

Vol. 50, Nos. 1 y 2  
Enero - Marzo. 2008  
Abril - Junio. 2008  
pp. 38 - 47

# Recombinería en bacterias: ingeniería del ADN usando recombinación homóloga

Gustavo Santoyo\*

**RESUMEN.** La recombinería es una poderosa metodología para modificar el ADN bacteriano, ya sea cromosomal o plasmídico. Esta novedosa herramienta utiliza las funciones «Red» del bacteriófago  $\lambda$  para llevar a cabo eventos de recombinación homóloga. Comparado con técnicas clásicas de ingeniería genética, la recombinería no usa enzimas de restricción ni ADN ligasas. Además, el uso de oligonucleótidos sintéticos, así como de productos de PCR con regiones pequeñas de homología (~35-50 pb) en sus extremos, brinda una gran ventaja para generar mutaciones en cualquier zona del genoma de bacterias. Esta revisión describe los mecanismos de la recombinación homóloga en *E. coli* y las funciones Red del fago  $\lambda$ . También se analizan algunos de los usos y ventajas de la recombinería en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Sin duda, la recombinería está cambiando la forma de realizar modificaciones genéticas en el ADN de una manera precisa, rápida, eficiente y económica.

**Palabras clave:** Recombinería, recombinación homóloga, bacteriófago  $\lambda$ .

## INTRODUCCIÓN

Hace más de tres décadas fueron descubiertas las enzimas de restricción, la ADN ligasa y vectores plasmídicos como el pBR322, los cuales iniciaron la era de la ingeniería genética (Weiss y Richardson, 1967; Nathans y Smith, 1975; Bolívar *et al.*, 1977). El uso *in vitro* de estas proteínas y moléculas permitió a los investigadores entrar en el mundo de la biología molecular y revolucionar el conocimiento de diversos organismos procariontes y eucariontes. Hoy en día, el uso de estas técnicas de clonación y modificación genética siguen siendo utilizadas en los laboratorios; sin embargo, cada vez están siendo empleados otros métodos mucho más eficientes, rápidos y menos costosos. Tal es el caso de la «recombinería». La recombinería es una poderosa herramienta de ingeniería genética que no emplea enzimas de restricción o ligasas, lo que permite reducir costos y tiempo de trabajo (Ellis *et al.*, 2001; Court *et al.*, 2002). Esta novedosa técnica usa las bondades de la

**ABSTRACT.** Recombineering is a powerful methodology employed to modify the bacterial DNA, either of chromosomal or plasmidic origin. This new tool utilizes the «Red» functions of the phage  $\lambda$  to carry on homologous recombination events with short homologies (~35-50 bp). In contrast to standard genetic engineering techniques, recombineering does not employ restriction enzymes and DNA ligases. Besides, the use of PCR products, as well as synthetic oligonucleotides, offers a wonderful advantage to modify any region of the bacterial genome. This review describes the homologous recombination mechanisms in *E. coli* and the Red functions of the phage  $\lambda$ . It also analyzes some of the uses and advantages of recombineering in Gram-negative and Gram-positive bacteria. Without a doubt, recombineering is changing the manner to engineer DNA in a precise, fast, efficient and economic way.

**Key words:** Recombineering, homologous recombination, phage  $\lambda$ .

recombinación homóloga y las funciones de los genes «Red» del bacteriófago lambda ( $\lambda$ ) para llevar a cabo diversos procesos de clonación y modificación genética (Sawitzke *et al.*, 2007). Los genes *red* de  $\lambda$  pueden realizar un intercambio genético entre dos moléculas de ADN con regiones homólogas muy pequeñas, de aproximadamente 50 pares de bases (pb) o menos, comparado con otros procesos mediados por la proteína RecA, que utiliza fragmentos de mayor tamaño para poder lograr una alta eficiencia (Watt *et al.*, 1985; Shen y Huang, 1986; Oppenheim *et al.*, 2004).

El término «recombineering» o «recombinaría» en español, fue acuñado por Ellis y colaboradores recientemente (2001) y deriva de las palabras en inglés: Recombination-Mediated Genetic Engineering (Ingeniería Genética mediada por Recombinación). El uso de la recombinería ha sido principalmente estudiada en la bacteria *Escherichia coli*, la cual se ha convertido en un modelo de estudio para otras bacterias (Datta *et al.*, 2006; Sawitzke *et al.*, 2007). Las aplicaciones de la recombinería son diversas; se puede realizar prácticamente cualquier modificación en el genoma bacteriano. Además, se puede llevar a cabo la clonación de secuencias de ADN en cualquier vector sin el uso de enzimas de restricción y ligasas. También se pueden recuperar fragmentos de ADN cromosomal y ser clonados en vectores lineales por reparación de «gaps» o huecos (Court *et al.*, 2002). Más adelante detallaremos estas aplicaciones de la recombinería.

\* Laboratorio de Recombinación y Diversidad Genómica, C.A. de Ecología Microbiana. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Algo importante de remarcar es que esta novedosa técnica se realiza *in vivo*, mediante la transformación de la bacteria con ADNcd o sencilla, es decir, mediante el uso de oligonucleótidos sintéticos (~50 pb) o regiones amplificadas por la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés) con extremos homólogos (~50 pb) a la zona del cromosoma que se desea modificar (Sawitzke *et al.*, 2007). De esta manera, la flexibilidad de la recombinería ha facilitado enormemente la creación de nuevas construcciones genéticas o generación de mutaciones en sólo unos cuantos días. Lo anterior comparado con otras técnicas de ingeniería genética, que pueden llegar a ser tediosas y consumidoras de tiempo, debido a la búsqueda de sitios de restricción (en muchas ocasiones no disponibles) y uso de ADN ligasas, siendo algunos de los pasos de clonación casi imposibles de realizar.

En esta revisión describimos las diferencias y similitudes de los mecanismos de recombinación homóloga en la bacteria *E. coli*, así como con la recombinación mediada por los genes *red* del bacteriófago  $\lambda$ . También discutimos las aplicaciones más recientes de la recombinería en cepas de *E. coli* K12, enteropatógenas (ECEP) y enterohemorrágicas (ECEH) (Murphy y Campellone, 2003), así como en *Salmonella enterica* (Datta *et al.*, 2006), *Yersinia* (Derbise *et al.*, 2003) y *Shigella* (Ranallo *et al.*, 2006). Finalmente, analizamos un sistema de recombinería recientemente desarrollado para las bacterias Gram-positivas; *Mycobacterium tuberculosis* y *M. smegmatis*.

## RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

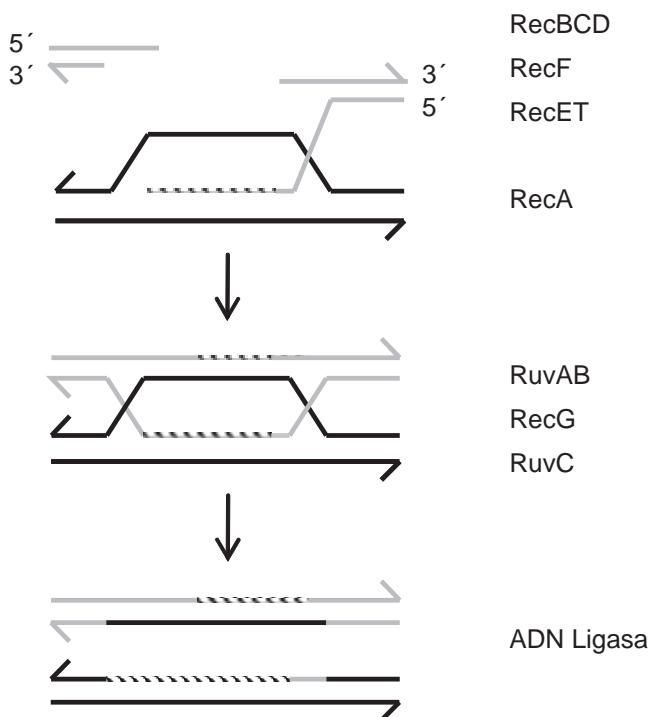
La recombinación homóloga se define como el intercambio recíproco de información genética entre dos moléculas de ADN idénticas (Szostak *et al.*, 1983). La recombinación ha sido ampliamente estudiada en bacterias como *E. coli* (Kowalczykowski *et al.*, 1994) y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Krogh y Symington, 2004). Estos dos sistemas han sido utilizados por su versatilidad para ser cultivados en laboratorio y lograr modificar su genoma con relativa facilidad. Sin embargo, existen otros organismos que han aportado novedosos conocimientos en el campo de la recombinación homóloga (Fernández *et al.*, 2000; Cox y Battista, 2005; Santoyo *et al.*, manuscrito en preparación).

Para fines de esta revisión, nos enfocaremos en *E. coli*. En esta bacteria los eventos de recombinación homóloga pueden iniciar por medio de las siguientes vías de recombinación; RecBCD, RecFOR y RecET (Fig. 1) (Kowalczykowski *et al.*, 1994; Clark y Sandler, 1994). El complejo RecBCD inicia la recombinación con ADN de doble cadena (Kowalczykowski, 2000), mientras que el

complejo RecFOR (junto con otras proteínas) inicia el evento usando ADN con discontinuidades de cadena sencilla (Horii y Clarke, 1973). Se sabe que la vía RecBCD es mucho más eficiente que RecFOR (~100 veces más), aunque se propone que su principal función es durante la replicación del ADN al reparar y reiniciar la replicación de horquillas atoradas (Kuzminov, 1995). Es de resaltar que mutaciones en la vía RecBCD se ven muy afectadas en recombinación conjugacional y transduccional; sin embargo, mutaciones supresoras en genes como *sbcBCD* pueden reemplazar (a niveles cercanos de cepas silvestres) el fenotipo *rec<sup>+</sup>* activando la vía RecFOR (Zahradka *et al.*, 2006). RecE es una exonucleasa 5'-3' que depende de ADNcd, y junto con RecT (promotora del alineamiento de cadenas sencillas) son activas en ciertos fondos genéticos. Los genes *recE* y *recT* son parte del prófago Rac presente en algunas cepas de *E. coli* (Hall *et al.*, 1993; Hall y Kolodner, 1994; Muyrers *et al.*, 2000). La función final de cada vía de recombinación es generar extremos de ADN 3', los cuales son necesarios para el evento de invasión y apareamiento de regiones complementarias en el ADN, etapa dependiente de la proteína RecA (Kowalczykowski *et al.*, 1994). Una mutación en el gen *recA* casi abate la recombinación homóloga y las cepas son extremadamente susceptibles a compuestos químicos que dañan el ADN (Clark y Margulies, 1965). La proteína RecA se une a los extremos 3' iniciando la búsqueda e invasión de la región homóloga (ADN de cadena doble) (Nishinaka *et al.*, 2007). Durante esta etapa de la recombinación se forma una estructura de cuatro cadenas de ADN conocida como el intermediario de Holliday (Holliday, 1990). Esta estructura es procesada por RuvAB o RecG y resuelta por medio de un corte endonucleolítico por la enzima RuvC (Rafferty *et al.*, 1996; Sharples *et al.*, 1999). Al final de este proceso de intercambio de información, una ADN ligasa sella las cadenas y termina el evento recombinación homóloga (Fig. 1).

## FUNCIONES DE LOS GENES «RED» DEL BACTERIÓFAGO $\lambda$

La recombinación homóloga en *E. coli* depende en un alto grado de la función del gen *recA* (Clark y Margulies, 1965; Kowalczykowski *et al.*, 1994); sin embargo, la recombinación del fago  $\lambda$  es muy eficiente tanto en una mutante *recA*, como en la cepa silvestre de *E. coli* (Brooks y Clark, 1967; Muyrers *et al.*, 2000). Esto se debe a que el genoma de  $\lambda$  contiene los genes de recombinación Red; *exo*, *bet* y *gam* (Court *et al.*, 2002). Los genes *exo*, *bet* y *gam* se encuentran localizados dentro del operón PL del fago  $\lambda$  y su expresión se da durante las etapas tempranas de la infección del fago y



**Figura 1.** Modelo de recombinación homóloga. Las vías RecBCD, RecF y RecET generan extremos de ADN 3', las cuales son reconocidas por RecA para la invasión de la región homóloga. Proteínas como RuvAB, RecG migran el intermediario de Holliday y RuvC lo resuelve con un corte. La ADN ligasa posteriormente liga los cortes.

posterior a la inducción del prófago (Court *et al.*, 2002). El sistema Red de  $\lambda$  es muy eficiente utilizando regiones muy pequeñas de homología, regularmente de 50 pb, mientras que RecA requiere mayores tratos de ADN para lograr la misma eficiencia. A continuación describiremos en más detalle las funciones de las proteínas Red del bacteriófago  $\lambda$ .

#### La proteína Exo

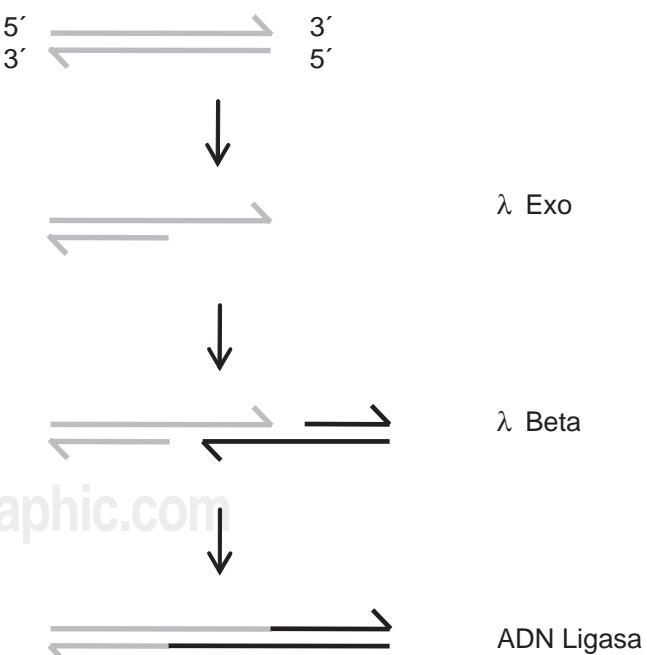
La proteína Exo del fago  $\lambda$  es una exonucleasa que degrada ADN lineal en dirección 5'-3' (Carter y Radding, 1971). Estudios *in vitro* demuestran que puede degradar hasta 1000 pares de bases por segundo, aunque depende del contenido de bases nucleotídicas del ADN, así como de cambios estructurales del complejo ADN-Enzima (Matsuura *et al.*, 2001; van Oijen *et al.*, 2003; Perkins *et al.*, 2003). La proteína Exo puede reconocer extremos de ADN de cadena doble (ADNcd) o de cadena sencilla (ADNcs) para proceder con la degradación de mononucleótidos y generar extremos 3' (Ellis *et al.*, 2001; Subramanian *et al.*, 2003) (Fig. 2).

#### La proteína Beta

Se propone que las proteínas Exo y Beta pueden interactuar y funcionar de manera coordinada para llevar a cabo la recombinación. Una vez que Exo genera extremos de ADN 3', éstos son inmediatamente reconocidos por Beta en una dirección 3'-5' (Fig. 2). Beta se une establemente al ADNcs mayor a 35 nucleótidos (Muniyappa y Radding, 1986). Así, Beta protege al ADNcs de la degradación de nucleasas. Posteriormente la proteína Beta promueve el apareamiento y alineación de regiones homólogas de ADNcs. Como se muestra en la Figura 2, Beta alinea los extremos 3' generados por Exo con otras regiones de ADNcs pero es incapaz de invadir ADN de doble cadena como lo realiza RecA (Court *et al.*, 2002). Se propone que ésta es una diferencia importante entre los dos sistemas de recombinación homóloga (Figs. 1 y 2), aunque algunos autores proponen que el sistema de recombinación de  $\lambda$  también puede invadir ADNcd en *E. coli* (Silberstein *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1998).

#### La proteína Gamma

Las actividades de Exo y Beta no se podrían llevar a cabo sin la función de Gamma. Esta proteína se une este-



**Figura 2.** Modelo de acción de los genes red del fago  $\lambda$  en recombinación homóloga. Mientras que Gamma inhibe la actividad de RecBCD, Exo degrada el ADN en dirección 5'-3' para generar extremos 3'. El alineamiento de cadenas es mediado por Beta.

quiométricamente a RecBCD e inhibe sus funciones de nucleasa, formando el complejo Gamma-RecBCD (Murphy, 2007; Court *et al.*, 2007). Aun cuando se sabe que Gamma puede bloquear la actividad nucleasa de RecBCD, las actividades de recombinación no son afectadas completamente en cepas que expresan Gamma (Murphy, 1991; Court *et al.*, 2002). Se ha sugerido que el complejo Gamma-RecBCD retiene algunas funciones de recombinación, y que enzimas de la vía RecFOR son requeridas para recombinar en presencia de Gamma. RecBCD es una exonuclease potente de fragmentos lineares de ADN que los degrada y evita que recombinen con el genoma de la bacteria (Sawitzke *et al.*, 2007). La proteína Gamma también puede bloquear la actividad de otras nucleasas como *sbcCD* (Kulkarni y Stahl, 1989). Es por ello importante la función de Gamma, ya que mediante la inhibición de estas nucleasas, las secuencias de ADN exógeno son más estables y permiten que se puedan integrar en regiones homólogas del genoma bacteriano, ya sea plásmido o cromosoma (Ellis *et al.*, 2001; Court *et al.*, 2002).

#### UN SISTEMA EFICIENTE DE RECOMBINERÍA

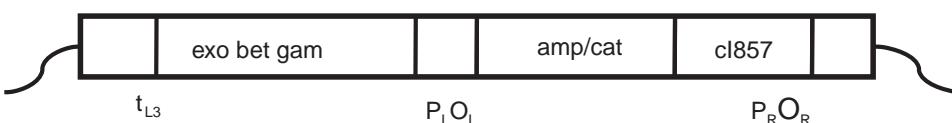
Varios laboratorios han desarrollado diferentes herramientas genéticas usando versiones modificadas del bacteriófago  $\lambda$  y del sistema RecET para ser utilizados en recombinería (Zhang *et al.*, 1998; Datsenko y Wanner, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2000; Ellis *et al.*, 2001; Muyrers *et al.*, 2001). Aun cuando el sistema RecET tiene la ventaja de utilizar extremos muy pequeños de homología, al igual que el sistema  $\lambda$ , éste tiene la desventaja de que la recombinación no es muy eficiente (Muyrers *et al.*, 2000; Court *et al.*, 2002). Sin embargo, ha sido muy útil en la modificación de BACs (Bacterial Artificial Chromosomes, por sus siglas en inglés) (Muyrers *et al.*, 1999).

Los genes *red* de  $\lambda$  se han clonado en plásmidos que contienen orígenes de replicación diversos, esto para facilitar su uso en bacterias Gram-negativas, diferentes a *E. coli* (Datta *et al.*, 2006). Además de que se han expresado bajo diferentes promotores (Datta *et al.*, 2006); así, su expresión transcripcional es regulada para evitar inestabilidad de los plásmidos, rearreglos genómicos y efectos tóxicos de proteínas como Gamma (Court *et al.*, 2002).

Recientemente el laboratorio del Dr. Court desarrolló un sistema de recombinería muy eficiente y versátil (Datta *et al.*, 2006). Consta de un prófago modificado en sus funciones líticas, de replicación y carece de los genes estructurales del fago (Fig. 3). Este sistema contiene los genes *red* que son expresados en operón a partir del promotor *pL*, y regulado por un represor sensible a temperatura, el CI857. De esta manera, cuando las células se mantienen en temperaturas menores a 37 °C el represor es activo y no hay inducción de los genes *red*. Al haber un cambio momentáneo a 42 °C durante el crecimiento celular, el represor CI857 se desnaturaliza, permitiendo la expresión del operón de los genes *red*. Al volver las células a temperaturas de 37 °C o menos, el represor se vuelve activo y termina la transcripción del operón *pL*. Este cambio momentáneo de temperatura es suficiente para que se lleven a cabo las funciones Red y se realice el evento de recombinación, sin que la expresión de Gamma sea tóxica ni afecte la viabilidad celular. Este prófago también contiene un cassette de resistencia a antibióticos como marcadores de selección, ya sea cloramfenicol o ampicilina. Una de las virtudes de este sistema es que ha sido clonado en vectores que contienen diferentes orígenes de replicación, lo que permite la expresión de los genes *red* en otras bacterias diferentes a *E. coli*. Finalmente, si se desea curar la bacteria del plásmido que contiene los genes para recombinería, existen vectores sensibles a temperatura (42 °C), de manera que se pueden perder en pocas rondas de duplicación celular (Datta *et al.*, 2006).

#### DESVENTAJAS DE LAS TÉCNICAS CLÁSICAS DE INGENIERÍA GENÉTICA

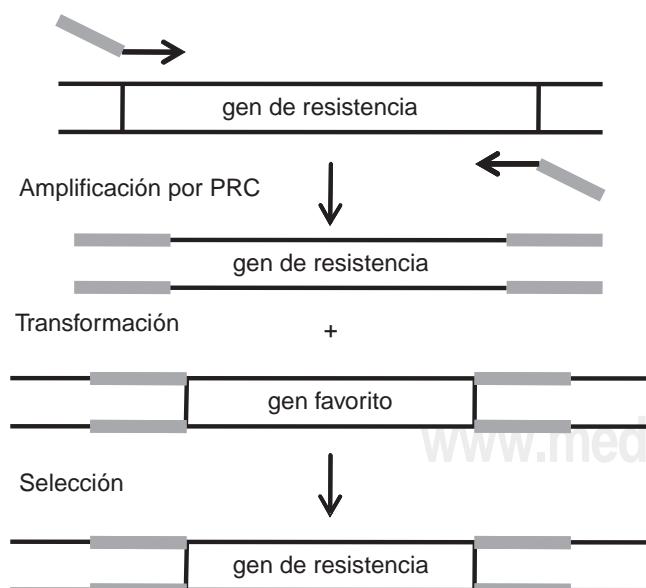
Las técnicas clásicas de clonación molecular y modificación genética requieren de enzimas de restricción, de la disponibilidad de sitios de corte para estas enzimas y ADN ligasa. Todo esto requiere bastante tiempo y en general los costos son altos. Un método comercial que utiliza una topoisomerasa en los extremos del vector para llevar a cabo el evento de clonación se ha convertido en uno de los favoritos en diversos laboratorios, ya que es eficiente y rápido; sin embargo, su desventaja es que es altamente costoso. Ahora bien, para llevar a cabo la construcción de



**Figura 3.** Sistema de recombinería que contiene los elementos mínimos de selección y expresión de los genes *red* de  $\lambda$ .  $t_{L3}$ ; terminador transcripcional,  $p_L$  y  $p_R$ ; promotores,  $O_L$  y  $O_R$ ; operadores (ver detalles en el texto) (Modificado de Datta *et al.*, 2006).

mutantes en *E. coli*, de igual manera se necesita la construcción de un vector que lleve regiones grandes de homología (~1,000 pb), además de la clonación de diversos marcadores; usualmente genes que codifican para la resistencia de antibióticos y algunos otros como *sacB* de *Bacillus subtilis* (Blomfield *et al.*, 1991), el cual es tóxico para la bacteria en presencia de sacarosa, son también utilizados para contra-selecciónar y perder el vector.

En ciertas especies bacterianas, el uso de fragmentos de ADN lineal generados por PCR, son usados para transformar y generar mutantes (Zeng *et al.*, 2007; Choi y Schweizer, 2005). Sin embargo, estos fragmentos requieren que los extremos aledaños al marcador contengan tractos grandes de homología para poder tener una elevada frecuencia de recombinación, ya que son dependientes de *recA*, además de que se necesitan dos o más pasos durante el PCR para generar el producto deseado. Aunque esta técnica es económica, lleva tiempo realizarse. Otras metodologías empleadas para crear modificaciones en el genoma de bacterias son mediante el uso de una recombinasa  $\beta$  sitio-específico o el sistema Cre-*LoxP* o (Lambert *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2007). Estas técnicas son eficientes y muy limpias, aunque también requieren de pasos adicionales de amplificación de productos por PCR y/o clonación, por lo que consumen demasiado tiempo.



**Figura 4.** Pasos para generar el reemplazo de un gen en el genoma bacteriano. Las flechas significan los oligonucleótidos empleados en el PCR. Las regiones grises (~50 pb) muestran los segmentos de homología donde se realiza la recombinación homóloga.

## VENTAJAS Y APLICACIONES DE LA RECOMBINERÍA

La recombinería es una herramienta eficiente, rápida y económica. Sus usos pueden ser muy diversos y las aplicaciones hasta el momento han sido variadas (Court *et al.*, 2002; Sawitzke *et al.*, 2007). A continuación mencionamos algunos usos y ventajas de la recombinería desarrollada en *E. coli* sobre técnicas clásicas de ingeniería genética.

### Recombinería en el cromosoma bacteriano

Hasta hace poco tiempo el uso de ADN lineal con regiones pequeñas de homología en los extremos (~50 pb) era sólo posible en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Baudin *et al.*, 1993). Sin embargo, la recombinería en bacterias como *E. coli* ha permitido a los genetistas bacterianos nivelar la facilidad con que se modifica el genoma de *S. cerevisiae*. Así, se pueden amplificar cassettes de resistencia por medio de PCR y ser transformados en cepas bacterianas que expresen los genes *red* del fago  $\lambda$ . En la Figura 4 se muestra la amplificación por PCR con oligonucleótidos, los cuales llevan una secuencia homóloga a la región del cromosoma bacteriano que se desea modificar o reemplazar. Esta región puede ser un gen, un promotor o un operón completo. Mediante esta técnica se han podido reemplazar segmentos de ADN de hasta 70 kilobases (Hill *et al.*, 2000). Los fragmentos de ADNc lineal que sean transformados en la bacteria podrían no sólo ser marcadores de resistencia, sino también fusiones de genes como *lacZ* o GFP (Green Fluorescent Protein, por sus siglas en inglés). De igual manera es posible sustituir un nucleótido para generar un cambio de aminoácido o un codón de paro que detenga la transcripción del gen. La construcción de cassettes de resistencia fusionados con genes como *sacB*, que es utilizado para contraseleccionar, podría emplearse para eliminar de manera perfecta cualquier región del genoma sin dejar huella del evento (Court *et al.*, 2002).

### Recombinería en plásmidos

De la misma manera en que se reemplaza alguna región del cromosoma bacteriano se puede modificar un plásmido por medio de recombinería (Fig. 4). Así, se han intercambiado orígenes de replicación y cassettes de resistencia, por mencionar algunos ejemplos (Datta *et al.*, 2006). Ahora bien, si se desea clonar o reemplazar cierta secuencia de ADN en un plásmido, ésta debe contener una región homóloga de ~50 pb y co-transformarse con el plásmido. La transformación conjunta de estas dos moléculas de ADN lineal permite que el evento de recombinería sea altamente eficiente (Fig. 5).

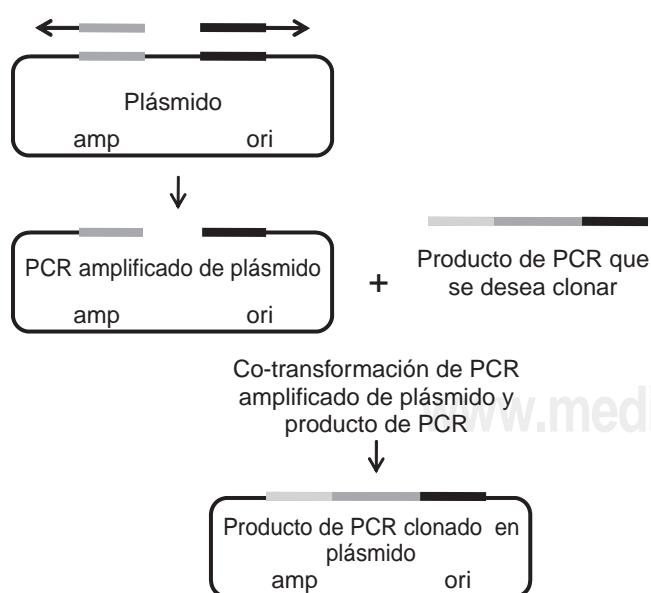
### Recuperación y clonación de ADN cromosomal en plásmidos

Casi cualquier zona del cromosoma de *E. coli* puede ser recuperado y clonado en un vector por medio de recombinería. Como se muestra en la Figura 6, se puede introducir un vector lineal que contenga en los extremos una pequeña homología (~50 pb) a la zona del cromosoma que se desea recuperar. Esta tecnología permite la clonación de cualquier región del cromosoma sin ser amplificado antes por PCR y posteriormente clonado en el vector, ahorrando tiempo y disminuyendo costos. Para conocer algunos consejos que maximizan la eficiencia de esta tecnología de recombinería se recomiendan lecturas adicionales (ver Constantino y Court, 2003; Sawitzke *et al.*, 2007).

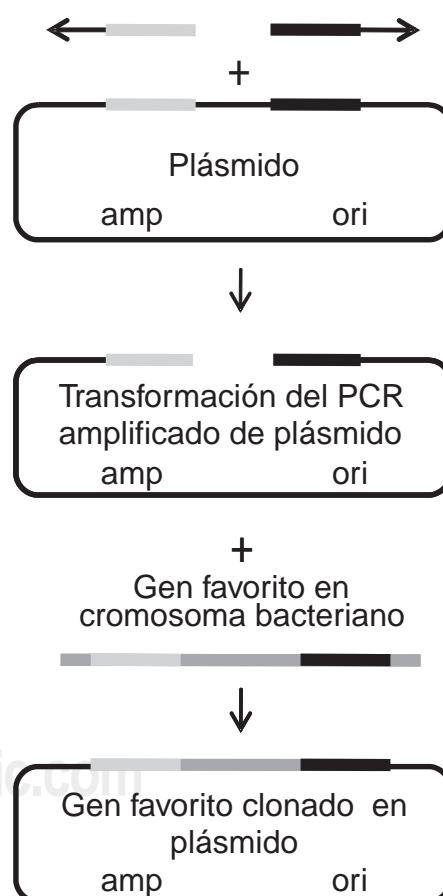
### Modificación genómica por medio de oligonucleótidos de cadena sencilla

Las técnicas de recombinería mencionadas utilizan ADN lineal de cadena doble. Sin embargo, también se pueden utilizar fragmentos de ADN lineal de cadena sencilla para modificar cualquier replicón bacteriano (Fig. 7). De hecho, algunos estudios muestran que los eventos de recombinación con ADNcs (por ejemplo; oligonucleótidos) pueden ser mucho más eficientes que con ADNcd (Li *et*

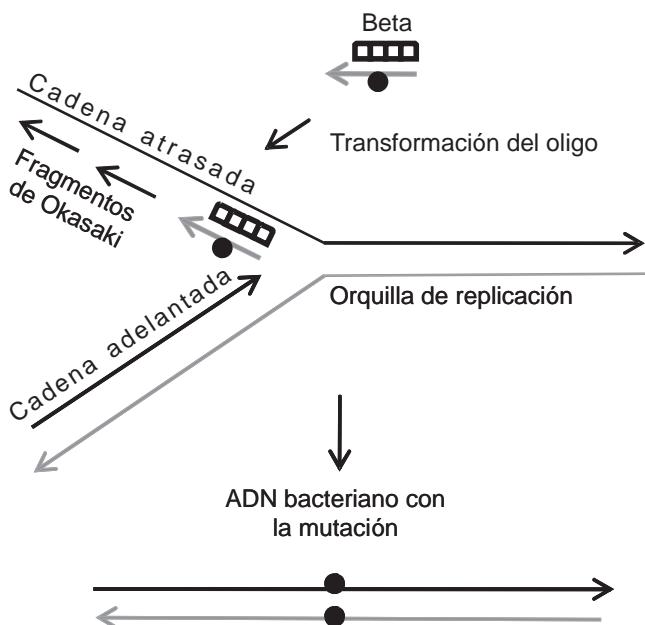
*al.*, 2003). Para este tipo de recombinación con ADNcs no se requieren los genes *exo* y *gam* del fago  $\lambda$ , sino que requiere la función única de la proteína Beta. La proteína RecA al parecer tampoco colabora en la recombinación de oligonucleótidos de cadena sencilla (Yu *et al.*, 2003). Pueden ser usados oligonucleótidos de tan sólo 30 nt para introducir cambios en la secuencia de un gen, modificar su expresión, corregir una mutación o introducir cualquier tipo de base. Al incrementar el tamaño del oligonucleótido en 40, 50, 60 o 70 nt, la eficiencia es varias veces mayor (Ellis *et al.*, 2001; Court *et al.*, 2002). De acuerdo a Court y colaboradores (2002), los oligonucleótidos que se alinean preferentemente con la cadena retardada durante la replicación del ADN generan más recombinantes, mientras que si se alinean a la cadena líder o adelantada generan recombinantes a menos frecuencia (Fig. 7) (Li *et al.*, 2003).



**Figura 5.** Clonación de un producto de PCR por recombinería. Las flechas significan los oligonucleótidos. Las regiones grises y negras de los oligonucleótidos, el plásmido y el PCR muestran las zonas de homología.



**Figura 6.** Recuperación y clonación de ADN cromosomal por recombinación. Las flechas indican los oligonucleótidos. Las zonas grises y negras las regiones homólogas. El producto de PCR es transformado en la bacteria. Los extremos homólogos del PCR recombinan con la región del genoma que se desea clonar y/o recuperar.



**Figura 7.** Modelo de recombinería usando oligonucleótidos. La flecha conteniendo una mutación (círculo negro) indica el oligonucleótido (~50 pb). La proteína Beta de  $\lambda$  alinea el oligonucleótido (preferentemente en la cadena retrasada) durante la replicación del ADN para introducir la mutación (Modificado de Court et al., 2002).

Algo que facilitaría el uso de recombinería con oligonucleótidos sería su co-transformación en células de *E. coli* con la proteína Beta, ya que reduciría pasos que requieren la expresión del gen *bet*. Sin embargo, estas investigaciones están aún en proceso y hasta el momento no han sido exitosas (Court, D.L. comunicación personal).

#### RECOMBINERÍA EN BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

Hasta hace poco la bacteria *E. coli* K12 había sido el caballo de Troya de la recombinería (Yu et al., 2000; Ellis et al., 2001). Actualmente se ha descrito el desarrollo de sistemas de recombinería en otras bacterias Gram-negativas, tal es el caso de cepas ECEP y ECEH de *E. coli* (Murphy y Campellone, 2003), *Salmonella enterica* (Datta et al., 2006), *Yersinia* (Derbise et al., 2003) y *Shigella* (Ranallo et al., 2006).

Las condiciones de recombinería eficientes para *E. coli* pueden no ser iguales en otras especies, incluso entre cepas. Tal es el caso de las cepas ECEP y ECEH de *E. coli*. En estos patógenos, Murphy y Campellone (2003) modificaron algunos de los pasos para lograr una mayor eficiencia de recombinería; incluyendo la optimización del buffer para electroporar, las condiciones del shock térmico, la adecuada posición del marcador bordeado por las regio-

nes homólogas y la construcción de un vector especial (pKM208). El pKM208 contiene los elementos *exo*, *bet* y *gam*, expresados bajo el promotor Ptac y regulado por el gen *lacI*. De esta forma, con tan sólo 20 minutos de exposición al inductor IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tio-galactósido), fue suficiente para obtener entre 70 y 600 recombinantes por cada  $10^8$  células sobrevivientes, logrando una alta eficiencia. Mediante esta metodología lograron eliminar varias islas de patogenicidad e identificar algunos factores de virulencia.

Otro ejemplo interesante del uso de recombinería en patógenos Gram-negativos, lo representa la construcción de cepas atenuadas de varios serotipos en *Shigella* (Ranallo et al., 2006). En este trabajo utilizaron el mismo vector (pKM208) usado por Murphy y Campellone (2003) para expresar las funciones Red de  $\lambda$  en *Shigella*. Así, lograron suprimir genes localizados en plásmido y cromosoma; que son importantes en la virulencia del patógeno. Las mutantes construidas se caracterizaron y mostraron una marcada atenuación en su virulencia en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Ahora, pretenden utilizar las diversas cepas generadas por recombinería como vacunas en contra de la misma enfermedad causada por *Shigella* (Ranallo et al., 2006).

En el caso del patógeno *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2, se transformaron varios vectores que contenían los genes *red* para comparar su eficiencia de recombinería con *E. coli* (Datta et al., 2006). Los eventos de recombinería se analizaron por reemplazamiento del gen *galK* por un cassette amp (ampicilina resistente) después de la transformación de ADNcd lineal. Las frecuencias de recombinantes de *S. enterica* (Ap<sup>R</sup> resistentes) fue de  $10^3$  por cada  $10^8$  células viables. De igual manera se obtuvo la frecuencia de recombinación mediante el uso de oligonucleótidos (ADN lineal de cadena sencilla) para corregir una mutación en el gen *galK* (TAG→TAC). La corrección cambia este codón de paro por uno de tirosina y produce cepas Gal<sup>+</sup>. Así, obtuvieron recombinantes Gal<sup>+</sup> a una frecuencia de  $5 \times 10^6$  por cada  $10^8$  de células viables. Las frecuencias de recombinación en *S. enterica* fueron muy similares a aquéllas de *E. coli* (Datta et al., 2006).

En este mismo sentido, Derbise y colaboradores (2003) lograron generar mutantes en varios loci de *Yersinia pseudotuberculosis* por medio de recombinería. Los autores utilizaron el plásmido pKOBEG (Chaveroche et al., 2000) que expresa los genes *red* mediante un promotor inducible por arabinosa (pBAD). Adicionalmente, se modificó este vector mediante la inserción del gen *sacB* (generando el plásmido pKOBEG-sacB), con la finalidad de perder el plásmido posterior al evento de recombinería a través de la sensibilidad a sacarosa. Los autores emplearon dos estrategias para eliminar genes cromosomales. En una de ellas, amplificaron por PCR un marcador con regiones ho-

mólogas en los extremos de ~500 pb, y en un segundo procedimiento, se emplearon homologías cortas (~55 pb), las cuales necesitaron las funciones Red de  $\lambda$ . De esta manera, se logró el intercambio alélico de tres genes con alta eficiencia, abriendo la posibilidad de generar mutaciones a gran escala en este patógeno.

Hasta donde se sabe, el empleo de un sistema de recombinería ha sido reportado únicamente en los ejemplos mencionados anteriormente. Actualmente se realizan estudios de recombinería en otras bacterias Gram-negativas, aunque hasta el momento no se han publicado los resultados (Court, D.L., comunicación personal; Santoyo, *et al.*, Resultados no publicados).

## RECOMBINERÍA EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS

El desarrollo de la recombinería en *E. coli* depende de las funciones Red del fago  $\lambda$ . La función de estas proteínas  $\lambda$  no es universal en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Aunque no se ha investigado ampliamente, ésta es una limitante para las aplicaciones de la recombinería. Por lo tanto se han buscado alternativas y actividades análogas a los genes *red* de  $\lambda$  en bacterias Gram-positivas. Recientemente, van Kessel y Hatfull (2007) reportaron un sistema de recombinería en *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis*. Descubrieron que el genoma del micobacteriófago Che9c contiene homólogos de RecE y RecT. CH9c gp60 codifica para una exonucleasa exonucleasas (5'-3') dependientes de ADNcd homóloga a RecE (Exo) (Muyrers *et al.*, 2000). CH9c gp61 homóloga de RecT y  $\lambda$  Beta son proteínas que se unen al ADNcs y promueven el alineamiento con regiones homólogas de ADN (Li *et al.*, 1998). Para conocer si realmente estas dos proteínas, gp60 y gp61 podían funcionar como un sistema de recombinería en estas dos bacterias Gram-positivas, *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, ambos genes se expresaron en un vector que fue transformado en dichas bacterias. La transcripción de estos genes fue regulada por un promotor inducible por acetamidasa. Utilizando como templado diferentes plásmidos se amplificaron diversos productos de PCR que contenían regiones homólogas de ~50 pb a 500 pb en ambos lados del marcador, esto con el fin de realizar el reemplazo de diversos genes. Las frecuencias para generar mutantes por medio de recombinería en ambas bacterias fueron de ~1X10<sup>-4</sup>. Del total de recombinantes analizados, el 90% o más de ellos contenían la mutación correcta. Este trabajo de investigación muestra que la recombinería es una tecnología eficiente (van Kessel y Hatfull, 2007), y por lo tanto factible para ambos grupos bacterianos, Gram-negativos y Gram-positivos. De hecho, se han descrito funciones similares a los genes *red* en la bacteria *Bacillus subtilis* (Ayora *et al.*, 2002; Martínez-Jimé-

nez *et al.*, 2005). Sería interesante investigar si la recombinaría funciona en estos sistemas.

## PERSPECTIVAS

La recombinería está permitiendo que se revolucione el conocimiento de la biología de bacterias como *E. coli*. De igual manera, el uso de esta novedosa tecnología es hoy en día posible en algunas otras especies del grupo Gram-negativos. Actualmente se está desarrollando en géneros donde las técnicas de modificación genética no son tan adelantadas como en *E. coli*. Esto permitirá que se aceleren los estudios de la genómica funcional, incluyendo la posibilidad de generar colecciones de mutantes en genomas completamente secuenciados. En muchos casos se puede utilizar el esqueleto de algunos vectores ya construidos (Datta *et al.*, 2006) mediante la inserción de nuevos promotores o cambiando el origen de replicación. La finalidad es que expresen adecuadamente los genes *red* del fago  $\lambda$  y faciliten su movimiento a diferentes especies bacterianas.

En el caso de las bacterias Gram-positivas, las investigaciones sobre recombinería se limitan a las micobacterias. Aún quedan muchas preguntas por contestar sobre el funcionamiento del sistema de recombinería en estas bacterias; ¿Cómo funciona el sistema de recombinería sin la proteína Gamma?, ¿Cómo es la regulación de exonucleasas que degradan el ADN lineal?, ¿Cuál es el tipo de interacción entre las proteínas del fago Che9c y los homólogos de RecBCD [addAB] en estas micobacterias? Pero el trabajo de van Kessel y Hatfull (2006) demuestra la factibilidad de emplear esta herramienta en el grupo de las Gram-positivas, abriendo nuevas posibilidades para su modificación genética.

Las investigaciones sobre recombinería llevan pocos años. Esta novedosa tecnología, que por su alta eficiencia y bajo costo, debería ser empleada en diversos laboratorios de investigación del mundo, incluyendo México. Hasta donde sabemos, no existe ningún laboratorio en el país que emplee esta herramienta para clonar o modificar el genoma de otras bacterias diferentes a *E. coli* o *S. typhimurium*. No dudamos que en poco tiempo se emplee la recombinería como una técnica rutinaria en nuestros laboratorios, además de desarrollar nuevas investigaciones en otras especies bacterianas.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo dedicar este artículo al Dr. David Romero por ser un tutor e investigador excelente. Agradezco a Ma. del Carmen Orozco-Mosqueda, así como a los dos revisores anónimos por las críticas y sugerencias que mejoraron el

manuscrito. También se agradece al CONACyT por el apoyo para la Consolidación Institucional de Grupos de Investigación (Proyecto No. 51832).

## REFERENCIAS

- Ayora, S., R. Missich, P. Mesa, R. Lurz, S. Yang, E.H. Egelman & J.C. Alonso. 2002. Homologous-pairing activity of the *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 replication protein G35P. *J Biol Chem.* 277:35969-73599.
- Baudin, A., O. Ozier-Kalogeropoulos, A. Denouel, F. Lacroute & C. A. Cullin. 1993. Simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 21:3329-3330.
- Blomfield, I. C., V. Vaughn, R. F. Rest & B. I. Eisenstein. 1991. Allelic exchange in *Escherichia coli* using a *Bacillus subtilis* *sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Mol Microbiol.* 5:1447-1457.
- Bolivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker & H.W. Boyer. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene.* 2:95-113.
- Brooks, K. & A. J. Clark. 1967. Behavior of lambda bacteriophage in a recombination deficient strain of *Escherichia coli*. *J Virol.* 1:283-293.
- Carter, D.M. & C. M. Radding. 1971. The role of exonuclease and Beta protein of phage lambda in genetic recombination. II. Substrate specificity and the mode of action of lambda exonuclease. *J Biol Chem.* 246:2502-2512.
- Chaverche, M. K., J. M. Ghigo & C. d'Enfert. 2000. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* 28:E97.
- Choi, K. H. & H. P. Schweizer. 2005. An improved method for rapid generation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* deletion mutants. *BMC Microbiol.* 5:30.
- Clark, A. J. & A. D. Margulies. 1965. Isolation and characterization of recombination-deficient mutants of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci USA.* 53:451-459.
- Clark, A. J. & S. J. Sandler. 1994. Homologous genetic recombination: the pieces begin to fall into place. *Crit Rev Microbiol.* 20:125-142.
- Costantino, N. & D. L. Court. 2003. Enhanced levels of lambda Red-mediated recombinants in mismatch repair mutants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:15748-53.
- Court, D. L. & J. A. Sawitzke & L. C. Thomason. 2002. Genetic engineering using homologous recombination. *Annu Rev Genet.* 36:361-388.
- Court, R., N. Cook, K. Saikrishnan & D. Wigley. 2007. The crystal structure of lambda-Gam protein suggests a model for RecBCD inhibition. *J Mol Biol.* 371:25-33.
- Cox, M. M. & J. R. Battista. 2005. *Deinococcus radiodurans* - the consummate survivor. *Nat Rev Microbiol.* 3:882-892.
- Datta, S., N. Costantino & D. L. Court. 2006. A set of recombineering plasmids for gram-negative bacteria. *379:109-115.*
- Datsenko, K. A. & B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:6640-6645.
- Derbise, A., B. Lesic, D. Dacheux, J. M. Ghigo & E. Carniel. 2003. A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 38:113-116.
- Ellis, H. M., D. Yu, T. DiTizio & D. L. Court. 2001. High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:6742-6746.
- Fernandez, S., S. Ayora & J. C. Alonso. 2000. *Bacillus subtilis* homologous recombination: genes and products. *Res Microbiol.* 151:481-6.
- Hall, S.D., M.F. Kane & R. D. Kolodner. 1993. Identification and characterization of the *Escherichia coli* RecT protein, a protein encoded by the recE region that promotes renaturation of homologous single-stranded DNA. *J Bacteriol.* 175:277-287.
- Hall, S.D. & R. D. Kolodner. 1994. Homologous pairing and strand exchange promoted by the *Escherichia coli* RecT protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:3205-3209.
- Hill, F., V. Benes, D. Thomasova D, A. F. Stewart, F. C. Kafatos & W. Ansorge. 2000. BAC trimming: minimizing clone overlaps. *Genomics.* 64:111-113.
- Holliday, R. 1990. The history of the DNA heteroduplex. *Bioessays.* 12:133-42.
- Horii, Z. & A. J. Clark. 1973. Genetic analysis of the recF pathway to genetic recombination in *Escherichia coli* K12: isolation and characterization of mutants. *J Mol Biol.* 80:327-344.
- Kowalczykowski, S. C. 2000. Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem Sci.* 25:156-165.
- Kowalczykowski, S. C., D. A. Dixon, A. K. Eggleston, S. D. Lauder & W. M. Rehrauer. 1994. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* 58:401-465.
- Krogh, B. O. & L. S. Symington. 2004. Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet.* 38:233-271.
- Kulkarni, S. K. & F. W. Stahl. 1989. Interaction between the *sbcC* gene of *Escherichia coli* and the *gam* gene of phage lambda. *Genetics.* 123:249-253.
- Kuzminov, A. 1995. Collapse and repair of replication forks in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 16:373-384.
- Lambert, J. M., R. S. Bongers & M. Kleerebezem. 2007. Cre-lox-based system for multiple gene deletions and selectable-marker removal in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol.* 73:1126-1135.
- Li, Z., G. Karakousis, S. K. Chiu, G. Reddy & C. M. Radding. 1998. The Beta protein of phage lambda promotes strand exchange. *J Mol Biol.* 276:733-744.
- Li, X. T., N. Costantino, L. Y.Lu, , D. P. Liu, R. M. Watt, K. S. Cheah, D. L. Court & J. D. Huang. 2003. Identification of factors influencing strand bias in oligonucleotide-mediated recombination in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 31:6674-6687.
- Martínez-Jiménez, M. I., J. C. Alonso & S. Ayora. 2005. *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1-encoded gene 34.1 product is a recombination-dependent DNA replication protein. *J Mol Biol.* 351:1007-1019.
- Matsuura, S., J. Komatsu, K. Hirano, H. Yasuda, K. Takashima, S. Katsura & A. Mizuno. 2001. Real-time observation of a single DNA digestion by lambda exonuclease under a fluorescence microscope field. *Nucleic Acids Res.* 29:E79.
- Muniyappa, K. & C. M. Radding. 1986. The homologous recombination system of phage lambda. Pairing activities of Beta protein. *J Biol Chem.* 261:7472-7478.
- Murphy, K. C. 1991. Lambda Gam protein inhibits the helicase and chi-stimulated recombination activities of *Escherichia coli* RecBCD enzyme. *J Bacteriol.* 173:5808-5821.
- Murphy, K. C. 2007. The lambda Gam Protein Inhibits RecBCD Binding to dsDNA Ends. *J Mol Biol.* 371:19-24.
- Murphy, K. C. & K. G. Campellone. 2003. Lambda Red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. *BMC Mol. Biol.* 4:11.
- Muyrers, J. P., Y. Zhang, F. Buchholz & A. F. Stewart. 2000. RecE/RecT and Redalpha/Redbeta initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. *Genes Dev.* 14:1971-1982.

40. Muyrers, J. P., Y. Zhang & A. F. Stewart. 2001. Techniques: Recombinogenic engineering- new options for cloning and manipulating DNA. *Trends Biochem Sci.* 26:325-321.
41. Muyrers, J. P., Y. Zhang, G. Testa & A. F. Stewart. 1999. Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res.* 27:1555-1557.
42. Nathans, D. & H. O. Smith. 1975. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Annu Rev Biochem.* 44:273-293.
43. Nishinaka, T., Y. Doi, R. Hara & E. Yashima. 2007. Elastic Behavior of RecA-DNA Helical Filaments. *J Mol Biol.* 370:837-845.
44. Oppenheim, A. B., A. J. Rattray, M. Bubunenko, L. C. Thomason & D. L. Court. 2004. *In vivo* recombineering of bacteriophage lambda by PCR fragments and single-strand oligonucleotides. *Virology.* 319:185-189.
45. Perkins, T.T., R. V. Dalal, P. G. Mitsis & S. M. Block. 2003. Sequence-dependent pausing of single lambda exonuclease molecules. *Science.* 301:1914-8.
46. Ranallo, R. T., S. Barnoy, S. Thakkar, T. Urick & M. M. Venkatesan. 2006. Developing live *Shigella* vaccines using lambda Red recombineering. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 47:462-469.
47. Rafferty, J. B., S. E. Sedelnikova, D. Hargreaves, P. J. Artymiuk, P. J. Baker, G. J. Sharples, A. A. Mahdi, R. G. Lloyd & D. W. Rice. 1996. Crystal structure of DNA recombination protein RuvA and a model for its binding to the Holliday junction. *Science.* 274:415-421.
48. Sanchez, H., M. C. Cozar & M. I. Martinez-Jimenez. 2007. Targeting the *Bacillus subtilis* genome: an efficient and clean method for gene disruption. *J Microbiol Methods.* 70:389-394.
49. Sawitzke, J. A., L. C. Thomason, N. Costantino, M. Bubunenko, S. Datta & D. L. Court. 2007. Recombineering: *in vivo* genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond. *Methods Enzymol.* 421:171-199.
50. Sharples, G. J., S. M. Ingleston & R. G. Lloyd. 1999. Holliday junction processing in bacteria: insights from the evolutionary conservation of RuvABC, RecG, and RusA. *J Bacteriol.* 181:5543-5550.
51. Shen, P. & H. V. Huang. 1986. Homologous recombination in *Escherichia coli*: dependence on substrate length and homology. *112:441-457.*
52. Silberstein, Z., Y. Tzfati & A. Cohen. 1995. Primary products of break-induced recombination by *Escherichia coli* RecE pathway. *J Bacteriol.* 177:1692-1698.
53. Subramanian, K., W. Rutvisuttinunt, W. Scott & R. S. Myers. 2003. The enzymatic basis of processivity in lambda exonuclease. *Nucleic Acids Res.* 31:1585-96.
54. Szostak, J. W., T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein & F. W. Stahl. 1983. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell.* 33:25-35.
55. van Oijen, A. M., P. C. Blainey, D. J. Crampton, C. C. Richardson, T. Ellenberger & X. S. Xie. 2003. Single-molecule kinetics of lambda exonuclease reveal base dependence and dynamic disorder. *Science.* 301:1235-8.
56. van Kessel, J. C. & G. R. Hatfull. 2007. Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Methods.* 4:147-152.
57. Watt, V. M., C. J. Ingles, M. S. Urdea & W. J. Rutter. 1985. Homology requirements for recombination in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:4768-4772.
58. Weiss, B. & C. C. Richardson. 1967. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. 3. An enzyme-adenylate intermediate in the polynucleotide ligase reaction. *J Biol Chem.* 242:4270-4272.
59. Yu, D., H. M. Ellis, E. C. Lee, N. A. Jenkins, N. G. Copeland & D. L. Court. 2000. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:5978-5983.
60. Yu, D., J. A. Sawitzke, H. M. Ellis & D. L. Court. 2003. Recombineering with overlapping single-stranded DNA oligonucleotides: testing a recombination intermediate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:7207-7212.
61. Zahradka, K., S. Simic, M. Buljubasic, M. Petranovic, D. Dermic & D. Zahradka. 2006. *sbcB15* and *DeltasbcB* mutations activate two types of recF recombination pathways in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 188:7562-7.
62. Zeng, X., L. H. He, Y. Yin, M. J. Zhang & J. Z. Zhang. 2007. Deletion of *cagA* gene of *Helicobacter pylori* by PCR products. *World J Gastroenterol.* 11:3255-3259.
63. Zhang, Y., F. Buchholz, J. P. Muyrers & A. F. Stewart. 1998. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet.* 20:123-128.
64. Zhang, Y., J. P. Muyrers, G. Testa & A. F. Stewart. 2000. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol.* 18:1314-1317.

**Correspondencia:****Gustavo Santoyo**

Laboratorio de Recombinación

y Diversidad Genómica, C.A.

de Ecología Microbiana.

Instituto de Investigaciones

Químico-Biológicas,

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Edificio B-5, Ciudad Universitaria.

Morelia, Michoacán, México. 58030.

Tel: (443) 326 57 y (443) 326 57 88 Ext. 131

E-mail: gustavo\_santoyo@yahoo.com