro para *CDA2* en base a las secuencias nucleotídicas depositadas en la base de datos del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* (*CDA1*: YLR307W; *CDA2*: YLR308W). El diseño de los oligonucleótidos se realizó siguiendo las consideraciones para clonación incluidas en el manual de uso del vector (Invitrogen, Carlsbad, CA), de manera tal, que los productos amplificados por PCR llevaran una secuencia consenso de la levadura necesaria para la adecuada iniciación de la traducción. Además, se

eliminó el codón de terminación con la finalidad de que los genes clonados, una vez introducidos en levaduras, se expresaran como proteínas de fusión con una etiqueta de polihistidina (6xHis). Esta adecuación codifica para un dominio de unión a metales que facilita la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía por afinidad a metales (*IMAC*, por sus siglas en inglés). A los oligonucleótidos se añadieron los sitios de restricción *Hind* III y *Xho* I de tal manera que se encuentren en los extremos de los genes y facilitar la unión al vector por clonación direccional; además, estos sitios se incluyen en el sitio múltiple de clonación del vector pYES6.

Los oligonucleótidos se recibieron liofilizados y se resuspendió cada uno en una cantidad de agua bidestilada estéril necesaria para obtener una concentración de 100 pmol/ μ L (100 μ M). Posteriormente se preparó una alícuota de trabajo de cada oligonucleótido tomando 50 μ L de cada solución y llevando a 100 μ l con agua bidestilada estéril para una concentración final de 50 μ M.

3.3 Amplificación de los Genes *CDA1* y *CDA2*.

Los fragmentos de DNA que contienen las regiones codificantes para *CDA1* y *CDA2* se amplificaron por PCR a partir de DNA genómico de *Saccharomyces cerevisiae*, proporcionado por la Dra. Islas-Osuna (Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, CIAD). Se utilizó una *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA) de alta fidelidad para disminuir la probabilidad de introducir algún error en la secuencia durante la amplificación por PCR. Las mezclas de reacción utilizadas para la amplificación de *CDA1* y *CDA2* se resumen en las Tablas 2 y 3, respectivamente.

Las reacciones de PCR de 50 μ L se prepararon por separado utilizando una mezcla 200 μ M de dNTPs, 1.5 μ M de $MgCl_2$, buffer de reacción 10X que contiene 200 μ M Tris-HCl, 500 μ M KCl. A éstas se añadió 1 μ g de DNA genómico de *S.*

cerevisiae, 50 pmol de cada oligonucleótido y 1.25 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para amplificar *CDA1* se utilizaron los oligonucleótidos CDA1ext-Fw y CDA1ext-Rv; a su vez, para la amplificación de *CDA2* se utilizaron los iniciadores CDA2ext-Fw y CDA2ext-Rv. El volumen restante se ajustó con agua destilada desionizada y estéril. Se aplicó una leve agitación para mezclar los contenidos.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador DNA ENGINE PTC-200 (MJ Research, Watertown, MA) utilizando dos bloques separados. El programa para amplificar *CDA1* difiere del programa para amplificar *CDA2* en la temperatura de alineación de los oligonucleótidos al templado, siendo el último de menor astringencia. Las condiciones de amplificación se muestran en la figura 3. Los productos esperados de aprox. 850 bp se identificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Tabla 2. Composición de la mezcla de reacción de PCR para amplificar *CDA1*.

Componentes	Volumen (μ L)	Concentración final
Agua estéril	39.25	
Buffer 10x	5.0	1x
dNTPs 10 mM	1.0	200 μ M
50 mM $MgCl_2$	1.5	1.5 mM
CDA1ext-Fw 50 μ M	1.0	1 μ M
CDA1ext-Rv 50 μ M	1.0	1 μ M
DNA templado 1 μ g/ μ L	1.0	1 μ g
<i>Taq</i> DNA pol 5 U/ μ L	0.25	1.25 U
Volumen total	50.0	

Tabla 3. Composición de la mezcla de reacción de PCR para amplificar *CDA2*.

Componentes	Volumen (μ L)	Concentración final
Agua estéril	39.25	
Buffer 10x	5.0	1x
dNTPs 10 mM	1.0	200 μ M
50 mM $MgCl_2$	1.5	1.5 mM
CDA2ext-Fw 50 μ M	1.0	1 μ M
CDA2ext-Rv 50 μ M	1.0	1 μ M
DNA templado 1 μ g/ μ L	1.0	1 μ g
<i>Taq</i> DNA pol 5 U/ μ L	0.25	1.25 U
Volumen total	50.0	

CDA1		CDA2	
94°C por 3 minutos		94°C por 3 minutos	
94°C por 30 segundos		94°C por 30 segundos	
65°C por 30 segundos	26 ciclos	55°C por 30 segundos	
68°C por 1 minuto		68°C por 1 minuto	
68°C por 7 minutos		68°C por 7 minutos	
4°C indefinidamente		4°C indefinidamente	
Fin		Fin	

Figura 3. Condiciones de amplificación por PCR para *CDA1* y *CDA2*.

3.4 Electroforesis en Gel de Agarosa.

Se disolvió agarosa (Sigma) a una concentración del 1% en buffer TAE (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA) calentando en un horno de microondas hasta su completa disolución. Se dejó enfriar hasta una temperatura aproximada de 50°C y se vació sobre un molde con un peine formador de pozos (Bio-Rad, Hercules, CA). Una vez polimerizado el gel, se transfirió a una cámara de electroforesis Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, Hercules, CA) conteniendo buffer TAE. Se mezclaron las muestras con buffer de carga 6x (30% glicerol, 0.25% azul de bromofenol y 0.25% de xilén-cianol), se cargaron dentro de los pozos y se corrió el gel a 75 V constantes. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio a concentración de 1 µg/mL durante un minuto y desteñidos en agua bidestilada durante 10 min.

El DNA se observó en el gel utilizando un transiluminador de luz ultravioleta (Gibco BRL) a una longitud de 302 nm con un tiempo de exposición de 4 segundos. La imagen fue capturada con un sistema de fotodocumentación digital Kodak EDAS 120. Originalmente, las fotografías presentan bandas blancas en un fondo negro, sin embargo, se invirtieron los colores para facilitar su visualización observándose las bandas oscuras sobre un fondo claro.

3.5 Purificación y Cuantificación de DNA.

Los pasos de purificación de DNA se llevaron a cabo mediante el sistema QIAquick (Qiagen, Valencia, CA). Este sistema utiliza la fuerza centrífuga para hacer pasar una muestra con DNA a través de columnas empacadas con membranas de sílica-gel. El DNA se adsorbe a la membrana de sílica-gel, en presencia de altas concentraciones de sales, mientras los contaminantes pasan a través de la columna. Una vez lavada la muestra, el DNA se eluye con buffer Tris o agua bidestilada estéril. Este sistema es utilizado para purificar DNA en solución o en geles de agarosa.

La muestra se mezcló con cinco volúmenes de buffer de captura con alta composición de sales, y se transfirió a un dispositivo que contiene la columna de silica-gel acoplado a un microtubo para la recolección del líquido que pasa a través del dispositivo. Se centrifugó a 13,000 rpm durante un minuto y se descartó el líquido recolectado. Se añadieron 750 μL de buffer de lavado (que contiene etanol) al dispositivo y se centrifugó nuevamente descartando el líquido en el tubo de recolección. Para eluir se transfirió el dispositivo a un microtubo estéril y se añadieron 30 μL de agua bidestilada estéril en el centro de la columna, dejándole reposar durante un minuto antes de centrifugar. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su utilización.

La concentración de DNA fue determinada por espectrofotometría de absorción de luz ultravioleta a longitud de onda de 260 nm, utilizando un espectrofotómetro Cary 50 Bio (Varian, Palo Alto, CA). Para estimar la pureza de las muestras de DNA se comparó la relación de absorbancia a 260 y 280 nm, ya que a 280 nm se determina la cantidad de proteína. Tomando un factor de dilución de 250 (f.d.), la concentración de DNA en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ está determinada por la ecuación:

$$\text{Concentración de DNA (}\mu\text{g}/\mu\text{L)} = \frac{A_{260} \times 50 \times \text{f.d.}}{1000}$$

3.6 Digestión de DNA con Enzimas de Restricción.

Los productos de PCR purificados y el vector de expresión se llevaron a una digestión doble con las enzimas de restricción *Hind* III y *Xho* I (New England Biolabs, Beverly, MA). Estas enzimas generan extremos cohesivos en cada cadena en la secuencia específica de DNA que reconocen y al utilizar dos enzimas diferentes se favorece que la entrada del inserto en la orientación adecuada.

Se digirieron 2 μg de cada DNA en reacciones separadas de 50 μL en buffer de reacción (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 1mM DTT y 100 $\mu\text{g/mL}$ seroalbúmina de bovino[SAB]), se utilizaron 10 U de cada enzima para cada reacción y se ajustó el volumen con agua desionizada estéril. Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C en baño de agua durante dos horas. En la tabla 4 se resumen los componentes de las reacciones de digestión. Posteriormente, las digestiones se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, y el DNA de interés se purificó usando el sistema QIAquick. Se determinó concentración de DNA como se describió anteriormente.

Tabla 4. Composición de las reacciones para la digestión enzimática doble con *Hind* III y *Xho* I del vector y los productos de PCR de *CDA1* y *CDA2*.

Componentes	CDA1 (μL)	CDA2 (μL)	pYES6 (μL)
DNA	21.6	21.3	4.3
Buffer reacción #2 10x	5.0	5.0	5.0
SAB* 100x	0.5	0.5	0.5
<i>Hind</i> III 20 U/ μL	0.5	0.5	0.5
<i>Xho</i> I 20 U/ μL	0.5	0.5	0.5
Agua	21.9	22.2	39.2
Volumen final	50.0	50.0	50.0

*SAB: seroalbúmina de bovino

La desfosforilación enzimática del vector se utiliza como una alternativa para evitar la recircularización del vector sin recombinarse, siendo la fosfatasa alcalina quien cataliza la remoción de los grupos fosfato en los extremo 5' del DNA. Puesto que para unir dos extremos de DNA, la DNA ligasa necesita por lo menos de un grupo fosfato en alguno de los dos extremos 5' a unir, por tanto, la ausencia de grupos fosfato en los extremos 5' del vector inhibe su recircularización. Para

esta reacción se utilizó el vector pYES6 digerido obtenido en el paso anterior utilizando la enzima SAP (MBI Fermentas, Hanover, MD). En la tabla 5 se muestran los componentes de la reacción de desfosforilación. Se añadieron 5 μL de buffer de reacción 10x (100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl_2 y 1 mg/mL SAB) y 5 U de enzima y el volumen se ajustó a 50 μL con agua destilada desionizada estéril. La reacción se incubó durante una hora a 37°C en baño de agua. Una vez finalizada la reacción el vector digerido y desfosforilado se purificó y se determinó su concentración como se describió anteriormente.

Tabla 5. Condiciones de reacción para la desfosforilación enzimática del vector pYES6 digerido utilizando SAP.

Componentes	(μL)
DNA (pYES6)	25.0
Buffer de reacción 10x	5.0
SAP 1 U/ μL	5.0
agua	15.0
Volumen final	50.0

3.7 Obtención de Plásmidos Recombinantes.

Como vector para la clonación se utilizó el plásmido de expresión inducible pYES6 (Invitrogen) de 5.8 Kb, que regula la expresión por medio del promotor *GAL1*. Se utilizó la clonación direccional dado a que las digestiones se hicieron con dos enzimas diferentes, lo cual asegura que el inserto se incorporará al vector en la orientación adecuada por la compatibilidad entre los extremos cohesivos. Para unir los extremos cohesivos del inserto y del vector se utilizó la DNA ligasa del fago T4 (Invitrogen). La ligación se verificó mediante electroforesis en gel de

agarosa de una alícuota de cada reacción, se comparó con una alícuota de la misma muestra pero digerida con *Xho* I.

Las reacciones de ligación se prepararon utilizando las cantidades necesarias de cada muestra para tener relaciones molares de inserto:vector a 1:1 y 3:1. Para esto se tomó como base la concentración de DNA obtenida en cada muestra y los tamaños de los insertos (~0.9 Kb) y del vector (5.8 Kb). El vector tiene un tamaño 6.4 veces mayor que los insertos, es decir, 1 µg de cada inserto y 6.4 µg del vector poseen aproximadamente la misma cantidad de moléculas de DNA.

Para la relación inserto:vector 1:1 se tomaron 50 ng de inserto digerido y 320 ng de vector digerido y desfosforilado. Así mismo, para la relación 3:1 se tomaron 50 ng de inserto digerido y 106 ng de vector digerido y desfosforilado. Se agregó a cada reacción la cantidad correspondiente de agua destilada desionizada estéril para un volumen final de 20 µL y se mezcló suavemente para facilitar la homogenización de los fragmentos de DNA. Las mezclas se calentaron a 45°C durante cinco minutos para favorecer la formación de los puentes de hidrógeno entre los extremos cohesivos. Posteriormente, se adicionó a cada microtubo 4 µL del buffer de reacción 5x, compuesto por 250 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% (p/v) polietilén glicol 8000. Se utilizó una unidad de T4 DNA ligasa para cada reacción. Las reacciones se incubaron a 21°C durante una hora, después de este tiempo se continuó la incubación a 16°C durante toda la noche (aprox. 10 hr). En las Tablas 6 y 7 se resumen los componentes de las reacciones de ligación del vector y los insertos a diferentes relaciones molares.

Tabla 6. Componentes de las reacciones de ligación de *CDA1* a diferentes relaciones molares.

Componentes	Relación 1:1 (μL)	Relación 1:3 (μL)
Buffer reacción 5x	4.00	4.00
<i>CDA1</i> digerido	0.75	0.75
pYES6 digerido	7.31	2.42
T4 DNA ligasa	1.00	1.00
Agua	6.94	11.83
Volumen final	20.00	20.00

Tabla 7. Componentes de las reacciones de ligación de *CDA2* a diferentes relaciones molares.

Componentes	Relación 1:1 (μL)	Relación 1:3 (μL)
Buffer reacción 5x	4.00	4.00
<i>CDA2</i> digerido	1.00	1.00
pYES6 digerido	7.31	2.42
T4 DNA ligasa	1.00	1.00
Agua	6.69	11.58
Volumen final	20.00	20.00

3.8 Transformación en *E. coli*.

Una vez confirmada la obtención de los plásmidos recombinantes se procedió a transformar en células competentes de *E. coli* JM109 (Promega), para esto se aplicaron los protocolos de transformación química y por electroporación. Para la electroporación se utilizó un Gene Pulser (Bio-Rad, Hercules, CA). Para este método es necesario limpiar el DNA de sales ya que con más de 10 mM de sales dentro de la celda, se forma un arco eléctrico que destruye las bacterias. Para transformar con células químicamente competentes es suficiente con poner en contacto el DNA con las bacterias y aplicar un choque térmico para permeabilizar temporalmente las membranas y que ocurra la transformación.

Se prepararon células electrocompetentes frescas para la electroporación, para lo cual se incubó la cepa de *E. coli* en caldo LB a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (OD) de 0.6 a 600 nm de longitud de onda. Las células se centrifugaron a 1,500 x *g* a 4°C durante 20 minutos y se lavaron con agua destilada desionizada estéril y enfriada. Se repitió el lavado un par de veces más. Finalmente se resuspendió en un volumen de agua estéril MilliQ fría, igual al volumen de pellet celular. Se utilizaron alícuotas de 40 µL de esta suspensión para cada transformación.

Se utilizaron 2 µL y 5 µL de reacción de ligación para cada inserto en reacciones separadas. Después de mezclar el DNA y las células, se incubó en baño de hielo durante 10 minutos y se transfirieron a celdas pre-enfriadas para electroporación. La electroporación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 2.5 KV, 25 µF y 200 ohms. Las células transformadas se estabilizaron en medio SOC (0.5% extracto de levadura, 2% triptona, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosa) y posteriormente se transfirieron a placas de agar LB (2% triptona, 1% extracto de levadura, 1% NaCl, 3% agar) conteniendo 100 µg/ml de ampicilina como marcador de selección de transformantes. Las placas se incubaron a 37°C por 24 a 48 horas.

Para la transformación de las cepas de *E. coli* JM109 químicamente competentes se añadieron 4 μL de cada reacción de ligación a 25-50 μL de células congeladas, se mezcló suavemente y se descongeló en baño de hielo durante 10 minutos. Se aplicó un choque térmico a 42°C durante 30 segundos y sin agitar se transfirió a hielo por otros cinco minutos. Se añadieron 200 μL de medio SOC y se incubaron a 37°C durante 30 minutos a 200 rpm. Posteriormente, se transfirieron a placas de petri con agar LB conteniendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina y se incubaron a 37°C por 24 a 48 horas.

3.9 Análisis de Células Transformadas Positivas.

Para seleccionar las colonias transformadas de las no transformadas del total de las colonias obtenidas en la placa fue necesario hacer la búsqueda de la presencia del inserto. Un método sencillo, rápido y confiable es el PCR de colonias. Con esta técnica, si una célula contiene el DNA de interés, éste será amplificado por PCR utilizando los oligonucleótidos específicos.

De las colonias obtenidas se eligieron las que presentaron mayor diámetro para la búsqueda. Se tocó la colonia con el extremo de un palillo estéril y se dispensó en un microtubo con 15 μL de agua destilada desionizada estéril y con el mismo palillo se inoculó en otra placa con agar LB ampicilina para su réplica. La suspensión bacteriana se calentó a 94°C durante 10 minutos para lograr la lisis de las células. Posteriormente se agregó la cantidad necesaria de buffer 10x, dNTPs, MgCl_2 , los iniciadores correspondientes, la *Taq* DNA polimerasa y la cantidad restante de agua para completar un volumen de reacción de 25 μL . Se seleccionaron y probaron 23 muestras distintas de las totales obtenidas para cada inserto en los programas descritos anteriormente para la amplificación de los genes. Una vez completados los ciclos, se cargaron las muestras en un gel de agarosa para el análisis de los resultados.

3.10 Aislamiento de DNA plasmídico.

La amplificación del DNA plasmídico recombinante de interés, finalmente se llevó a cabo por las células de *E. coli*. Al incubar las bacterias transformadas con el DNA de interés, éstas se dividen y a la vez replican el plásmido recombinante. Posteriormente, es posible extraer el DNA plasmídico y así obtener cantidades suficientes de éste para su posterior análisis y uso.

Del total de las muestras analizadas positivas se eligieron aquellas que al ser analizadas en el gel revelaban bandas más claras y abundantes, con la finalidad de hacer el aislamiento del DNA plasmídico recombinante mediante el método de hidrólisis alcalina descrito por Sambrook *et al* (1989). Para ello, las colonias seleccionadas se inocularon en 2 mL de caldo LB con ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 37°C y 200 rpm. Las células se recuperaron por centrifugación a 11,000 rpm por un minuto. El pellet obtenido se resuspendió en 100 µL de buffer 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA y se añadieron 30 µg de RNasa A y 100 µL de buffer de lisis 200 mM NaOH, 1% SDS recién preparado. Se mezcló suavemente y se mantuvo a temperatura ambiente por 10 minutos.

Posteriormente se añadió a cada muestra 120 µL de buffer de neutralización 3 M de acetato de potasio pH 5.5 y se mezcló suavemente durante tres minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó nuevamente para remover restos celulares y los sobrenadantes fueron transferidos a microtubos estériles. El DNA plasmídico se precipitó con isopropanol, mezclando constantemente durante un minuto y se centrifugó por 30 segundos a 11,000 rpm. El sobrenadante se desechó y el DNA precipitado se lavó con 500 µL de etanol frío al 70%. Se precipitó nuevamente por centrifugación durante 30 segundos y se eliminó el sobrenadante. El etanol restante se eliminó en un concentrador de vacío DNA 110 Speed Vac (Savant) durante 5 a 10 minutos. Las muestras se resuspendieron en 50 µL de agua destilada desionizada estéril y se verificó la presencia del plásmido en gel de agarosa.

3.11 Secuenciación de los Genes Clonados.

Se seleccionó una muestra de los DNA recombinantes, obtenidos de cada inserto, para su secuenciación. La secuenciación se llevó a cabo por el método de terminación de cadena por dideoxidos (Sanger *et al.*, 1977) en el Laboratorio de Sistemática y Evolución Molecular de la Universidad de Arizona (Tucson, AZ). Las muestras fueron primeramente purificadas por el sistema QIAquick y posteriormente se les determinó concentración de DNA. Se tomaron alícuotas de las clonaciones y se secuenciaron, se utilizaron los oligonucleótidos del promotor del fago T7 en dirección sentido y el oligonucleótido específico de cada gen en sentido reverso. Las secuencias nucleotídicas y las deducidas de aminoácidos obtenidas se compararon con las secuencias depositadas en bases de datos como el GenBank utilizando el algoritmo BLASTx disponible en internet (Altschul *et al.*, 1990) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Este algoritmo busca y compara en la base de datos del GenBank secuencias de aminoácidos que presenten similitud a la secuencia de aminoácidos deducida a partir de una de nucleótidos que se envía.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Diseño de Oligonucleótidos Para Amplificación por PCR.

Los oligonucleótidos para amplificar los genes por PCR se diseñaron a partir de las secuencias nucleotídicas de los genes *CDA1* y *CDA2* de *S. cerevisiae* depositadas en la base de datos del genoma de la levadura (*CDA1*: YLR307W; *CDA2*: YLR308W) (*Saccharomyces* Genome Database) (Stanford University, CA).

En el diseño de los oligonucleótidos, se incluyeron secuencias para el reconocimiento y corte de las enzimas de restricción *Hind* III y *Xho* I, así como una secuencia consenso para favorecer la traducción de la proteína. El sitio de corte *Hind* III (AAGCTT) se agregó a los oligonucleótidos que amplifican en la dirección sentido (*Forward*, Fw), mientras que el sitio de *Xho* I (CTCGAG) se incorporó en los oligonucleótidos antisentido (*Reverse*, Rv). De esta manera, los productos de PCR se encuentran flanqueados por el sitio *Hind* III en el extremo 5' y por el sitio *Xho* I en el extremo 3'. La secuencia consenso (AAAA) se adicionó a los oligonucleótidos sentido corriente arriba (*upstream*) antes del codón de iniciación (ATG).

A su vez, en los oligonucleótidos antisentido se eliminó el codón de terminación natural del gen con la finalidad de que, una vez introducido el plásmido recombinante en la levadura, la expresión de ambos genes produzca una proteína de fusión con una etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo terminal. Esta etiqueta favorecerá la identificación y purificación de la proteína una vez que se sobreexpresa el gen en las células de levadura.

Por otra parte, fue necesario agregar un triplete de bases a los extremos de los productos amplificados, ya que si los sitios de restricción se encuentran en los extremos de los fragmentos a digerir, la unión de la enzima al DNA y su posterior hidrólisis no es muy efectiva. Esto resulta en un impedimento de la ligación del inserto al vector. Estas bases extras se incorporaron a los oligonucleótidos en los extremos 5'. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar *CDA1* y *CDA2*, y algunas de sus características se resumen en la Tabla 2.

La secuencia nucleotídica de *CDA1* en el extremo 5' de la región codificante tomada como base para el diseño del oligonucleótido sentido fue:

S N G S T A L
5'-TCA AAT GGG AGT ACC GCA TTG-3'

Por lo que el oligonucleótido sentido CDA1ext-Fw resultó en la secuencia:

5' CCC **AAGCTT** AAAAA ATG TCT TCA AAT GGG AGT ACC GCA TTG 3'
Hind III

El oligonucleótido antisentido se diseñó en base a la secuencia del extremo 3' del gen de *CDA1*, la cual es:

D T D Y I E R Y D -
5'-GAT ACA GAC TAC ATC GAA CGC TAC GAC TAG-3'

Sin embargo, el oligonucleótido antisentido corresponde a la secuencia reverso complemento del extremo 3' de la región a amplificar; por lo que el oligonucleótido CDA1ext-Rv, resultó en la siguiente secuencia:

5' CCG **CTCGAG** GTC GTA GCG TTC GAT GTA GTC TGT ATC 3'
Xho I

De igual manera, se tomó como base la secuencia nucleotídica en el extremo 5' de *CDA2* para el diseño del oligonucleótido sentido, ésta y su traducción a secuencia de aminoácidos es:

E A N R E D L K
5'-GAA GCT AAT AGG GAA GAT TTA AAG-3'

Por lo que el oligonucleótido CDA2ext-Fw quedó con la secuencia:

5' CCCAAGCTTAAAA ATG TCT GAA GCT AAT AGG GAA GAT TTA AAG 3'
Hind III

A su vez, el oligonucleótido antisentido para *CDA2* se basó en la siguiente secuencia que corresponde al extremo 3' de la región de *CDA2*:

D Y I K E F L S
5'-GAT TAC ATA AAA GAA TTC TTG TCC-3'

El oligonucleótido resultante, CDA2ext-Rv es:

5' CCGCTCGAG GGA CAA GAA TTC TTT TAT GTA ATC 3'
Xho I

Tabla 8. Secuencia y propiedades de los oligonucleótidos para amplificar *CDA1* y *CDA2*.

Nombre	Secuencia	Núm. bases	Temp. Fusión	Peso molecular	% GC
CDA1ext-Fw	5' CCCAAGCTTAAAAATGTCTTCAAATGGGAGTACCGCATTG 3'	40	79.7°C	12287.8	42.50
CDA1ext-Rv	5' CCGCTCGAGGTCGTAGCGTTCGATGTAGTCTGTATC 3'	36	80.0°C	11073.9	55.56
CDA2ext-Fw	5' CCCAAGCTTAAAAATGTCTGAAGCTAATAGGGAAGATTTAAAG 3'	43	74.1°C	13315.5	34.88
CDA2ext-Rv	5' CCGCTCGAGGGACAAGAATTCTTTATGTAATC 3'	33	73.6°C	10127.4	42.42

4.2 Amplificación por PCR de *CDA1* y *CDA2*.

Una vez finalizada la reacción de PCR, las muestras se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Como se muestra en la figura 4, en los carriles 2 y 3 se aprecia la presencia de las bandas correspondientes a la amplificación de *CDA1* y *CDA2*. Las bandas se esperaban a una altura de aproximadamente 0.9 Kb.

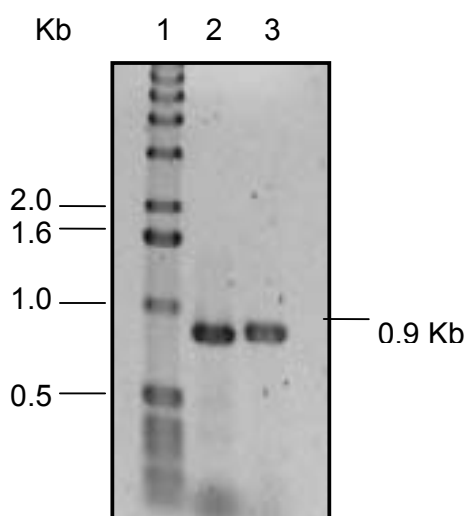


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la amplificación por PCR de *CDA1* y *CDA2*.

Carril 1: Estándar de peso molecular “1Kb DNA ladder” (Invitrogen); carril 2: amplificación *CDA1*; carril 3: amplificación de *CDA2*.

4.3 Clonación de los productos de PCR en el vector pYES6.

Los productos de PCR se purificaron por el método QIAquick y posteriormente se prepararon las reacciones de digestión. Una vez finalizadas las digestiones, las muestras se purificaron por el método de QIAquick, y se verificó la presencia del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, como se aprecia en la

figura 5. El vector en su forma circular, migra de una manera más rápida que su correspondiente linearizado, lo que se refleja en la diferencia de migración de las bandas en los carriles 2 y 3 de la fotografía. El vector digerido se aprecia a una altura aproximada de 5.8 Kb, que corresponde al tamaño del vector reportado por el fabricante. Respecto a la digestión de los productos de la amplificación por PCR, no es posible identificar diferencia de tamaño entre el digerido y el no digerido, debido a que las enzimas de restricción remueven solamente pocas bases a los extremos de cada fragmento.

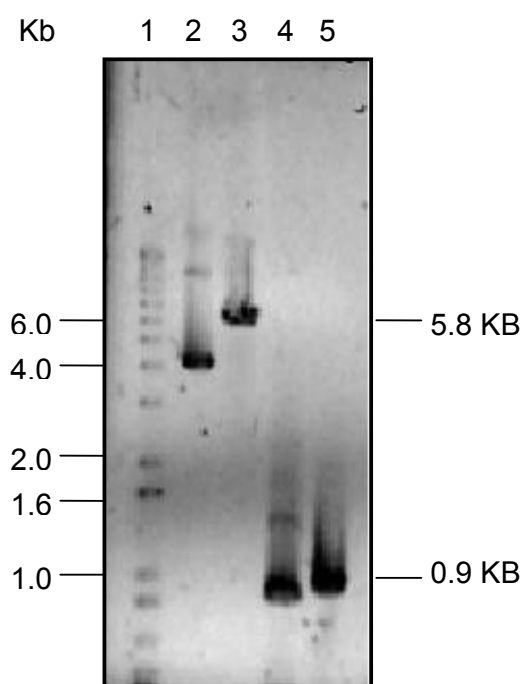


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la digestión enzimática con *Hind* III y *Xho* I del vector pYES6 y de los productos de PCR *CDA1* y *CDA2*.

Carril 1: estándar de peso molecular "1Kb plus DNA ladder" (Invitrogen); carril 2: pYES6 en su forma circular; carril 3: pYES6 linearizado digerido; carril 4: producto de PCR de amplificación de *CDA1* digerido; carril 5: producto de PCR de amplificación de *CDA2* digerido.

Posteriormente a la digestión del vector y de los insertos, se prepararon las reacciones de ligación para obtener los plásmidos recombinantes. Una vez finalizadas las ligaciones, se tomó una alícuota de 1 μL de cada reacción y se llevó a digestión enzimática con una enzima de restricción, en este caso se utilizó la enzima *Xho* I. Esta digestión sencilla se realizó para facilitar el análisis electroforético de las ligaciones. De esta manera, el plásmido recombinante digerido con *Xho* I debe observarse aproximadamente de 6.7 Kb; mientras que en su forma circular, este plásmido se puede presentar en una banda que migra más rápido y que posiblemente se encuentre cercana a la que presenta el plásmido sin recombinarse linearizado (5.8 Kb).

Para esto, se cargaron 2.5 μL de estándar de peso molecular para DNA, 1.5 μL del vector circular y del vector linearizado, 1.0 μL de la reacción de ligación, y 10 μL de cada digestión en gel de agarosa para la electroforesis. En la figura 6 se muestran los resultados, en el carril 3 se observa la banda correspondiente al plásmido linearizado (5.8 Kb), en los carriles 4, 6, 8 y 10 se muestran las reacciones de ligación, y en los carriles 5, 7, 9 y 11 se presentan las digestiones simples correspondientes a cada reacción de ligación. Como era de esperarse, en las digestiones se observan claramente dos bandas, una superior cercana a 6.7Kb, y otra inferior que correspondería a la banda de 5.7 Kb. La banda superior indica la formación de las moléculas recombinantes esperadas en su forma linearizada.

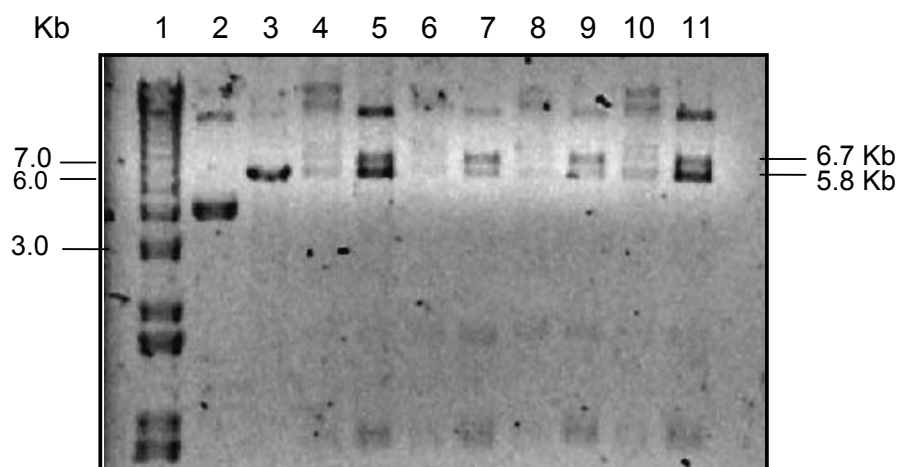


Figura 6. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de las reacciones de ligación de pYES6-CDA1, y pYES6-CDA2.

Carril 1: estándar de peso molecular “1 Kb plus DNA ladder”; carril 2: pYES6; carril 3: pYES6 linearizado; carril 4: reacción de ligación pYES6-CDA1 relación 1:1; carril 5: digestión con *Xho* I de la reacción de ligación pYES6-CDA1 1:1; carril 6: reacción de ligación pYES6-CDA1 relación 3:1; carril 7: digestión de pYES6-CDA1 3:1; carril 8: reacción de ligación pYES6-CDA2 relación 1:1; carril 9: digestión de pYES6-CDA2 1:1; carril 10: ligación pYES6-CDA2 relación 3:1; carril 11: digestión de pYES6-CDA2 3:1.

Con los productos de las reacciones de ligación se transformaron bacterias de *E. coli* JM109 químicamente competentes. De cada reacción de ligación se inocularon cuatro placas de agar LB con ampicilina, las cantidades utilizadas para cada placa fueron 30, 50, 100 μ L, y el resto. Después de 24 horas de incubación a 37°C se observó la presencia de colonias blancas, grandes y de bordes no lisos. Se obtuvieron 41 colonias para las placas de la transformación con pYES6-CDA1 y 25 colonias para las transformadas con pYES6-CDA2. También se presentó crecimiento de colonias más pequeñas como contaminación, posiblemente por degradación del antibiótico.

Se seleccionaron 23 colonias transformadas con pYES6-CDA1 y 23 colonias para las transformadas con pYES6-CDA2 para hacer la búsqueda de clones positivos mediante la técnica del PCR de colonias. Esta amplificación se realizó con los oligonucleótidos específicos para cada inserto utilizando un lisado de cada colonia

seleccionada como templado. En esta ocasión no se utilizó una DNA polimerasa de alta fidelidad puesto que solo se trata de una prueba cualitativa para verificar la presencia del DNA recombinante. Las colonias participantes en la búsqueda se identificaron por numeración, tanto en la placa original como en la réplica, con la finalidad de facilitar su manipulación subsiguiente.

Los resultados de la búsqueda se analizaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1% y se muestran en la figura 7. Los positivos posibles presentan una banda cercana a 0.9 Kb producto de la amplificación por PCR. De las 23 colonias analizadas para pYES6-CDA1, 11 colonias resultaron positivas, posiblemente conteniendo el inserto; para el caso de pYES6-CDA2 fueron 18 posibles positivos de los 23 analizados.

Del total de los positivos posibles, se seleccionaron cuatro colonias para la clonación y extracción del DNA plasmídico recombinante. Se tomaron aquellas colonias en las cuales el análisis fotográfico revelaba bandas más intensas y con menos barrido. Éstas fueron la número 1, 3, 14 y 16 para el caso de pYES6-CDA1; y la número 15, 17, 18 y 21 para pYES6-CDA2. En la figura 8 se muestra el DNA plasmídico obtenido a partir de las muestras seleccionadas. En el carril número dos se muestra el vector pYES6 original y en los carriles del 3 al 10 se observan las bandas de los DNA plasmídicos recombinantes obtenidos. Del total de las muestras obtenidas se optó por la número 3 para pYES6-CDA1 y la número 17 para pYES6-CDA2 (carriles 4 y 8, respectivamente) para los ensayos posteriores. Estas muestras se purificaron y se les determinó concentración de DNA. Las concentraciones obtenidas fueron de 218.7 ng/ μ L para pYES6-CDA1 y de 216.6 ng/ μ L para pYES6-CDA2, a partir de 2 mL de cultivo de las colonias seleccionadas en medio líquido de LB ampicilina.

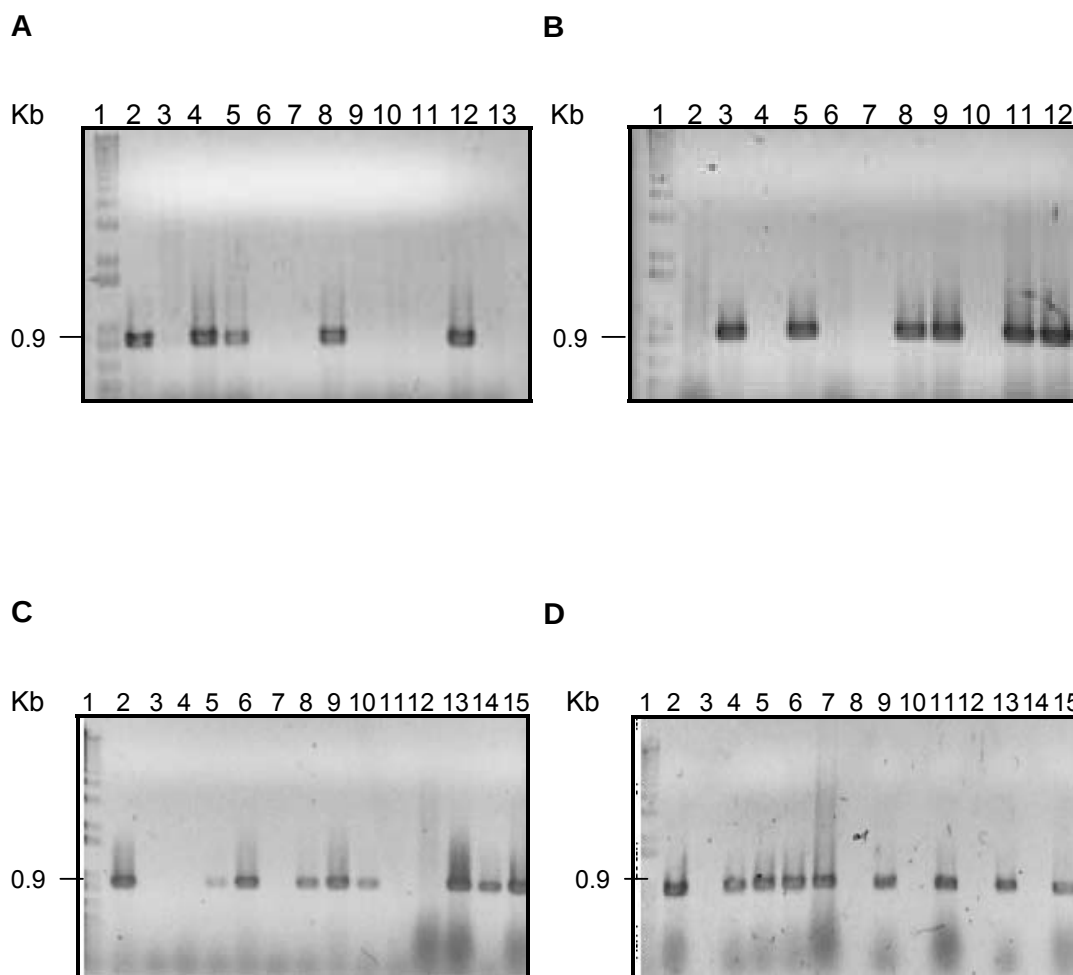


Figura 7. Análisis electroforético de los productos de la amplificación por PCR de colonias posiblemente positivos.

En A, B, C y D: carril 1: estándar de peso molecular “1 Kb plus DNA ladder”.

Panel A: carriles 2, 4, 5, 8 y 12: clones positivos que posiblemente contienen el inserto CDA1.

Panel B: carriles 3, 5, 8, 9, 11 y 12: clones positivos que posiblemente contienen el inserto CDA1

Panel C: carriles 2, 5, 6, 8, 9, 10, 13, 14 y 15: clones positivos que posiblemente contienen el inserto CDA2.

Panel D: carriles 2, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 15: clones positivos que posiblemente contienen el inserto CDA2.

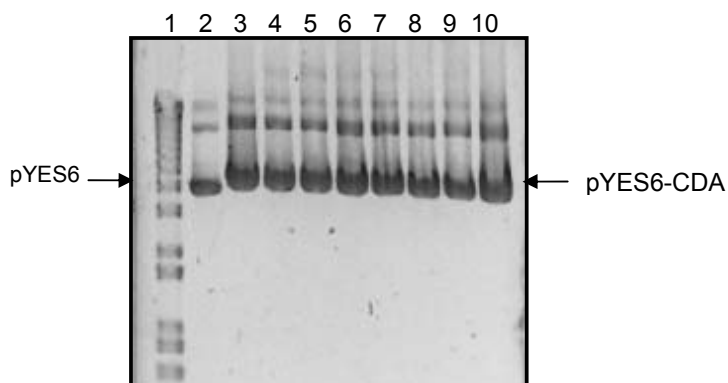


Figura 8. Análisis electroforético del aislamiento de DNA plasmídico a partir de los posibles clones del vector recombinante.

Carril 1: estándar de peso molecular “1 Kb plus DNA ladder”; carril 2: pYES6; carriles 3, 4, 5 y 6: DNA plasmídico obtenido de las colonias número 1, 3, 14 y 16 de pYES6-CDA1, respectivamente; carriles 7, 8, 9 y 10: DNA plasmídico obtenido de las colonias número 15, 17, 18 y 21 de pYES6-CDA2.

Se realizó una amplificación por PCR de las muestras seleccionadas de DNA plasmídico recombinante (carriles 4 y 8 en la figura anterior) para confirmar los resultados de la clonación. Para esto se utilizó como templado una alícuota de 1 μ L del DNA plasmídico y el oligonucleótido antisentido específico correspondiente. El oligonucleótido sentido correspondió al T7-Fw, el cual, se une a la secuencia del promotor del fago T7 que se encuentra incluida en el vector en dirección corriente arriba del sitio *Hind* III donde se añadieron los insertos. Los productos de esta amplificación, en la figura 9, comprueban la presencia del inserto en el DNA plasmídico recombinante obtenido, ya que la región amplificada concuerda con el tamaño del inserto en ambos casos (aprox. 0.9 Kb). Sin embargo, mediante la secuenciación se confirma de una manera más clara la inserción correcta del inserto al vector, y es posible verificar que el marco de lectura del gen sea el correcto para producir una proteína recombinante con la secuencia de aminoácidos deseada.

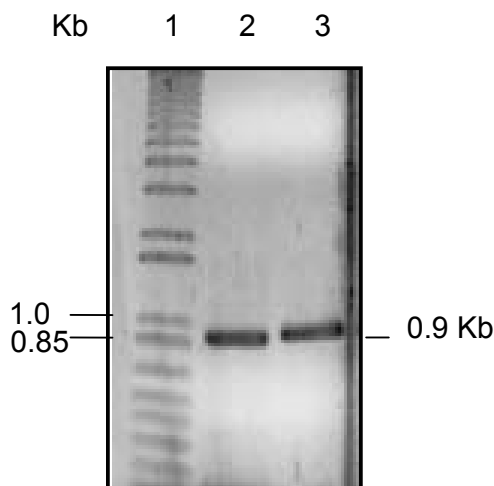


Figura 9. Productos de PCR de los plásmidos recombinantes utilizando un oligonucleótido antisentido específico y T7 Fw.

Carril 1: estándar de peso molecular “1 Kb plus DNA ladder”; carril 2: amplificación de *CDA1* a partir de pYES6-CDA1; carril 3: amplificación de *CDA2* a partir de pYES6-CDA2.

Se tomó una alícuota de 20 μ L de estos productos para secuenciar en la Universidad de Arizona (Tucson, AZ), con los oligonucleótidos T7-Fw y CDA1ext-Rv o CDA2ext-Rv, según cada caso. Utilizando éstos oligonucleótidos fue posible obtener la secuencia de la cadena codificante y de la cadena complementaria para comparar y corroborar que la secuencia era la indicada. Las secuencias presentadas en la figura 10 y 11 corresponden a las secuencias de nucleótidos de las moléculas recombinantes pYES6-CDA1 y pYES6-CDA2, comprendidas entre los oligonucleótidos mencionados y se incluye la traducción deducida a secuencia de aminoácidos.

El análisis de las secuencias para verificar que el inserto corresponde a *CDA1* o *CDA2* se desarrolló por medio del algoritmo tipo BLASTx (Altschul *et al.*, 1990) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Este algoritmo busca y compara en la base de datos del GenBank secuencias de aminoácidos que presenten similitud a la secuencia de aminoácidos deducida de una secuencia de nucleótidos que se envía.

```

1      M S S N G S T A L M G E V D M Q
1  TTAAGCTTAAAAATGTCTTCAAATGGGAGTACCGCATTGATGGGGGAAGTAGATATGCAA
    Hind III
21  T P F P E W L T E F T N L T Q W P G I D
61  ACGCCCTTTCCAGAGTGGTTAACAGAATTTACTAATCTTACACAATGGCCTGGAATTGAC

41  P P Y I P L D Y I N L T E V P E L D R Y
121 CCACCTTATATTCCGCTAGATTACATAAATCTTACTGAAGTGCCAGAATTAGATAGGTAC

61  Y P G Q C P K I S R E Q C S F D C Y N C
181 TATCCTGGCCAGTGTCCCAAAATTTCTAGAGAGCAGTGCTCATTTGACTGCTATAACTGC

81  I D V D D V T S C F K L S Q T F D D G P
241 ATCGATGTTGATGATGTAACCTTCGTGTTTCAAACCTTTCCCAAACATTTGACGACGGTCCG

101 A P A T E A L L K K L R Q R T T F F V L
301 GCCCCGGCGACAGAGGCGTTGCTCAAGAAATTGAGACAAAGAACCACTTTTTTTGTCTG

121 G I N T V N Y P D I Y E H I L E R G H L
361 GGGATAAACACTGTTAATTATCCTGATATATATGAGCATATTTTAGAGAGGGGTCATTTG

141 I G T H T W S H E F L P S L S N E E I V
421 ATGGTACACACACGTGGTCACATGAATTCTTGCCAAGTTTATCAAACGAAGAAATTGTA

161 A Q I E W S I W A M N A T G K H F P K Y
481 GCCCAAATTGAATGGTCAATTTGGGCTATGAATGCCACAGGCAAACATTTCCCAAGTAT

181 F R P P Y G A I D N R V R A I V K Q F G
541 TTTAGGCTCCATACGGTGCAATTGATAATAGGGTTAGAGCTATAGTAAAACAGTTTGGC

201 L T V V L W D L D T F D W K L I T N D D
601 CTAACGGTTGTCTTGTGGGATCTCGATACTTTTGATTGGAAATTAATCACTAATGATGAT

221 F R T E E E I L M D I N T W K G K R K G
661 TTCAGAACAGAGGAAGAAATACTTATGGACATAAATACTTGGAAGGGGAAAACGGAAAGGT

241 L I L E H D G A R R T V E V A I K I N E
721 TTGATCTTAGAGCACGATGGTGCACGAAGAACAGTTGAGGTTGCTATTTAAATCAACGAA

261 L I G S D Q L T I A E C I G D T D Y I E
781 CTTATTGGTAGTGACCAATTGACAATTGCAGAATGTATTGGTGATACAGACTACATCGAA

281 R Y D L E S R G P F E G K P I P N P L L
841 CGCTACGACCTCGAGTCTAGAGGGCCCTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTC
    Xho I
301 G L E S T R T G H H H H H H - V L X P -
901 GGTCTCGAATCTACGCGTACCGGTCATCATCACCATCACCATTGAGTTTTAANCCCTGA
    Poli-histidina

```

Figura 10. Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos del clon recombinante pYES6-CDA1.

Las regiones correspondientes a los sitios de restricción y a la cola de histidinas se indican. Los aminoácidos correspondientes a la proteína CDA1 se indican en negritas.

```

1      M S E A N R E D L K Q I D F Q F
1  TTAAGCTTAAAAATGTCTGAAGCTAATAGGGAAGATTTAAAGCAGATAGACTTTCAATTT
    Hind III
21  P V L E R A A T K T P F P D W L S A F T
61  CCTGTATTGGAAAGGGCAGCTACAAAAACGCCTTTTCCGGATTGGCTTAGTGCATTACC

41  G L K E W P G L D P P Y I P L D F I D F
121 GGGTAAAAAGAATGGCCTGGGTTAGATCCACCTTATATACCTTTAGATTTTCATTGATTTTC

61  S Q I P D Y K E Y D Q N H C D S V P R D
181 AGTCAAATTCAGATTATAAGGAATATGATCAAAACCATTGCGACAGTGTTCCAAGGGAC

81  S C S F D C H H C T E H D D V Y T C S K
241 TCGTGCTCTTTCGATTGCCATCACTGCACCGAACACGATGATGTGTACACATGTTCCAAA

101 L S Q T F D D G P S A S T T K L L D R L
301 CTTTCCAGACATTTGACGATGGTCCTTCTGCTTCCACTACTAAATTATTGGACCGGTTG

121 K H N S T F F N L G V N I V Q H P D I Y
361 AAGCATAATTCCACCTTCTTCAATTTAGGTGTCAATATAGTTCAACATCCAGATATCTAT

141 Q R M Q K E G H L I G S H T W S H V Y L
421 CAAAGAATGCAAAAGGAGGGACACTTAATCGGCTCACATACCTGGTCTCACGTATATTTG

161 P N V S N E K I I A Q I E W S I W A M N
481 CCAAATGTATCGAATGAAAAAATTATAGCTCAAATTGAATGGTCCATCTGGGCGATGAAT

181 A T G N H T P K W F R P P Y G G I D N R
541 GCTACTGGCAACCATACCCCCAAATGGTTCAGACCTCCATATGGCGGAATAGATAATAGA

201 V R A I T R Q F G L Q A V L W D H D T F
601 GTAAGAGCAATAACAAGGCAATTTGGCTTACAAGCCGTCTTATGGGATCACGATACTTTT

221 D W S L L L N D S V I T E Q E I L Q N V
661 GATTGGAGCCTCCTTCTCAATGATTCTGTGCATAACTGAACAAGAAATTCCTCAAATGTA

241 I N W N K S G T G L I L E H D S T E K T
721 ATAACTGGAACAAGTCAGGAACCGGATTAATATTAGAACACGATTCAACGGAAAAAACT

261 V D L A I K I N K L I G D D Q S T V S H
781 GTCGATCTTGCCATTAATAAATAAGTTGATAGGTGATGATCAATCAACAGTTTCTCAT

281 C V G G I D Y I K E F L S L E S R G P F
841 TGTGTCGGCGGAATTGATTACATAAAAGAATTCTTGTCCTCGAGTCTAGAGGGCCCTTC
    Xho I
301 E G K P I P N P L L G L E S T R T G H H
901 GAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGAATCTACGCGTACCGGTCATCAT

321 H H H H - V L X P -
961 CACCATCACCATTGAGTTTTAANCCCTGA
    Poli-histidina

```

Figura 11. Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos del clon recombinante pYES6-CDA2.

Las regiones correspondientes a los sitios de restricción y a la cola de histidinas se indican. Los aminoácidos correspondientes a la proteína CDA2 se indican en negritas.

Martinou *et al* (2002) reportaron la clonación del gen *CDA2* de *Saccharomyces cerevisiae* en el vector pYES2 y su expresión en células vegetativas de la misma levadura. Sin embargo, debido al bajo rendimiento obtenido con este sistema de expresión, subsiguientemente reportaron la suclonación del mismo gen en el vector pET-26b(+) para sobreexpresar en *E. coli* (Martinou *et al.*, 2003). La sobreexpresión de *CDA2* en bacterias resultó en la obtención de enzima no glicosilada e inactiva que requirió de la adición de CoCl_2 para presentar actividad, en contraste con la obtenida a partir de *S. cerevisiae* que resultó en la enzima glicosilada y activa.

Por otra parte, el vector pYES2 utilizado en el estudio de Martinou *et al* (2002) contiene marcadores de selección de levaduras transformadas por auxotrofia, mientras que el vector pYES6 utilizado en este trabajo contiene el gen que confiere resistencia al antibiótico blasticidina que es un agente de selección potente. Este factor puede influir de manera alguna en la sobreexpresión de proteínas recombinantes en *Saccharomyces cerevisiae* y obtener mejores resultados utilizando el vector pYES6, posiblemente por una selección más adecuada de células transformadas de las no transformadas.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se logró clonar los genes *CDA1* y *CDA2* de *Saccharomyces cerevisiae* en el vector de expresión pYES6. Este hecho fue confirmado mediante la secuenciación de los clones pYES6-CDA1 y pYES6-CDA2 utilizando un oligonucleótido específico para el vector y otro específico para cada gen.

La secuenciación de las clonaciones obtenidas en este trabajo comprobó que éstas son adecuadas para la sobreexpresión de ambos genes que resulte en cantidades suficientes de enzimas para los estudios de desacetilación enzimática de quitina.

Futuros estudios derivados de este trabajo deberán emprender el protocolo para la transformación de células de levaduras con estos clones recombinantes; así como establecer las condiciones para la sobreexpresión de los mismos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers y D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.
- Christodoulidou, A., V. Bouriotis y G. Thireos (1996). "Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **271**(49): 31420-5.
- Christodoulidou, A., P. Briza, A. Ellinger y V. Bouriotis (1999). "Yeast ascospore wall assembly requires two chitin deacetylase isozymes." FEBS Lett **460**(2): 275-9.
- Cohen, S. N., A. C. Chang y L. Hsu (1972). "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(8): 2110-4.
- Delorme, E. (1989). "Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation." Appl Environ Microbiol **55**(9): 2242-6.
- Gietz, R. D. y R. A. Woods (2001). "Genetic transformation of yeast." Biotechniques **30**(4): 816-20, 822-6, 828 passim.
- Goycoolea, F. M., W. Argüelles-Monal, C. Peniche e I. Higuera-Ciapara (2000). Chitin and chitosan. Novel Macromolecules in Food Systems. D. G. a. K. V., Elsevier Science Series: 265-308.
- Guthrie, C. y G. R. Fink (1991). Guide to yeast genetics and molecular and cell biology. Amsterdam ; Boston ; London, Academic Press.

- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata y A. Kimura (1983). "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations." J Bacteriol **153**(1): 163-8.
- Kafetzopoulos, D., A. Martinou y V. Bouriotis (1993). "Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(7): 2564-8.
- Lewin, B. (1997). Genes VI. Nueva York, Oxford University Press.
- Li, X. y S. Roseman (2004). "The chitinolytic cascade in *Vibrios* is regulated by chitin oligosaccharides and a two-component chitin catabolic sensor/kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(2): 627-31.
- Mandel, M. y A. Higa (1970). "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection." J Mol Biol **53**(1): 159-62.
- Martinou, A., D. Kafetzopoulos y V. Bouriotis (1995). "Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation processes." Carbohydrate Research **273**(2): 235-242.
- Martinou, A., D. Koutsioulis y V. Bouriotis (2002). "Expression, purification, and characterization of a cobalt-activated chitin deacetylase (Cda2p) from *Saccharomyces cerevisiae*." Protein Expr Purif **24**(1): 111-6.
- Martinou, A., D. Koutsioulis y V. Bouriotis (2003). "Cloning and expression of a chitin deacetylase (CDA2) from *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli*. Purification and characterization of the cobalt-dependent recombinant enzyme." Enzyme and microbial technology **32**(6): 757-763.
- Meibom, K. L., X. B. Li, A. T. Nielsen, C. Y. Wu, S. Roseman y G. K. Schoolnik (2004). "The *Vibrio cholerae* chitin utilization program." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2524-9.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn y H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-73.
- Muzzarelli, R. A. (1999). "Native, industrial and fossil chitins." Exs **87**: 1-6.

- Nahar, P., V. Ghormade y M. V. Deshpande (2004). "The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests." J Invertebr Pathol **85**(2): 80-8.
- Rao, M. S., J. Munoz y W. F. Stevens (2000). "Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste." Appl Microbiol Biotechnol **54**(6): 808-13.
- Saito, Y., J.-L. Putaux, T. Okano, F. Gaill y H. Chanzy (1997). "Structural aspects of the swelling of B chitin in HCl and its conversion into a chitin." Macromolecules **30**: 3867-3873.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., S. Nicklen y A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Struhl, K., D. T. Stinchcomb, S. Scherer y R. W. Davis (1979). "High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(3): 1035-9.
- Studier, F. W. y B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." J Mol Biol **189**(1): 113-30.
- Thukral, S. K., K. K. H. Chang y G. A. Bitter (1993). "Functional expression of heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*." Methods **5**: 86-95.
- Tsigos, I. y V. Bouriotis (1995). "Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*." J Biol Chem **270**(44): 26286-91.
- Tsigos, I., A. Martinou, D. Kafetzopoulos y V. Bouriotis (2000). "Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology." Trends Biotechnol **18**(7): 305-12.