

Efecto del sistema de restricción McrB de *E. coli* en la amplificación de genotecas de mamíferos

G.M. HERNÁNDEZ,¹ J. DE LA FUENTE² Y A. SILVA³

¹ Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Apartado postal 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

² Agrupación de Genética de Células de Mamíferos, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba

³ Agrupación de Proteínas y Hormonas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba

Recibido en enero de 1989

Aprobado en marzo de 1989

RESUMEN

Se construyó una genoteca bovina en el bacteriófago 2EMBL3 por el método de llenado parcial de los extremos cohesivos. Se estudian los efectos de los sistemas de restricción de *E. coli* en la amplificación de la biblioteca y se demuestra que el sistema McrB en las cepas derivadas de *E. coli* K-12, interfiere en la propagación de los fagos recombinantes durante la amplificación de la genoteca. El empleo de la cepa *E. coli* C-1a en la construcción de genotecas de eucariotes superiores conjuntamente con el método anterior permite obtener genotecas de alta eficiencia y representatividad.

SUMMARY

A bovine genomic library was constructed in the 2EMBL3 bacteriophage by the method of partial filling-in of cohesive ends. The effects of the *E. coli* restriction systems in the amplification of the library are studied and it is demonstrated that the McrB restriction system of *E. coli* K-12 interferes with the propagation of recombinant phages during the amplification of the library. The use of *E. coli* C-1a strain conjunctually with the former method permits to obtain libraries of high efficiency and representativity.

INTRODUCCION

En la construcción de genotecas en bacteriófagos, un paso fundamental es la eliminación o inactivación del fragmento central del genoma del fago por métodos físicos o bioquímicos, para evitar que durante la reacción de ligazón con el ADN genómico del organismo que se quiere clonar, se "religue" de nuevo este fragmento a los "brazos" del vector, disminuyendo la probabilidad de ligazón con el inserto (Maniatis *et al.*, 1982; Frischauf *et al.*, 1983).

No obstante, suele ocurrir que como resultado de la ligazón de los brazos entre sí se formen moléculas que, si bien no contienen el fragmento central, tampoco llevan el inserto, y a causa de fenómenos de recombinación genética asociados a la mutación Chi presente en el brazo izquierdo del fago (Stahl *et al.*, 1975) estas moléculas presentan un tamaño molecular superior al que se espera desde un punto de vista teórico. Estos

fenómenos de recombinación posibilitan que estas moléculas sean empaquetadas *in vitro* (Frischauf *et al.*, 1983; Loenen y Brammar, 1980), produciendo un alto nivel de falsos recombinantes en la genoteca.

Ha sido reportado un método de llenado parcial de los extremos cohesivos del fago con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, el cual aprovecha la compatibilidad que surge al rellenar parcialmente los extremos Sal I de los brazos del vector con los extremos Sau 3AI del inserto parcialmente rellenos también (Zabarovsky y Allikmets, 1986). De tal manera se impide la ligazón entre moléculas del vector y entre los fragmentos del inserto, y solo es posible la ligazón vector-inserto.

Por otra parte, se han reportado nuevos sistemas de restricción en *E. coli* que pueden interferir significativamente durante el clonaje primario de secuencias provenientes de organismos superiores en *E. coli* (Whittaker *et al.*, 1988). Se conoce que una porción de los residuos de citosina están metilados en los eucariotes superiores, siendo muy frecuente la metilación en forma de 5-metilcitosina en los mamíferos (Ehrlich y Wang, 1981; Raleigh, 1987).

Se ha demostrado que además del conocido sistema de restricción *E. coli* K-12 que actúa cuando su sitio de reconocimiento no está metilado, los sistemas McrA, McrB y McrC actúan sobre determinadas secuencias cuando la citosina o la adenina están metiladas (Raleigh, 1987; Raleigh *et al.*, 1988).

En este trabajo aplicamos el método de Zabarovsky y Allikmets (1986) en la construcción de una genoteca bovina y estudiamos los efectos del sistema de restricción McrB de *E. coli* en la amplificación de la genoteca.

MATERIALES Y METODOS

Fagos y cepas bacterianas

Para la construcción de la genoteca se utilizó el vector EMBL3 (Frischauf *et al.*, 1983). Para la titulación de los fagos se utilizaron las cepas:

- LE392 [F^- , hsdR 514($R_K^- M_K^+$), supE44, supF58, lacY1 o (lacIZY)6, gal T22, met B1, trpR55, lambda⁺, mcrA⁺, mcrB⁺]
- NM538 [supF, hsdR ($R_K^- M_K^+$), mcrA⁻, mcrB⁺]
- NM539 [supF, hsdR ($R_K^- M_K^+$), mcrA⁻, mcrB⁺, (P2cox3)]
- C-1a: *E. coli* C, F^- , Su⁻, RK⁻, MK⁻, mcrA⁻, mcrB⁻.

Para la preparación de las mezclas de empaquetamiento se utilizaron las cepas *E. coli* BHB2688 y BHB2690 (Hohn y Hohn, 1974).

Enzimas

Todas las enzimas utilizadas fueron ENZIBIOT, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (Apartado 6162. La Habana, Cuba) y se utilizaron según las condiciones recomendadas por la casa comercial.

Preparación del vector

El ADN del EMBL3 se obtuvo por el método de Maniatis *et al.*, (1982). Después de digestión con Sall y EcoRI, los extremos Sall se rellenaron parcialmente utilizando 6U de ADN Polimerasa I (fragmento Klenow) por microgramo de ADN en presencia de dCTP y dTTP 50 μ M durante 30 min, a temperatura ambiente según el método de Zabarovsky y Allikmets (1986).

Preparación del inserto

El ADN bovino de alto peso molecular se obtuvo a partir del hígado de un ternero de la raza Holstein-Friesian, según el método de A. Ephrussi (comunicación personal). El tejido se cortó en pequeños pedazos y se pulverizó en un mortero previamente enfriado bajo nitrógeno líquido. El tejido pulverizado

se resuspendió en PBS y se homogeneizó en un homogeneizador tipo Potter. Se centrifugó 10 min a 200xg y se resuspendió el pellet en 3 ml de PBS más 150 µl de NP-40 al 10 % por cada 1 g de tejido. Se dejó 15 min en hielo y se centrifugó a 800xg durante 10 min. El pellet se resuspendió en 3 ml de solución (Tris HCl 50 µM, pH 7,4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Proteínasa K 200 mg/ml, SDS 1 %) y se incubó a 37°C con agitación suave durante 12 h.

Los productos de digestión se extrajeron con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico(25:24:1) hasta desaparición de la interfase proteica. A la fase acuosa se le adicionó NaCl a concentración final 150 mM e igual volumen de etanol absoluto y se invirtió suavemente durante 10 min. En estas condiciones, el ADN de alto peso molecular forma un agregado en forma de medusa. Utilizando la punta de una pipeta Pasteur se pasó la "medusa" hacia otro tubo con 3 ml de solución TE por cada 1 g de tejido inicial y se dejó resuspender con agitación suave. Se repitió el proceso de precipitación y resuspensión en solución TE, y finalmente, se dializó a 4°C contra 600 volúmenes de solución TE durante 12 horas.

Se ensayaron las condiciones óptimas de digestión parcial con Sau3AI a fin de obtener una mayor proporción de fragmentos entre 9 y 23 kb (Maniatis *et al.*, 1982) los que se separaron mediante gradiente continuo de sacarosa del 10 al 40 %. Posteriormente los extremos Sau3AI fueron rellenados parcialmente en presencia de dATP y dGTP 50 µM utilizando 1 U de Klenow por cada 2 µg de ADN durante 30 min a temperatura ambiente (Zabarovsky y Allikmets, 1986).

Ligazón y empaquetamiento

La ligazón se realizó en presencia de PEG6000 al 12 % (Zabarovsky y Allikmets, 1986) utilizando una relación en peso vector/inserto de 1:1 a una concentración de 100 ng de vector por microlitro. Se adicionaron 2 U Weiss de T4 ADN ligasa por microgramo de ADN total y se incubó 16 h a 4°C. Los productos de la ligazón se empaquetaron *in vitro* y se probó la eficiencia sobre diferentes cepas de *E. coli*. La amplificación de la genoteca se realizó sobre la cepa *E. coli* C-1a.

Preparación de la sonda para el pesquiasaje de la genoteca

La sonda se preparó a partir de un par de oligonucleótidos, A y B (25 y 27 mers respectivamente), cuyas secuencias son parcialmente complementarias, según se muestra en la figura 1. El oligo A coincide en su secuencia con la región del ADN complementario (ADNc) de la α -S₁ caseína bovina que codifica los aminoácidos 23 al 30 de la proteína madura (Stewart *et al.*, 1984). Cien moles de cada oligonucleótido se mezclaron y se diluyeron con agua hasta 35 µl.

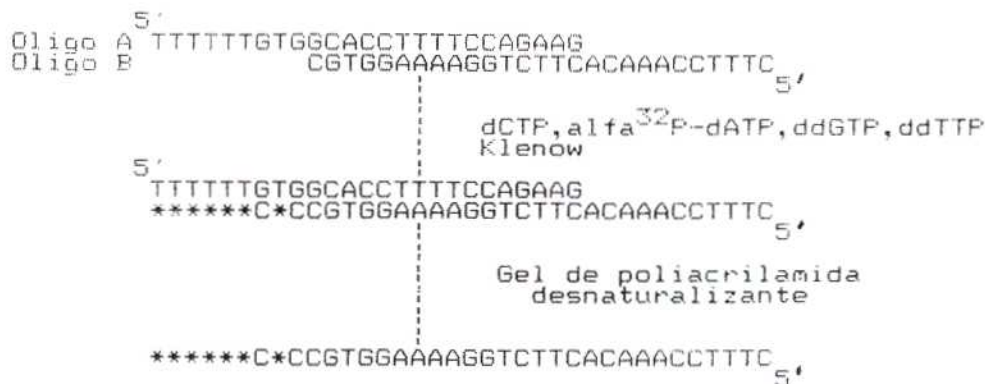


FIG. 1. Preparación de la sonda para el pesquiasaje de la genoteca. El oligo B se extendió por su extremo 3' utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I en presencia de dCTP y α -³²P-dATP, se adicionó ddGTP y ddTTP a la reacción para impedir la extensión del oligo A. El oligo B extendido se purificó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante.

Teniendo en cuenta que se ha reportado la presencia de 5-metilcitosina en el genoma de mamíferos (Erllich y Wang, 1981) y sobre la base de los resultados anteriores, decidimos amplificar la genoteca sobre la cepa C-1a de *E. coli*, la cual no presenta ninguno de estos sistemas de restricción, y una vez perdido el patrón de metilación característico de eucariotes, al propagarla sobre otra cepa, tal como la LE392, puede adquirir el patrón de metilación *E. coli* K-12 que la protege de este tipo de restricción en futuros procedimientos de clonaje.

En la cepa *E. coli* C-1a, el título obtenido al empaquetar los productos de la ligazón del vector con el inserto es 500 veces mayor que el obtenido al ligar el vector consigo mismo, resultado que se corresponde con los reportados (Zabarovsky y Allikmets, 1986).

Al realizar el empaquetamiento *in vitro* a mayor escala, la eficiencia fue de $7,8 \times 10^5$ fagos recombinantes por microgramo de ADN bovino. El tamaño de la genoteca amplificada fue de $5,6 \times 10^8$ fagos recombinantes.

En el pesquisaje primario se obtuvieron 27 clones positivos, los cuales fueron posteriormente titulados sobre LE392 a una menor densidad para realizar el pesquisaje secundario.

A 20 clones se les extrajo el ADN y se comprobó mediante digestión con EcoRI que todos eran recombinantes, con un tamaño de inserto entre 11 y 18 kb. Uno de estos clones fue posteriormente "secuenciado" y se comprobó que contiene un fragmento correspondiente a la región 5' del gen de la α -S₁ caseína bovina (Yu-Lee et al., 1986).

El método reportado por Zabarovsky y Allikmets (1986) para la construcción de genotecas, utilizado en este trabajo, permite obtener genotecas de alta eficiencia. Se pudo comprobar que la utilización de la cepa C-1a en la amplificación de la genoteca aumenta la eficiencia y la representatividad de la misma.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Luis Herrera por la asistencia técnica brindada durante el desarrollo del trabajo y por la revisión del manuscrito. A Juan Morales por sus sugerencias en el transcurso de los experimentos.

REFERENCIAS

- EHRlich, M. y R.Y. WANG (1981). *5-methylcytosine in Eukaryotic DNA*. Science **212**: 1350-1357.
- FRISCHAUF, A.M.; H. LEHRACH; A. POUSTKA y N. MURRAY (1983). *Lambda replacement vector carrying polylinker sequences*. J. Mol. Biol. **170**: 827-842.
- GROSSBERGER, D. (1987). *Minipreps of DNA from bacteriophage lambda*. Nucleic Acid Res **15**: 6737.
- HOHN, B. y T. HOHN (1974). *Activity of empty headlike particles for packaging of DNA of bacteriophage λ in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **71**: 2372-2376.
- LOENEN, W.A.M y W.J. BRAMMAR (1980). *A bacteriophage lambda vector for cloning large DNA fragments made with several restriction enzymes*. Gene **10**: 249-259.
- MANIATIS, T.; E.F. FRITSCH y J. SAMBROOK (1982). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- RALEIGH, E.A. y G. WILSON (1986). *Escherichia coli K-12 restricts DNA containing 5 methylcytosine*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 9070-9074.
- RALEIGH, E.A. (1987). "Restriction and modification in vivo by *Escherichia coli* K-12" en: *Methods in Enzymology* **152**: 130-141.
- RALEIGH, E.A.; N.E. MURRAY; H. REVEL; R.M. BLUMENTHAL; D. WESTAWAY; A.D. REITH; P.W.J. RIGBY; J. ELHAI y D. HANAHAN (1988). *McrA and McrB restriction phenotypes of some E. coli strains and implications for gene cloning*. Nucleic Acid Res. **16**: 1563-1575.

- STAHL, F.W.; J.M. CRASEMANN y M.M. STAHL (1975). *Rec-mediated recombinational hot spot activity in bacteriophage lambda III.Chi mutations are site-mutations stimulating rec-mediated recombination.* J.Mol. Biol. **94**: 203-212.
- STEWART, A.F.; I.M. WILLIS y A.G. MACKINLAY (1984). *Nucleotide sequences of bovine α S₁- and K-casein cDNAs.* Nucleic Acid Res. **12**: 3895-3907.
- WHITTAKER, P.A.; A.J.B. CAMPBELL; E.M. SOUTHERN y N.E. MURRAY (1988). *Enhanced recovery and restriction mapping of DNA fragments cloned in a new λ vector.* Nucleic Acid Res. **16**: 6725-6736.
- YU-LEE, L.; L. RICHTER-MANN; C.H. COUCH; A.F. STEWART; A.G. MACKINLAY y J.M. ROSEN (1986). *Evolution of the casein multigene family: conserved sequences in the 5' flanking and exon regions.* Nucleic Acid Res. **14**: 1883-1902.
- ZABAROVSKY, E.R. y R.L. ALLIKMETS (1986): *An improved technique for the efficient construction of gene libraries by partial filling-in of cohesive ends.* Gene **42**: 119-123.