

TRANSCRIPCIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN FLAGELAR DE RHODOBACTER SPHAEROIDES EN ESCHERICHIA COLI

Clave del registro: CIN2012A10256

Centro Universitario México

Autor: Ricardo Iván Rodríguez Ramírez

Asesora: Dra. Rosa Laura Camarena Mejía

Área: Ciencias Biológicas, Químicas y de la Salud

Disciplina: Biología

Tipo de Investigación: Experimental

Lugar y Fecha: Cd. Universitaria, México, D.F. a 8 de febrero de 2013



TRANSCRIPCIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN FLAGELAR DE *RHODOBACTER SPHAEROIDES* EN *ESCHERICHIA COLI*

RESUMEN

Rhodobacter sphaeroides es una bacteria con un impacto ambiental sumamente importante debido a las curiosidades de su metabolismo y de sus diversas formas de alimentación ya que se comporta como fotótrofa vía fotosíntesis, a falta de luz es capaz de crecer heterotróficamente, en ausencia de nitrógeno es capaz de fijar nitrógeno para generar ATP y también puede crecer por medio de la fermentación. Lo que más llama la atención de esta bacteria son las peculiaridades en su maquinaria transcripcional, la cual se ha vuelto un modelo de estudio importante, el problema radica en que no es posible transformar a esta bacteria por métodos físicos o químicos, lo cual dificulta su estudio. El genoma de esta bacteria fue publicado hace poco tiempo lo cual dio paso a este proyecto, ya que con el conocimiento de su mapa genético se pueden ubicar los genes de interés y transcribirlos a una bacteria que presente condiciones más favorables de estudio, en este caso *Escherichia coli*, siendo el modelo estándar en las investigaciones de esta índole, ya que es de fácil manipulación, de rápida reproducción y de fácil modificación genética.

Palabras clave: *Rhodobacter sphaeroides*, *Escherichia coli*, gene, transcripción genética, expresión genética.

ABSTRACT

Rhodobacter sphaeroides is a bacterium with a very important environmental impact due to the curiosities of its metabolism and its various forms of alimentation as it behaves as a phototrophic life form via photosynthesis in the absence of light is able to grow heterotrophically in the absence of nitrogen can setting to generate ATP and nitrogen can also grow through fermentation. What catches the attention of this bacterium are peculiarities in the transcriptional machinery, which has become an important study model, the problem is that it is not possible to transform these bacteria by physical or chemical methods, which makes it difficult study. The genome of this bacterium was published



recently which led to this project, and with the knowledge that this genetic map can locate and transcribe genes of interest to a bacteria present study more favorable terms, in this case *Escherichia coli* being the standard in investigations of this nature, as it is easy to handle, quick to play and easy genetic modification.

Keywords: *Rhodobacter sphaeroides*, *Escherichia coli*, gene, gene transcription, gene expression.

INTRODUCCIÓN

○ PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Rhodobacter sphaeroides posee particularidades en su maquinaria transcripcional que la han convertido en un modelo muy importante de investigación. Sin embargo, no es posible transformar esta bacteria por métodos químicos o físicos y esto es una limitante para el estudio de los factores de transcripción, por ejemplo, mediante la obtención de factores de transcripción alterados por mutagénesis al azar.

○ HIPÓTESIS

1. Los factores de transcripción de *Rba. sphaeroides* serán funcionales en *Escherichia coli*.
2. Si se logran transcribir los genes específicos de *Rba. sphaeroides* a *E.coli*, entonces se podrá dar un avance en el estudio de esta bacteria.

○ SÍNTESIS DEL MARCO TEÓRICO

- *Rhodobacter sphaeroides*

Rhodobacter sphaeroides es una bacteria nadadora purpura que en condiciones anaeróbicas se comporta como fotótrofa vía fotosíntesis, a falta de luz es capaz de crecer heterotróficamente. En ausencia de nitrógeno es capaz de fijar nitrógeno para generar ATP y también puede crecer por medio de la fermentación. ¹

¹ Armitage, Judith P., 2009, *Swimming and behavior in purple non-sulfur bacteria*, Inglaterra, Departamento de bioquímica. Universidad de Oxford.



Su desplazamiento es generalmente hacia zonas con mayor concentración de nutrientes. El estudio de la expresión de los genes flagelares es el tema de este trabajo, cuyo principal interés es utilizar a *E. coli* como un huésped exógeno para el estudio de los factores transcripcionales involucrados en la expresión del promotor *fliOp*.²

- Amplificación de ADN y su clonación en *E. coli*
 - Pasos:
 1. Aislamiento y fragmentación de la fuente de ADN: ADNg (genómico), por PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) utilizando oligonucleótidos específicos.
 2. clonación del fragmento de ADN en un vector.
 3. Introducción y amplificación del vector recombinante en un organismo huésped.³
- **OBJETIVO GENERAL**
 - Comprobar la activación del gen flagelar *fliO* de la bacteria *Rhodobacter sphaeroides* con la utilización de la proteína sigma 54.
- **OBJETIVOS PARTICULARES**
 - Clonar los genes *rpoN*, *fleT* y *fleQ* de *R. sphaeroides* en plásmidos compatibles y estables en *E. coli*.
 - Detectar la expresión de los genes *rpoN*, *fleT* y *fleQ* en *E. coli*.
 - Detectar si el promotor *fliOp* es transcrito en *E. coli* bajo control de los factores de transcripción *rpoN*, *fleQ* y *fleT*.

² *ibid*

³ *Técnicas de ADN recombinante: Clonado de genes*, Instituto de Investigaciones Biológicas, Argentina, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Universidad Nacional del Mar del Plata, http://www.iib.org.ar/bajar_material.php?archivo=49.pdf



- **MARCO TEÓRICO**

- ***Rhodobacter sphaeroides***

Rhodobacter sphaeroides es una bacteria purpura no sulfurosa, libre nadadora, en forma de bacilo, gram negativa que pertenece a la subclase de Proteobacterias α -3. Como otras especies de *Rhodobacter*, *R. sphaeroides* es un organismo metabólicamente muy diverso que es capaz de crecer de muchas maneras incluyendo respiración aeróbica, fotosíntesis anaeróbica, fermentación y a falta de nitrógeno son capaces de fijar nitrógeno para producir ATP⁴. La presencia de su metabolismo tan diverso sugiere la existencia de un mecanismo regulador muy complejo utilizado por el organismo para identificar el método más eficiente de utilización de carbono y energía para su supervivencia en una amplia variedad de ecosistemas.

NADO

El nado de *R. sphaeroides* se ha conservado sin modificaciones por mucho tiempo, como sea se han observado interesantes diferencias en la regulación de la expresión de los genes flagelares dando nuevas perspectivas y sugiere que el nado está ambientalmente regulado, incluso más que en otras especies con esta misma característica.⁵

El flagelo es de las estructuras más complejas de las bacterias y es fundamental para la conservación del microorganismo. Está constituido por una extensión citoplasmática semirrígida en forma de espiral y un mecanismo de motricidad regulado genéticamente. La expresión y ensamble del mecanismo de locomoción requiere de la expresión coordinada y secuencial de más de 50 genes y el complejo motriz es expresado y ensamblado antes de los componentes extracelulares. El motor flagelar comprende un rotor y un regulador de giro.

⁴ Blankenship, R. E. Madigan, M. T. and Bauer. 1995. *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, Países Bajos, Kluwer Academic Publishers.

⁵ Armitage Op. Cit.



- **Regulación y expresión**

En la mayoría de las especies existe una regulación flagelar con operones codificando proteínas ensambladas en etapas diversas siendo expresadas en momentos diferentes. En especies entéricas un operón maestro regulado por el sistema *CRP/cAMP* y maneja la expresión de un factor sigma específico para el flagelo (σ^{28}) y un factor anti-sigma (*FlgM*). En especies entéricas este sistema regula una cascada con el ensamblaje de los componentes transmembranales del motor permitiendo la exportación de un factor anti-sigma que luego libera el σ^{28} para expresar la siguiente clase de genes. En las bacterias purpuras parece existir un nivel de control adicional identificado en otras α -Proteobacterias.

La expresión de los genes flagelares de clase II y III está regulado por un σ^{54} específico, distinto al esencial para la regulación de Nitrógeno. Esto ha sido confirmado en *Rba. Sphaeroides*, *Rba.centenum* y *Rhodopsedomonas palustris*. El operón maestro *flaQ* parece ser constitutivo, regulando la expresión de los operones de clase II y III que incluye dos proteínas promotoras de σ^{54} *FlaQ* y *FlaT*. Su mecanismo de operación es incierto pero estas proteínas parecen necesitar oligomerizar antes de ligar las secuencias previas de los promotores dependientes de σ^{54} . La ocurrencia de las interacciones depende de la concentración de *FlaT*. Los genes de clase III incluyen los genes estructurales para σ^{28} y el factor anti sigma *FlgM*, así que cuando un cuerpo basal se ensambla correctamente, estos genes dependientes de σ^{28} permitan la expresión de proteínas filamentosas después de la exportación de *FlgM*.⁶ Las secuencias promotoras previas de los genes flagelares y de fijación de nitrógeno han sido comparadas y mutadas, y las diferencias en las secuencias que permiten el reconocimiento diferencial de dos promotores han sido identificadas. Por qué se requiere este nivel extra de regulación es incierto pero puede ligar la síntesis del nuevo flagelo al grado de crecimiento. Interesantemente, existen dos homólogos σ^{54} en *Rba.sphaeroides*, y trabajos recientes han identificado que una de estas proteínas regule uno de los operones quimio sensoriales en esta especie.⁷

⁶ Ibid.

⁷ Ibid



o **Escherichia coli**

Escherichia coli es quizás la bacteria más estudiada por el ser humano. Se trata de una endobacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, y por ende en las aguas negras, pero realmente se encuentra en todos lados aunque en menores proporciones, esto es dado a que es un organismo ubicuo.⁸ Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore Von Escherich, quien la denominó *Bacterium coli commune* dado que se aislaba de las heces de individuos sanos y enfermos. La colonización por E. coli se inicia cuando el producto (recién nacido) pasa a través del canal del parto que se encuentra contaminado por diferentes microorganismos, algunos de estos de las heces de la madre. Cuando el recién nacido se obtiene por cesárea, la colonización se realiza más lentamente, sin embargo, a la cuarta semana se alcanzan los mismos niveles de concentración de microorganismos (10⁸/mL), que presentan los niños que nacen por la ruta natural. Ésta y otras bacterias que colonizan el intestino, son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo, además de participar en la producción de las vitaminas B y K no sintetizadas por el organismo⁹. Es un microorganismo anaerobio facultativo que se mueve por acción de flagelos que se distribuyen en todo el cuerpo de la bacteria (periféricos). Cuando Theodore Von Escherich aísla por primera vez E. coli, propone que el microorganismo podría ser agente responsable de diarreas. Sin embargo, lo anterior fue objetado por el hecho de que se aislaba indistintamente de heces de niños sanos, como de aquellos con diarrea. Fue hasta 1933 cuando Adam utilizando el procedimiento de tipificación por sueros, mostró que algunas variedades antigénicas de E. coli estaban involucradas en brotes de diarrea en niños albergados en cuneros.¹⁰

Diferentes modelos sobre la evolución de bacterias proponen que la diversidad en la patogenicidad de los microorganismos, es el resultado de la adquisición de genes llamados de virulencia a través de la transferencia horizontal de los mismos. Escherichia coli es uno de los microorganismos más representativos para responder esta pregunta, ya que como se hizo referencia, es integrante de la

⁸ *Escherichia coli*, en: Wikipedia, Fundación Wikimedia Inc. http://es.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli

⁹ Eslava Campos, Carlos A.; Navarro Ocaña, Armando; Hernández Chiñas, Ulises; Salazar Jiménez, Erika P. *Escherichia coli* microorganismo divergente con actitud dual en su relación de convivencia con sus hospederos, Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM, http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/ourprofs/ecoli_divergente.htm

¹⁰ Ibid



biota intestinal de diferentes vertebrados incluyendo al hombre, pero que a la vez se relaciona con un amplio espectro de enfermedades intestinales y extraintestinales. La gran diversidad de clonas patógenas en *Escherichia coli* al parecer es el resultado de la adquisición constante de diferentes factores de virulencia, mismos que son codificados por genes presentes en plásmidos, islas de patogenicidad y en fagos, elementos genéticos que son intercambiados a una frecuencia alta entre diferentes cepas de bacterias, proceso que se ha definido como transferencia horizontal de genes. En *Escherichia coli* eventos de mutación de su genoma y la transferencia de genes, ha dado lugar a la enorme divergencia de la bacteria y es así que existen clonas (variedades) que habitan de manera natural en el intestino y clonas relacionadas con infecciones intestinales y extraintestinales como son las infecciones del tracto urinario, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonías. La diversidad en las propiedades patógenas que ha desarrollado la bacteria, ha dado lugar a una clasificación de *E. coli* en los grupos EPEC (*E. coli* enteropatógena), ETEC (*E. coli* enterotoxigénica), EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), EIEC (*E. coli* enteroinvasiva), EAEC (*E. coli* enteroagregativa) y DAEC (*E. coli* con adherencia difusa) que integran las cepas relacionadas con la etiología de la diarrea. La clasificación incluye además las variedades conocidas como UPEC (*E. coli* uropatógena) responsable de infecciones de vías urinarias, ExEC (*E. coli* extraintestinal) relacionadas con septicemias e infecciones del sistema nervioso central. Es importante mencionar que cada uno de estos grupos patógenos presenta afinidad por especies animales incluido el humano, grupos etarios, variedades antigénicas específicas (serogrupos o serotipos), características epidemiológicas y factores de virulencia particulares entre los que se incluyen capacidad de adherencia, invasividad y/o producción de toxinas entre otros.¹¹

- *Escherichia coli* como modelo de estudio en la microbiología

La quimiostasis en *E.coli* es probablemente el sistema de comportamiento más comprendido de la biología. Todos los componentes son conocidos y, con excepción de los dominios de los quimiorreceptores transmembranales, hay una alta resolución de las estructuras de las proteínas con y

¹¹ Ibid.



sin ligando y la interacción con las proteínas asociadas.¹² El número de copias de cada proteína y la cinética *in vitro* de cada reacción de fosfotransmisión son conocidas. Sus proteínas han sido mutadas, reticuladas entre ellas y estudiadas *in vivo* por experimentos de resonancia de transferencia de energía fluorescente. Esto ha llevado a un gran número de modelos de predicciones para describir respuestas en ambientes cambiantes.¹³ Incluso se ha descrito la secuencia genómica completa de esta bacteria desde 1997, contando con 4639221 pares de bases, 4288 genes codificadores de proteínas y el 38% de estos genes se mantienen inactivos.¹⁴

Debido a todos los conocimientos (sin limitarse a los antes mencionados) acerca de *E.coli* se utiliza en el mundo de la ciencia como un modelo de transformación para el estudio de otras bacterias menos conocidas, tomando plasmidos de la bacteria a estudiar e insertándolo por diversos métodos en *E.coli* obteniendo la expresión de los genes deseados.¹⁵

- o **Electroforesis**

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas en una mezcla por aplicación de un campo eléctrico. Las moléculas disueltas se desplazan o migran en un campo eléctrico a una velocidad determinada por su relación carga: masa. Para poder separar las diversas moléculas de ADN se requiere emplear un gel de agarosa que posee micro poros que hacen más precisa la lectura y sumergir este gel en una solución de bromuro de etidio para después observarse a la luz UV de onda larga.¹⁶

- o **Amplificación de ADN y su clonación en *E. coli***

Pasos:

1. Aislamiento y fragmentación de la fuente de ADN: ADNg (genómico), por PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) utilizando oligonucleótidos específicos.

¹² Armitage Op.Cit.

¹³ Ibid

¹⁴ Blattner, Frederick R. 1997. "The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12", en: *Science*, Vol. 277 no. 5331 pp. 1453-1462. AAAS. U.S.A

¹⁵ Galván Cejudo Aurora. *Transformación de Escherichia coli con un plásmido recombinante*, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales. Córdoba.

¹⁶ Yábar Varas, Carlos Augusto. 2003. *Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN*, Instituto Nacional de Salud. Perú.



2. Clonación del fragmento de ADN en un vector.
3. Introducción y amplificación del vector recombinante en un organismo huésped.¹⁷

- **METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN:**

- a. **Métodos**

Durante la investigación experimental se utilizaron diversos métodos para manipular y transformar las bacterias y comprobar resultados, estos fueron:

- 1. Preparación de Gel de Agarosa**

Se pesan 0.38g de Agarosa y se agregan 38 mL de Buffer E 1x. Se calentó en horno de micro ondas 40 segundos, y se esperó a que enfriara. Se vertió en el molde y se colocan los peines con el tamaño de diente que se deseaban. Se corrió en electroforesis con Buffer E 1x, λ y la muestra a examinar. Finalmente se dejó remojar el gel en bromuro de etidio por 10 minutos y se expuso a la luz ultravioleta para medir los resultados.

- 2. Purificación de Plásmidos**

Un cultivo Overnight de 3ml de la cepa de *E.coli* con el plásmido de interés. Se cosechó por centrifugación a 14000 rpm por 2 minutos. Desechar el sobrenadante dejando un pequeño volumen. Agitar vigorosamente por 2 segundos. Se agregan 300 μ L de STET y 30 μ L de lisozima (10mg/mL) y agitar por 2 segundos. Se hierve por 45 segundos y se centrifuga a 14000 rpm por 18 minutos a 4°C. Se lava el pellet con etanol al 70% y se seca al vacío por 10 minutos. Se resuspende en 30-50 μ L de agua y se utilizan 3 μ L para analizar en gel de agarosa al 1%.

¹⁷ *Técnicas de ADN recombinante: Clonado de genes. Op.Cit.*



3. Digestión de un plásmido

La digestión de un plásmido es el utilizar una enzima de restricción para realizar un corte en su secuencia de ADN para obtener la cadena deseada y poder trabajar con ella. Para realizarlo se necesita primero que nade saber qué es lo que se va a cortar, para esto se realiza una electroforesis. Para esto se utilizan 1 μ L de buffer NE2 10x, .5 μ L de enzima de restricción, 3 μ L de plasmido y 5.5 μ L de agua.

4. Inserción de Plásmido en *E.coli* por medio del método de CaCl₂

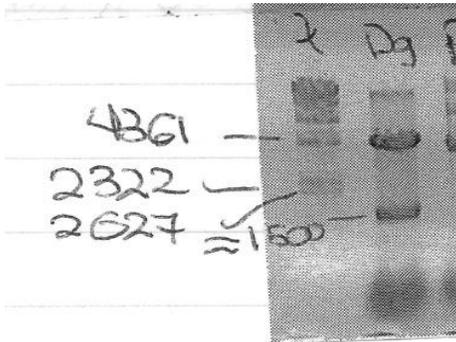
Se inoculó 10 μ L de medio LB (Luria-Bertani) con la cepa de *E.coli* por transformar y se cultivó hasta la fase exponencial. Posteriormente se transfiere a hielo, donde se incubó por 10 minutos. Las células se colectaron por centrifugación a 3500 rpm por 5 minutos a 4°C, el paquete celular se resuspendió agregando 6mL de CaCl₂ y se dejó incubar por 1 hora. Una alícuota de 200 μ L de células se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se agregaron 5 μ L de plásmido. Después de incubar en hielo por 30 minutos se dio un choque termicoa 42°C por 2 minutos y se regresó al hielo por otros 2 minutos. Se añadió 800 μ L de LB y se incubó a 37°C por 1 hora. Las células se centrifugaron a 3500 rpm por 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se sembraron en el medio selectivo por medio de un plateado.

b. Procedimiento

Siguiendo los métodos se procedió de la manera siguiente:

1. Se purificaron plásmidos de *Rba. sphaeroides* y se analizaron en gel de agarosa.
2. Se realizó la digestión de este plásmido con la enzima de restricción EcoR1, realizando el corte en su sitio correspondiente. Se realizó una electroforesis al finalizar.





Electroforesis de la digestión de los plásmidos de *Rba. sphaeroides*

3. Se identificó el plásmido obtenido a partir de un PCR (Reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés) y electroforesis.
4. Se realizó una nueva digestión al plásmido obtenido.
5. Se transformó a la cepa BL21ZA1 de *E.coli* con el nuevo plásmido por medio del método de CaCl_2 .
6. Se realizó una mezcla con 40 μL de mezcla de reacción GUS, 10 μL de cepa BL21ZA1 modificada por 10 minutos a 37°C agregando 950 μL de Na_2CO_3 para detener la reacción.
7. Se analizó bajo luz ultravioleta y se observaron los siguientes resultados:

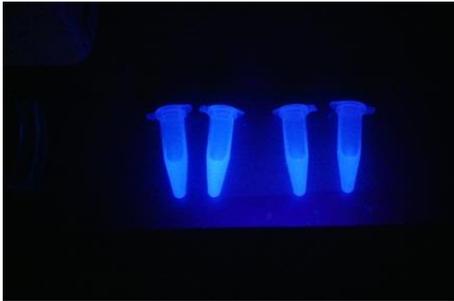


Primer análisis de resultados siendo el grupo control el tubo 2, expresando más el gen que los tubos con enzima promotora.

Debido a la baja actividad que se obtuvo en la expresión del gen flagelar de *Rba. sphaeroides* en los tubos que se supone deberían presentar mayor reactividad (1-3 y 4 por



tener diversos promotores de este gen) se repitió el experimento procediendo de la misma manera pero manipulando los genes a utilizar por separado, obteniendo el siguiente resultado:



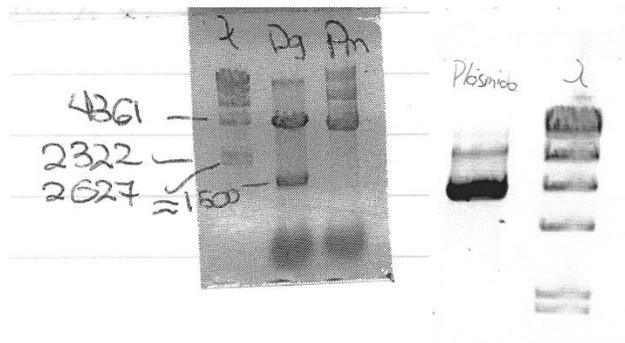
2° análisis de resultados con mejor expresión pero sin ser la esperada

Se observa una mayor reactividad en estos resultados, sin embargo el tubo número 2, que no posee ningún promotor, sigue presentando mayor expresión del gen flagelar al contrario de los demás, que presentan mayor actividad que en la prueba pasada pero aun siendo inferior al tubo 2 cuando debería ser al revés.

Se continuará haciendo pruebas para deducir la fuente del problema y corregirlo en la medida de lo posible.

- **RESULTADOS OBTENIDOS**

A lo largo del proyecto se logró aislar el plásmido que se buscaba, lo cual se muestra en las imágenes a continuación:



En esta imagen se puede observar el plásmido digerido (izq) y la segunda digestión del plásmido obtenido (der)



Esto se logró a partir de la digestión del plásmido de *Rba.sphaeroides* y se comprobó comparando los pares de bases con λ . A partir de este punto se comenzó a introducir el plásmido en diversas cepas de *E.coli* para comprobar su expresión en esta.

Hasta el momento hemos logrado transformar *E. coli* con los plásmidos que llevan los genes *rpoN*, *fleQ* y *fleT*. Sin embargo, la expresión del gen reportero *uidA* fue muy baja. Por lo tanto se siguen haciendo pruebas para eliminar la posibilidad de tener interferencia entre los diferentes plásmidos. Adicionalmente aún es necesario determinar si las proteínas *FleQ* y *FleT* son estables en *E. coli*.



Primera toma de resultados bajo luz UV



Segunda toma de resultados bajo luz UV



- **CONCLUSIONES**

Escherichia coli, como la mayoría de las bacterias, puede compartir plásmidos con otras bacterias de otras especies, logrando obtener genes silvestres muy básicos que pueden interferir con las pruebas a realizar, por lo cual se intenta mantener la cepa lo más pura posible.

En base a los experimentos realizados y los avances obtenidos se puede inferir que es posible que exista algún gen silvestre que no hayamos detectado en la cepa BL21ZA1 de *E.coli*, que está interfiriendo en la expresión correcta de los genes *rpoN*, *fleQ* y *fleT* ya que se hicieron correcciones para eliminar algunas variables de interferencia entre estos pero seguía habiendo una expresión baja incluso con los promotores.

A pesar de esto se observó que *E.coli* expresa de manera débil estos genes lo cual nos lleva a hipotetizar que si se logra eliminar la interferencia de este gen silvestre, se logrará estabilizar los genes de *Rba.sphaeroides* en *E.coli* expresándolos correctamente y abriendo paso al estudio de esta bacteria purpura para el completo aprovechamiento del ser humano.



• BIBLIOGRAFÍA

- Armitage, Judith P., 2009, *Swimming and behavior in purple non-sulfur bacteria*, Inglaterra, Departamento de bioquímica. Universidad de Oxford.
- Blankenship, R. E. Madigan, M. T. and Bauer. 1995. *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers.
- Blattner, Frederick R. 1997. "The Complete Genome Sequence of Escherichia coli K-12", en: *Science* Vol. 277 no. 5331 pp. 1453-1462. AAAS. U.S.A
- Eslava Campos, Carlos A.; Navarro Ocaña, Armando; Hernández Chiñas, Ulises; Salazar Jiménez, Erika P. *Escherichia coli microorganismo divergente con actitud dual en su relación de convivencia con sus hospederos*, Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM,
http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/ourprofs/ecoli_divergente.htm
- Galván Cejudo, A. *Transformación de Escherichia coli con un plásmido recombinante*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales. Cordoba.
- Yábar Varas, Carlos Augusto. 2003. *Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN*. Instituto Nacional de Salud. Perú.
- *Técnicas de ADN recombinante: Clonado de genes*, Instituto de Investigaciones Biológicas, Argentina, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Universidad Nacional del Mar del Plata,
http://www.iib.org.ar/bajar_material.php?archivo=49.pdf
- *Escherichia coli*, en: Wikipedia, Fundación Wikimedia Inc.
http://es.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli

