

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se detallan en las tablas 2.1.1 y 2.1.2, en su mayoría pertenecientes a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium:

Tabla 2.1.1 Cepas bacterianas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium utilizadas en este trabajo.

| Cepas | Genotipo relevante | Referencia/Origen |
|-----------------|---|----------------------------------|
| LT2 | cepa salvaje | Lilleengen, 1948 |
| TT1704 | $\Delta his-9533$ | Torreblanca y Casadesús, 1996 |
| SV3081 | pSLT ⁻ (isogénica de LT2) | Torreblanca <i>et al.</i> , 1999 |
| YFER | TT1704 <i>yfeR::MudJ</i> | Prenafeta, 1999 |
| YFER2 | TT1704 <i>yfeR</i> ⁻ | Este trabajo |
| YFERYGDP | TT1704 <i>yfeR::MudJ ygdP::Tn10dCam</i> | Prenafeta, 1999 |
| YGDP | TT1704 <i>ygdP::Tn10dCam</i> | Polo, 2000 |
| C52 | $\Delta rpoS::cam$ | Kowarz <i>et al.</i> , 1994 |
| TTRPOS | TT1704 $\Delta rpoS::cam$ | Este trabajo |
| YFEH | TT1704 <i>yfeH</i> | Este trabajo |
| 14028 | cepa salvaje | ATCC |
| SV4280 | <i>lrp</i> ⁻ | J. Casadesús |

Tabla 2.1.2 Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo.

| Cepas | Genotipo relevante | Referencia |
|------------------|---|--------------------------------|
| HB101 | <i>supE44, supF58, hsdS3(r_B⁻m_B⁻), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1</i> | Sambroock <i>et al.</i> , 1989 |
| BL21(DE3) | pLysE; <i>hsdS, gal, lclts857, ind1, Sam7, Nin5, lacUV5-T7gene1</i> | Studier y Moffatt, 1986 |

A continuación se describen las características de los plásmidos (tabla 2.1.3) y bacteriófagos (tabla 2.1.4) utilizados en este trabajo:

Tabla 2.1.3 Plásmidos utilizados en la realización de este trabajo.

| Plásmido | Descripción | Referencia |
|----------------------------|---|-------------------------------------|
| pBR322 | <i>ori</i> _{pMB1} ; Ap ^r , Tc ^r | Bolívar <i>et al.</i> , 1977 |
| pLG338-30 | <i>ori</i> _{pSC101} ; Ap ^r | Cunningham <i>et al.</i> , 1993 |
| pUC19 | <i>ori</i> _{ColEI} ; Ap ^r | Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985 |
| pMC391 | <i>lacZ'</i> | Casadaban <i>et al.</i> , 1980 |
| pKD46 | <i>oriR101</i> , <i>repA101</i> (ts), <i>araBp-gam-bet-exo</i> (Red helper plasmid, Ts; Ap ^r) | Datsenko y Wanner, 2000 |
| pKD4 | <i>oriRγ</i> , Km ^r , Ap ^r | Datsenko y Wanner, 2000 |
| pCP20 | <i>λcI857</i> (ts), <i>ts-rep</i> (Recombinasa FLP, Ts) | Cheperanov y Wackernagel, 1995 |
| pET3b | Promotor de T7, Ap ^r | Studier <i>et al.</i> , 1990 |
| pETYFER | pET3b + <i>yfeR</i> , Ap ^r | Este trabajo |
| pETYFER_r | pET3b + cadena complementaria al ARN _m de <i>yfeR</i> , Ap ^r | Este trabajo |
| pANN202-312 | pACYC184 + <i>hlyC</i> , <i>hlyA</i> , <i>hlyB</i> , <i>hlyD</i> ; Cm ^r | Godessart <i>et al.</i> , 1988 |
| pLGYFER | pLG338-30 + <i>yfeR</i> , Ap ^r | Este trabajo |
| pLGYFEHLAC | pLG338-30 + <i>yfeH::lacZ</i> , Ap ^r | Este trabajo |
| pLGYFEHCAT | pLG338-30 + <i>yfeH::CAT</i> , Ap ^r | Este trabajo |
| pLACP | pLA2917 + <i>yfeR</i> , Tc ^r ; Kn ^r | Polo, 2000 |
| pUCIR | pUC19 + <i>yfeH</i> + región intergénica <i>yfeR-yfeH</i> + extremo 5' MudJ | Este trabajo |
| pKO3 | Cm ^r , <i>repA</i> (ts), <i>sacB</i> | Link <i>et al.</i> , 1997 |
| pKYFEH | pKO3 + <i>yfeH</i> mutado | Este trabajo |

Tabla 2.1.4 Bacteriófagos utilizados en experimentos de transducción generalizada.

| Bacteriófago | Descripción | Referencia |
|---------------------------|-------------|-------------------------------|
| P22 HT <i>int4</i> | <i>int4</i> | Schmieger, 1972 |
| P22 H5 | <i>c2</i> | Torreblanca y Casadesús, 1996 |

2.2 MEDIOS DE CULTIVO Y ANTIBIÓTICOS

2.2.1 MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizaron diferentes medios de cultivo líquidos y sólidos, cuya composición y preparación se detallan a continuación:

- **LB** (Luria-Bertani; Sambrook *et al.*, 1989): medio de cultivo líquido utilizado de forma habitual para el crecimiento bacteriano. En algunos experimentos se modificó la osmolaridad del medio cambiando la concentración de NaCl. Si en condiciones normales la molaridad del NaCl es de 170 mM se aumentó a 0.5 M (29.22g/l) o bien se disminuyó a 0 M.

| LB | g/l |
|---|------------|
| Peptona tríptica de caseína (Schärlau Microbiology) | 10 |
| Extracto de levadura (Schärlau Microbiology) | 5 |
| NaCl (Panreac) | 10 |

- **LB agar:** es el medio de cultivo sólido utilizado de forma habitual y consiste en añadir 15 g/l de agar para bacteriología (Schärlau Microbiology) al medio LB arriba especificado.

- **LB agar blando:** medio de cultivo semisólido utilizado para la titulación de lisados fágicos al permitir el crecimiento en masa de la bacteria. En este caso al medio LB se le añaden de 6-8 g/l de agar para bacteriología (Schärlau Microbiology).

- **EBU:** medio sólido utilizado para la obtención de clones libres de pseudolisógenos después de una transducción generalizada con el fago P22. Consiste en el medio LB agar que una vez esterilizado se suplementa el resto de componentes abajo indicados, todos ellos esterilizados por filtración.

| EBU | |
|---|-------------|
| LB AGAR | |
| Glucosa (Panreac) | 0,25% (p/v) |
| K ₂ HPO ₄ (Merck) | 0,25% (p/v) |
| Azul de Evans (Sigma) | 0,0125 g/l |
| Fluoresceína (Uranina, Sigma) | 0,0250 g/l |

- **E y NCE:** los medios E (Vogel y Bonner, 1956) y NCE (Berkowitz *et al.*, 1968) se usaron en su calidad de medios mínimos. La composición y preparación de ambos medios es prácticamente la misma, salvo que el medio E contiene citrato, fuente de carbono utilizable por *Salmonella*, además de la glucosa, que es la fuente de carbono habitual. El medio NCE no contiene citrato, por lo que es necesaria una variación en la composición de sales para que el pH sea neutro. Tanto el medio E como el NCE se preparan como soluciones de sales 50 veces concentradas, que se esterilizan con cloroformo. En el momento de preparar el medio se diluyen 50 veces en agua bidestilada estéril para el medio líquido, y en agua con agar 15 g/l para el medio sólido. Posteriormente se añade la fuente de carbono a una concentración de 2 g/l a partir de una solución madre estéril. En el medio NCE el MgSO₄ también se añade *a posteriori* a partir de una solución madre al 20% (p/v). Como la cepa utilizada mayoritariamente en este trabajo es la TT1704, o cepas isogénicas derivadas de la misma, y la cepa TT1704 es auxótrofa para la histidina, se añadieron 4ml /l de una solución madre de este aminoácido a 10 mg/ml (Miller, 1992).

| Sales minerales del medio E | |
|--|--------|
| MgSO ₄ (Merck) | 0,8 mM |
| Ácido cítrico (Merck) | 9,5 mM |
| K ₂ HPO ₄ (Merck) | 57 mM |
| NaNH ₄ HPO ₄ (Merck) | 17 mM |

| Sales minerales del medio NCE | |
|--|-------|
| KH ₂ PO ₄ (Merck) | 29 mM |
| K ₂ HPO ₄ (Merck) | 28 mM |
| NaNH ₄ HPO ₄ (Merck) | 17 mM |

- **MS** (Spector y Cubbitt, 1992): medio mínimo resultado de una ligera modificación del medio **MOPS** (Neidhart *et al.*, 1974), en el que sus componentes están perfectamente controlados, por lo que se puede utilizar para limitar la concentración de determinados nutrientes como el fósforo, el nitrógeno o la glucosa. Este medio se preparó

10 veces concentrado mezclando las soluciones en el orden indicado en la tabla para evitar la precipitación de las sales. El medio se esterilizó por filtración y posteriormente se guardó congelado a -20°C hasta su utilización.

| MS | l |
|--|--------|
| MOPS (Sigma) 1M ajustado a pH 7,4 con KOH | 400 ml |
| Tricina (Sigma) 1M ajustada a pH 7,4 con KOH | 40 ml |
| FeSO ₄ 0,01 M | 10 ml |
| K ₂ SO ₄ 0,276 M | 10 ml |
| CaCl ₂ 0,5 mM | 10 ml |
| MgCl ₂ 0,528 M | 10 ml |
| NaCl 5 M | 100 ml |
| Solución de micronutrientes | 10 ml |
| H ₂ O bidestilada | 360 ml |

| Solución de micronutrientes | |
|--|---------------------|
| (NH ₄) ₆ (MO ₇) ₂₄ | $3 \cdot 10^{-6}$ M |
| H ₃ BO ₃ | $4 \cdot 10^{-4}$ M |
| CoCl ₂ | $3 \cdot 10^{-5}$ M |
| CuSO ₄ | 10^{-5} M |
| MnCl ₂ | $8 \cdot 10^{-5}$ M |
| ZnSO ₄ | 10^{-5} M |

El medio 1 x se preparó por dilución de esta solución en agua bidestilada estéril, y se suplementó con cantidades no limitantes de fuentes de fósforo, carbono y nitrógeno (medio MShiPCN, “MS high P,C,N”), a una concentración final de: 15 mM KH₂PO₄/ K₂HPO₄ (pH 7,4), 0,4% glucosa (p/v) y 15 mM de NH₄Cl, respectivamente. Cuando se quiso conseguir cantidades limitantes de estos nutrientes la concentración final fue la siguiente: 0,1125 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 7,4) (MSloP, “MS low P”), 0,04% glucosa (p/v) (MSloC, “MS low C”), y 0,6 mM de NH₄Cl (MSloN, “MS low N”). Tal y como ya se ha comentado con el medio mínimo E se suplementó el medio con histidina.

- **Caldo de fagos:** su composición es la del medio NB (Nutrient Broth, Difco) más 5 g/l de NaCl, sales del medio mínimo E y glucosa al 0,2% (p/v). Para utilizarlo en la obtención de lisados de *S. Typhimurium* se añaden 0,1 ml de un lisado de P22 crecido en la cepa TT1704 por cada 100 ml de caldo de fagos.

- **SOB** (Hanahan *et al.*, 1991): Medio de cultivo líquido utilizado para el crecimiento bacteriano en la mutagénesis de inactivación de genes cromosómicos utilizando fragmentos de PCR (apartado 2.4.1).

| SOB | |
|---|----------|
| Peptona tríptica de caseína (Schärlau Microbiology) | 20 g/l |
| Extracto de levadura (Schärlau Microbiology) | 5 g/l |
| NaCl (Panreac) | 0,58 g/l |
| KCl (Merck) | 0,19 g/l |
| MgCl ₂ + MgSO ₄ * | 20 mM |

*A partir de una solución madre Mg²⁺ 2M (MgCl₂ 1 M + MgSO₄ 1 M).

- **SOC** (Hanahan *et al.*, 1991): Se utiliza como medio de recuperación de las células después de la electroporación en la mutagénesis de genes cromosómicos utilizando fragmentos de PCR (apartado 2.4.1). Se trata del medio SOB suplementado con glucosa 20 mM.

2.2.2 ANTIBIÓTICOS

Cuando fue necesario, los diferentes medios de cultivo anteriormente citados se suplementaron con antibióticos. Estos antibióticos se añadieron al medio estéril a partir de una solución concentrada conservada a -20°C preparada siguiendo las instrucciones de la bibliografía (Sambrook *et al.*, 1989). En la tabla 2.2.1 se muestran las concentraciones finales a las que fueron utilizadas los antibióticos, según la localización del gen de la resistencia o el medio de cultivo.

- **Ampicilina (Ap)** (sal sódica, Roche): se preparó una solución concentrada a 100 mg/ml en agua bidestilada y se esterilizó por filtración.

- **Cloranfenicol (Cm)** (Fluka): se preparó a una concentración de 100 mg/ml en Etanol absoluto (Prolabo).
- **Estreptomicina (Sm)** (Sulfato, Sigma): se preparó a 100 mg/ml en agua bidestilada y se esterilizó por filtración.
- **Kanamicina (Km)** (Sulfato ácido, Sigma): la solución concentrada se preparó a 50 mg/ml en agua bidestilada y se esterilizó por filtración.
- **Tetraciclina (Tc)** (Hidrocloruro, Fluka): la solución madre se preparó a 12,5 mg/ml en etanol (absoluto) al 50% (v/v), se esterilizó por filtración y se guardó protegida de la luz.
- **Rifampicina (Rf)** (Fluka): se preparó a 50 mg/ml en agua bidestilada añadiendo unas gotitas de NaOH 2N hasta su completa disolución. Se esterilizó por filtración pero no se guardó más de dos semanas una vez preparada.

Tabla 2. 2. 1. Concentraciones de los antibióticos.

| ANTIBIÓTICO | Concentración en el medio (µg/ml) | |
|-----------------------|--|----------------|
| | Medio rico | Medio mínimo |
| Ampicilina | 25 ^a - (50 -100) ^b | 15 |
| Cloranfenicol | 12,5 ^a -50 ^b | - ^c |
| Estreptomicina | 200 ^a | - ^c |
| Kanamicina | 50 ^a | 125 |
| Rifampicina | 75 ^a | - ^c |
| Tetraciclina | 15 ^a | 10 |

^a Para resistencias cromosómicas ^b Para resistencias contenidas en plásmidos de medio-elevado número de copias. ^c No utilizado en esta tesis.

2.3 MÉTODOS DE TRANSFERENCIA GENÉTICA

2.3.1 TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

Para llevar a cabo la transformación de células bacterianas se utilizaron dos métodos diferentes. Normalmente se llevó a cabo la transformación con CaCl_2 , pero en algunos casos, especialmente cuando la eficiencia de transformación fue baja, se recurrió a la electroporación.

2.3.1.1 Transformación de células competentes obtenidas mediante tratamiento con CaCl_2

(Cohen *et al.*, 1972)

- Obtención de células competentes de *E. coli*: a partir de un inóculo crecido durante toda la noche en LB se hizo una dilución 1:50 en medio de cultivo fresco, y se incubó a 37°C hasta fase exponencial temprana, es decir, hasta una absorbancia de 0,2-0,3 a 600 nm. Se incubó un volumen de cultivo 10 minutos en hielo, y se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos y a una temperatura de 4°C. A continuación se resuspendieron las células en la mitad de volumen de CaCl_2 50 mM frío, y se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones pero sólo durante 5 minutos. Finalmente se resuspendieron en un volumen de CaCl_2 que representaba 1/20 parte del volumen inicial. Esta suspensión se incubó en hielo desde un mínimo de 30 minutos hasta un máximo de 24 horas antes de la transformación.

- Obtención de células competentes de *Salmonella*: esta bacteria presenta una eficiencia de transformación por CaCl_2 50 mM menor que *E. coli*, por lo que se modificó ligeramente el protocolo de transformación. Si con *E. coli* el volumen final de resuspensión fue de 1/20 del volumen inicial, en este caso fue de 1/100 del volumen inicial, de forma que las células quedaron mucho más concentradas.

En los dos casos alícuotas de 100 μl de células competentes se mezclaron con 1-10 μl de solución de ADN plasmídico. Esta mezcla se incubó 30 minutos en hielo y a continuación se las sometió a un choque térmico a 42°C durante 40 segundos. Se añadió medio de cultivo LB fresco hasta un volumen de 1 ml y se dejó incubar a 37°C durante una hora para permitir la expresión de los marcadores fenotípicos transferidos

(mayoritariamente genes de resistencia a antibióticos), que permitieron seleccionar las células que adquirieron el plásmido al sembrar en medio sólido con el agente selectivo.

2.3.1.2 Electroporación

(Dower *et al.*, 1988)

Este método permite la captación de ADN mediante la permeabilización de las membranas provocada por una descarga eléctrica. Con este método la eficacia de la transformación aumenta considerablemente, obteniendo entre 10^9 - 10^{10} transformantes por μg de ADN.

A partir de un inóculo crecido toda la noche se realiza una dilución 1:50 en medio LB fresco y se incuba a 37°C hasta una DO a 600 nm de 0,5. Después de enfriar el cultivo en hielo, partiendo de un volumen de 10 ml, se realizan varias centrifugaciones sucesivas a $3000 \times g$ y 4°C , en las que se va disminuyendo el volumen al resuspender en 1, 0,5, 0,1 y finalmente 0,005 volúmenes de glicerol 10%. De esta forma se disminuye la fuerza iónica de la suspensión celular, al limpiar las sales. Las células se mantienen en hielo hasta el momento de la electroporación: se mezclan $50 \mu\text{l}$ de células con 1-5 μl de la suspensión que contiene el ADN y a continuación se transfiere a cubetas esterilizadas con luz ultravioleta. El electroporador utilizado en esta tesis fue el Electro Cell Manipulator 600 (BTX Electroporation System), con las condiciones de electroporación que se muestran a continuación:

| Condiciones de electroporación | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Temperatura | 4°C |
| Modo | 2,5 kV / Resistencia de alto voltaje |
| Capacitancia | No utilizar en modo de alto voltaje |
| Resistencia | R5 (129Ω) |
| Voltaje de la descarga | 2 kV |
| Fuerza del campo eléctrico aplicado | 10 kV / cm (máximo) |
| Duración del pulso | 5 ms |

Una vez realizada la descarga eléctrica se añadió medio LB fresco hasta completar a 1 ml de volumen y se incubó a 37°C durante una hora para permitir la expresión de los

genes de resistencia a antibióticos. Las células transformadas se seleccionaron en medio sólido suplementado con los marcadores correspondientes.

2.3.2 TRANSDUCCIÓN CON EL BACTERIÓFAGO P22

El bacteriófago P22 HT *int4* (Schmieger, 1972) se utilizó en este trabajo para introducir mutaciones en las cepas por recombinación homóloga. Este fago P22 presenta dos mutaciones, HT e *int*, que le confieren respectivamente una elevada frecuencia de transducción, y una deficiencia en la integración del DNA del bacteriófago en el cromosoma de la cepa receptora, evitando así la lisogenia.

2.3.2.1 Obtención de lisados de P22

Un cultivo de toda la noche de la cepa dadora (0,5 ml) se mezcló con 2 ml de caldo de P22 (apartado 2.2.1), y se incubó a 37°C de 8 a 16 h en agitación a 200 rpm. Aunque durante esta incubación se produce lisis celular la turbidez del cultivo no disminuye. Posteriormente se centrifugó la mezcla (3000 x g, 25 minutos) para eliminar las células. Se recogió el sobrenadante, donde quedan las partículas fágicas, y después de añadir unas gotas de cloroformo, agitar vigorosamente en un vórtex e incubar a temperatura ambiente durante dos horas, se guardó a 4°C hasta su utilización.

2.3.2.2 Titulación del lisado fágico

Se mezclaron 200 µl de un cultivo de la cepa hospedadora en fase exponencial (DO_{600nm} 0,3-0,4), con 100 µl de diluciones seriadas del lisado fágico en MgSO₄ 10 mM. Estas mezclas se incubaron a 37°C durante 20 minutos para permitir la adsorción del fago. Acto seguido se les añadieron 2,5 ml de LB agar blando (mantenido líquido a 55°C), vertiéndolo todo rápidamente después de mezclar sobre una placa de LB, que se incubó a 37°C hasta la aparición de calvas de lisis.

2.3.2.3 Transducción con P22

Las transducciones con P22 llevadas a cabo en este trabajo se realizaron en medio líquido. Consistió en mezclar en un tubo de 1,5 ml volúmenes iguales de un cultivo de toda la noche de la cepa receptora y del lisado fágico obtenido sobre la cepa dadora o diluciones del mismo en MgSO_4 10 mM (normalmente 10^{-1} y 10^{-2}). A continuación se incubaron a 37°C sin agitación durante 30 minutos para permitir la infección del fago, y se sembraron en placas de LB agar conteniendo los marcadores de resistencia a antibióticos transferidos por recombinación homóloga.

Es posible que en el proceso de transducción una célula transductante sea infectada de nuevo por el fago P22, dando como resultado un pseudolisógeno, y aunque éste sea deficiente para sus funciones de integración en el cromosoma, puede pasar en este caso que el DNA de P22 se acabe integrando. Estas cepas se vuelven resistentes a subsiguientes infecciones con el fago P22, por lo que no se podrán utilizar en experimentos de transducción. Por esto, después de una transducción con P22 fue necesaria una “limpieza de pseudolisógenos”, que se realizó sembrando en placas EBU. En estas placas se pueden distinguir las colonias con pseudolisógenos, que tienen un color verde oscuro, de las que están libres de ellos, de color verde más claro. El color verde oscuro es debido a la lisis por P22 que libera productos ácidos, haciendo virar un indicador de pH que contiene el medio. Así, se siembran dos o tres estrías sucesivas a partir de colonias verde claras.

Tras el paso por placas EBU, se realizó una última prueba para comprobar que los transductantes estuvieran totalmente libres de pseudolisógenos, sometiéndolos a un test de sensibilidad al bacteriófago P22 H5. La mutación en el gen *c2* que presenta este derivado virulento de P22 hace que produzca calvas de lisis claras. Para este ensayo se realizó una estría a partir de un lisado de P22 H5 en una placa de LB. En esta misma placa se sembraron la cepa TT1704, como control, y la cepa transductante, haciendo dos estrías paralelas que cruzasen perpendicularmente la estría de P22 H5. Después de incubar la placa 18-24 h a 37°C , se observa como las cepas sensibles a la infección, y por lo tanto libres de pseudolisógenos, crecen solamente hasta llegar a la estría de P22 H5, mientras que las cepas con P22 integrado son resistentes a la infección y pueden crecer cruzando la estría de P22 H5.

2.4 TÉCNICAS DE MUTAGÉNESIS BACTERIANA

2.4.1 INACTIVACIÓN DE GENES CROMOSÓMICOS UTILIZANDO FRAGMENTOS DE PCR

(Datsenko y Wanner, 2000)

Con esta metodología es posible reemplazar una secuencia cromosómica por un gen de resistencia a antibióticos, generado por PCR, utilizando oligonucleótidos con extensiones homólogas correspondientes al gen a deletar. Estas extensiones permitirán la recombinación mediante la recombinasa Red en las regiones flanqueantes al gen. Después de la selección de mutantes, la resistencia al antibiótico puede ser eliminada utilizando un plásmido auxiliar que expresa la recombinasa FLP, actuando sobre la repetición directa FRT adyacente al gen de la resistencia.

2.4.1.1 Generación del fragmento de PCR

La resistencia a Km del plásmido pKD4 se amplificó utilizando oligonucleótidos que en su extremo 5' contenían secuencias homólogas (de entre 35 y 50 nucleótidos) al gen objeto de delección (H1 y H2), más la secuencia correspondiente a P1 y P2 del plásmido PKD4 (figura 2.4.1). En total los oligonucleótidos midieron entre 56 y 70 nucleótidos. De esta forma, al amplificar la resistencia a Km del plásmido pKD4, se genera un fragmento de PCR que contiene la resistencia al antibiótico flanqueada por los sitios FRT, las secuencias P1 y P2, más las secuencias homólogas al gen que se quiere deletar. Después de la amplificación el fragmento se purificó por electroelución, y posteriormente se digirió con *DpnI* para eliminar el ADN molde utilizado en la PCR, ya que esta enzima digiere selectivamente el ADN metilado.

2.4.1.2 Transformación del plásmido pKD46

El plásmido pKD46 codifica para la recombinasa Red del fago λ bajo el control de un promotor inducible por L-arabinosa, y al tener un origen de replicación termosensible se cura fácilmente a 43°C. La recombinasa Red, además de favorecer la recombinación inhibe a la exonucleasa V, permitiendo así la entrada a la célula de un fragmento de PCR sin que

este sea digerido. El plásmido portador de la recombinasa es resistente a ampicilina (100 µg/ml).

Se hizo crecer a la cepa objeto de la mutagénesis, transformada previamente con el plásmido pKD46, a 30°C en medio SOB suplementado con ampicilina y L-arabinosa 10 mM (Sigma) hasta una $DO_{600}=0,6$. Cuando la cepa llegó a este punto del crecimiento se obtuvieron células electrocompetentes por centrifugación (3000 x g, 4°C) y lavados con glicerol 10 % (v/v) frío, concentrando las células x 100.

Alícuotas de 25 µl de células electrocompetentes se electroporaron con 10-100 ng de producto de PCR. Una vez sometidas las células al pulso eléctrico se resuspendieron en 1 ml de medio SOC y se incubaron durante 1 hora a 37°C para favorecer la recombinación y permitir la expresión de la resistencia al antibiótico. La selección de los mutantes se realizó sembrando la mitad de las células en medio sólido LB agar suplementado con kanamicina. El resto de transformantes se incubaron a temperatura ambiente entre 18-24 horas y se sembraron pasado este tiempo en el mismo medio. Las placas se incubaron a 37°C 48 horas.

Una vez obtenida alguna colonia posible mutante se realizaron amplificaciones por PCR con distintas parejas de oligonucleótidos para comprobar la inserción del antibiótico en el gen en cuestión. Para eliminar el plásmido pKD46 se realizaron estrías en medio sólido sin el antibiótico a 43°C. En la figura 2.4.1 se muestra un esquema del proceso.

2.4.1.3 Eliminación de la resistencia al antibiótico

Una vez comprobada la mutación por PCR, se transformó con el plásmido pCP20, que codifica para la recombinasa FLP inducible por temperatura (43°C), resistente a ampicilina y cloranfenicol, y con origen de replicación termosensible. La transformación se sembró en medio sólido con Ap a 30°C, y se incubó a esta temperatura durante 16 horas. Los transformantes obtenidos se sembraron en medio sólido no selectivo a 43°C para favorecer la pérdida del plásmido, ya que la mayoría de pérdidas de la resistencia flanqueada por sitios FRT es simultánea a la pérdida del plásmido pCP20. Aún así, se hicieron sucesivas estrías a 43°C en medio sólido para asegurarnos que realmente se había perdido el plásmido. Para finalizar, se comprobó por PCR que la resistencia a Km del plásmido pKD4 se había perdido y que el gen original estaba delecionado.

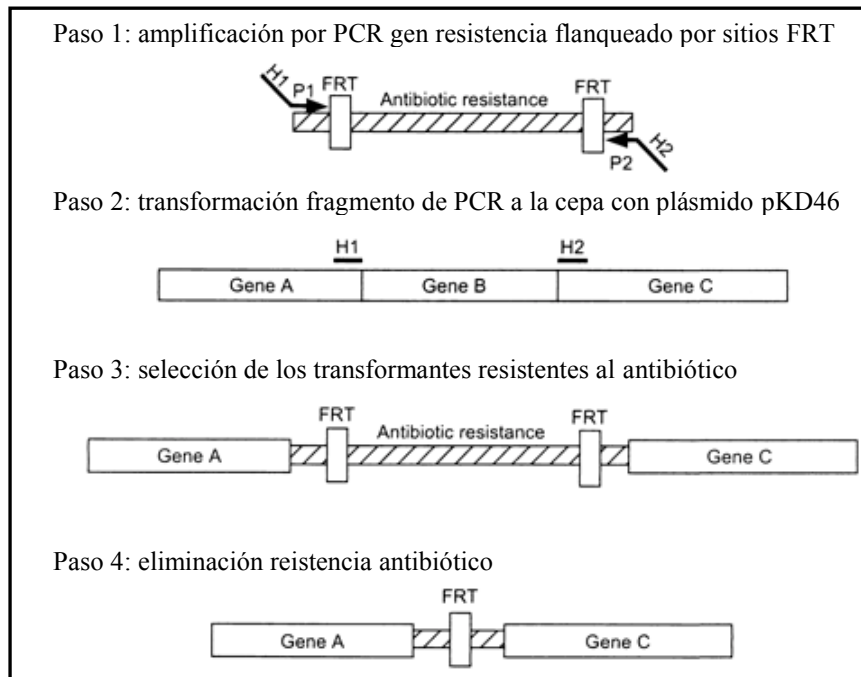


Fig. 2.4.1. Esquema del proceso de mutagénesis. H1 y H2 se refieren a las regiones de homología del gen, y P1 y P2 a las regiones de homología con el plásmido pKD46.

2.4.2 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA POR DOBLE RECOMBINACIÓN

Este método se utilizó para generar mutaciones cromosómicas en pauta de lectura, evitando así los posibles efectos polares en los genes adyacentes que pueden causar los mutantes por inserción. El sistema utilizado se basó en el plásmido pKO3 descrito por Link *et al.*, (1997). El método consistió en sintetizar por PCR una copia del gen que llevara una deleción y al mismo tiempo mantuviese la pauta de lectura. Para ello se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos: la pareja A y B amplificó la región inmediatamente anterior al gen y los 5-10 primeros tripletes completos de éste, mientras que la pareja C y D hizo lo mismo pero para el final del gen. Además, los oligonucleótidos B y C fueron diseñados con una cola de 21 pares de bases complementarias que no existían en el gen. Fueron realizadas dos PCRs asimétricas con las parejas A-B y C-D, respectivamente. En estas reacciones de PCR la relación de concentración de los oligonucleótidos era de 10:1: 600 nM los externos (A-D) y 60 nM los internos (B-C). Los productos amplificados fueron utilizados como molde para una última PCR con los oligonucleótidos A y D, de tal forma que se generó un fragmento de PCR con la región anterior al gen a mutar, varios tripletes iniciales del gen, una región de 21 pares de bases aleatorias (que mantenía la pauta de

lectura), varios tripletes finales del gen y la región posterior del gen a mutar. En la figura 2.4.1 se muestra el proceso de delección del gen a partir de las reacciones de PCR.

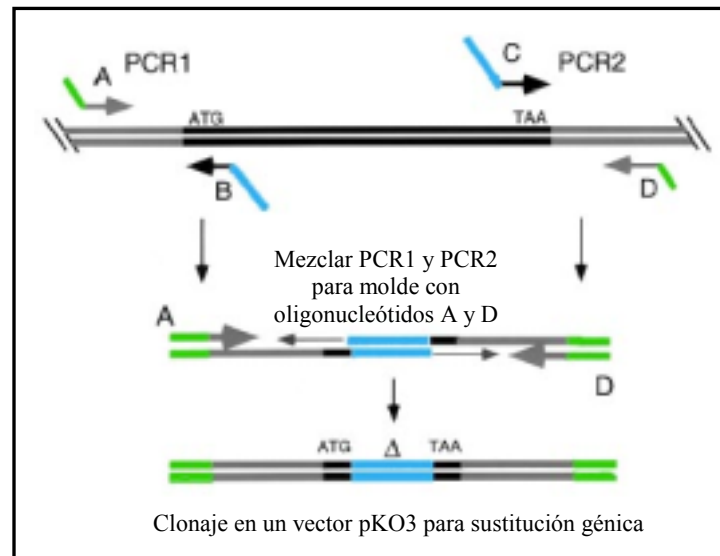


Fig 2.4.2. Esquema del proceso de delección del gen utilizando como molde el producto de dos PCRs asimétricas (PCR1+PCR2). Se muestra en color azul las regiones complementarias de los oligonucleótidos B y C, que posteriormente crearán la delección en pauta del gen objeto de mutagénesis. Las líneas de color verde representan los extremos de los oligonucleótidos A y D diseñados con dianas de restricción para su posterior clonaje en pKO3.

Esta construcción fue clonada en el plásmido pKO3 y se transformó a la cepa objeto de la mutagénesis. La transformación se incubó en LB agar suplementado con cloranfenicol (resistencia del plásmido) a 42°C, ya que ésta es una temperatura no permisiva de crecimiento para el plásmido. De esta forma las colonias que crecieran a esta temperatura sólo podían ser resultado de una integración del plásmido en el cromosoma por recombinación homóloga. Posteriormente estas colonias se hicieron crecer en LB agar suplementado con sacarosa al 5% (p/v) y se incubó a 30°C (Blomfield *et al.*, 1991). El plásmido pKO3 contiene el gen *sacB*, que es letal para la bacteria cuando crece en sacarosa. De esta forma las colonias que crecieran a 30°C y fueran sensibles al cloranfenicol sólo podían ser el resultado de una segunda recombinación homóloga que eliminara el plásmido del cromosoma. Para finalizar, se realizó una PCR para saber si la copia del gen que quedó en el cromosoma bacteriano era la salvaje o la delecionada. Además, la región delecionada fue secuenciada para comprobar que se mantuviera en pauta. En la figura 2.4.3 se muestra el esquema del proceso de mutagénesis una vez clonado el gen con la delección en el plásmido pKO3.

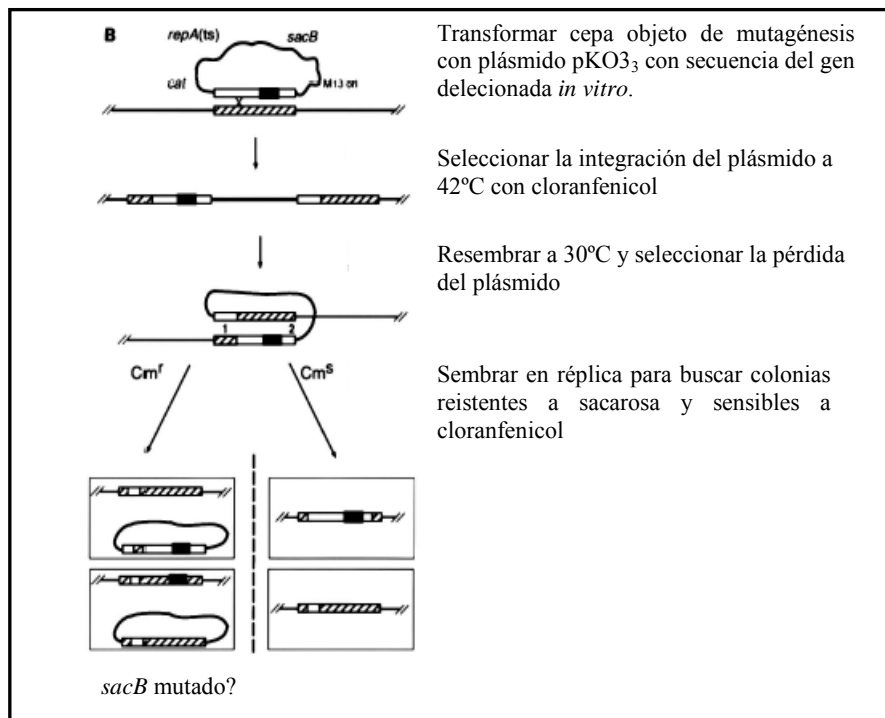


Fig 2.4.3. Protocolo utilizado para sustituir secuencias salvajes en el cromosoma con secuencias alteradas *in vitro*. La línea delgada curvada representa la secuencia del vector pKO₃; la línea delgada recta la secuencia del cromosoma bacteriano; las cajas representan la secuencia homóloga clonada en el vector (vacía) y localizada en el cromosoma (rayada). La caja negra dentro de la secuencia homóloga clonada en el vector indica la deleción introducida *in vitro* en el gen objeto de la mutagénesis.

2.5 TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

2.5.1 AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO

Fueron utilizadas diferentes técnicas, dependiendo de la finalidad que se le quisiera dar al plásmido aislado.

2.5.1.1 Aislamiento de ADN plasmídico por lisis alcalina

(Birnboim, 1983)

Éste fue el método utilizado de forma habitual. El volumen de cultivo bacteriano del que se partió varió en función del ADN plasmídico requerido. El protocolo detallado

está diseñado para un cultivo de 5 ml, pero se pueden escalar los volúmenes de las soluciones si partimos de otro volumen de cultivo.

Se centrifugaron 5 ml de un cultivo de toda la noche (3000 x g, 10 minutos) y se resuspendieron las células en 0,2 ml de solución I. Tras 15 minutos en hielo se le añadieron 0,4 ml de solución II, se mezcló por inversión y se incubó 10 minutos en hielo. Se añadieron 0,3 ml de solución III, se mezcló de nuevo por inversión y se dejó 15 minutos en hielo. Esta solución se centrifugó (12.000 x g, 15 minutos, 4°C), y se recogió el sobrenadante, que contenía el ADN plasmídico. A continuación se llevó a cabo una desproteinización del mismo, para la cual se utilizaron dos métodos diferentes: por precipitación con cloruro de litio o por extracción con fenol. El mismo protocolo se adaptó para la extracción de ADN plasmídico de volúmenes más grandes, cambiando los volúmenes de soluciones I, II, y III, pero siempre manteniendo las proporciones entre ellas (1:2:1,5).

| SOLUCIÓN I | |
|-------------------|-------|
| Glucosa (Panreac) | 55 mM |
| EDTA (Merck) | 10 mM |
| Tris (Roche) | 25 mM |

Ajustar a pH 8

| SOLUCIÓN II | |
|----------------|-------|
| NaOH (Panreac) | 0,2 M |
| SDS (Merck) | 1% |

| SOLUCIÓN III | |
|------------------------|-----|
| Acetato sódico (Merck) | 3 M |

Ajustar a pH 4,8 con ácido acético glacial (Panreac)

2.5.1.1.1 Desproteinización del ADN por precipitación con cloruro de litio

(Martínez y de la Cruz, 1988)

Este protocolo fue seguido cuando se aisló ADN plasmídico de cultivos de 5 y 10 ml. Al sobrenadante resultante de la lisis alcalina se le añadió el mismo volumen de isopropanol y se incubó en hielo durante 10 minutos. Se centrifugó (12000 x g, temperatura ambiente, 5 minutos), se eliminó el sobrenadante y el precipitado se

resuspendió en 0,2 ml de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8). En este punto se realizó el tratamiento con RNasa A para eliminar posibles restos de ARN en la muestra (apartado 2.5.1.1.3). A la solución libre de ARN se le añadieron 2 volúmenes de LiCl 5 M (Merck) y otros 2 volúmenes de cloroformo, se agitó vigorosamente, se centrifugó (12.000 x g, temperatura ambiente, 15 minutos) y se recuperó el sobrenadante. Seguidamente se precipitó el ADN añadiéndole 1/10 parte del volumen de solución III y 2 volúmenes de etanol absoluto frío, y se incubó como mínimo 1 hora a -20°C o 30 minutos a -70°C. A continuación se centrifugó el ADN (12.000 x g, 4°C, 15 minutos), se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol al 70% preenfriado a -20°C para eliminar restos de sales. Finalmente, el precipitado que contenía el ADN plasmídico se secó utilizando un secador de vacío (Speed-Vac, Savant) y se resuspendió en el volumen adecuado de agua bidestilada o TE.

2.5.1.1.2 Desproteización del ADN por extracción con fenol

El ADN plasmídico resultante de la lisis alcalina se concentró por precipitación, añadiéndole dos volúmenes de etanol absoluto frío e incubándolo, como mínimo a -20°C durante 1 hora, o a -70°C 30 minutos. A continuación se centrifugó (12.000 x g, 4°C, 15 minutos) y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se secó utilizando un secador de vacío (Speed-Vac, Savant), y se resuspendió en un volumen como mínimo de 0,5 ml de agua bidestilada. En este punto se realizó el tratamiento con RNasa A (apartado 2.5.1.1.3). La fenolización propiamente dicha empezó a partir de este punto: a esta solución se le añadió de forma sucesiva: en un primer paso la $\frac{1}{2}$ de volumen de fenol (Sigma, pH 7,9); $\frac{1}{4}$ de volumen de fenol más $\frac{1}{4}$ de volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) en un segundo paso; y finalmente $\frac{1}{2}$ de volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). En cada uno de estos tres pasos se mezcló la fase acuosa y la orgánica hasta conseguir una emulsión, y se centrifugó (16.000 x g, 2 minutos) para separar las dos fases, recogiendo la fase acuosa que es dónde se encuentra el ADN. Generalmente no fueron necesarios más que estos tres pasos para desproteizar el ADN, pero en algunas muestras en las que se observó mucha suciedad en el segundo paso (en la interfase quedan visibles los restos de proteínas), se repitió éste tantas veces como fue necesario.

Una vez desproteizado el ADN se precipitó con etanol tal y como se ha explicado en el apartado anterior.

2.5.1.1.3 Tratamiento del ADN con RNasa A

El ADN obtenido por el método de la lisis alcalina fue tratado con RNasa A de páncreas bovino (Boehringer Mannheim) a una concentración de 50 µg/ml durante 30 minutos a 37°C.

La solución de RNasa A (Sambrook *et al.*, 1989) se preparó del siguiente modo: se realizó una solución de 5 mg RNasa A/ml en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 15 mM, y se eliminaron las DNasas incubando la solución 5 minutos a 100°C. La preparación se mantuvo a 4°C.

2.5.1.2 Aislamiento de ADN plasmídico con “kits” comerciales

Como métodos rápidos de aislamiento de ADN plasmídico o en ocasiones en las que el ADN se requiriese muy limpio, bien para restricciones (apartado 2.5.3), aislamiento de bandas o secuenciación (apartado 2.5.5), se utilizaron “kits” comerciales basados en la lisis alcalina y una posterior adsorción del ADN plasmídico a una resina. Para cultivos de 5 ml se utilizó el “kit” Plasmix[®] de la casa comercial Talent. Para cultivos de 100 ml se utilizó el “kit” Wizard[®] Plus SV Midipreps de la casa comercial Promega; normalmente se partió de volúmenes tan grandes para procesos en los que se requería gran cantidad de ADN. En ambos casos se siguieron estrictamente las indicaciones del fabricante.

2.5.1.3 Caracterización rápida de ADN plasmídico a partir de colonia

(Maniatis *et al.*, 1982)

Es un método de aislamiento de ADN rápido que permite visualizar el tamaño de los plásmidos, y por lo tanto fue muy útil para distinguir qué colonias fueron transformadas con un plásmido que adquirió un inserto en un experimento de clonaje.

Se resuspendieron 3 o 4 colonias en 50 µl de tampón de lisis. Se incubó esta suspensión a 68°C durante 50 minutos y tras dejar enfriar a temperatura ambiente se añadieron 5µl de glicerol. Esta muestra se cargó directamente en un gel de agarosa (apartado 2.5.6.1).

| Tampón de lisis | |
|----------------------|---------|
| NaOH (Panreac) | 50 mM |
| SDS | 0,5% |
| EDTA | 5 mM |
| Verde de bromocresol | 0,025 % |

2.5.3 USO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN, LIGASA Y ENZIMAS MODIFICANTES

Para el uso de enzimas de restricción (Gibco, Promega, Boehringer Mannheim), la ligasa de T4 (USB), la fosfatasa alcalina (Roche), u otros enzimas modificantes, se utilizaron tampones (x10) suministrados con los enzimas, y se siguieron las indicaciones proporcionadas por el fabricante.

En el caso de los enzimas de restricción la cantidad de éstos en la reacción no superó nunca el 10% del volumen total, ya que la actividad enzimática puede resultar inhibida a causa del glicerol que contienen las preparaciones de los enzimas.

En todos los casos, después del tratamiento con los diversos enzimas mencionados, el ADN se purificó bien por fenolización (apartado 2.5.1.1.2), o mediante el “kit” comercial Wizard[®] DNA Clean-Up System de Promega.

2.5.4 AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para las reacciones de amplificación de ADN por PCR se utilizó la polimerasa termoestable nativa DynaZyme[™]. La casa comercial suministró junto con el enzima un tampón de amplificación (x10). El volumen de las reacciones fue generalmente de 25 µl, de los cuales 24 correspondieron a la mezcla de reacción y 1 µl a la muestra que se quiso amplificar. En algunos casos en los que la PCR se utilizó para la búsqueda de clones, y por lo tanto muchas muestras, el volumen de reacción fue de 10 µl, manteniendo las proporciones de cada componente. Se utilizó como muestra (ADN molde), células enteras de una colonia resuspendida en agua bidestilada y hervida 5 minutos, o bien ADN muy diluido previamente purificado. La mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) se preparó con antelación de forma que todos estuvieran a la misma concentración.

| Mezcla de reacción (25 μ l) | |
|------------------------------------|------------------|
| Polimerasa | 1 U |
| Tampón 10x | 2,5 μ l |
| dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech) | 0,4 mM (de cada) |
| Oligonucleótidos | 45 ng (de cada) |
| Muestra | 1 μ l |
| H ₂ O bidestilada | hasta 25 μ l |

El programa básico de amplificación varió en cuanto a la temperatura de hibridación y el tiempo de extensión, según el tamaño del fragmento a amplificar y los oligonucleótidos utilizados.

Programa básico de amplificación:

1. Desnaturalización inicial: 94°C, 5'.
 2. Desnaturalización: 94°C, 30''.
 - Hibridación: 55°C, 30''.
 - Extensión: 72°C, 30''.
 3. Extensión final: 72°C, 7'.
- } 25 ciclos

El termociclador utilizado en todos los casos fue un GeneAmp PCR System 2400 de Perkin Elmer.

Los productos de amplificación resultantes de la PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (apartado 2.5.6.1). En el caso de que el ADN amplificado fuera utilizado para un posterior tratamiento con enzimas de restricción, ligación o modificación, se procedió a la purificación del mismo mediante el “kit” comercial Wizard[®] DNA Clean-up System de Promega.

2.5.5 SECUENCIACIÓN

El ADN se secuenció por el método de Sanger, basado en la síntesis y terminación con dideoxinucleótidos, mediante ciclos de PCR. Se utilizó el “Kit” ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 3.0 (Biosystems), el cual proporciona una mezcla de reacción que contiene la polimerasa termoestable, los dideoxinucleótidos no marcados y marcados con un colorante, y el tampón necesario para la reacción de secuenciación. Se utilizaron como ADN molde productos de amplificación previamente purificados (Wizard[®] DNA Clean-up System de Promega), o ADN plasmídico aislado con el “kit” Wizard[®] Plus SV Midipreps de la casa comercial Promega.

| Mezcla de reacción (10 µl) | |
|------------------------------|-------------------------|
| Mix de secuenciación | 4 µl |
| Oligonucleótido | 1,6 pmol |
| Muestra ADN plasmídico | 200-500 ng |
| Producto PCR | según pb ^(a) |
| H ₂ O bidestilada | hasta 10µl |

^(a)1-3 ng 100-200 pb; 3-10 ng 200-500 pb; 5-20 ng 500-1000pb; 10-40 ng 1000-2000 pb; 40-100 ng >2000 pb.

El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

1. Desnaturalización inicial: 96°C, 1’.
 2. Desnaturalización: 96°C, 10’’.
 - Hibridación: 50°C, 35’’.
 - Extensión: 60°C, 4’.
- } 25 ciclos

Una vez finalizada la reacción a los 10 µl se le añadieron 64 µl de etanol 95% y 26 µl de agua bidestilada estéril. Se dejó precipitar la mezcla 15 minutos a temperatura ambiente y a continuación se centrifugó durante 20 minutos a 16.000 x g. Se extrajo el líquido y se añadieron 0,2 ml de etanol al 70%, centrifugando de nuevo 5 minutos. Se quitó el etanol con mucho cuidado y se secó en un secador de vacío (Speed-Vac, Savant). La muestra se analizó en el secuenciador ABI PRISM[®] 3700 DNA Analyzer de los Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

2.5.6 ELECTROFORESIS DE ADN

El ADN se analizó mediante la electroforesis en geles horizontales de agarosa (Pronadisa), a concentraciones del 0,8% al 2% en tampón TBE x 0,5, y una posterior tinción en una solución de bromuro de etidio para su visualización (Sambroock *et al.*, 1989).

2.5.6.1 Electroforesis en geles de agarosa

Antes de cargar las muestras se les añadió 1/5 parte de su volumen de tampón de muestras x 5. Generalmente la electroforesis se llevó a cabo en una cubeta horizontal MUPID-2 de Cosmo Bio, con tampón TBE x 0,5, aplicando un voltaje de 50 a 100 V.

| TBE x 5 | |
|------------------------|--------|
| Tris (Roche) | 450 mM |
| Ácido Bórico (Bio-Rad) | 450 mM |
| EDTA (Merck) | 10 mM |

| Tampón de muestras x 5 | |
|------------------------------|--------|
| Azul de bromofenol (Bio-Rad) | 0,25 % |
| Xilen Cianol (Bio-Rad) | 0,25 % |
| Glicerol (Panreac) | 60 % |

2.5.6.2 Marcadores de tamaño molecular

Tanto para determinar el tamaño como para cuantificar el ADN presente en una muestra, se cargó en los geles 0,1 µg de ADN de un marcador de peso molecular conocido. Se escogió un marcador u otro dependiendo del tamaño esperado de los fragmentos a analizar.

| Marcadores de tamaño molecular | |
|---|--|
| Tipo | Tamaño de los fragmentos (pares de bases) |
| Fago λ / <i>Hind</i> III (Promega) | 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 564, 125 |
| Fago Φ X174 / <i>Hae</i> III (Promega) | 1.353, 1.078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 |
| 100 bp ladder (Biotools) | 1.031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 |

2.5.6.3 Tinción con bromuro de etidio

La tinción se realizó, después de la electroforesis, con bromuro de etidio (Merck). El gel se sumergió durante 15-30 minutos en una solución de bromuro de etidio preservada de la luz y preparada en tampón TBE x 0,5 a una concentración de 0,5 μ g/ml. Esta solución se preparó a partir de una solución madre concentrada a 10 mg/ml, que se conservó a 4°C también preservada de la luz.

Una vez teñidos los geles se observaron con luz ultravioleta y se fotografiaron (ImageMaster[®] VDS de Pharmacia).

2.5.7 AISLAMIENTO DE BANDAS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA: ELECTROELUCIÓN

Este método fue utilizado cuando se necesitaron fragmentos específicos de ADN después de una restricción, y en ocasiones a partir de una amplificación por PCR donde existían bandas inespecíficas.

Después de una electroforesis en geles de agarosa y posterior tinción con bromuro de etidio (apartados 2.5.6.2 y 2.5.6.3), el ADN se visualizó con la ayuda de un transiluminador de longitud de onda larga y baja intensidad para no dañar el ADN (UVL-56, BLACK-RAY[®] LAMP), puesto que normalmente el ADN aislado de este modo fue utilizado para clonajes. Se recortó el fragmento de agarosa del menor tamaño posible y se colocó en una membrana de diálisis (Sigma), previamente tratada tal y como se describe en la bibliografía (Sambrook *et al.*, 1989). Después de introducirlo en la membrana se llenó con TBE x 0,5 y se cerró con pinzas por los extremos procurando que no quedase ninguna burbuja de aire.

Se introdujo la membrana en una cubeta de electroforesis de forma que quedase completamente cubierta por el tampón de la electroforesis, y se aplicó un voltaje de 100 V

durante 60-90 minutos. Transcurrido este tiempo, suficiente para que el ADN saliera del bloque de agarosa y quedase retenido en la membrana, se invirtió el voltaje durante tan sólo 10 segundos para que el ADN se distribuyera en el tampón contenido en la membrana y no quedase adherido a la misma.

Para finalizar se extrajo la solución de la membrana y se limpió el ADN bien por fenolización o con el “Kit” Wizard[®] DNA Clean-up System de Promega.

2.5.8 ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ADN-PROTEÍNA MEDIANTE ENSAYOS DE RETARDO EN GEL

Los ensayos de retardo en gel se utilizaron para detectar la capacidad de unión de una proteína al ADN. La técnica se basa en el hecho de que la unión del ADN a una proteína provoca un cambio en la movilidad electroforética del ADN. Se prepararon mezclas de reacción de proteína con ADN marcado radiativamente. Después de incubar la reacción para permitir la unión, se cargó la mezcla en un gel de poliacrilamida para analizar la movilidad de las muestras en la electroforesis.

2.5.8.1 Marcaje radiactivo de fragmentos de ADN

Los fragmentos de ADN se obtuvieron a partir de una amplificación por PCR (apartado 2.5.4). Un paso previo y necesario para el marcaje de los fragmentos de ADN mediante la incorporación del isótopo radiactivo $\gamma^{32}\text{P}$, llevada a cabo por el enzima polinucleótido quinasa, es la defosforilación del ADN. Así, en un primer paso el ADN se defosforiló con una incubación con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim) a 37°C 2 horas, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para eliminar este enzima se llevó a cabo una fenolización del ADN. Después de esta desproteinización el ADN se precipitó con etanol, se secó con un secador de vacío y se resuspendió en agua bidestilada.

El marcaje del ADN se realizó mezclando los componentes indicados a continuación en un volumen final de 50 μl e incubando a 37°C 2 horas.

Reacción de marcaje:

75 ng de ADN defosforilado

20 μCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (3.000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, Amersham)

10 unidades de Polinucleótido quinasa (PNK, Biolabs)

5 μl de tampón x 10 de PNK (Biolabs)Agua bidestilada hasta un volumen final de 50 μl

Después de la reacción de marcaje el ADN se purificó, para eliminar el enzima y restos de radiactividad no incorporada, mediante el “kit” Wizard[®] DNA Clean-Up System (Promega), recuperándolo en un volumen final de 100 μl .

2.5.8.2 Reacción de unión ADN-proteína:

Antes de valorar la unión del ADN a la proteína se determinó la cantidad de ADN marcado que se utilizó en el ensayo, analizando diluciones del ADN mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6 % en TBE x 0,5. Después de la electroforesis el gel se secó y se obtuvo una autoradiografía para visualizar la señal correspondiente al ADN de las diferentes diluciones. En la mezcla de unión se añadió el ADN marcado, la proteína, el tampón de ensayo y agua destilada hasta un volumen final de 10 μl . Después de una incubación de 15 minutos a 25°C, se añadió el tampón de muestras de ADN (apartado 2.5.6.1) y se cargó en un gel de poliacrilamida al 6% en TBE x 0,5. Después de una electroforesis a un voltaje de 110 V, el gel se secó sobre papel de filtro (Bio- Rad) con un secador de geles Bio-Rad 583. Con el gel seco se obtuvo una autoradiografía impresionando una película (Hyperfilm MP, Amersham): se incubaron el gel y la película en un casete de autoradiografía Gevomatic 18 x 24 con pantallas amplificadoras Curix C-2 (Agfa) a -70°C, y se reveló automáticamente (RG II, Fuji X-Ray, Film Processor).

| Tampón de ensayo | |
|-------------------|-------|
| Tris-HCl pH 8 | 40 mM |
| KCl | 0,1 M |
| DTT | 1 mM |
| EDTA | 1 mM |
| MgCl ₂ | 2 mM |
| Glicerol | 5 % |

2.6 TÉCNICAS EXPERIMENTALES CON ARN

La manipulación de ARN realizada en este trabajo tuvo como objetivo analizar los niveles de ARNm mediante el ensayo de protección de la RNasa ONE[™] o RT-PCR (“Reverse Transcriptase PCR”).

2.6.1 EXTRACCIÓN DE ARN CELULAR TOTAL

2.6.1.1 Extracción de ARN celular total mediante fenol ácido caliente

El método de extracción del ARN celular total fue el del fenol ácido caliente (Koronakis *et al.*, 1988). Para acidificar el fenol (Sigma) se hicieron de 3 a 4 lavados con acetato sódico 0,2 M pH 5,2 (ajustado con ácido acético glacial y esterilizado en el autoclave). Se comprobó que el pH era realmente ácido y se guardó protegido de la luz a 4°C.

Se centrifugaron 50 ml de cultivo (11.000 x g, 10 minutos, 4°C), y el sedimento celular se resuspendió en 0,6 ml de fenol ácido (pH 5,2) precalentado a 60°C, más 0,6 ml de solución AES. Se agitó la mezcla y se incubó 15 minutos a 60°C agitando frecuentemente. A continuación se dejó la mezcla en hielo durante 10 minutos, y durante esta incubación también se agitó con frecuencia. Después se centrifugó a 16.000 x g durante 3 minutos, se recogió la fase acuosa superior y se repitió la extracción dos veces más pero sólo añadiendo fenol ácido. A la fase acuosa recogida después de la tercera centrifugación se le añadió el mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), para eliminar posibles restos de fenol. Tras recoger la fase acuosa el ARN se precipitó con 2-3 volúmenes de etanol absoluto frío durante un mínimo de 2 horas a -70°C, se centrifugó (16.000 x g, 5 minutos), se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 0,2 ml de solución de hibridación.

| AES | |
|----------------|-------|
| Acetato sódico | 50 mM |
| EDTA (Merck) | 1mM |
| SDS (Merck) | 0,5 % |

| Solución de hibridación | |
|--|--------|
| PIPES (Sigma) | 40 mM |
| Acetato sódico (Merck) | 200 mM |
| EDTA (Merck) | 1 mM |
| Formamida desionizada ^(a) (Merck) | 80 % |

^(a)Formamida desionizada con resina de intercambio iónico AG 501-X8(D) (Bio-Rad) al 10% (p/v). Después de agitar la mezcla 1 hora, se filtró con papel de celulosa y se guardó a -20°C.

La solución de hibridación se preparó 5 veces concentrada sin formamida y se ajustó a pH 6,4 con NaOH, se esterilizó y se guardó a 4°C. La solución de hibridación de trabajo arriba indicada, se obtuvo al mezclar la solución concentrada y la formamida desionizada en una proporción 1:4.

2.6.1.2 Extracción ARN celular total con “kits” comerciales

Como método rápido de aislamiento de ARN para la técnica de RT-PCR se utilizó el Kit comercial de Qiagen Rneasy[®] Mini Kit, siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante.

2.6.1.3 Cuantificación espectrofotométrica del ARN

Una vez aislado, el ARN se cuantificó con el espectrofotómetro. Para hacerlo es necesario valorar antes la pureza de la muestra, mediante las absorbancias a las longitudes de onda de 260 y 280 nm:

- si la relación $DO_{260} / DO_{280} < 2$, ello indica que la muestra está contaminada con proteínas o fenol, por lo que la cuantificación no será exacta.
- Si la relación $DO_{260} / DO_{280} = 2$, la muestra es pura y se puede calcular la concentración del ARN teniendo en cuenta que:

$$1 \text{ Unidad de } DO_{260} = 40 \mu\text{g ARN} / \text{ml}$$

2.6.2 ELECTROFORESIS DE ARN EN GELES DE AGAROSA

Se siguió el mismo procedimiento descrito para geles de ADN (apartado 2.5.6), pero teniendo en cuenta algunas particularidades para evitar la degradación del ARN: se lavó la cubeta con SDS 0,1% para inhibir las RNasas, y el TBE x 0,5 se autoclavó.

La tinción de los geles para visualizar el ARN también se realizó con bromuro de etidio.

2.6.3 ENSAYO DE PROTECCIÓN CONTRA LA RNasa ONE™

Este método se utilizó para analizar el nivel de transcripción de un gen determinado. El método se basa en que el ARN procedente de la transcripción del gen de estudio queda protegido de la degradación de la RNasa ONE™ mediante la hibridación de una sonda antisentido. Esta sonda está marcada radiactivamente con ^{32}P , de forma que la sonda hibridada puede ser cuantificada por autoradiografía.

2.6.3.1 Obtención de una sonda de cadena sencilla marcada radiactivamente

Para obtener una sonda antisentido del ARN mensajero del gen objeto de estudio, se clonó un fragmento del gen en un vector pET3b bajo el promotor de T7. La secuencia de ADN clonada que sirvió como molde se encontraba a continuación del promotor de T7, pero en una orientación que permitió la producción de un ARN mensajero antisentido.

2.6.3.1.1 Preparación de un molde de ADN

El fragmento del gen que sirvió como molde en la transcripción *in vitro* fue clonado después de un sitio de clonaje múltiple detrás del promotor de T7. Para obtener la transcripción a partir del promotor únicamente de la secuencia clonada, se realizó una restricción con *Bam*HI, dado que este enzima delimitó el final de fragmento clonado. Para determinar la cantidad de ADN molde de la que se disponía y asegurarnos que el plásmido estaba totalmente linealizado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa.

2.6.3.1.2 Síntesis *in vitro* de ARN dirigida por la ARN polimerasa de T7

Las condiciones utilizadas en la transcripción *in vitro* del ADN plasmídico linealizado que contenía un promotor de T7 de *E. coli* fueron las que se indican a continuación.

La mezcla se incubó 2 horas y 30 minutos a 37°C. A continuación se añadieron 5 µl de ARNt de *Saccharomyces cerevisiae* (10 µg/µl) y 1,5 µl de DNasa I libre de RNasas 10 U/µl (Amersham Biosciences). Esta segunda mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C.

| Mezcla de reacción | |
|---|--------|
| Tampón x 10 ARN polimerasa de T7 (Roche) | 10 µl |
| Mezcla de NTPs (ATP, CTP y GTP 25 mM, UTP 5 mM) (Roche) | 2 µl |
| ADN plasmídico linealizado | 500 ng |
| RNasin (30 U / µl) (Promega) | 1 µl |
| [α - ³² P] UTP (3.000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) (Amersham Biosciences) | 3 µl |
| ARN-polimerasa de T7 (20 U / µl) (Roche) | 1,5 µl |
| Llevar a un volumen final de 100 µl con agua bidestilada | |

Para la extracción y el lavado de la sonda de ARN se añadieron 0,1 ml de una mezcla de fenol ácido (pH 5,2):cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló con la pipeta y se centrifugó (16.000 x g, 5 minutos). La fase acuosa resultante se mezcló con 0,2 ml de acetato de amonio 2,5 M y 1 ml de etanol absoluto y se dejó 1 hora a -70°C. A continuación se centrifugó (16.000 x g, 10 minutos) y el precipitado se lavó con etanol al 70%. Después de centrifugar de nuevo y extraer el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 0,1 ml de solución de hibridación (apartado 2.6.1).

Asumiendo una incorporación total del nucleótido marcado radiactivamente a la sonda, ésta se encuentra en una proporción marcada/no marcada radiactivamente de 1/10.000, en una cantidad total de 10 µg. Se mantuvo a -20°C y se utilizó antes de un máximo de 3 días, dado que en períodos de tiempo superiores la degradación por radiólisis es muy importante. Se comprobó el marcaje por electroforesis en condiciones desnaturizantes y posterior autoradiografía tal y como se describe en el apartado 2.6.3.4.

2.6.3.2 Hibridación ARN-sonda radiactiva

Antes de realizar la mezcla de hibridación se incubaron las muestras de ARN a analizar durante 15 minutos en un baño a 85°C, para deshacer posibles estructuras secundarias. A continuación se mezclaron 25 µg de ARN con un exceso de ARN antisentido de cadena sencilla marcado radiactivamente (mezcla no superior a 50 µl), permitiendo de esta forma la formación de híbridos de secuencias complementarias ARN-³²P:ARN. La mezcla de reacción de hibridación se incubó toda la noche a temperatura ambiente.

2.6.3.3 Ensayo de protección contra la RNasa ONE™

Para la realización del ensayo se tuvieron en cuenta las indicaciones de la bibliografía (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1992), y de los proveedores de los enzimas. A la mezcla de reacción de hibridación del apartado anterior se le añadió tampón de digestión, de forma que se diluyese la mezcla entre 8 y 10 veces, y 0,5 unidades de RNasa ONE™ (Boehringer Mannheim). La mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y se precipitó con 2-3 volúmenes de etanol absoluto frío durante 1 hora a -70°C. Después se centrifugó (16.000 x g, 10 minutos), se descartó el sobrenadante y se dejó secar la muestra al aire. A continuación se resuspendió en 50 µl de tampón de carga y se guardó a -20 °C hasta el momento de ser analizada por electroforesis.

| Tampón de digestión de la RNasa ONE™ | |
|--------------------------------------|--------|
| Tris (Roche) | 10 mM |
| EDTA (Merck) | 5 mM |
| Acetato de Sodio (Merck) | 200 mM |

Ajustar a pH 7,5, autoclavar y guardar a 4°C.

| Tampón de carga | |
|--------------------------------|-------|
| Tris (Roche) | 10 mM |
| EDTA (Merck) | 1 mM |
| SDS (Merck) | 0,1% |
| Formamida desionizada (Merck) | 80 % |
| Azul de bromofenol (Millipore) | 0,1 % |

Ajustar a pH 8,0.

2.6.3.4 Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes de poliacrilamida/urea y autoradiografía

Tanto la sonda marcada como los fragmentos protegidos contra la RNasa ONE™ fueron analizados por electroforesis en minigeles de 1,5 mm de grosor de poliacrilamida al 7,2%/urea 6 M en tampón TBE x 0,5.

Se utilizó una solución de Acrilamida/Bis 20%T, 5%C obtenida mezclando 19 g de acrilamida (Bio-Rad) y 1 g de bisacrilamida (Bio-Rad) en un volumen de 100 ml. Una vez preparada la solución se filtró con papel de celulosa, se desionizó con la resina AG 501-X8(D) (Bio-Rad) durante 2 horas, y se filtró de nuevo. Se guardó a 4°C preservada de la luz.

Para preparar los geles, se polimerizaron 10 ml de TBE-Urea-PAGE con 0,1 ml de APS (Bio-Rad) al 10% y 10 µl de TEMED (Bio-Rad).

| Solución TBE-Urea-PAGE | |
|--------------------------------|------|
| Urea (Bio-Rad) | 21 g |
| Acrilamida / Bis 20%T, 5%C | 6 ml |
| TBE x 5 | 5 ml |
| Hasta 50 ml con agua destilada | |

%T: Porcentaje de acrilamida + bisacrilamida
 %C: Porcentaje de bisacrilamida respecto a T
 (“cross-linking”).

Una vez polimerizado el gel se hizo un precalentamiento de una hora a 120 V. A continuación se cargaron 25 µl de las muestras después de desnaturalizarlas a 85°C 10 minutos. El gel se corrió a 100 V durante 1 hora y 15 minutos.

El equipo utilizado para la preparación de los minigeles y la electroforesis fue el Mini-Protean II™ (Bio-Rad).

Después de la electroforesis el gel se obtuvo la autoradiografía tal como se describe en el apartado 2.5.8.2.

2.6.4 ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL ARN POR RT-PCR

Como se ha mencionado anteriormente el análisis del nivel de transcripción de un gen se realizó también por RT-PCR (“Reverse Transcriptase PCR”). El ARN del gen objeto de estudio se retro-transcribió a ADN con la transcriptasa inversa de M-MuLV y posteriormente éste se amplificó por PCR.

2.6.4.1 Digestión con DNasaI

El ARN obtenido con el Kit comercial de Qiagen fue tratado con la DNasa libre de RNasa 10 unidades/ μ l (Promega). A 100 μ l de muestra se le añadieron 2 unidades del enzima y se añadió agua hasta un volumen total de 300 μ l. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora. A continuación, se eliminó el enzima de la misma forma que en la deproteinización del ADN con fenol (apartado 2.5.1.1.2), sólo que en este caso se utilizó fenol ácido. El ARN se precipitó a -70°C con 2 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de acetato de amonio 2,5 M. Después de 2 horas la muestra se centrifugó durante 10 minutos a 4°C y se lavó con 100 μ l de etanol 70%. El precipitado que contenía el ARN se secó utilizando un secador de vacío (Speed-Vac, Savant) y se resuspendió en 50 μ l de agua bidestilada. La muestra se cuantificó espectrofotométricamente (apartado 2.6.1.3).

2.6.4.2 RT-PCR

Para esta técnica se utilizó el kit Ready-to-Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences), que suministra en tubos de PCR una bola deshidratada con todos los componentes necesarios para la reacción, exceptuando los oligonucleótidos y el ARN. Para añadir la concentración de ARN apropiada para el análisis del nivel de expresión de un gen determinado, fue necesario hacer una prueba con diferentes concentraciones de ARN, y encontrar un rango para el cual la reacción no estuviese saturada. Antes de añadir la dilución de ARN con la concentración apropiada se incubó durante 5 minutos a 80°C en el termociclador, y se mantuvo en hielo hasta el momento de ser utilizada.

Las cantidades de cada reactivo en la reacción de RT-PCR se describen en la siguiente tabla:

| Reactivo | Cantidad |
|---|--------------------|
| Ready-to-Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences) | 1 bola |
| Oligonuclótido RT 10 pmols/ μ l | 2 μ l |
| Oligonucleótido PCR 10 pmols/ μ l | 2 μ l |
| ARN (1/2 concentración apropiada) | 2 μ l |
| H ₂ O bidestilada | Hasta a 50 μ l |

El programa de RT-PCR utilizado fue el siguiente:

Retro-transcripción: 42°C, 1h
 Inactivación Transcriptasa inversa: 95°C, 5'
 Desnaturalización: 95°C, 30''
 Hibridación: 54°C, 30''
 Elongación: 72°C, 30''
 Finalización: 72°C, 10'

} x 40 ciclos

Para asegurar que la muestra no contuviese ningún resto de ADN fue necesario hacer un control que consistió en inactivar la transcriptasa inversa (incubación 10 minutos a 95°C), y comprobar que no se producía amplificación debido a la presencia de ADN en la muestra.

Una vez finalizada la reacción se analizaron por electroforesis 8 μ l de cada muestra.

2.7 TÉCNICAS EXPERIMENTALES CON PROTEÍNAS

2.7.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS

Según la finalidad de la obtención de extractos proteicos se utilizaron diferentes métodos.

2.7.1.1 Fraccionamiento de cultivos bacterianos y aislamiento de proteínas de membrana

2.7.1.1.1 Fraccionamiento de cultivos bacterianos

Con el fin de analizar por electroforesis el contenido proteico en los diferentes compartimentos celulares, se obtuvieron fracciones externas, periplasmáticas y citoplasmáticas de cultivos bacterianos. En este caso los extractos se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5% (apartado 2.7.3.1).

En algunas ocasiones simplemente se trató de separar entre fracción externa e interna. La fracción externa se obtuvo del sobrenadante de centrifugar 5 ml de cultivo a 16.000 x g, 5 minutos. En el caso de la fracción interna se centrifugaron 10 ml de cultivo, y el sedimento celular se resuspendió en 1 ml de tampón de choque más 0,1 ml de una solución de lisozima 5 mg/ml, preparada justo antes de utilizarla. Después de 20 minutos en hielo se congeló y descongeló la suspensión celular, y se centrifugó (16.000 x g, 1 minuto). El sobrenadante obtenido se utilizó como fracción interna.

Sin embargo, en la mayoría de ocasiones se separó la fracción interna en periplasma y citoplasma. Se centrifugaron 10 ml de cultivo, y las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de choque más 0,1 ml de una solución de lisozima 1 mg/ml. Después de 3 minutos en hielo, la suspensión se centrifugó a 16.000 x g durante 30 segundos. El sobrenadante resultante de esta centrifugación correspondía a la fracción periplasmática. El precipitado de esta centrifugación se resuspendió nuevamente en 1 ml de tampón de choque más 0,1 ml de lisozima 5 mg/ml. Después de 20 minutos en hielo, se congeló, descongeló y se volvió a centrifugar durante 1 minuto a 16.000 x g. El sobrenadante se consideró la fracción citoplasmática.

| Tampón de choque | |
|---|-------|
| Tris-HCl pH 8 | 33 mM |
| EDTA | 1 mM |
| Sacarosa (Panreac) | 20% |
| PMSF (Fenil-metil-sulfonil-fluoruro) (Merck) ^(a) | 1 mM |

^(a) El tampón se preparó con todos sus componentes, excepto el PMSF, se esterilizó en el autoclave y se guardó a 4°C. En el momento de utilizarlo se atemperó y se añadió el PMSF a partir de una solución 100 mM en isopropanol (Panreac).

2.7.1.1.2 Obtención de proteínas de membrana

Para el aislamiento y separación de proteínas de membrana externa (OM) e interna (IM), se utilizó la solubilidad diferencial que presentan estas proteínas en lauril sarcosinato sódico (Filip *et al.*, 1973), siguiendo el método descrito por Crosa y Hodges (1981) y ligeramente modificado (Díaz y Juárez, 1991).

Un cultivo de toda la noche se centrifugó (3000 x g, 10 minutos), y se lavó dos veces con 1ml de Tris- HCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7,3. Las células se sonicaron durante 2 periodos de 1 minuto a 50 W y la suspensión se centrifugó (16.000 x g, 1 minuto) para eliminar las bacterias que no se lisaron al sonicar. Las proteínas de membrana, que se encontraron en el sobrenadante, se recogieron por centrifugación (16.000 x g, 60 minutos, 4°C). El precipitado se volvió a resuspender en 1 ml de Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM pH 7,3 y se añadió 1 ml de lauril sarcosinato sódico (Sigma) 1,2% (p/v), de forma que la concentración final fue del 0,6%. Después de permitir la disolución de las proteínas de membrana interna al incubarlo 20 minutos a temperatura ambiente en lauril sarcosinato sódico, se centrifugó también a temperatura ambiente (16.000 x g, 30 minutos). El sobrenadante contenía mayoritariamente las proteínas de membrana interna (IM), y el precipitado, que fue resuspendido en 0,1 ml de agua bidestilada, contenía mayoritariamente las proteínas de membrana externa (OM). En los dos casos, las proteínas se precipitaron con tres volúmenes de acetona (Panreac) fría durante un mínimo de 2 horas a 4°C, y después de centrifugar (16.000 x g, 15 minutos, 4°C), se resuspendieron en 0, 1 ml de agua bidestilada.

2.7.1.2 Obtención de extractos totales

Este método se utilizó para analizar por electroforesis en geles de poliacrilamida el contenido proteico total, separando entre fracción soluble e insoluble.

Se recogieron las células por centrifugación (5000 x g, 5 minutos) y se resuspendieron en 1/10 del volumen de cultivo en Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 2 mM. A continuación se añadieron: lisozima a 100 µg/ml, recién preparada en el mismo tampón de resuspensión a 10 mg/ml, y 1/10 del volumen inicial de Tritón X-100 1% (p/v); incubándolo todo 15 minutos a 30°C. El paso siguiente fue sonicar la muestra hasta que ésta perdiese viscosidad, con el fin de romper el ADN. Para finalizar se centrifugó la

muestra (12.000 x g, 15 minutos, 4°C): el sobrenadante contenía la fracción soluble y el precipitado la insoluble.

2.7.1.3 Obtención de extractos para geles de 2D-PAGE

Se centrifugaron 250 ml de cultivo (11.000 x g, 30 minutos, 4°C), y el precipitado celular se resuspendió en 5 ml de tampón de lavado (bajo en sales), repitiendo esta operación 4 veces. El precipitado de la cuarta centrifugación se resuspendió en 0,3 ml de tampón de resuspensión y se congeló a -20°C. Después de descongelar la muestra se resuspendieron 10 µl en 300 µl de tampón de lisis y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Para finalizar se centrifugó la muestra 5 minutos a 10.000 x g, se realizó una valoración de la concentración de proteínas por el método Bradford (apartado 2.7.2) y se guardó a -70 °C hasta el momento de analizarla por electroforesis.

| Tampón de lavado | |
|--|--------|
| KCl (Merck) | 30 mM |
| KH ₂ PO ₄ (Merck) | 1,5 mM |
| NaCl (Panreac) | 68 mM |
| NaH ₂ PO ₄ (Merck) | 9 mM |

| Tampón de resuspensión | |
|------------------------------|--------|
| Tris-HCl (Roche) pH 8 | 10 mM |
| MgCl ₂ (Merck) | 1,5 mM |
| KCl (Merck) | 10 mM |
| SDS (Merck) | 0,1% |
| PMSF ^(a) (Merck) | 0,5 mM |
| DTT ^(b) (Bio-Rad) | 0,5 mM |

^(a) Se añadió justo antes de usar a partir de una solución concentrada en isopropanol 100mM.

^(b) Se añadió antes de usar a partir de una solución 1M en H₂O.

| Tampón de lisis | |
|------------------------------|-------|
| Urea (Bio-Rad) | 7 M |
| Tiourea (Sigma) | 2 M |
| Tris (Roche) | 40 mM |
| CHAPS (Merck) | 4% |
| DTT ^(a) (Bio-Rad) | 65 mM |

^(a) Añadir antes de usar.

2.7.2 VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO BRADFORD

(Bradford, 1976)

Para determinar la concentración proteica de un extracto, obtenido por cualquiera de los métodos descritos en el apartado anterior, se utilizó el reactivo de Bio-Rad “Protein Assay Dye Reagent Concentrates”. Siguiendo las instrucciones de la casa comercial se siguió el protocolo descrito por Bradford, basado en la afinidad de las proteínas por el azul de Coomassie.

Se preparó una solución concentrada de BSA (Boehringer Mannheim) a 25 mg/ml. A partir de esta solución madre se preparó un banco de diluciones a 25, 12,5, 6,25, 3,125 y 1,56 ($\mu\text{g/ml}$). A 0,8 ml de estas diluciones se añadieron 0,2 ml de reactivo, de forma que la cantidad de proteína total de cada una de las diluciones pasó a ser de 20, 10, 5, 2,5 y 1,25 (μg) respectivamente, quedando así definida la recta patrón. Para valorar las muestras se añadieron entre 5 y 25 μl de éstas más 0,2 ml de reactivo Bradford, y a continuación se completó con agua bidestilada hasta 1 ml.

Se determinó la absorbancia a DO_{595} , tanto de la recta patrón como de las muestras. La concentración de proteína de las muestras se calculó extrapolando a partir de los valores de absorbancia de la recta patrón, teniendo en cuenta el volumen de muestra añadido.

2.7.3 TÉCNICAS DE ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

2.7.3.1 Geles de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS

(Laemmli, 1970)

Este tipo de geles de poliacrilamida separan las proteínas en función de su peso molecular. Para la fabricación y electroforesis de estos geles desnaturizantes se utilizó el equipo MINI-Protean IITM de Bio-Rad, que permite obtener geles verticales de 7,3 cm de altura, 8 cm de ancho y 0,75 o 1,5 mm de grosor.

Los geles de poliacrilamida están formados por dos fases, cuya función y composición son diferentes: la fase de compactación, que forma $\frac{1}{4}$ del gel en la zona superior, y la de resolución (donde se da la separación efectiva de las proteínas). La fase de compactación contiene un 5% de acrilamida, mientras que en la de resolución el porcentaje oscila entre el 10-15%, siendo el 12,5% el más utilizado en este trabajo.

| Geles de poliacrilamida | Fase de resolución | Fase de compactación |
|------------------------------|--------------------|----------------------|
| % Acrilamida | 12,5% | 5% |
| Acrilamida/Bis 30,8%T, 2,6%C | 2,5 ml | 0,8 ml |
| Tampón de resolución x 4 | 1,5 ml | - |
| Tampón de compactación x 4 | - | 1,25 ml |
| Agua bidestilada | 2 ml | 2,92 ml |
| APS 10% | 30 µl | 35 µl |
| TEMED (Bio-Rad) | 5 µl | 10 µl |

%T: Porcentaje de acrilamida + bisacrilamida

%C: Porcentaje de bisacrilamida respecto a T (“cross-linking”)

Acrilamida/Bis 30,8% 2,6% C: 30 g de acrilamida (Bio-Rad) y 0,8 g de bisacrilamida (Bio-Rad) en 100 ml de agua destilada, filtrar y guardar a 4°C preservada de la luz.

Para preparar el gel primero se añadió la fase de resolución entre los vidrios de soporte hasta $\frac{3}{4}$ de la altura total y se recubrió con agua destilada. Una vez esta fase había polimerizado, se eliminó el agua destilada y se añadió la fase de compactación, y antes de que ésta polimerizase se colocó el peine que definiría los pocillos de carga.

Antes de cargar las muestras éstas se incubaron de 5 a 10 minutos a 100°C con el tampón de carga de proteínas x 4 (se añade $\frac{1}{4}$ del volumen total). Después de cargar las muestras con una microjeringa (Hamilton) se aplicó un voltaje de 40 V hasta que todas las muestras se alinearon en la fase de compactación, aplicando entonces un voltaje de 120 V hasta el final de la electroforesis.

A continuación se detalla la composición de todos los tampones utilizados.

| Tampón de carga x 4 | |
|--------------------------------|---------|
| Glicerol (Panreac) | 20% |
| β-mercaptoetanol (Bio-Rad) | 10% |
| SDS (Merck) | 4,6% |
| Tris (Roche) | 0,125 M |
| Azul de bromofenol (Millipore) | 0,2% |

Ajustar a pH 6,8

| Tampón de compactación x 4 | |
|----------------------------|-------|
| Tris (Roche) | 1,5 M |
| SDS (Merck) | 0,4% |

Ajustar a pH 8,8

| Tampón de resolución x 4 | |
|--------------------------|-------|
| Tris (Roche) | 0,5 M |
| SDS (Merck) | 0,4% |

Ajustar a pH 6,8

| Tampón de recorrido x 10 | |
|--------------------------|--------|
| Tris (Roche) | 0,25 M |
| Glicina (Fluka) | 1,92 M |
| SDS (Merck) | 1% |

2.7.3.2 Electroforesis bidimensional (2D-PAGE)

2.7.3.2.1 Primera dimensión

Una vez obtenida la muestra tal y como se indica en el apartado 2.7.1.3, se procedió a la separación de las proteínas según su punto isoelectrico (pI). Se utilizaron tiras de 24 cm con un rango de pH 3-10 (ImmobilineDrystrip Gels, Amersham Biosciences), y el isoelectroenfoco se realizó en el equipo IPGphor (Amersham Biosciences) en la Unitat de Proteòmica dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona. Se cargaron 200 µg de muestra en un volumen total de 450 µl, en el mismo tampón que el tampón de lisis del apartado 2.7.1.3, pero se añadió una solución de anfólitos concentrada (IPG buffer, Amersham Biosciences) para que su concentración final fuera del 0,5% (v/v). Se cargaron los 450 µl de muestra en el centro del soporte de porcelana donde se coloca la tira de pH, y se introdujo la tira con mucho cuidado de forma que se impregnara toda ella con la muestra, evitando así que la muestra quedase concentrada en el centro y la acrilamida de la tira se secase. Una vez cargada la muestra se cubrió toda la superficie de la tira con IPG Cover Fluid (Amersham Biosciences), para evitar la evaporación y cristalización de la urea. A continuación se colocaron los diferentes soportes de porcelana de cada muestra en el equipo IPGphor, y se aplicó el programa de isoelectroenfoco que se detalla a continuación, con un tiempo de duración aproximada de 24 horas:

- Rehidratación de la tira: 10 h a 50 V.
- 1 h 30 min a 500 V.
- 1 h 30 min a 1000 V.
- 1 h 30 min a 2000 V.
- 1 h 30 min a 4000 V.
- 2 h a 8000 V.
- 8000 V hasta 75.000 V/h.

Una vez acabada la primera dimensión se guardó la tira a -80°C en una pipeta de plástico de un solo uso si no se procedía de inmediato a la segunda dimensión.

2.7.3.2.2 Segunda dimensión

Todo el proceso de la segunda dimensión se realizó en la Unitat de Serveis de Proteòmica de l'IIBB (CSIC).

- *Preparación del gel:* para preparar los geles se utilizó el sistema de montaje del equipo Ettan DALTsix (Amersham Biosciences), que nos permitió preparar de una vez 6 geles de 24 x 20 cm y 1 mm de grosor. Se prepararon 450 ml de una solución de acrilamida / bisacrilamida al 12%, y se llenó el sistema de montaje con esta solución hasta 0,5 cm por debajo del vidrio pequeño, dejando el espacio justo para colocar la tira. A continuación se añadieron 2 ml de n-butanol (50 ml de n-butanol en 10 ml de H₂O Milli-Q) sobre cada gel y se dejó polimerizar. Transcurrida una hora se descartó el n-butanol y se lavó varias veces con agua.

| Solución acrilamida/bis 12% | |
|--|-------------------|
| H ₂ O Milli-Q | 153 ml |
| 30% / 0,8% acril/bis (Duracryl, Oxford Glycosystems) | 180 ml |
| Tampón de resolución (apartado 2.7.3.1) | 112,5 ml |
| SDS 10% | 4,5 ml |
| APS 10% | 2,25 ml |
| TEMED | 380 μl |

• *Equilibrado de la tira*: antes de correr la segunda dimensión es necesario equilibrar la tira. Para hacerlo son necesarias dos incubaciones de 15 minutos en agitación suave con 10 ml de tampón de equilibrado-SDS. En la primera incubación se añaden a este tampón 100 mg DTT/10 ml, y en la segunda 250 mg de iodoacetamida/10 ml.

| Tampón de equilibrado-SDS | |
|---------------------------|-------|
| Tris (Roche) | 50 mM |
| Urea (Sigma) | 6 M |
| Glicerol 87% | 30% |
| SDS (Merck) | 2% |
| Azul de bromofenol | 2-3 g |

Ajustar a pH 8,8

• *Electroforesis*: una vez equilibrada la tira se colocó sobre la superficie del gel. También se colocó a la derecha del gel un recorte de papel Whatman de 0,5 cm x 0,5 cm, impregnado con 5 µl de marcador de peso molecular de precisión (Bio-Rad, apartado 2.7.3.3). Para evitar que la tira se moviese al añadir líquido a la cubeta de electroforesis, se selló con una solución de agarosa al 0,5% en tampón de recorrido. Se repitió esta operación para cada tira. A continuación se insertaron los casetes en la cubeta de electroforesis del sistema Ettan DALTsix, y se rellenó con tampón de recorrido (apartado 2.7.3.1). Las condiciones de la electroforesis fueron las siguientes:

- 2,5 W/gel durante 30 min.
- 100 W hasta que el frente estaba a 1mm del final del gel.

En todo momento se mantuvo la temperatura a 25°C con un sistema de refrigeración para evitar la precipitación de la urea, lo que puede provocar un desdoblamiento de los “spots”.

2.7.3.3 Marcadores de peso molecular

Se utilizaron básicamente dos marcadores de peso molecular:

- SDS-PAGE Standard, Low-Range de Bio-Rad: se utilizó en los geles de poliacrilamida Tris-Glicina-SDS (apartado 2.7.3.1). Contiene una mezcla de proteínas con los siguientes pesos moleculares: 97,4 - 66,2 - 45 - 31 - 21,5 - 14,4 kDa.
- Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range: 194 - 116 - 95 - 51 - 36 - 28 - 19 - 6 kDa. Los pesos moleculares son aproximados, pueden variar dependiendo del lote.
- Precision Protein Standards de Bio-Rad: se utilizó en los geles de 2D-PAGE (apartado 2.7.3.2). Se trata de una mezcla de proteínas recombinantes con los siguientes pesos moleculares: 250 - 150 - 100 - 75 - 50 - 37 - 25 - 15 - 10 kDa.

2.7.3.4 Tinción de geles de proteínas

2.7.3.4.1 Tinción de proteínas con azul de Coomassie[®]

Este tipo de tinción se utilizó para los geles de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS. La tinción se realizó incubando los geles desde un mínimo de 30 minutos hasta un máximo de 12 horas en la solución de tinción. Para eliminar el exceso de tinción y que sólo quedasen teñidas las proteínas se realizaron tres o cuatro lavados con ácido acético glacial (Panreac) 10% (v/v).

| Solución de tinción | |
|--|-------|
| Azul brillante de Coomassie [®] R-250 (Fluka) | 0,5 ‰ |
| Ácido acético glacial (Panreac) | 10% |
| Isopropanol (Merck) | 25% |

Filtrar la solución con papel de celulosa.

2.7.3.4.2 Tinción de proteínas con nitrato de plata (geles 2D- PAGE)

Esta tinción se utilizó para los geles de 2 dimensiones. Se siguió meticulosamente el protocolo que se detalla a continuación:

1. Fijación: 40% Etanol (Merck), 10% Acido acético (Merck)
30 minutos
2. Sensibilización: 30% Etanol(Merck)
Na₂S₂O₃ (Sigma) 0,2% w/v
Acetato sódico (Sigma) 6,8% w/v
30 minutos
3. Lavado: Agua Milli-Q
3 veces x 5 minutos
4. Tinción: AgNO₃ (Merck) 2,5 g/l
20 minutos
5. Lavado: Agua Milli-Q
2 veces x 1 minuto
6. Revelado: Na₂CO₃ (Sigma) 2,5% w/v
Formaldehído (0,4ml/l)
2-5 minutos, hasta visualizar los spots.
7. Stop: EDTA-Na₂·2H₂O (Sigma) 1,46% w/v
10 minutos
9. Lavado: Agua Milli-Q
3 veces x 5 minutos

- Todas las disoluciones se guardaron a 4°C.
- Todas las disoluciones se prepararon en H₂O Milli-Q.
- Todos lo recipientes que se utilizaron fueron lavados previamente con H₂O Milli-Q y metanol.

2.7.4 SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

Con la finalidad de sobreproducir una proteína se utilizó el sistema de expresión de T7 (Studier *et al.*, 1990). Primero se construyó un plásmido recombinante que contenía el gen de interés clonado bajo la influencia del promotor de la ARN polimerasa de T7. Se utilizó el vector de expresión pET3b.

A continuación el plásmido recombinante se transformó a la cepa BL21(DE3) (pLysE), capaz de sintetizar la polimerasa del fago T7 bajo un promotor inducible por IPTG. Como media, se recogieron 2000 colonias obtenidas en la transformación y se utilizaron para inocular 50 ml de LB.

El cultivo se incubó en agitación a 37°C hasta alcanzar una DO_{600} de 0,5. En este momento se añadió IPTG (Promega) a una concentración final de 0,5 mM. Según la finalidad de la inducción el cultivo se incubó a diferentes temperaturas y se recogieron extractos proteicos a diferentes tiempos.

2.7.5 VALORACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

2.7.5.1 Determinación de la actividad β -galactosidasa

(Miller, 1992)

A la DO_{600} escogida para medir la actividad β -galactosidasa de un cultivo de la cepa objeto de estudio, se recogieron alícuotas de entre 50 μ l- 500 μ l que se llevaron a un volumen de 1ml completando con tampón Z. Se añadieron 50 μ l de cloroformo y 25 μ l de SDS 0,1% y se agitó con un vórtex durante 15 segundos para romper las células. A continuación se incubó la muestra durante 5 minutos en un baño a 28°C y se añadió el ONPG (4 mg/ml en tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7). Se incubaron las muestras hasta la aparición de color amarillo de una absorbancia entre 0,3-0,6, momento en el que se paró la reacción con 0,5 ml de Na_2CO_3 1 M. Se dejaron reposar las muestras unos minutos y se midió la absorbancia a las longitudes de onda de 412 nm y 550 nm.

| Tampón Z | |
|--|-------|
| Na ₂ HPO ₄ (Merck) | 60 mM |
| NaH ₂ PO ₄ (Merck) | 40 mM |
| KCl (Merck) | 10 mM |
| MgSO ₄ | 1 mM |
| β- mercaptoetanol | 50 mM |

pH 7, no autoclavar

Tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7: sobre 39 ml de Na₂HPO₄ 0,1 M añadir 61 ml de NaH₂PO₄ 0,1 M.

Con los valores de absorbancia obtenidos se calcula la actividad β-galactosidasa con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad } \beta\text{-galactosidasa (U)} = 1000 \times (\text{DO}_{412} - 1,75 \times \text{DO}_{550}) / (t \times V \times \text{DO}_{600})$$

U: Unidades Miller.

DO₄₁₂ y DO₅₅₀: valores de absorbancia a las longitudes de onda de 412 nm y 550 nm una vez detenida la reacción.

DO₆₀₀: valor de absorbancia a 600 nm del cultivo al tomar la muestra.

t: tiempo transcurrido en minutos desde la adición de ONPG hasta detener la reacción con Na₂CO₃.

V: volumen de cultivo utilizado para la determinación de actividad (ml).