



Figura 1.10. Vías de reactivación de horquillas de replicación bloqueadas. Las vías difieren según el daño a reparar. En verde se representan las cadenas a replicar y en naranja las cadenas hijas. (A) y (B) son propuestas de Cox (1998) en la que se describen los eventos que tienen lugar si se encuentra una lesión no reparada (A) o un hueco (B). En ambos casos una cadena complementaria es reclutada desde el otro lado de la horquilla de replicación, con la ayuda de RecA, RecFOR y probablemente otras proteínas. Una vez que los intermediarios de recombinación son procesados (usando la actividad de RuvABC y/o RecG) la replicación se reinicia por un conjunto de enzimas especializadas. (C) es un modelo de reiniciación de la replicación descrito recientemente que implica RecFOR, PriA, DNA polimerasa II y DNA polimerasa III tras una lesión provocada por daño a UV (Rangarajan *et al.*, 2002). Modificado de Cox (1998) y Rangarajan *et al.*, (2002).

1.1.5. Mutagénesis SOS

Hemos visto que la respuesta SOS induce diferentes mecanismos de reparación cuando el nivel de daño en el DNA es muy alto permitiendo a la célula continuar con la replicación. Tal y como ya se ha descrito, la inducción SOS facilita que las DNA polimerasas atascadas en las lesiones las puedan saltar y continuar con la replicación, con la consecuente generación de mutaciones debidas a la síntesis translesión. Como ya se ha comentado, ésta depende principalmente del funcionamiento del operón *umuDC*, con la intervención de la actividad coproteasa de la proteína RecA, y cuyo mecanismo se ha expuesto en el punto 1.1.2.2.3.

Además, se ha descubierto que entre las funciones inducidas por respuesta SOS se encuentra una actividad que aumenta la mutagénesis en el DNA que no ha estado expuesto a agentes dañinos exógenos. Esta forma de mutagénesis se conoce como mutagénesis no dirigida (Witkin y Wermundsen, 1979).

Se ha demostrado también que la expresión de DinB desde un plásmido de bajo número de copia es suficiente para aumentar drásticamente la mutagénesis no dirigida en plásmidos F' de *E. coli* (Kim *et al.*, 1997). Este efecto, llamado actividad mutagénica DinB, se ha visto confirmado con la recientemente descubierta actividad polimerasa de DinB (DNA polimerasa IV) (Wagner *et al.*, 1999). Esta DNA polimerasa IV media en la replicación del DNA y carece de actividad 3'-5' exonucleasa (de corrección), y su modo de replicación es estrictamente distributivo.

De esta manera, polimerasas inducibles por daño, tales como la DNA polimerasa IV SOS-inducible o la DNA polimerasa V en *E. coli*, no solamente "bypassan" ciertas lesiones no codificantes sino que aumentan los errores de replicación de bases normales (Tang *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 1999, Wagner *et al.*, 2000). Su descubrimiento permite sugerir que una fracción significativa de mutaciones espontáneas en células creciendo bajo condiciones normales puede ser debida a errores causados por niveles basales de polimerasas tendentes a error (Strauss *et al.*, 2000). La DNA polimerasa IV codificada por *dinB* es el primer candidato, ya que su sobreexpresión en plásmidos de alto número de copia se traduce en un aumento de sustituciones de bases y corrimientos de lectura.

Además, diferentes estudios han demostrado una disminución de aproximadamente dos veces en la cantidad de mutaciones espontáneas en cepas con un alelo de *dinB* inactivado que también reduce la expresión de tres genes *yafNOP* situados a continuación de *dinB*, (McKenzie *et al.*, 2003; Strauss *et al.*, 2000), a pesar de que este efecto no está presente si solo se inactiva *dinB* (McKenzie *et al.*, 2003). La expresión de *dinB* y *yafNOP* está aumentada tras la inducción SOS (Courcelle *et al.*, 2001) y estos cuatro genes forman parte de un operón (McKenzie *et al.*, 2003).

1.1.6. Otras funciones SOS

Entre otras funciones que forman parte de la respuesta SOS, está la inhibición de la división celular, que se produce cuando el daño del DNA es persistente y no ha podido ser reparado. La célula continúa elongándose, pero no puede septarse por lo que forma filamentos. El producto del gen *sulA*, regulado por LexA, es el inhibidor de la septación y actúa bloqueando la actividad de FtsZ, de manera que la célula no puede dividirse y se produce una filamentación transitoria, cuyo objetivo podría ser retardar la división celular mientras se repara el daño. La proteína SulA es muy inestable y solamente se puede observar una acumulación de la misma cuando el sistema está totalmente inducido (Huisman y D'Ari, 1981; Walker, 1996).

Finalmente, otra función del sistema SOS, en caso de daño severo, es la inducción de profagos. Éstos no están regulados por el represor LexA, pero en un sistema inducido la proteína RecA* tiene la capacidad de catalizar la autohidrólisis de varios represores de los genes líticos de algunos profagos, tales como ζ , λ 80 y 434, con lo que se induce el ciclo lítico que provoca la muerte celular (Sauer *et al.*, 1982). Tal es el caso del represor CI del fago ζ , ampliamente estudiado y que presenta similitudes con las proteínas LexA y UmuD en su mecanismo de autohidrólisis dependiente de RecA* (Mustard y Little, 2000).

1.2. El regulón SOS en otras proteobacterias

Aunque el sistema SOS de *E. coli* es el mejor estudiado, en los últimos años se han hecho grandes avances en su conocimiento en otros microorganismos (Eisen y Hanawalt, 1999), demostrando la existencia de esta red en diferentes organismos y describiendo similitudes y diferencias entre ellos. En general, se puede decir que la existencia del sistema de reparación SOS o algún sistema similar es generalizado entre los distintos grupos bacterianos, en arqueobacterias e incluso en eucariotas como *Saccharomyces cerevisiae*. A continuación hablaremos de la distribución y características de las proteínas RecA y LexA en el mundo bacteriano.

Con la excepción del endosimbionte *Buchnera aphidicola* (Tamas *et al.*, 2002), en todos los genomas secuenciados hasta ahora se ha identificado un *recA*. Esto lo convierte en el componente del regulón SOS más ubicuo y conservado. Su poca variabilidad específica, que indica un origen ancestral (Eisen y Hanawalt, 1999) ha sido determinante para su uso como marcador alternativo al 16S rRNA. Entre estos usos, podemos destacar:

- i) Marcador filogenético alternativo en la familia *Vibrionaceae* (Thompson *et al.*, 2004), donde se comprobó que es mucho más discriminatorio que 16S rRNA.
- ii) En análisis filogenéticos intragenéricos en el caso de *Bifidobacterium* intestinales (Kullen *et al.*, 1997).
- iii) Para diferenciar *Lactobacillus* (Torriani *et al.*, 2001).
- iv) Para confirmar la proximidad de *Frankia* y *Acidothermus* (Marechal *et al.*, 2000).

v) Para cambiar la taxonomía del grupo *Lactobacillus casei* (Felis *et al.*, 2001).

En cambio, el gen *lexA* no es tan ubicuo, habiéndose descrito su ausencia en microorganismos como *Aquifex aerolicus*, *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumonia*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Porphyromonas gingivalis* y *Chlorobium tepidum* (Campoy *et al.*, 2003).

A pesar de la conservación de *recA* y *lexA* en el dominio Bacteria, tan sólo se ha analizado la constitución génica del regulón LexA en el grupo filogenético de las proteobacterias Gamma (Erill *et al.*, 2003). Estos estudios se basan en la predicción de motivos reguladores mediante algoritmos, y sus resultados en otros microorganismos han sido corroborados por ensayos *microarray*.

Este trabajo realizado en nuestro laboratorio ha permitido obtener las siguientes conclusiones con respecto a las proteobacterias Gamma:

- i) Los genes *lexA*, *recA* y *recN* pertenecen al regulón LexA de todas ellas.
- ii) Los genes *mdf* y *impA* forman parte del regulón LexA en *H. influenzae* y *P. multocida*, especies estrechamente relacionadas, lo que puede indicar que heredaron esta regulación de un ancestro común.

1.3. Objetivos

Teniendo en cuenta que lo publicado hasta ahora apunta hacia una ubicuidad del sistema SOS en el mundo bacteriano, nos proponemos caracterizar la composición génica de este regulón en diferentes grupos filogenéticos:

- i) *Geobacter sulfurreducens*, como representante del grupo Desulfuromonas, perteneciente a la subdivisión Delta de las proteobacterias.
- ii) *Fusobacterium nucleatum*, del Phylum Fusobacteria.
- iii) Clase Alfa de proteobacterias.
- iv) Bacterias gram positivas.

Dicho estudio se llevará a cabo tanto mediante técnicas experimentales como biocomputacionales.

2. Material y métodos

2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo, así como sus características más relevantes y su procedencia se resumen en la Tabla 2.1. Los oligonucleótidos (Roche Diagnostics S.L.) están indicados en la Tabla 2.2.

2.2. Métodos microbiológicos

2.2.1. Métodos de cultivo y conservación de cepas

Los cultivos de las diferentes cepas bacterianas de *E. coli* y de *B. subtilis* se realizaron en medio rico Luria-Bertani (LB) (Miller, 1992). En el caso de *E. coli* también se utilizó el medio altamente rico Terrific Broth (TB) para preparar ON (Tartoff y Hobbs, 1987). Los antibióticos se suplementaron cuando fue necesario a la concentración adecuada (Tabla 2.3). Las siembras en medio sólido se realizaron en placas Petri con medio LB con 17% de agar. La temperatura de incubación de *E. coli* fue de 37°C.

Los cultivos de *G. sulfurreducens* se realizaron a 30°C en medio NBAF bajo condiciones de anaerobiosis estricta (Coppi *et al.*, 2001). Por otro lado, *F. nucleatum* fue cultivado en medio Schaedler (Scharlau Chemie) en líquido y en placas agar-chocolate (Biomérieux) a 37°C en condiciones de anaerobiosis. Finalmente *S. meliloti* fue cultivado en medio rico T4 a 30°C.

Para realizar los cultivos de noche se partía de colonias aisladas de crecidas en medio sólido y se inoculaban en 10 ml del medio de cultivo líquido con los suplementos necesarios, a la temperatura adecuada con una agitación de 110 rpm en todos los casos menos en los de las bacterias anaeróbicas, que no eran agitadas. Para obtener cultivos en fase exponencial se hacía una resiembra (1:50) del cultivo en medio fresco y se incubaba en las mismas condiciones hasta llegar a la concentración esperada. El crecimiento del cultivo era controlado mediante la medida de la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 550 nm.

La conservación de las cepas de *E. coli* se realizó en placas de LB suplementadas según el caso, que se mantenían a 4°C y se resembraban cada mes. También se mantenían las cepas congeladas a -20°C, en forma de viales del cultivo glicerizados [Glicerol (Scharlau) al 50%, como agente crioprotector]. Las cepas de *F. nucleatum* se mantenían a 4°C en placas de agar chocolate en anaerobiosis y se resembraban cada semana. *S. meliloti* y *B. subtilis* se mantenían en sus respectivos medios sólidos, T4 y LB, a 4°C. Finalmente, *G. sulfurreducens* se conservó en placas NBAF a 4°C y en anaerobiosis. Para el almacenamiento prolongado se utilizaba el sistema de criopreservación de bacterias con perlas porosas que se mantienen a -70°C (Protect).

Tabla 2.1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo

CEPA	Características relevantes^a	Procedencia
<i>E. coli</i>		
DH5 ζ	supE4 +lacU169 (\emptyset 80 lacZ+M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Clontech
BL21-CodonPlus ³ (DE3)	F- ompT hsdSB(r _B m _B) dcm ⁺ Tet ^r gal (DE3) endA hte (argU ileY leuW Cam ^r)	Clontech
<i>G. sulfurreducens</i> DL21	Salvaje	Caccavo <i>et al.</i> , 1994
<i>F. nucleatum</i> subsp. polymorphum ATCC10953	Salvaje	DSMZ
<i>S. meliloti</i> 2011	Salvaje	J. Imperial
<i>B. subtilis</i> Bs8025	Salvaje	Dep. Genética y Microbiología UAB
PLÁSMIDO	Características relevantes^a	Procedencia
pGEM-T ²	Vector de clonación de PCR, Ap ^r	Promega
pGEX-4T-1 ²	Vector de sobreexpresión con GST, Ap ^r	Promega
pUA1021	pGEM-T ² con un fragmento de 1.075 pb clonado, que contiene el gen <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i> , incluyendo su propia región promotora.	Este estudio
pUA1022	pGEM-T ² con un fragmento de 710 pb clonado, que contiene el gen <i>lexA2</i> de <i>G. sulfurreducens</i> , incluyendo su propia región promotora.	Este estudio
pUA1023	pGEM-T TM con un fragmento de 639 pb clonado, que contiene la región codificante del gen <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i> .	Este estudio
pUA1024	pGEM-T TM con un fragmento de 606 pb clonado, que contiene la región codificante del gen <i>lexA2</i> de <i>G. sulfurreducens</i> .	Este estudio
pUA1025	Derivado de pGEX-4T-1 ² con un fragmento <i>EcoRI-SalI</i> que contiene la región codificante del gen <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i> .	Este estudio
pUA1026	Derivado de pGEX-4T-1 ² con un fragmento <i>EcoRI-SalI</i> que contiene la región codificante del gen <i>lexA2</i> de <i>G. sulfurreducens</i> .	Este estudio
pUA1060	pGEM-T TM con un fragmento de 639 pb clonado, que contiene la región codificante del gen <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i> .	Este estudio
pUA1061	Derivado de pGEX-4T-1 con un fragmento <i>EcoRI-SalI</i> que contiene la región codificante del gen <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i> .	Este estudio
pUA1062	pGEM-T ² con un fragmento de 717 pb clonado que contiene la región codificante del gen <i>lexA</i> de <i>S. meliloti</i> .	Este estudio
pUA1063	Derivado de pGEX-4T-1 con un fragmento <i>EcoRI-SalI</i> que contiene la región codificante del gen <i>lexA</i> de <i>S. meliloti</i> .	Este estudio

Tabla 2. 2. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Posición ^a	Aplicación ^b
Direct-Cy5	Cy5-CGACGTTGTAAACGACGGCCAGT	+2957c	Oligonucleótido universal del vector pGEM-T marcado con Cy5 en el extremo 5', utilizado para secuenciación
Reverse-Cy5	Cy5-CAGGAAACAGCTATGAC	+177c	Oligonucleótido inverso universal del vector pGEM-T marcado con Cy5 en el extremo 5', utilizado para secuenciación
T7 prom-Cy5	Cy5-TAATACGACTCACTATAGGG	+2987c	Oligonucleótido del promotor del fago T7 marcado con Cy5 en el extremo 5', utilizado para secuenciación
Geobacter sulfurreducens			
LexA1up	TCATCAACGTTGTATGTGG	-398	Oligonucleótido para clonar el gen <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
LexA1dw	TTGCTCATGCTTGAGTGCC	+639	Oligonucleótido para clonar el gen <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
LexA1EcoRI	GAATTCATGCAGGAACTTGCCCCCGCCAGC	+1	Oligonucleótido para clonar el gen <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i> en el vector pGEX-4T-1
LexA1SmaII	GTCCGACCTACTCCAGGGTCCGGTAGATGCCG	+659	Oligonucleótido para clonar el gen <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i> en el vector pGEX-4T-1
LexA1+48	GGTTATGAACTCAAAGCAC	+48	Oligonucleótido para clonar el promotor <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i> usado como competidor específico en EMSA
LexA1+48dig	DIG-GGTTATGAACTCAAAGCAC	+48	Oligonucleótido para obtener los fragmentos para EMSA, marcado con digoxigenina en su extremo 5'
LexA1-95	TGACAGCAATTCCCGC	-95	Oligonucleótido para obtener el fragmento LexA1.1
LexA1-74	GTTTCACACCCCTTGAC	-74	Oligonucleótido para obtener el fragmento LexA1.2
LexA1-41a	CATGATAGGTTGACATATG	-41	Oligonucleótido para obtener el fragmento LexA1.3
LexA1-34	TGACATATGTCAACCA	-34	Oligonucleótido para obtener el fragmento LexA1.4
LexA1-41 +CCCC	CATGATAGGTTGACATCCCCATGTCAACCAAT	-41	Oligonucleótido para obtener el fragmento lexA1.3mut
LexA1-41b	CATGATAGGTTGACATATGTCAACC	-41	Oligonucleótido para obtener el fragmento LexA-40
LexA1.1	CATGATGGTTGACATATGTCAACC	-41	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
LexA1.2	CATGATAGGTTGACATATGTCAACC	-41	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
LexA1.3	CATGATAGGTTGACATATGTCAACC	-41	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
LexA1.4	CATGATAGGTTGACATATGTCAACC	-41	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
LexA1.5	CATGATAGGTTGGACATATGTCAACC	-41	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
LexA1.6	CATGATAGGTTCCACATATGTCAACC	-41	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
LexA1.7	CATGATAGGTTGAGATATGTCAACC	-41	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i>

Tabla 2.2. Continuación.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3') ^a	Posición ^b	Aplicación
LexA1.8	CATGATAGGTTGACGATGTGCAACC	-41	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
LexA1.9	CATGATAGGTTGACATCTGTCAACCATGACTG	-41	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
LexA1.10	CATGATAGGTTGACATACTGTCAACCATGACTG	-41	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
LexA1.11	CATGATAGGTTGACATACTTCAACCATGACTG	-41	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
LexA1.12	CATGATAGGTTGACATAATGCCAACCATGACTG	-41	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
LexA1.13	CATGATAGGTTGACATAATGTCAACCATGACTGAT	-41	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
LexA1.14	CATGATAGGTTGACATAATGTCAAAGCATGACTGAT	-41	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
LexA1.15	CATGATAGGTTGACATAATGTCAACGATGACTGAT	-41	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
LexA1.16	CATGATAGGTTGACATAATGTCAAACCGTGACTGAT	-41	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
RecAup	AGAGTCTGGGACGCCG	-213	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>recA</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
RecAdw	CTATCTGGCTGAGCGCAAGC	+55	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>recA</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
RecAdw-dig	DIG-CTATCTGGCTGAGCGCAAGC	+55	Oligonucleótido para obtener el promotor del gen <i>recA</i> de <i>G. sulfurreducens</i> marcado con digoxigenina en su extremo 5'
LexA2up	GTAACCCCGCCCTGGCGG	-104	Oligonucleótido para clonar el gen <i>lexA2</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
LexA2dw	GGGGCAAAGACGGCCCGC	+606	Oligonucleótido para clonar el gen <i>lexA2</i> de <i>G. sulfurreducens</i>
LexA2EcoRI	GAAJTCATGCAGGAACCTTGCCCCCGCCAGC	+1	Oligonucleótido para clonar el gen <i>lexA2</i> de <i>G. sulfurreducens</i> en el vector pGEX-4T-1
LexA2SalI	GTCGACCTACTCCAGGGGTCCGGTAGATGCCG	+606	Oligonucleótido para clonar el gen <i>lexA2</i> de <i>G. sulfurreducens</i> en el vector pGEX-4T-1
LexA2+65	TTTTCGGCGATGAAGCCGG	+65	Oligonucleótido para clonar el promotor <i>lexA2</i> de <i>G. sulfurreducens</i> usado como competidor específico en EMSA
LexA2+65-dig	DIG- TTTTCGGCGATGAAGCCGG	+65	Oligonucleótido para obtener los fragmentos del promotor de <i>lexA2</i> de <i>G. sulfurreducens</i> para ensayos EMSA, marcado con digoxigenina en su extremo 5'
LexAint	GTGACTCCATGATCAAGCCCGC	+386 ^c	Oligonucleótido para obtener la región interna de ambas copias <i>lexA-dinB</i> de <i>G. sulfurreducens</i> en una RT-PCR
DimBint	GCGATGCCGATGGAGCAGG	+353 ^d +1122 ^c	Oligonucleótido para obtener la región interna de ambas copias <i>lexA-dinB</i> de <i>G. sulfurreducens</i> en una RT-PCR
LexA1 A	ATCGGCAAAGTTGGGTATT	+1300 ^d +600	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA

Tabla 2.2. Continuación.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3') ^a	Posición ^b	Aplicación
LexA1 B	CTCGTAGGATGCGGTAGTGATGA	+735	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>lexA1</i> de <i>G. sulfurreducens</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
LexA2 A	GGAGAACCAGGGGACATCGTG	+419	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>lexA2</i> de <i>G. sulfurreducens</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
LexA2 B	GGCTCCCCGGGCAAAGAC	+667	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>lexA2</i> de <i>G. sulfurreducens</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
RecA A	TGCGTCATCTTCATCAACCAG	+581	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>recA</i> de <i>G. sulfurreducens</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
RecA B	GTAAATGTTCGAACCTCCACCTCTT	+789	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>recA</i> de <i>G. sulfurreducens</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
Trp A	GGAGGACCCCTGCCGAAGAT	+224	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>trpA</i> de <i>G. sulfurreducens</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
Trp B	TGGGGGTGAGAAGGAAGATAACAT	+466	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>trpA</i> de <i>G. sulfurreducens</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
Fusobacterium nucleatum			
LexA up	GGAAATCAATTGCACTTCAAGGG	-345	Oligonucleótido para clonar el gen <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
LexA dw	GGATCCTTACAATAATTTTTCTGTG	+660	Oligonucleótido para clonar el gen <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
LexAEcoRI	GAAATTCATGAGTTTTGGAAAAAC	+1	Oligonucleótido para clonar el gen <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i> en el vector pGEX-4T-1
LexASall	GTCGACTTACAATAATTTTTCTTTG	+660	Oligonucleótido para clonar el gen <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i> en el vector pGEX-4T-1
LexA+65	AACCTCTTAAACTATCC	+65	Oligonucleótido para clonar el promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i> para EMSA y los ensayos de <i>footprinting</i>
LexA+65dig	DIG-AACCTCTTAAACTATCC	+65	Oligonucleótido para obtener los fragmentos del promotor de <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i> para ensayos EMSA, marcado con digoxigenina en su extremo 5'
LexA-188	AAAAATACTATGTC AAG	-188	Oligonucleótido para obtener el fragmento <i>lexAA</i>
LexA-113	GTATTTTATTTTTTATAC	-113	Oligonucleótido para obtener el fragmento <i>lexAB</i>
LexA-63	GACACCTTTAGAAATAATTG	-63	Oligonucleótido para obtener el fragmento <i>lexAC</i>
LexA-40	TAAATGTATCTGTATAGTAG	-40	Oligonucleótido para obtener el fragmento <i>lexAD</i>
LexA-24	TAGTACAAAAAAGGAGG	-24	Oligonucleótido para obtener el fragmento <i>lexAE</i>
LexA-40.3	TAAACCCCTCTGTATAGTAG	-40	Oligonucleótido para obtener el fragmento <i>LexA-40.3</i>
LexA-40.2	TAAATGTATCTGTATAGTAGCCGCAAAAAGGAGG	-40	Oligonucleótido para obtener el fragmento <i>LexA-40.2</i>
LexA-40+4C	TAAATGTATCTGCCCTATAGTAGTAC	-40	Oligonucleótido para obtener el fragmento <i>LexA-40+4C</i>
LexA1.3	TACTGTATCTGTATAGTAG	-40	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
LexA2.1	TAAACGTATCTGTATAGTAG	-40	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>

Tabla 2.2. Continuación.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3') ^a	Posición ^b	Aplicación
LexA2.2	TAATCTATCTGTATAGTAG	-40	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
LexA2.3	TAATGCATCTGTATAGTAG	-40	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
LexA3.1	TAATGICTCTGTATAGTAG	-40	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
LexA3.2	TAATGTACCTGTATAGTAG	-40	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
LexA3.3	TAATGTCGCTGTATAGTAG	-40	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
LexA5.2	TAATGTATCTGTAAAGTAGTACAA	-40	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
LexA5.3	TAATGTATCTGTATIGTAGTACAAAA	-40	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
LexA6.1	TAATGTATCTGTATAGTAGTACAAAA	-40	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
LexA6.2	TAATGTATCTGTATAGAGTACAAAAAAA	-40	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
LexA6.3	TAATGTATCTGTATAGTTGTACAAAAAAA	-40	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
LexA7.1	TAATGTATCTGTATAGTTTACAAAAAAA	-40	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
LexA7.2	TAATGTATCTGTATAGTTGAACAAAAAAA	-40	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
LexA7.3	TAATGTATCTGTATAGTTGTTCAAAAAAA	-40	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
LexA8.1	TAATGTATCTGTATAGTTGAAGAAAAAAA	-40	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
LexA8.2	TAATGTATCTGTATAGTTGTGAAAAAAA	-40	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
LexA8.3	TAATGTATCTGTATAGTTGTAGAAAAAAA	-40	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
LexA9.1	TAATGTATCTGTATAGTACAAIAAAGGAGGAA	-40	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
LexA9.2	TAATGTATCTGTATAGTACAAAIAAGGAGGAAT	-40	Oligonucleótido para obtener mutantes puntuales del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i>
RecA-251	TTACTCACAAAATGATTCAGG	-251	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>recA</i> de <i>F. nucleatum</i>
RecA+73	TGACTGCTTTTCTTTTC	+73	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>recA</i> de <i>F. nucleatum</i>

Tabla 2.2. Continuación.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3') ^a	Posición ^b	Aplicación
RecA+73dig	DIG-TGACTGCCTTTTCTTTTCC	+73	Oligonucleótido para obtener el promotor del gen <i>recA</i> marcado con digoxigenina en su extremo 5'
DinB-89	TCATTCTTTTTAGTTTTAAC	-89	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>dinB</i> de <i>F. nucleatum</i> para ensayos EMSA y footprinting
DinB+62	CTGTTGATTCAATAGAAGC	+62	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>dinB</i> de <i>F. nucleatum</i> para usarlo en el ensayo de footprinting
DinB-32	TTATCTACAAAATAATTATAAGG	-32	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>dinB</i> de <i>F. nucleatum</i> , obtener el fragmento DinBB
LexA2.2A	TAATTTGTTATAAATATATCTGTATAG	-40	Oligonucleótido para obtener el mutante del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i> LexA2.2A.
LexA3.3A	TAATTTGTTATAAATGTATATGTATAG	-40	Oligonucleótido para obtener el mutante del promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i> LexA3.3A.
LexA-100	TATACAAAATTAATAATTTAATTTAG	-100	Oligonucleótido para el promotor <i>lexA</i> de <i>F. nucleatum</i> para el ensayo de footprinting
LexAup	TTGAAAATGTTGTAGCAGTT	+140	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>lexA</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
LexArv	AGGCATATAATAGTCAGGAGT	+342	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>lexA</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
RecAup	GCCCTACAACTACAACACTACT	+652	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>recA</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
RecArv	CTAAAACCTGAACCAAGAACC	+923	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>recA</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
RecA2up	ATCGGATATCAGAGTTAGCA	+241	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>recA2</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
RecA2rv	AAGCACCTGTACCAATTATTAG	+502	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>recA2</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
DinBup	ACTATGATATGGATGCTTTCT	+20	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>dinB</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
DinBrv	TATTCAGTCTTATCAACAGGA	+224	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>dinB</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
16SrRNAup	GTGGAGCATGTGGTTTA	+904	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>16SrRNA</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
16SrRNArv	GGGCAATGATGACTTGAC	+1174	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>16SrRNA</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
Sinorhizobium meliloti			
LexSmdwSal	GTGACCTAATGATAGCGCCGG	+713	Oligonucleótido para clonar el gen <i>lexA</i> de <i>S. meliloti</i> en el vector pGEX-4T-1

Tabla 2.2. Continuación.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3') ^a	Posición ^b	Aplicación
LexSm+1Eco	GGATTCATGCTGACCCGCAAGC	+1	Oligonucleótido para clonar el gen <i>lexA</i> de <i>S. meliloti</i> en el vector pGEX-4T-1
LexASm+80	TCGAAGGACGGGGGACCCC	+80	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>lexA</i> de <i>S. meliloti</i> y usarlo como competidor específico en ensayos EMSA
LexASm-99	CAACAGCAAGCGAAATTCACGG	-99	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>lexA</i> de <i>S. meliloti</i> y usarlo tanto como competidor específico como muestra en ensayos EMSA
LexASm-99dig	DIG-CAACAGCAAGCGAAATTCACGG	-99	Oligonucleótido para los ensayos EMSA, marcado con digoxigenina en su extremo 5'
SulASmcr-94	AGTGATGAATTCATATCCC	-94	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>sulA</i> de <i>S. meliloti</i> y usarlo en ensayos EMSA
SulASmcr+73	CTCGGAAGGGAAAGAACGG	+73	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>sulA</i> de <i>S. meliloti</i> y usarlo en ensayos EMSA
SulASmpl-100	TGACATGGGCACACATGAAT	-100	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>sulA</i> plasmídico de <i>S. meliloti</i> y usarlo en ensayos EMSA
SulASmpl+110	GGGTTCCGAAAGTGGCGACGGC	+110	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>sulA</i> plasmídico de <i>S. meliloti</i> y usarlo en ensayos EMSA
DimBSm-30	AAGTCGCCGGTTCAACAATTTGTCCG	-30	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>dimB</i> de <i>S. meliloti</i> y usarlo en ensayos EMSA
DimBSmup	GGCGGTAAGCGTGGCGTCGTC	+220	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>dimB</i> de <i>S. meliloti</i> para ensayos de cuantificación de mRNA
DimBSmrv	GGCGGGCGGATCGTGGTGAA	+480	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>dimB</i> de <i>S. meliloti</i> para ensayos EMSA y para clonar la región interna y usarla en ensayos de cuantificación de mRNA
03093Sm-173	GCTGCTTTTGTCTTGATTGTTC	-173	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen SMC03093 de <i>S. meliloti</i> y usarlo en ensayos EMSA
03093Smup	GAGCGGGCGATTGCGTTCTAC	+73	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen SMC03093 de <i>S. meliloti</i> para ensayos de cuantificación de mRNA
03093Smrv	GCCCGTCCGGCAGCGTTTCG	+369	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen SMC03093 de <i>S. meliloti</i> para ensayos EMSA y para clonar la región interna y usarla en ensayos de cuantificación de mRNA
MoaASm-189	CTGAATATTTGTTCTTGATTGTTC	-189	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>moaA</i> de <i>S. meliloti</i> y usarlo en ensayos EMSA
MoaASmup	GGGCTCTCGGCAGGGCTTGATTTC	+361	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>moaA</i> de <i>S. meliloti</i> para ensayos de cuantificación de mRNA
MoaASmrv	CACCATGGCCGATTTTGTAAACGAT	+369	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>moaA</i> de <i>S. meliloti</i> para ensayos EMSA y para clonar la región interna y usarla en ensayos de cuantificación de mRNA
DnaESm-283	AACGGAAATAGAACAAAAAGGGAAC	-283	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>dnaE</i> de <i>S. meliloti</i> y usarlo en ensayos EMSA

Tabla 2.2. Continuación.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3') ^a	Posición ^b	Aplicación
DnaESmup	TGCCGAACAATCCCGCCAACC	+1481	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>dnaE</i> de <i>S. meliloti</i> para ensayos de cuantificación de mRNA
DnaESmrv	CCGCTGCTCGACCCATTTC	+1747	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>dnaE</i> de <i>S. meliloti</i> para ensayos EMSA y para clonar la región interna y usarla en ensayos de cuantificación de mRNA
ParESm-142	GGGCATCGAAATTCGCCTTTTGTTCGC	-142	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>parE</i> de <i>S. meliloti</i> y usarlo en ensayos EMSA
ParESmup	GGGGGGCCTCGAAGACCTG	+579	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>parE</i> de <i>S. meliloti</i> para ensayos de cuantificación de mRNA
ParESmrv	GCCGGCCGGGAAATGAAACAC	+816	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>parE</i> de <i>S. meliloti</i> para ensayos EMSA y para clonar la región interna y usarla en ensayos de cuantificación de mRNA
MoaAcoSm-124	GCAGAAAATAGAACAAAATCAAGAAG	-124	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen adyacente a <i>moaA</i> de <i>S. meliloti</i> y usarlo en ensayos EMSA
MoaAcoSmup	CCCCGGCGAGTGGTTGATG	+206	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen adyacente a <i>moaA</i> de <i>S. meliloti</i> para ensayos de cuantificación de mRNA
MoaAcoSmrv	GCGTCCCCCTTCGGCAGCAGA	+407	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen adyacente a <i>moaA</i> de <i>S. meliloti</i> para ensayos EMSA y para clonar la región interna y usarla en ensayos de cuantificación de mRNA
RuvCSm-68	TCTGTGCAATGTTTTTGTGTTGTTTC	-68	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>ruvC</i> de <i>S. meliloti</i> y usarlo en ensayos EMSA
RuvCSmup	GGGCTTGCCGAGGTGGTGCA	+163	Oligonucleótido para obtener la región interna del <i>ruvC</i> de <i>S. meliloti</i> para ensayos de cuantificación de mRNA
RuvCSmrv	CTCGGCCCTTGGGCATCAGGAC	+414	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>ruvC</i> de <i>S. meliloti</i> para ensayos EMSA y para clonar la región interna y usarla en ensayos de cuantificación de mRNA
SulAcroSm-157	CATCTGCATGTTTCATGTTATGTTTC	-157	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen adyacente a <i>sulA</i> de <i>S. meliloti</i> y usarlo en ensayos EMSA
SulAcroSmup	TCGAACAGCTCGCGTTTGAAG	+62	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen adyacente a <i>sulA</i> de <i>S. meliloti</i> para ensayos de cuantificación de mRNA
SulAcroSmrv	GATGATCGGGCGGGTAGAG	+297	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen adyacente a <i>sulA</i> de <i>S. meliloti</i> para ensayos EMSA y para clonar la región interna y usarla en ensayos de cuantificación de mRNA
YigNSm-59	GGAAATGCATGTTCTCGTTTGTGATC	-59	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>yigN</i> de <i>S. meliloti</i> y usarlo en ensayos EMSA
YigNSmup	CGACCGGCCCGGAAGAGCA	+146	Oligonucleótido para obtener la región interna del <i>yigN</i> de <i>S. meliloti</i> para ensayos de cuantificación de mRNA

Tabla 2.2. Continuación.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3') ^a	Posición ^b	Aplicación
YigNSmrv	TTGGCGAGCGACTGGATGTTG	+407	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>yigN</i> de <i>S. meliloti</i> para ensayos EMSA y para clonar la región interna y usarla en ensayos de cuantificación de mRNA
ComMSm-163	TCGCTCTTGTGTTCTATCAATTGTTT	-163	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>comM</i> de <i>S. meliloti</i> y usarlo en ensayos EMSA
ComMSmup	CGCGCTGTCCCGGTTATGTGCGT	+249	Oligonucleótido para obtener la región interna del <i>comM</i> de <i>S. meliloti</i> para ensayos de cuantificación de mRNA
ComMSmrv	CTCGGGGGCGGAAAGCACCTG	+531	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>comM</i> de <i>S. meliloti</i> para ensayos EMSA y para clonar la región interna y usarla en ensayos de cuantificación de mRNA
ThrSmup	CGCGCCTCGGAGAAAGATGTGG	+1087	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>thr</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
ThrSmrv	CGTCGGAAAGCGTGGGGTCAATAC	+1296	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>thr</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
SulAcrSmup	TTGCGTCAGCGCGGGCGGAGGAG	+631	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>sulA</i> cromosómico y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA.
SulAcrSmrv	CGGCAGATCGGGAAAAGTGGAT	+922	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>sulA</i> cromosómico y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA.
SulAplSmup	CACGAGTTGCGCGGGGAAAATC	+118	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>sulA</i> plasmídico y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA.
SulAplSmrv	GCGAGCGCGGAAAGAACAGA	+380	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>sulA</i> plasmídico y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA.
LexAupSmRT	CGGGCCCTCGAAGTCATCAAG	+184	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>lexA</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA.
LexArvSmRT	CGCCGCTGCCGATCATTTCAA	+442	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>lexA</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
Bacillus subtilis			
LexAupBs-161	ACTCATGATCATAAACCTCCAACAGG	-161	Oligonucleótido para clonar el promotor <i>lexA</i> de <i>B. subtilis</i> y utilizarlo como competidor en ensayos EMSA
LexABsrv	GGACGCAAGCCCGACAGCCTCTCCG	+116	Oligonucleótido para obtener el promotor de <i>lexA1</i> de <i>B. subtilis</i> .
LexABsrvdig	DIG-GGACGCAAGCCCGACAGCCTCTCCG	+116	Oligonucleótido para obtener el promotor de <i>lexA1</i> de <i>B. subtilis</i> , marcado con digoxigenina en su extremo 5'
LexABsup	GATATCCGCCTTCCGTGAGAG	+68	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>lexA</i> de <i>B. subtilis</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
LexABsrv	GAGATCCCGCCGTGACTTTC	+280	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>lexA</i> de <i>B. subtilis</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
RuvABsup-150	TACAGCGGTAGCGTCCCGC	-150	Oligonucleótido para clonar el promotor <i>ruvA</i> de <i>B. subtilis</i> y utilizarlo como competidor en ensayos EMSA

Tabla 2.2. Continuación.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3') ^a	Posición ^b	Aplicación
RuvABsup	GGCGGCATCGGCTATCAG	+64	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>ruvA</i> de <i>B. subtilis</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
RuvABsrv	CTGGCGTGCGGTTTCTTCTTC	+360	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>ruvA</i> de <i>B. subtilis</i> y usarlo como competidor específico en ensayos EMSA y para obtener la región interna y usarla en ensayos de cuantificación de mRNA
DnaEBsup-215	CGCCCCCGATCAGCACCC	-215	Oligonucleótido para clonar el promotor <i>dnaE</i> de <i>B. subtilis</i> y utilizarlo como competidor en ensayos EMSA
DnaEBsup	GTGCCGTCAAAAAGCGTAAAT	+2506	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>dnaE</i> de <i>B. subtilis</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
DnaEBsrv	GAAGGCGGAGAGGGGATGAT	+2793	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>dnaE</i> de <i>B. subtilis</i> y usarlo como competidor específico en ensayos EMSA y para obtener la región interna y usarla en ensayos de cuantificación de mRNA
AppCup-224	GATTCCTTCATTATCGGC	-224	Oligonucleótido para clonar el promotor <i>appC</i> de <i>B. subtilis</i> y utilizarlo como competidor en ensayos EMSA
AppCBsup	CTTCAAGCCGGGTGGAC	+471	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>appC</i> de <i>B. subtilis</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
AppCBsrv	CGATTGCGGCTGGATT	+748	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>appC</i> de <i>B. subtilis</i> y usarlo como competidor específico en ensayos EMSA y para obtener la región interna y usarla en ensayos de cuantificación de mRNA
PcrABsup-113	TGAAAGATTTTGACAGGGC	-113	Oligonucleótido para clonar el promotor <i>pcrA</i> de <i>B. subtilis</i> y utilizarlo como competidor en ensayos EMSA
PcrABsup	GGAGGAAGCGGAAATGGAAGA	+1779	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>pcrA</i> de <i>B. subtilis</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
PcrABsrv	TAGGATACCGGGCGTGAAACA	+2030	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>pcrA</i> de <i>B. subtilis</i> y usarlo como competidor específico en ensayos EMSA y para obtener la región interna y usarla en ensayos de cuantificación de mRNA
RecQsup-110	GTTTGCCAAACGGATGCGG	-110	Oligonucleótido para clonar el promotor <i>recQ</i> de <i>B. subtilis</i> y utilizarlo como competidor en ensayos EMSA
RecQsup	CATGCGGTTTGGAGTCAG	+778	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>recQ</i> de <i>B. subtilis</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
RecQsrv	TTACGTCGGCGATTCTTCTCAG	+1075	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>recQ</i> de <i>B. subtilis</i> y usarlo como competidor específico en ensayos EMSA y para obtener la región interna y usarla en ensayos de cuantificación de mRNA
UvrCBsup-95	ATCGCTTTTTTATTTCGCC	-95	Oligonucleótido para clonar el promotor <i>uvrC</i> de <i>B. subtilis</i> y utilizarlo como competidor en ensayos EMSA
UvrCBsup	TTTCCCGGATGATTGTGTTTA	+1184	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>uvrC</i> de <i>B. subtilis</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA

Tabla 2.2. Continuación.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3') ^a	Posición ^b	Aplicación
UvrCBsrv	TCCAAGCCGAGTTCATTITCA	+1418	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>uvrC</i> de <i>B. subtilis</i> y usarlo en ensayos EMSA y para obtener la región interna y usarla en ensayos de cuantificación de mRNA
RecOBsup-205	TTAACTACAGAAAAGGTGGG	-205	Oligonucleótido para clonar el promotor <i>recO</i> de <i>B. subtilis</i> y utilizarlo en ensayos EMSA
RecOBsup	TGCTGCCTATGTTGCTGAGTT	+270	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>recO</i> y usarlo en ensayos de cuantificación de mRNA
RecOBsrv	GCGGGTTTAAATCGGGTATCCTGT	+565	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>recO</i> de <i>B. subtilis</i> y usarlo en ensayos EMSA y para obtener la región interna usarla en ensayos de cuantificación de mRNA
RecRBsup-29	CCAGGTTTATTCTAGGGGG	-29	Oligonucleótido para clonar el promotor <i>recR</i> de <i>B. subtilis</i> y utilizarlo en ensayos EMSA
RecRBsup	TGAAGATACGGCGCAGGGATAA	+216	Oligonucleótido para obtener la región interna del gen <i>recR</i> y usarla en ensayos de cuantificación de mRNA
RecRBsrv	TCGCGAGGATCACTTCTGTCA	+427	Oligonucleótido para clonar el promotor del gen <i>recR</i> de <i>B. subtilis</i> y usarlo en ensayos EMSA y para obtener la región interna usarla en ensayos de cuantificación de mRNA
16SrRNAup	GATTTTGCCGAAGAACGATAC	+82	Oligonucleótido para obtener la región interna de <i>16SrRNA</i> y usarla en ensayos de cuantificación de mRNA
16SrRNArv	TTCTTTGACCTTCCCGATGAG	+352	Oligonucleótido para obtener la región interna del <i>16SrRNA</i> y usarla en ensayos de cuantificación de mRNA

^a En los casos necesarios, los sitios de restricción añadidos se muestran en cursiva y los cambios de nucleótidos introducidos se encuentran subrayados.

^b Las posiciones de los extremos 5' de los oligonucleótidos con respecto del punto de inicio transcripcional de cada gen.

^c Posición con respecto al inicio del gen *lexA1* de *G. sulfurreducens*.

^d Posición con respecto al inicio del gen *lexA2* de *G. sulfurreducens*.

2.2.1.1. Medios de cultivo

Medio LB (Luria Bertani) (Miller, 1992)

A 950 ml de agua destilada se añaden:

§ Bacto-triptona (DIFCO)	10 g
§ Extracto de levadura (DIFCO)	5 g
§ Cloruro de sodio (NaCl) (Panreac)	10 g

Mezclar hasta disolver los componentes y ajustar el pH a 7 con NaOH 5 N. Ajustar el volumen a 1 L con agua destilada. Esterilizar en el autoclave (121°C por 15 min).

Agar LB

A 950 ml de agua destilada se añaden:

§ Bacto-triptona (DIFCO)	10 g
§ Extracto de levadura (DIFCO)	5 g
§ Cloruro de sodio (NaCl) (Panreac)	10 g
§ Agar (DIFCO)	17 g

Mezclar hasta disolver los componentes y ajustar el pH a 7 con NaOH 5 N. Ajustar el volumen a 1 L con agua destilada. Esterilizar en el autoclave (121°C por 15 min). Repartir en placas Petri.

Medio TB (Terrific Broth) (Tartoff y Hobbs, 1987)

A 900 ml de agua destilada se añaden:

§ Bacto-triptona (DIFCO)	12 g
§ Extracto de levadura (DIFCO)	24 g
§ Glicerol (Scharlau)	4 ml

Mezclar hasta disolver los componentes. Esterilizar en el autoclave (121°C por 15 min). Dejar enfriar hasta 50-60°C y añadir 100 ml de solución salina estéril KH_2PO_4 0.17 M y K_2HPO_4 0.72 M.

§ Solución salina

A 90 ml de agua destilada se añaden:

§ KH_2PO_4 (Merck)	2.31 g
§ K_2HPO_4 (Merck)	12.54 g

Mezclar hasta disolver los componentes y ajustar el volumen a 100 ml con agua destilada. Esterilizar en el autoclave (121°C por 15 min).

BHI (Brain heart infusion) (OXOID)

A 1 L de agua destilada se añaden:

§ BHI (OXOID)	37 g
---------------	------

Mezclar hasta disolver y esterilizar en el autoclave (121°C por 15 min).

Schaedler (Scharlau Chemie)

A 1 L de agua destilada se añaden:

§ Schaedler (Scharlau Chemie) 28.3 g

Mezclar hasta disolver y esterilizar en el autoclave (121°C por 15 min).

T4

A 950 ml de agua destilada se añaden:

§ Bacto-triptona (DIFCO) 6 g

§ Extracto de levadura (DIFCO) 3 g

§ Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Panreac) 0.5 g

Mezclar hasta disolver los componentes y ajustar el pH a 7 con NaOH 5 N. Ajustar el volumen a 1 L con agua destilada. Esterilizar en el autoclave (121°C por 15 min).

T4 sólido

A 950 ml de agua destilada se añaden:

§ Bacto-triptona (DIFCO) 6 g

§ Extracto de levadura (DIFCO) 3 g

§ Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Panreac) 0.5 g

§ Agar (DIFCO) 17 g

Mezclar hasta disolver los componentes y ajustar el pH a 7 con NaOH 5 N. Ajustar el volumen a 1 L con agua destilada. Esterilizar en el autoclave (121°C por 15 min).

NBAF (Coppi *et al.*, 2001)

A 950 ml de agua desionizada se añaden:

§ KH_2PO_4 0.42 g

§ K_2HPO_4 0.22 g

§ NH_4Cl 0.2 g

§ KCl 0.38 g

§ NaCl 0.36 g

§ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g

§ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g

§ NaHCO_3 1.8 g

§ Na_2CO_3 0.5 g

§ $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2.01 g

§ $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ 6.4 g

§ 0.1% resazurina 0.5 ml

§ Na_2SeO_4 100mM 1.0 ml

§ Solución vitamínica (Balch *et al.*, 1979) 10.0 ml

Dicha solución está compuesta por:

- Biotina	2 mg/l
- Ácido fólico	2 mg/l
- Hidroclorito de piridoxina	10 mg/l
- Hidroclorito de tiamina	5 mg/l
- Rivo flavina	5 mg/l
- Ácido nicotínico	5 mg/l
- DL-Pantoteato de calcio	5 mg/l
- Vitamina B ₁₂	0.1 mg/l
- Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	5 mg/l
- Ácido lipoico	5 mg/l
š Solución NB	10.0 ml

Para proceder a su preparación a 1 L de agua desionizada se añaden:

- Ácido nitriloacético	2.14 g
- MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1 g
- FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.3 g
- CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.17 g
- ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
- CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.3 g
- AlK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0.005 g
- H ₃ BO ₃	0.005 g
- Na ₂ MoO ₄	0.09 g
- NiSO ₄ ·6H ₂ O	0.11 g
- Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	0.2 g

Mezclar hasta disolver, añadir un 0.1% de extracto de levadura y 1 mM de cisteína. Esterilizar en el autoclave (121°C por 15 min).

NBAF sólido (Coppi *et al.*, 2001)

Se procede de forma análoga al líquido, se mezclan todos los componentes menos CaCl₂ y MgSO₄, se le añade agar a una concentración final de 15 g/ml y, una vez autoclavado, se le añaden las cantidades apropiadas de CaCl₂, MgSO₄, extracto de levadura y cisteína estériles hasta alcanzar una concentración final de 0.004%, 0.01%, 0.1% y 5 mM, respectivamente.

2.2.1.2. Incubación en anaerobiosis

Con el fin de llevar a cabo los cultivos de microorganismos anaeróbicos como *G. sulfurreducens* y *F. nucleatum* se utilizaron jarras GasPak™, cuyo cierre hermético permite la conservación de una atmósfera anaeróbica, y sobres BBL™ GasPak™ Plus Anaerobic System[®] como generadores de dicho entorno. Estos sobres se activan al añadirles 10 ml de agua, con lo que generan hidrógeno que, en contacto con el oxígeno de la jarra, se transforma en agua gracias al paladio que incluyen y que realiza la función de catalizador.

Para comprobar la eficiencia tanto del sobre como de la jarra y que, efectivamente, los cultivos se hayan en una atmósfera anaeróbica, se utilizaron indicadores BBL™ Dry Anaerobic Indicators Strips, que en ausencia de oxígeno adoptan una coloración blanca.

2.2.1.3. Antibióticos

El único antibiótico utilizado en el presente estudio ha sido la Ampicilina (Ap) (Roche Diagnostics S.L.). Este antibiótico se guardó en forma de solución concentrada a 50 µg/ml a -20°C y una vez diluido se mantenía a 4°C. Para diluirlo se utilizaba agua ultrapura estéril, de forma que se obtenía un stock a 5 mg/ml, que se utilizaba para obtener una concentración final en placa de 50 µg/ml.

2.2.1.4. Otras soluciones y productos químicos

Para suplementar los medios de cultivo se utilizaron otras soluciones y productos químicos en diferentes pruebas realizadas en este trabajo.

Mitomicina C (SIGMA)

La mitomicina C se utilizó a concentración de 25 µg/ml para suplementar medios líquidos de LB, Schaedler y NBAF a diferente concentración final según el microorganismo, disuelta en agua ultrapura estéril.

5-Bromo-4-cloro-3-indolil- η -D-galactopiranosido (X-gal) (Apollo)

Se utilizó para suplementar placas de LB a una concentración de 40 mg/l, disuelto en *N,N* dimetil formamida.

2.2.2. Inducción de la respuesta SOS

Los ensayos de inducción de genes SOS se realizaron utilizando mitomicina C. Para ello se realizó un cultivo de noche de las cepas de estudio (Tabla 2.1) en 10 ml del respectivo medio y se incubaba a 30°C o a 37°C, según la cepa, durante 20-36 horas. Se sembraron en 10 ml de medio fresco (1:50) en el caso de *F. nucleatum* y *G. sulfurreducens* y en 100 ml en el de *B. subtilis* y *S. meliloti*. Todos ellos se hicieron crecer hasta que el cultivo llegó a fase exponencial (DO_{550nm} aproximada de 0.2). La diferencia en el volumen final de la resiembra se debía a que los cultivos anaeróbicos se debían incubar dentro de jarras GasPak™, cuyo tamaño permitía la entrada de botellas de 100ml, pero no más grandes.

Se añadió mitomicina C a una concentración final diferente dependiendo de la sensibilidad del microorganismo. Esta sensibilidad fue testada experimentalmente para cada uno, y las concentraciones y los tiempos de exposición a mitomicina C utilizadas para cada especie se muestran en la Tabla 2.2. La exposición a mitomicina C se modificó en función

del tiempo de duplicación que presentaron las diferentes especies. Finalizado el tratamiento, se centrifugaba el cultivo a 10 000 rpm durante 10 min y se guardaba el sedimento de células congelado a -80°C hasta su utilización.

Tabla 2.3. Características del tratamiento a la mitomicina C en cada microorganismo.

Microorganismo	Concentración final de mitomicina C ($\mu\text{g/ml}$)	Tiempo de exposición (h)
<i>G. sulfurreducens</i>	20	1,5
<i>F. nucleatum</i>	40	4
<i>S. melloti</i>	20	4,5
<i>B. subtilis</i>	20	2

2.3. Métodos genéticos

2.3.1. Transformación

En el presente trabajo se han utilizado dos metodologías diferentes para incorporar plásmidos a diferentes cepas de *E. coli* (BL21, DH5 ζ), una química, utilizando cloruro cálcico 50 mM, y otra física utilizando un campo eléctrico.

2.3.1.1. Transformación con cloruro cálcico (CaCl_2)

El método que se utiliza es el descrito por Hanahan (1988) con ligeras modificaciones. Se basa en la exposición del cultivo bacteriano en fase exponencial a una solución hipotónica de cloruro de calcio 100 mM a 0°C , que provoca la formación de células competentes, que son capaces de captar DNA exógeno. Este proceso se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* BL21 Codon Plus.

Preparación de células competentes

- § Hacer una resiembra 1:50 a partir de un cultivo de noche de la cepa en 100 ml de medio LB.
- § Incubar a 37°C 110 rpm de agitación hasta alcanzar una $\text{DO}_{550\text{nm}}$ de 0.4 correspondiente a la mitad de la fase exponencial del ciclo de crecimiento celular.
- § Centrifugar el cultivo en un tubo de propileno estéril a 5000 rpm durante 10 min a 4°C , eliminar el sobrenadante en condiciones de esterilidad y resuspender el sedimento en 100 ml de CaCl_2 100 mM frío.
- § Mantener el tubo en hielo durante 15 min.
- § Centrifugar a 5000 rpm durante 10 min a 4°C y resuspender el sedimento suavemente en 5 ml de CaCl_2 100 mM frío.
- § Mantener el tubo en hielo durante 1 h.
- § Añadir 1 ml de glicerol estéril al 100%, hacer alícuotas de 200 μl y congelar a -80°C .

Transformación

- § Mezclar en un tubo de vidrio 200 μ l de células competentes con 10-100 ng de DNA plasmídico y mantenerlo en hielo durante 30 min. En este paso el DNA se adhiere a la pared de las células competentes.
- § Incubar el tubo a 42°C durante 90 s. Con este choque térmico el DNA es incorporado dentro de la célula.
- § Mantener el tubo en hielo durante 5 min.
- § Añadir 0.8 ml de LB e incubar a 37°C durante 45-60 min en agitación. Este paso permite la expresión fenotípica.
- § Sembrar en placas selectivas adecuadas e incubar a 37°C durante 12-18 horas.

Soluciones

Solución CaCl₂ 100 mM

A 90 ml de agua ultrapura se añaden:

- § CaCl₂ (Merck) 1.47 g

Mezclar hasta su total disolución y llevar a un volumen final de 100 ml. Esterilizar por filtración.

2.3.1.2. Electrotransformación

El método que se utiliza es el descrito por Dower *et al.* (1988) con ligeras modificaciones. Es un método más eficaz que el de la transformación con cloruro cálcico. Se basa en aplicar un pulso eléctrico de alto voltaje que despolariza la membrana celular, de manera que se forman poros, transitoriamente, a través de los cuales puede entrar el DNA a la célula (Shigekawa y Dower, 1988). Se utilizó el *Gene Pulser II* y el *Pulse Controller Electroporation System* de BIORAD y los protocolos recomendados por el fabricante.

Es importante en esta técnica evitar al máximo el contenido de sales de las células competentes, por lo cual, los cultivos se prepararon en medio LB con NaCl a una concentración de 0.5% y el DNA que se utiliza debe estar muy limpio y ser de baja fuerza iónica. Este proceso se empleó para transformar las cepas de *E. coli* DH5 ζ .

Preparación de células competentes

- § Hacer un cultivo de noche en 10 ml de LB preparado con NaCl al 0.5%.
- § Hacer una resiembra 1:100 en 1 L de LB (0.5% NaCl) fresco.
- § Incubar a 37°C con una agitación de 110 rpm hasta llegar a una DO_{550nm} de 0.2-0.3 (para cepas *recA*⁺) o de 0.6 (para cepas *recA*⁻).
- § Mantener el cultivo en hielo durante 15 min. A partir de este paso, todo el material y las soluciones que se utilicen estarán atemperados a 4°C.
- § Centrifugar el cultivo en tubos de polipropileno de 250 ml estériles a 6000 rpm durante 10 min a 4°C.

-
- § Eliminar el sobrenadante en condiciones de esterilidad y resuspender el sedimento en 1 L de agua ultrapura estéril. Volver a centrifugar en las mismas condiciones y repetir el lavado con agua ultrapura.
 - § Resuspender las células en 20 ml de glicerol al 10% frío y estéril.
 - § Centrifugar en un tubo de polipropileno de 30 ml estéril a 6000 rpm durante 15 min a 4°C.
 - § Eliminar el sobrenadante en condiciones de esterilidad y resuspender el sedimento en 1 ml de glicerol 10% frío.
 - § Repartir en tubos eppendorf estériles alícuotas de 50 μ l y congelarlos en nieve carbónica.
 - § Conservar las células a -80°C .

Transformación

- § Descongelar las células competentes, manteniéndolas en hielo.
- § Añadir 1-2 μ l de solución de DNA, mezclar con la pipeta y dejar 5 min en hielo.
- § Ajustar las condiciones del *Gene Pulser II* y el *Pulse Controller Electroporation System* a 125 μ F de capacitancia y 200 ohms de resistencia en paralelo.
- § Transferir la mezcla de células y DNA a una cubeta de electrotransformación de 1 mm de paso preenfriada estéril y colocarla en la cámara del *Gene Pulser*.
- § Aplicar un pulso eléctrico de 2.0 kV de potencial eléctrico.
- § Sacar la cubeta y añadir 1 ml de medio BHI. Mezclar y pasar a un tubo estéril de vidrio e incubar a 37°C en agitación durante 45 min (tiempo de expresión fenotípica).
- § Sembrar en placas selectivas adecuadas e incubar a 37°C durante 12-18 horas.

2.4. Métodos de manipulación de DNA

La mayoría de técnicas utilizadas en este trabajo están basadas en los protocolos de *Molecular cloning: a laboratory manual* (Sambrook *et al.*, 1989) y *Current protocols in molecular biology* (Ausubel *et al.*, 1995) con algunas modificaciones.

2.4.1. Extracción de DNA cromosómico

En este procedimiento se lleva a cabo una lisis celular utilizando un detergente, seguida de un tratamiento con proteinasa K. Los restos celulares, proteínas y polisacáridos son secuestrados y precipitados con un tratamiento con hexadecil trimetil bromuro de amonio (CTAB, SIGMA), se extraen con fenol/cloroformo/isoamílico y, finalmente, se recupera el DNA cromosómico por precipitación con 2-propanol (Panreac).

- § Se parte de un cultivo de noche realizado en las condiciones óptimas para cada cepa.
- § Centrifugar 1.5 ml de cultivo a 12 000 rpm durante 1-2 min.
- § Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 567 μ l de tampón TE. Agregar 30 μ l de SDS 10% (Sal sódica de dodecilsulfato) (Merck) y 3 μ l de proteinasa K (20

-
- mg/ml) (Roche Diagnostics S.L.). Mezclar por inversión e incubar a 37°C durante 1 h o hasta que se haya producido la lisis celular.
- § Añadir 100 μ l NaCl 5 M (AppliChem), mezclar vigorosamente y añadir 80 μ l de solución CTAB/NaCl, precalentada. Volver a mezclar e incubar a 65°C durante 10 min.
 - § Añadir 1 volumen de solución cloroformo/isoamílico, mezclar vigorosamente y centrifugar a 12 000 rpm durante 5 min.
 - § Transferir el sobrenadante a otro tubo, utilizando puntas de micropipeta previamente recortadas (para evitar la rotura mecánica del DNA), agregar un volumen de fenol/cloroformo/isoamílico y mezclar vigorosamente.
 - § Centrifugar a 12 000 rpm durante 5 min y recuperar en otro tubo el sobrenadante. Repetir estos pasos de extracción con fenol/cloroformo/isoamílico hasta que la fase superior sea totalmente transparente y desaparezca la interfase.
 - § Hacer un paso con cloroformo/isoamílico para eliminar los restos de fenol. Recuperar el sobrenadante en otro tubo.
 - § Añadir 0.6 volúmenes de 2-propanol (Panreac) absoluto y mezclar por inversión. Se podrá observar la formación de filamentos (precipitado del DNA cromosómico).
 - § Centrifugar a 12 000 rpm durante 10 min.
 - § Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 1 ml de etanol (Carlo Erba Reagenti) 70% frío, centrifugando durante 5 min a 12 000 rpm.
 - § Eliminar el sobrenadante y secar al vacío en el *SpeedVac* (Savant).
 - § Añadir 50-100 μ l de tampón TE+RNAsa y dejar hasta que se resuspenda a 37°C.

Soluciones

Tampón TE

A 97 ml de agua ultrapura se le añaden:

- § Solución de EDTA 0.5 M pH 8 (14.6125 g/100 ml) (AMRESCO) 2 ml
- § Solución de Tris-Cl 1 M pH 7.4 (AppliChem) 1 ml

Mezclar y esterilizar en el autoclave (121°C, 15 min).

Solución CTAB/NaCl

A 80 ml de agua ultrapura se le añaden:

- § NaCl (Panreac) 4.1 g
- § CTAB (Hexadecil trimetil bromuro de amonio) (SIGMA) 10 g

Mezclar y si es necesario calentar hasta 65°C hasta su total disolución. Llevar a un volumen final de 100 ml con agua ultrapura. Conservar a temperatura ambiente.

Solución Cloroformo/isoamílico

- § Triclorometano (Carlo Erba Reagenti) 480 ml
- § 3-metil-1-butanol (Panreac) 20 ml

Solución Fenol/cloroformo/isoamílico

§ Solución cloroformo isoamílico	250 ml
§ Fenol (Panreac) bidestilado	250 ml
§ 8-hidroxiquinoleína (Panreac)	0.25 g

Para preparar el fenol bidestilado, éste debe estar equilibrado a un pH superior a 7.8. Con esta finalidad se calienta el fenol con la 8-hidroxiquinoleína hasta que se licue, se le añade un volumen de tampón Tris-HCl 0.5 M (pH 8); se dejan separar las fases, se elimina la fase acuosa superior y se hacen lavados añadiendo un volumen de tampón Tris-HCl 0.1 M (pH 8) hasta llegar a un pH mayor a 7.8. Se conserva el fenol con 0.1 volúmenes de tampón Tris-HCl 0.1 M (pH 8) que contenga 0.2% de η -mercaptoetanol, a 4°C en una botella de vidrio oscura.

RNAsa

A 987 μ l de agua ultrapura se le añaden

§ RNAsa (Roche Diagnostics S.L.)	0.01 g
§ Solución de Tris-Cl 1 M pH 7.4 (AppliChem)	10 μ l
§ Solución NaCl 5 M (AppliChem)	3 μ l

Se mezcla hasta su total disolución y se calienta durante 15 min a 100°C. Se deja enfriar y se hacen alícuotas de 25 μ l que se mantienen a -20°C. Estas alícuotas se utilizan resuspendidas con 500 μ l de TE.

2.4.2. Extracción de DNA plasmídico

2.4.2.1. Miniextracción de DNA plasmídico

Esta técnica se basa en el protocolo de lisis alcalina (Birboim y Doly, 1979), utilizando SDS como detergente y NaOH. Se neutraliza con acetato de potasio, se desproteiniza con fenol y se precipita el DNA plasmídico con etanol.

- § Se parte de un cultivo de noche crecido en las condiciones óptimas para cada cepa.
- § Centrifugar 1.5 ml de cultivo a 12 000 rpm durante 1 a 2 min.
- § Eliminar el sobrenadante y resuspender en 100 μ l de solución I fría.
- § Añadir 200 μ l de solución II y mezclar por inversión, hasta que se obtenga una solución viscosa (por la lisis celular). Mantener 5 min en hielo.
- § Añadir 150 μ l de solución III y mezclar por inversión vigorosamente hasta que se forme un precipitado blanquecino. Mantener de 5-10 min en hielo.
- § Centrifugar 5 min a 12 000 rpm.
- § Transferir la fase acuosa a un tubo, sin arrastrar la interfase.
- § Añadir 1 volumen de fenol/cloroformo/isoamílico y mezclar hasta tener una emulsión homogénea.
- § Centrifugar durante 5 min a 12 000 rpm.

-
- § Hacer otro pase de fenol/cloroformo/isoamílico y volver a transferir la fase acuosa a otro tubo.
 - § Añadir un volumen de cloroformo/isoamílico y agitar enérgicamente.
 - § Centrifugar durante 5 min a 12 000 rpm.
 - § Transferir la fase superior acuosa a otro tubo y añadir 2 volúmenes de etanol absoluto frío, mezclar por inversión y dejar precipitando a -80°C durante 20-30 min.
 - § Centrifugar a 4°C a 12 000 rpm durante 10 min.
 - § Eliminar el sobrenadante y realizar un lavado con etanol 70% frío.
 - § Eliminar el sobrenadante y secar al vacío en el *SpeedVac* (Savant).
 - § Resuspender en 20-30 μl de tampón TE con RNAsa y dejar incubando a 37°C durante 45 min. Se conserva a -20°C .

2.4.2.2. Maxiextracción de DNA plasmídico

Cuando se requieren mayores cantidades de DNA plasmídico, se realiza una extracción desde un volumen de cultivo mayor, adaptando las proporciones de las soluciones empleadas. La extracción se puede purificar por ultracentrifugación en un gradiente de CsCl o por columna (Wizard² Promega).

- § Realizar el mismo proceso que se utilizó para realizar la miniextracción aumentando las cantidades según el volumen de cultivo, hasta añadir la solución III.
- § Centrifugar durante 15 min y recuperar la fase acuosa superior.
- § Añadir 0.6 volúmenes de 2-propanol absoluto (Panreac), mezclar por inversión y dejar 15 min a temperatura ambiente. Se formará un precipitado de color blanquecino.
- § Centrifugar, eliminar el sobrenadante y dejar que se seque el precipitado y se evapore totalmente el 2-propanol.
- § Resuspender el precipitado de DNA plasmídico en tampón TE con RNAsa, incubándolo a 37°C hasta su total disolución.

A partir de este punto el DNA puede purificarse por columna.

Purificación por columna

Este método se basa en la utilización de una resina que secuestra el DNA, el mismo que es posteriormente purificado a través de una columna *Wizard* de Promega, con un lavado con etanol al 70%. Finalmente se eluye el DNA con tampón TE caliente.

- § Repartir 500 μl de solución de DNA plasmídico en un tubo eppendorf.
- § Añadir 1 ml de tierra de diatomeas, mezclar por inversión y esperar 5 min.
- § Transferir el contenido a una jeringa, colocada sobre una columna de purificación *Wizard Minicolumn* (Promega) y pasar a través del filtro.
- § Extraer la jeringa de la columna. Volver a conectar la jeringa a la columna y pasar 2 ml de etanol 70%.

-
- § Centrifugar la columna a 12 000 rpm durante 5 min para eliminar todos los restos de etanol.
 - § Añadir de 20-50 μ l de tampón TE caliente a la columna y esperar 5 min para eluir el DNA.
 - § Centrifugar la columna dentro de un tubo eppendorf y recoger el contenido del tubo, donde estará eluido el DNA.

Soluciones

Solución I

Se prepara una solución *stock* que se mantiene a temperatura ambiente. La solución con la que se trabaja se preparará diluyendo la solución *stock* 1:1 con agua ultrapura.

A 910 ml de agua ultrapura se le añaden:

- § Solución de Tris-Cl 1 M pH 8 (AppliChem) 50 ml
- § Solución de EDTA 0.5 M pH 8 (14.6125 g/100 ml) (AMRESCO) 40 ml

Se mezclan los componentes y se esteriliza en el autoclave (121°C 15 min)

Solución II

A 44 ml de agua ultrapura se le añaden:

- § SDS 10% (Merck) 5 ml
- § NaOH 10 N (40 g/100 ml) (Panreac) 1 ml

Solución III

A 200 ml de agua ultrapura se le añaden:

- § Acetato potásico 5 M (294.4 g/600 ml) (Panreac) 600 ml
- § Ácido acético glacial (Panreac) 115 ml

Mezclar los componentes y ajustar el pH a 4.8. Llevar a un volumen final de 1 l con agua ultrapura.

Tierra de diatomeas

- § Tierra de diatomeas (SIGMA) 3.5 g
- § Hidrocloruro de guanidina (SIGMA) 100 g
- § Solución de Tris-Cl 1 M pH 7.4 (AppliChem) 8.75 ml
- § Solución de EDTA 0.5 M pH 8 (14.6125 g/ 100 ml)(AMRESCO) 14 ml

- § Diluir en 50 ml de agua ultrapura la tierra de diatomeas y dejar precipitando por lo menos 3 h. Una vez haya sedimentado completamente la tierra de diatomeas, eliminar el sobrenadante.

-
- § Añadir a 50 ml de agua ultrapura, el hidrocloreuro de guanidina, la solución de EDTA y la solución de Tris-Cl, disolver completamente y llevar a un volumen final de 175 ml con agua ultrapura.
 - § Añadir esta solución al sedimento de la tierra de diatomeas y mezclar.
 - § Guardar en una botella protegida de la luz a temperatura ambiente.
 - § Cuando se utilice la resina, agitarla vigorosamente, para que esté lo más homogénea posible.

2.4.3. Digestión con enzimas de restricción

En este trabajo se han utilizado las enzimas y sus respectivos tampones, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Roche Diagnostics S.L.).

- § Añadir en un tubo eppendorf un volumen determinado de una solución de DNA, el tampón de restricción (10 x) en una relación 1:10 con el volumen final de la reacción de digestión y agua ultrapura hasta completar el volumen final.
- § Añadir 0.2 a 0.5 unidades de enzima de restricción.
- § Mezclar bien y dar un pulso en la microcentrífuga. Incubar a la temperatura adecuada de 1 a 12 horas.

Consideraciones:

- § Si después del tiempo de incubación queda DNA por cortar, se puede añadir más enzima o continuar la incubación un tiempo adicional.
- § Se pueden ajustar las condiciones a grandes volúmenes de digestión, manteniendo las proporciones de los diferentes componentes.
- § Para realizar digestiones con más de una enzima, se tiene que tener en cuenta los tampones para cada endonucleasa y en caso de que no coincida el mismo tampón para las dos enzimas, se debe realizar, cuando sea posible, la digestión con el tampón que tenga menor concentración salina. Después de esta primera reacción, se añade el otro tampón y la segunda enzima, manteniendo siempre las proporciones.
- § El DNA cromosómico es más difícil de digerir, ya que puede tener mayor cantidad de impurezas y se tienen que utilizar cantidades de enzima con relación al tamaño y cantidad de DNA.

2.4.4. Electroforesis de DNA

2.4.4.1. Preparación de geles de agarosa

- § Pesar la cantidad de agarosa en polvo y añadir el volumen de tampón de electroforesis (1 x TAE). Pueden utilizarse dos tipos de agarosa diferente según el tamaño de los fragmentos de DNA y su utilización posterior. En caso de que se trate de fragmentos de pequeño tamaño que vayan a ser purificados, lo más adecuado es utilizar agarosa de

bajo punto de fusión (LM-sieve PRONADISA). Para el resto de aplicaciones se emplea normalmente agarosa para biología molecular (Roche Diagnostics S.L.). Las concentraciones recomendadas de agarosa según el rango de resolución de los fragmentos lineales de DNA (kb) son las siguientes:

% Agarosa	kb de fragmentos de DNA
0.3	60 - 5
0.5	30 - 1
0.7	12 - 0.8
1.0	10 - 0.5
1.2	7 - 0.4
1.5	3 - 0.2
2.0	3 - 0.1

- § Calentar hasta fundir la agarosa, evitando que llegue a la ebullición.
- § Atemperar la solución a 50°C aproximadamente y añadir bromuro de etidio (Roche Diagnostics S.L.) a una concentración final de 0.5 μ g/ml (a partir de una solución concentrada a 10 mg/ml).
- § Verter la solución en el soporte del gel, con los extremos sellados. Colocar uno o más peines de acuerdo al DNA que se desee cargar y esperar a que se solidifique.
- § Quitar el/los peines y colocar el soporte en una cubeta de electroforesis llena de tampón 1 x TAE.
- § Cargar las muestras de DNA en los pozos del gel. Para preparar las muestras se utiliza solución transportadora 6 x en una relación 1:5 con respecto al volumen final de DNA.
- § Aplicar un voltaje constante entre 20 y 80 voltios. El tiempo de la electroforesis dependerá del tamaño de los fragmentos de DNA que se quieran visualizar así como el voltaje aplicado.
- § Observar el gel con un transiluminador de luz ultravioleta (302 nm).
- § Una vez acabada la electroforesis, puede fotografiarse el gel, utilizando una cámara polaroid o mediante un digitalizador de imágenes.

Soluciones

Tampón 50 x TAE

Añadir a 750 ml de agua ultrapura:

- § Trizma Base (SIGMA) 242 g
- § Solución de EDTA 0.5 M pH 8 (14.6125 g/100 ml) (AMRESCO) 100 ml
- § Ácido acético glacial (Panreac) 57 ml

Mezclar hasta su completa disolución y llevar a un volumen final de 1 l con agua ultrapura.

Solución transportadora 6 x

Añadir a 90 ml de agua ultrapura

§ Glicerol (Scahrlau)	30 g
§ Xilencianol (Clontech)	0.25 g
§ Azul de bromofenol (Panreac)	0.25 g
§ Solución de EDTA 0.5 M pH 8 (14.6125 g/100 ml) (AMRESCO)	2 ml

Disolver el glicerol y los colorantes, añadir la solución de EDTA y esterilizarlo en el autoclave (121°C 15 min).

2.4.4.2. Marcadores de peso molecular

§ Los marcadores de peso molecular (kb) utilizados en este trabajo han sido:

ς γ <i>Hind</i> III	23.13, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 0.564, 0.125
ς γ <i>Bst</i> EII	8.543, 7.242, 6.369, 5.687, 4.822, 4.234, 3.675, 2.323, 1.929, 1.371, 1.264, 0.702, 0.224, 0.117
λ γ <i>Hin</i> I	0.726, 0.713, 0.553, 0.500, 0.427, 0.417, 0.413, 0.311, 0.249, 0.200, .151, 0.140, 0.118, 0.100, 0.082, 0.066, 0.048, 0.042, 0.040, 0.024

2.4.4.3. Cuantificación de DNA

Existen varios métodos para cuantificar la cantidad de DNA. El método utilizado en este trabajo ha sido el de fluorescencia en geles de agarosa, el cual se basa en que la intensidad de la fluorescencia debida al agente intercalante (bromuro de etidio) es proporcional a la concentración de DNA. El método consiste en cargar diferentes diluciones de la solución de DNA en un gel de agarosa con bromuro de etidio. Paralelamente se carga un patrón de concentración conocida y se hace una comparación con la muestra. No es un método muy exacto, pero puede utilizarse rutinariamente.

2.4.5. Clonación en vectores plasmídicos

2.4.5.1. Purificación de fragmentos de DNA

Para recurerar los fragmentos de DNA (productos de PCR, fragmentos de digestiones, etc.) éstos se separan mediante electroforesis en geles de agarosa. Una vez aisladas se recortan del gel, se funden y la agarosa es retirada mediante la utilización de resinas (*Wizard PCR Preps DNA Purification Resin* (Promega) o tierra de diatomeas, según el tamaño de la banda) y columnas *Wizard*[®]. Básicamente, el DNA se une a la resina y es secuestrado en el filtro de la columna. Posteriormente el DNA es eluido del complejo que había formado con la resina con agua ultrapura caliente y recuperado por centrifugación.

-
- § Recortar la región del gel de agarosa que contiene el fragmento de DNA e introducirla en un tubo eppendorf para pesarla.
 - § Añadir de 2 a 3 volúmenes de solución de NaI 6 M (Panreac).
 - § Incubar en un baño de agua a 55-65°C hasta que la agarosa esté completamente fundida.
 - § Repartir el contenido en tubos eppendorf, de manera que se tengan 500 μ l en cada tubo y añadir 1 ml de resina, dependiendo del tamaño del fragmento, mezclar por inversión y esperar 5 min.
 - § Transferir el contenido del eppendorf a una jeringa montada sobre una columna de purificación de DNA *Wizard^P* (Promega), colocar el émbolo y pasar por la columna.
 - § Sacar la jeringa, volver a montarla y pasar 3 ml de 2-propanol (Panreac) al 80%, por la columna que tiene el complejo DNA-resina.
 - § Centrifugar la columna durante 5 min en un tubo eppendorf para eliminar todos los restos de 2-propanol.
 - § Añadir a la columna de 15 a 40 μ l de agua ultrapura calentada a 55°C y esperar 5 min.
 - § Centrifugar la columna en otro tubo eppendorf durante 5 min para eluir el DNA.

2.4.5.2. Preparación del vector y del inserto

El vector que se desee utilizar será digerido previamente por una o más enzimas de restricción. Para evitar posibles recircularizaciones del mismo antes de realizar la ligación, puede defosforilarse para eliminar los grupos fosfato del extremo 5'.

Dependiendo de la compatibilidad de las dianas entre el vector y el inserto, puede ser necesario rellenar los extremos del inserto, del vector o de ambos.

Defosforilación del producto de una restricción

- § Añadir en un tubo eppendorf 100 μ l de producto de restricción de DNA, 20 μ l de tampón de fosfatasa alcalina (10 x) (Roche Diagnostics S.L.), 80 μ l de agua ultrapura y 1 μ l de fosfatasa alcalina (1 unidad/ μ l) (Roche Diagnostics S.L.).
- § Mezclar bien y dar un pulso en la microcentrífuga. Incubar a 37°C durante 30 min.
- § Añadir 1 μ l de enzima e incubar a 37°C durante 30 min adicionales.
- § Detener la reacción, incubando durante 10 min a 70°C.
- § Precipitar el DNA

Rellenado de extremos

Mediante la aplicación de esta técnica, se pretende conseguir fragmentos de DNA con extremos romos.

- § Añadir el volumen de DNA en solución, 20 μ l de tampón de DNA polimerasa del T4 (5 x) (Roche Diagnostics S.L.), 20 μ l de la mezcla de dNTPS (5 x) (Roche Diagnostics S.L.), 5 μ l de DNA polimerasa del T4 (1 unidad/ μ l) (Roche Diagnostics S.L.) y la cantidad necesaria de agua ultrapura para llegar a un volumen final de 100 μ l.

-
- § Incubar a 37°C durante 15 min.
 - § Inactivar la reacción incubándola 10 min a 70°C.
 - § Precipitar el DNA

Precipitación de DNA

Este protocolo permite obtener DNA purificado, después de que éste haya sido defosforilado o sus extremos rellenados.

- § Llevar el volumen de la reacción a 400 μ l con agua ultrapura.
- § Realizar un lavado con un volumen de fenol/cloroformo/isoamílico. Mezclar bien y centrifugar durante 5 min.
- § Recuperar la fase acuosa y añadir un volumen de cloroformo/isoamílico. Mezclar bien y centrifugar durante 3 min.
- § Recuperar la fase acuosa y añadir 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M (Merck).
- § Dejar precipitando a -80°C de 1 a 12 h.
- § Centrifugar a 4°C, eliminar el sobrenadante y lavar con 1 ml de etanol 70%.
 - § Centrifugar 10 min a 4°C y secar el sedimento usando *DNA SpeedVac* (Savant).
- § Resuspender el DNA en 20-30 μ l de TE.

Este protocolo está adaptado a un volumen final de 100 μ l, rellenando 5 μ g de DNA en disolución, pero estas cantidades pueden ser modificadas para otros volúmenes, manteniendo siempre las proporciones.

2.4.5.3. Reacción de ligación

Las diferentes reacciones de ligación se realizan entre un vector plasmídico linearizado y un fragmento de DNA. Se utiliza la enzima DNA ligasa del T4 (Promega), capaz de catalizar la formación de uniones fosfodiéster entre los extremos terminales 5'-fosfato y 3'-hidroxil en DNA de doble cadena. Permite la unión de fragmentos de restricción que tengan extremos compatibles. La reacción depende de la concentración relativa de extremos de vector y de inserto. Cuando se trata de una reacción entre fragmentos con extremos cohesivos, la relación de extremos vector-inserto será 1:2, mientras que si son extremos romos esta será 1:1.

Para calcular las cantidades de vector e inserto se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{ng de inserto} = [(\text{ng de vector} \times \text{kb de inserto}) / \text{kb de vector}] \times \text{relación inserto/vector}$$

Procedimiento:

- § Mezclar en un tubo eppendorf 2.5 μ l de tampón de ligasa 2 x (Promega), el volumen de vector y de inserto de manera que se tenga la relación adecuada, 0.5 μ l de DNA ligasa del fago T4 (Promega) y la cantidad de agua ultrapura hasta obtener un volumen final de 5 μ l.
- § Incubar la mezcla durante 2 h o más a temperatura ambiente.
- § Inactivar la reacción, incubándola durante 10 min a 70°C.

Consideraciones:

- § Ligación de fragmentos de PCR. Para clonar productos de PCR se utiliza el vector pGEM-T⁺ de Promega. Dicho vector está cortado con la enzima *EcoRV* y contiene timidina en ambos extremos terminales 3'. Esto mejora la eficiencia de ligación de un producto de PCR en el plásmido, previniendo la recircularización del vector y además es compatible con muchos productos de PCR cuando se amplifican utilizando la *Taq* polimerasa que añaden una deoxiadenuina a su extremo 3'. Este vector además contiene los promotores del T7 y de la RNA polimerasa del SP6 flanqueando el MCS (*Multiple Cloning Site*) dentro de la región codificante ζ -peptídica de la enzima η -galactosidasa. Al insertar un fragmento, la región ζ -peptídica se inactiva, de manera que los clones recombinantes pueden identificarse directamente utilizando placas selectivas que contengan X-gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil- η -D-galactopiranosido) (Apollo). Contiene además las secuencias dianas de los oligonucleótidos universales *Direct* y *Reverse* que serán utilizados para amplificar los fragmentos, los cuales pueden ser posteriormente secuenciados mediante el método dideoxi (Sanger *et al.*, 1977) en un secuenciador ALFexpress (Amersham Pharmacia Biotech).

2.4.6. Amplificación de DNA

2.4.6.1. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

El protocolo habitual utilizado para un volumen final de 25 μ l de reacción de PCR es el siguiente:

- § Se utilizará todo el material previamente irradiado con luz ultravioleta en una cámara de flujo vertical para PCR (FLV60 Euro Aire) y mantenido en hielo.
- § Mezclar en un tubo de 0.5 ml de capacidad:
 - 4 2.5 μ l de tampón de PCR 10 x (*Expand High Fidelity*) (Roche Diagnostics S.L.)
 - 4 2.5 μ l de mezcla de dNTPs (2 mM c/dNTP) (Roche Diagnostics S.L.)
 - 4 1 μ l de cada uno de los oligonucleótidos (10 pmol/ μ l)
 - 4 0.2 μ l de la enzima (3.5 unidades/ μ l) (*Expand High Fidelity*) (Roche Diagnostics S.L.)
 - 4 Agua ultrapura hasta llegar a un volumen final de 25 μ l.

-
- § Añadir 200 ng de DNA molde, mezclar bien y dar un pulso en la microcentrifuga.
 - § Programar el termociclador según la reacción de PCR que se quiera realizar.
 - § Colocar los tubos en el termociclador y poner en marcha el programa.

2.4.6.2. Secuenciación

La secuenciación de los fragmentos de DNA se llevó a cabo según el método de Sanger (1977) modificado usando el *ALFexpress™DNA Sequencer* (Amersham Pharmacia Biotech) como secuenciador y el kit *fmoFDNA Sequencing System* (Promega). Para el marcaje de fragmentos se utilizaron como cebadores oligonucleótidos marcados en su extremo 5' con Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech).

Las PCR de marcaje con el kit, se realizaron según las instrucciones del fabricante.

2.5. Métodos de manipulación de RNA

2.5.1. Extracción de RNA

La extracción de RNA bacteriano implica un primer paso de lisis celular, seguido de la separación del RNA de las proteínas y de DNA. Después se realizará una extracción orgánica y finalmente una precipitación con alcoholes o sales. Durante todo el proceso el material debe estar limpio de RNAsas que pueden degradar el RNA que queremos extraer. Por este motivo se debe extremar la precaución y utilizar siempre guantes, material lavado con agua con el inhibidor de la actividad RNAsa DEPC (pirocarbonato dietílico) y material autoclavado y tratado en un horno a 180°C durante 8 horas.

2.5.1.1. Extracción de RNA con Tri Reagent[®] LS

- § Centrifugar los 100 ml del cultivo (procedentes de la inducción con mitomicina C, punto 2.2.2.) durante 10 min a 8000 rpm.
- § Añadir 1 ml de Tri Reagent[®] LS (MRC).
- § Resuspender la mezcla con vórtex y pipeta.
- § Pasar la mezcla a un nuevo tubo y dejar reposar 5 min a temperatura ambiente.
- § Centrifugar durante 10 min a 13000 rpm a 4°C.
- § Recuperar fase acuosa superior y añadir 200 μ l de cloroformo (Carlo Erba), agitar vigorosamente durante 15 s y dejar reposar durante 15 min a temperatura ambiente.
- § Centrifugar durante 15 s a 13000 rpm a 4°C.
- § Recuperar la fase acuosa superior, añadir 500 μ l de Isopropanol (Panreac) y dejar reposar durante 10 min a temperatura ambiente.
- § Eliminar el sobrenadante y lavar con etanol 70% frío. Centrifugar durante 5 min a 12000 rpm a 4°C. Eliminar el sobrenadante y secar al vacío en el equipo *DNA SpeedVac* (Savant).
- § Resuspender el sedimento en 180 μ l de agua ultrapura tratada con DEPC.

Tratamiento con DNAsa

- § Añadir 20 μ l de tampón de DNAsa 10 x y 1 μ l de DNAsa [*RNase-free DNase I* (Roche Diagnostics S.L.)] e incubar 20 min a 37°C.
- § Añadir 200 μ l de agua ultrapura tratada con DEPC.
- § Añadir 1 volumen de fenol pH 7. Agitar por inversión, centrifugar 5 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente y recuperar la fase acuosa superior.
- § Añadir 1 volumen de fenol/cloroformo/isoamílico. Agitar por inversión, centrifugar 5 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente y recuperar la fase acuosa superior.
- § Añadir 1 volumen de cloroformo/isoamílico. Agitar por inversión, centrifugar 5 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente y recuperar la fase acuosa superior.
- § Añadir 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5.3) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Mezclar por inversión y dejar precipitando a -80°C durante 30-60 min.
- § Centrifugar 10 min a 12 000 rpm a 4°C. Eliminar el sobrenadante y lavar con etanol 70% frío. Centrifugar durante 5 min a 12 000 rpm a 4°C. Eliminar el sobrenadante y secar al vacío en el equipo *DNA SpeedVac* (Savant).
- § Resuspender el sedimento en 30-50 μ l de agua ultrapura tratada con DEPC. Conservar a -20°C.

Cuantificación espectrofotométrica

- § Hacer una dilución del RNA 1/100 en agua ultrapura tratada con DEPC y medir a DO 260 nm utilizando un espectrofotómetro (en el presente trabajo *Gene Quant* (Amersham Biosciences)) para determinar la concentración de RNA. Además, mediciones a DO 280 y 230 nm nos proporcionarán parámetros que nos indicarán la pureza de la muestra:

$$DO_{260 \text{ nm}}/DO_{280 \text{ nm}} \approx 1.8$$

$$DO_{260 \text{ nm}}/DO_{230 \text{ nm}} > 2$$

- § Para comprobar que no hay una contaminación de DNA, se realiza una PCR con oligonucleótidos propios del microorganismo del que se ha extraído el RNA.

En caso de que se produzca la amplificación del fragmento, se volverá a someter al RNA a tratamiento con DNAsa, iniciando de nuevo todo el protocolo.

Soluciones

Fenol ácido

- § Disolver el fenol (Panreac) a 65°C.
- § Añadir 1 volumen de agua ultrapura tratada con DEPC. Mezclar hasta que esté homogéneo.
- § Dejar separar las dos fases.
- § Añadir 0.1 g de 8-hidroxiquinoleína (Panreac) por cada 100 ml de fenol.

-
- § Guardar protegido de la luz a -20°C .

Fenol pH 7

Para preparar el fenol pH 7 debe equilibrarse el pH. Para ello se calienta el fenol (Panreac) con la 8-hidroxiquinoleína al 0.1% (Panreac) hasta que se licue, se le añade un volumen de tampón Tris-HCl 0.5 M (pH 8); se dejan separar las fases, se elimina la fase acuosa superior y se hacen lavados añadiendo un volumen de tampón Tris HCl 0.1 M (pH 8) hasta llegar a 7. Se conserva el fenol con 0.1 volúmenes de tampón Tris HCl 0.1 M (pH 7) que contenga 0.2% de η -mercaptoetanol, a 4°C y protegido de la luz.

Solución Fenol/cloroformo/isoamílico

§ Fenol pH 7 (Panreac)	500 ml
§ Triclorometano (Carlo Erba Reagenti)	480 ml
§ 3-metil-1-butanol (Panreac))	20 ml

Acetato sódico 3 M pH 5.3

A 60 ml de agua ultrapura tratada con DEPC se le añaden:

§ Acetato sódico (Merck)	24.6 g
--------------------------	--------

Mezclar hasta su disolución, ajustar el pH a 5.3 y llevar a un volumen final de 100 ml.

Tampón DNAsa I (10 x)

A 5 ml de agua ultrapura tratada con DEPC se le añaden:

§ MgCl_2 (Merck)	0.057 g
§ Trizma HCl (SIGMA)	0.630 g

Mezclar los componentes y llevar a un volumen final de 10 ml con agua ultrapura tratada con DEPC.

Agua ultrapura tratada con DEPC (Sigma)

Preparar una solución de agua ultrapura con DEPC al 0.1%. Incubarse en agitación a 37°C durante 20 min y autoclavarlo dos veces para destruir el inhibidor de RNAsa. Este compuesto es tóxico y carcinogénico, por lo que su manipulación ha de llevarse a cabo con especial cuidado.

2.5.1.2. Extracción de RNA utilizando el *RNeasy²Mini Kit* (QUIAGEN)

El kit de extracción de RNA de QUIAGEN, permite la extracción partiendo de pequeñas cantidades de material. Se fundamenta en las propiedades de unión selectivas del RNA a una membrana de silica-gel en un medio tamponado con un alto contenido salino. Primero, se realiza un paso de lisis y homogenización en presencia de un tampón altamente

desnaturalizante (GITC Guanidin-isotiocianato), que inactiva las RNAsas. Se añade etanol para mejorar las condiciones de unión y, finalmente, se pasa la muestra por una mini-columna donde el RNA se une a la membrana y los contaminantes pueden ser eliminados por lavado. Al final se obtiene RNA de alta calidad eluido en agua libre de RNAsas.

En este estudio se utilizó este tipo de extracción, siguiendo las instrucciones del fabricante, y al final del protocolo se realizó un tratamiento para eliminar los posibles restos de DNA, siguiendo el protocolo antes descrito.

Soluciones

Las únicas soluciones que no están provistas por el kit de extracción son:

- § Etanol absoluto (Carlo Erba)
- § Solución de lisozima (Roche Diagnostics S.L.) 100 mg/ml en agua ultrapura tratada con DEPC.

2.5.2. RT-PCR

Esta técnica se utiliza para detectar la presencia de fragmentos de RNA para los que se han diseñado previamente oligonucleótidos. Es un método muy sensible, que combina una Transcripción Inversa con una Reacción de Polimerasa en Cadena (RT-PCR). En este estudio se ha utilizado el *Titan One Tube RT-PCR System* de Roche Diagnostics S.L., que permite la realización de ambas reacciones en un solo paso. Para realizar las RT-PCR en este estudio se siguieron las instrucciones y recomendaciones de Roche Diagnostics S.L. con oligonucleótidos internos de la región codificante de diferentes genes.

2.5.3. RT-PCR en tiempo real

Este método se utiliza para cuantificar la expresión de genes por análisis de RNA. En este estudio se ha utilizado el kit para RT-PCR en un paso *LightCycler-RNA Master SYBR Green I* de Roche Diagnostics S.L., usando el *LightCycler Instrument* (Roche Diagnostics S.L.).

El *LightCycler-RNA Master SYBR Green I* realiza una amplificación a alta temperatura, utilizando la *Tth* DNA polimerasa combinada con aptámeros. Esta polimerasa es termoestable, tiene actividad de transcriptasa inversa dependiente de RNA y DNA polimerasa dependiente del DNA, por lo que permite la realización de la RT y la PCR en una sola reacción. Los aptámeros son oligonucleótidos que se unen al centro activo de la polimerasa y no permiten la unión de otros ácidos nucleicos a temperaturas inferiores a la óptima para la *Tth* polimerasa. Cuando se aumenta la temperatura, los aptámeros son liberados por la enzima y se puede iniciar la transcripción inversa y la subsiguiente amplificación.

El *SYBR Green I* es un fluoróforo específico para DNA de doble cadena y está incluido en la mezcla de reacción del kit.

El equipo *LightCycler* permite cuantificar y analizar los productos de la PCR, monitorizando la fluorescencia, a una longitud de onda de 521 nm, durante cada ciclo de la

amplificación. Es un termociclador rápido combinado con un fluorímetro de microvolumen, que permite cambios de temperatura veloces, entre los diferentes ciclos.

Con los datos que se obtienen *on-line* se puede hacer un análisis paso a paso de la amplificación, con lo que se podrá cuantificar el RNA que nos interesa. Además se puede determinar el punto de fusión de los fragmentos amplificados y descartar amplificaciones inespecíficas.

Los datos obtenidos se analizan en un ordenador con el *Light Cycler Software version 3*, de Roche Diagnostics S.L. utilizando un sistema operativo Windows NT.

Todos los protocolos que se utilizaron en este trabajo son los descritos por Roche Diagnostics S.L.

2.6. Métodos de manipulación de proteínas

2.6.1. Sobreexpresión y purificación de proteínas con pGEX-4T-1² (Amersham Biosciences)

La expresión de proteínas recombinantes fusionadas a la Glutación S-transferasa (GST) permite una purificación proteínica rápida y fácil. El DNA que codifica esta proteína de 25 kDa se coloca en el mismo marco de lectura que gen codificante de la proteína deseada por lo que, después de la sobreexpresión, la proteína se encuentra fusionada al dominio GST. Este dominio se une fuertemente al glutatión, característica esencial para su purificación, y es incubada con bolitas de sefarosa con glutatión inmovilizado en su superficie. De esta manera la fusión queda inmovilizada en la superficie de las bolitas y se separa el resto de proteínas. La expresión de la construcción se encuentra bajo el control del promotor *tac* inducible por isopropil η -D tiogalactósido (IPTG). Además todos los vectores pGEX poseen un gen *lacI^q* interno que se une a la región operadora del promotor *tac*, previniendo así la expresión de la proteína quimérica hasta el momento de la inducción con IPTG. Una vez sobreexpresada la proteína se puede utilizar fusionada a la GST o se puede liberar mediante una digestión con trombina, ya que existe una diana situada entre ambos genes.

El protocolo de purificación sería el siguiente:

- § Amplificar mediante PCR el fragmento de DNA que codifica la proteína que se desea sobreexpresar, utilizando oligonucleótidos que incorporen las dianas de restricción *EcoRI* y *Sall* para su posterior clonación.
- § Clonar el inserto en el vector pGEMT² mediante ligación y electrotransformar en células competentes de DH5 ζ . Comprobar los plásmidos obtenidos mediante restricción y secuenciación del fragmento clonado.
- § Extraer el fragmento clonado en pGEMT² mediante digestión con los enzimas de restricción *EcoRI-Sall* y clonarlo en el vector pGEX-4T-1.
- § Una vez obtenido el plásmido, transformarlo en células BL21CodonPlus² mediante transformación con cloruro cálcico.
- § Inducir la producción de la proteína en un cultivo:

Previamente ya se ha comprobado a pequeña escala que la cepa con la que se trabaja sobreexpresa nuestra proteína. Para esto se hacen una resiembra en 20 ml de cultivo a partir del cultivo de noche y, una vez llegados a una DO_{550nm} de 0.8, se divide en dos y se añade IPTG solamente a uno de los dos cultivos. Tras 3 h más de incubación, se centrifugan ambos cultivos y se extraen las proteínas totales de una muestra de 1,5 ml de cada uno mediante congelación/descongelación a $-80^{\circ}C$. El extracto obtenido se visualiza en un gel de electroforesis de proteínas (punto 2.6.2.) y, una vez comprobado que sobreexpresa el cultivo tratado con IPTG, se procede a la inducción a gran escala:

- Preparar un cultivo de noche de los clones BL21/pGEX-4T-1/inserto en 10 ml de medio LB con ampicilina (50 σ g/ml) e incubar con una agitación constante de 110 rpm a $37^{\circ}C$.
- Realizar una resiembra 1:100 en 1 L de medio LB con ampicilina (50 σ g/ml) e incubar el cultivo con una agitación de 110 rpm a $37^{\circ}C$ hasta alcanzar una DO_{550nm} de 0.8.
- Añadir 1 ml de IPTG 1 M.
- Incubar en las mismas condiciones durante 3 h.

§ Extraer y purificar la proteína sobreexpresada:

- Centrifugar el cultivo durante 10 min a 10 000 rpm a $4^{\circ}C$ en 4 tubos de polipropileno de 250 ml.
- Resuspender las células en 30 ml de PBS frío con inhibidores de proteasas.
- Sonicar las bacterias siempre con el tubo en hielo.
- Agregar 2ml de 20% Tritón X-100 (Roche Diagnostics) e incubar 30 min a $4^{\circ}C$ con agitación.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 20 min a $4^{\circ}C$.
- Recoger el sobrenadante y añadir 300 σ l de bolitas con sefarosa-glutati3n (Amersham) tratadas previamente de la siguiente manera:
 - Lavar 1 ml de bolitas sefarosa-glutati3n con 10 ml de PBS frío.
 - Centrifugar a 1000 rpm durante 5 min y descartar sobrenadante.
 - Repetir el proceso, pero no descartar el sobrenadante completamente. Dejar 300 σ l de PBS y mezclar.
- Incubar durante 2 h a $4^{\circ}C$ con agiti3n.
- Centrifugar durante 1 min a 13000 rpm y descartar el sobrenadante.
- Lavar las bolitas con 10 ml de 1% Trit3n X-100 diluido en PBS (2 veces) y con 10 ml de PBS otras 3 veces.
- En la 3ltima centrifugaci3n, descartar el sobrenadante dejando unos 700 σ l de volumen final y pasarlo a un tubo eppendorf.
- Guardar 10 σ l sin cortar, y digerir el resto con trombina (Amersham Biosciences): 700 σ l de bolitas+prote3nas+GST m3s 25 unidades de trombina (25 σ l).
- Incubar toda la noche a temperatura ambiente con agiti3n.
- Centrifugar 1 min a 10000rpm y recuperar el sobrenadante.

PBS 1 x

Diluir PBS 10 x con H₂O estéril. Almacenar a 4°C. En el caso en el que se necesite añadir inhibidor de proteasas, se prepara de la siguiente manera:

- § PBS 1 x 10ml
 - § Complete Mini (Roche Diagnostics) 2 pastillas
- Disolver con el vórtex y almacenar a 4°C.

PBS 10 x

Añadir a 950 ml de agua ultrapura:

- § NaCl 80 g
- § KCl 2 g
- § Na₂HPO₄·7H₂O 26.8 g
- § KH₂PO₄ 2.4 g

Ajustar el pH a 7.4 y rellenar hasta alcanzar un volumen final de 1 L. Autoclavar y almacenar a 4°C.

IPTG 1 M

A 10 ml de agua ultrapura se le añaden:

- § IPTG (isopropil η -D-tiogalactopiranosido) (Roche Diagnostics S.L.) 2.38 g

Se mezcla hasta que esté completamente disuelto y se esteriliza por filtración. Se mantiene a -20°C.

2.6.2. Electroforesis de proteínas

En este trabajo se realizaron electroforesis de proteínas en minigeles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida (15% de acrilamida), (Sambrook *et al.*,1989). El aparato de electroforesis utilizado fue *Hoefler MINIVE Complete (Vertical electrophoresis system* Amersham Biosciences), la fuente de electroforesis APELEX ST304 (*Electrophoresis power supply*), y los vidrios, soportes, peines, etc. fueron de Amersham Pharmacia.

- § Preparar el aparato de electroforesis, el cual debe estar perfectamente limpio.
- § Preparar los vidrios con el soporte en los que se hará el gel.
- § Preparar el gel de proteínas, realizando dos mezclas por separado:
 - Mezcla del gel compresor 4% (volumen final 6 ml):
 - 30% *Acrylamide/Bis solution* 37.5:1 (Biorad) 0.78 ml
 - Tampón compresor 4 x 1.5 ml
 - APS (*Ammonium persulphate*) 10% (AMRESCO) 30 μ l
 - Temed (AMRESCO) 6 μ l
 - Agua ultrapura 3.66 ml
 - Mezcla del gel separador 15% (volumen final 15 ml):
 - 30% *Acrylamide/Bis solution* 37.5:1(Biorad) 7.5 ml
 - Tampón separador 4 x 3.75 ml

- APS (<i>Ammonium persulphate</i>) 10%(AMRESCO)	50 μ l
- Temed (AMRESCO)	10 μ l
- Agua ultrapura	3.75 ml

- § Transferir la mezcla de gel separador al soporte de vidrio hasta llenar aproximadamente las $\frac{3}{4}$ partes del mismo. Poner algunas gotas de SDS al 1% en la superficie y dejar polimerizar aproximadamente 30 min.
- § Transferir la mezcla del gel compresor al soporte con el gel separador ya polimerizado y poner el peine en la parte superior. Dejar que polimerice durante 30 min.
- § Preparar las muestras de proteínas que se van a cargar y los marcadores de peso molecular. Las muestras y el marcador de peso molecular (*SDS-PAGE Molecular Weight Standard Low Range* BIO-RAD) (0.25 μ l/10 μ l tampón transportador) se cargan utilizando el tampón transportador Laemmli 4 x y se preparan según el volumen de muestra que se utilice, diluyendo 1:4. Generalmente el volumen de carga es de 15 o 20 μ l.
- § Desnaturalizar las muestras durante 5 min a 95°C.
- § Sacar el peine y colocar el soporte con el gel en la cubeta de electroforesis y el tampón de electroforesis TGS 1 x.
- § La electroforesis se realiza a 20 mA, 200 V.
- § Una vez finalizada la electroforesis, se saca el gel del soporte.
- § Colocar el gel en la solución de tinción y mantenerlo en agitación lenta durante 10 min.
- § Descartar la solución de tinción y desteñir el gel con solución de ácido acético glacial 10%.
- § Cambiar la solución cuando esté muy coloreada.
- § Detener el proceso cuando se visualicen bien las bandas de proteínas en el gel.

El marcador de peso molecular *SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Low Range* BIO-RAD permite ver las siguientes bandas:

Proteínas	Peso molecular (Da)
Fosforilasa b	97 400
Albúmina de suero	66 200
Ovoalbúmina	45 000
Anhidrasa carbónica	31 000
Inhibidor de tripsina	21 500
Lisozima	14 400

Soluciones

Tampón separador 4 x

A 300 ml de agua ultrapura se le añaden:

- § Tris Base (SIGMA) 91 g

Mezclar hasta que se diluya completamente y ajustar el pH con HCl 37% (Panreac) hasta llegar a 8.8. Añadir 2 g de SDS (Merck) y mezclar. Llevar a un volumen final de 500 ml con agua ultrapura. Esterilizar por filtración y guardar a 4°C.

Tampón compresor 4 x

A 40 ml de agua ultrapura se le añaden:

§ Tris Base (SIGMA) 6.05 g

Mezclar hasta que se diluya completamente y ajustar el pH con HCl 37% (Panreac) hasta llegar a 6.8. Añadir 0.4 g de SDS (Merck) y mezclar. Llevar a un volumen final de 100 ml con agua ultrapura. Esterilizar por filtración y guardar a 4°C.

Tampón de electroforesis TGS 1 x

Diluir 1:10 el Tampón TGS 10 x (Tris Glicina SDS, pH 8.3 de BIO-RAD) con agua ultrapura.

Tampón transportador Laemmli 4 x

§ Tampón compresor 4 x 25 ml

§ Glicerol (Scharlau) 20 ml

§ SDS (Merck) 4 g

§ Azul de bromofenol (Panreac) 0.2 g

Llevar a un volumen final de 50 ml con agua ultrapura. Hacer alícuotas de 900 μ l del tampón y conservarlas a 4°C. En el momento de su uso, se añaden 36 μ l de 2-mercaptoetanol (Merck) y 64 μ l de solución DTT (6.25 M) (9.64 g/10 ml agua ultrapura) (Roche Diagnostics S.L.).

Solución de tinción

A 180 ml de agua ultrapura se le añaden:

§ *Comassie Brilliant Blue* (BIO-RAD) 0.5 g

§ Ácido acético glacial (Panreac) 50 ml

§ Metanol (Panreac) 250 ml

Mezclar los componentes y llevar a un volumen final de 500 ml con agua ultrapura.

Solución ácido acético glacial 10% (Solución para desteñir)

A 450 ml de agua ultrapura se le añaden:

§ Ácido acético glacial (Panreac) 50 ml

Mezclar hasta tener una solución completamente homogénea.

2.6.3. Cuantificación de proteínas

El método Folin-fenol o de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) está basado en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{2+} y los nitrógenos de los enlaces peptídicos llamada reacción de Biuret. Para resaltar el color formado en esta reacción y aumentar la sensibilidad, se hace reaccionar posteriormente con el reactivo de Folin que al ser reducido por los residuos de aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano da un color azulado. Este color azulado es valorado por un espectrofotómetro y comparado con una curva patrón de concentraciones conocidas de proteína BSA (*Bovine Serum Albumine*, SIGMA).

- § En 10 tubos poner cantidades crecientes de BSA a 0.4 mg/ml (100, 200, 300, 400 y 500 μl) por duplicado y añadir agua ultrapura a cada uno hasta llegar a un volumen final de 500 μl . En otros dos tubos añadir 500 μl de agua ultrapura; éstos serán los blancos.
- § Preparar la muestra problema a volumen final 500 μl .
- § Añadir 500 μl de NaOH 1M a todos los tubos e incubar a 100°C durante 5 min.
- § Dejar enfriar en agua.
- § Añadir 2,5 ml de solución CTC, agitar fuertemente y dejar reposar durante 10 min a temperatura ambiente.
- § Añadir 500 μl de reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac), agitar inmediatamente y dejar reposar durante 30 min a temperatura ambiente.
- § Determinar la absorbancia A_{750} de todos los tubos. A partir de los resultados de los tubos patrón realizar una recta e interpolar el resultado de la muestra problema.

Soluciones

Solución CTC (Copper tartrate/carbonate)

- | | | |
|---|--|-------------------|
| § | Na_2CO_3 | 2,5 g |
| § | Agua ultrapura | 50 ml |
| § | Solución tartrato-sulfato de cobre | 200 μl |
| | - Sodio y potasio tartrato 4-hidrato (Panreac) | 10% |
| | - CuSO_4 | 5% |

La solución tartrato-sulfato se prepara como stock y se almacena a -20°C. En el momento de realizar el ensayo se descongela y se prepara la solución CTC.

2.6.4. Ensayo de movilidad electroforética (EMSA)

El ensayo de movilidad electroforética (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) en geles de poliacrilamida (PAGE) es un método rápido, simple y extremadamente sensible para la

detección de la unión de las proteínas a DNA. El protocolo se divide en diferentes fases que incluyen: la preparación del gel de poliacrilamida, la preparación de los fragmentos de DNA, la preparación de la mezcla de la proteína con el DNA marcado y la electroforesis en que se verá la unión. El protocolo que se utiliza es el descrito en el *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1995), con algunas modificaciones.

2.6.4.1. Marcaje de fragmentos de DNA

Los fragmentos utilizados para el ensayo se obtienen mediante amplificación por PCR utilizando uno de los oligonucleótidos marcado con digoxigenina (Roche Diagnostics S.L.). Se realiza una electroforesis con el producto de la amplificación en un gel de agarosa y después se recupera la banda de DNA, utilizando el método de columna (*Wizard* de Promega). Las bandas tendrán la marca de digoxigenina.

2.6.4.2. Reacción de unión proteína-DNA

Las mezclas de reacción de unión de la proteína al fragmento de DNA se realizan a 30°C y tendrán los siguientes componentes:

§ Agua ultrapura	12 μ l
§ Fragmento de DNA marcado (20 ng/ μ l)	1 μ l
§ Tampón de unión	4 μ l
§ DNA inespecífico (<i>Herring Testes Carrier DNA Denatured</i> BD)	2 μ l
§ Extracto de proteína (dilución adecuada)	1 μ l

Cuando se realizan ensayos de competición se añadirá a la mezcla los diferentes fragmentos específicos o inespecíficos a la concentración elegida.

La reacción se mezcla, se da un pulso en la microcentrífuga y se incuba durante 30 min a 30°C.

Soluciones

Tampón de unión

§ HEPES 1 M (4-(2-Hidroxietil)-1-piperazin-etan-sulfonácido 238.3 g/l agua ultrapura) (Roche Diagnostics S.L.)	10 ml
§ Solución Tris HCl 1 M pH 7.4 (AppliChem)	10 ml
§ Glicerol (Scharlau)	25 ml
§ Solución KCl 1 M (74.56 g/l agua ultrapura)(Panreac)	25 ml
§ Solución EDTA 0.5 M pH 8 (AppliChem)	0.2 ml
§ Agua ultrapura	30 ml

Ajustar el pH a 7.5 y guardar a 4°C.

En el momento del uso por cada 500 μ l de tampón se añaden

§ DTT 0.5 M (1,4 <i>Dithiothreitol</i> 0.0765g/ml) (Roche Diagnostics S.L.)	1 μ l
§ BSA (6 mg/ml) (<i>Bovine Serum Albumine</i>)(SIGMA)	4.16 μ l

2.6.4.3. Preparación del gel de poliacrilamida y electroforesis

Los geles de poliacrilamida para los ensayos EMSA se realizaron utilizando vidrios, soportes, espaciadores, peines y cubetas de electroforesis BIO-RAD. La fuente de electroforesis fue de *GROC Instruments* G-201. Las concentraciones de poliacrilamida a las que se trabajaron fueron del 5 o del 6% en función del tamaño de los fragmentos utilizados.

€ Preparar el aparato de electroforesis, teniendo cuidado con su limpieza.

€ Colocar los vidrios en el soporte.

€ Preparar el gel de poliacrilamida 5% (volumen final 55 ml):

- 30% <i>Acrylamide/Bis solution</i> 37.5:1 (BIO-RAD)	9.2 ml
- Tampón glicina 5 x	11 ml
- APS (<i>Ammonium persulphate</i> 10% (AMRESCO))	256 μ l
- Temed (AMRESCO)	44 μ l
- Agua ultrapura	34.8 ml

Para preparar un gel al 6% se utilizan 11 ml de acrilamida y 33 ml de agua ultrapura. Además, los geles son de uso inmediato, por lo que se preparan justo en el momento de su utilización.

§ Transferir la mezcla del gel al soporte de vidrio y colocar el peine en la parte superior. Dejar que polimerice durante aproximadamente 30 min.

§ Sacar el peine y colocar el gel en el soporte de electroforesis. Llenar la cubeta de tampón glicina 1 x y poner el soporte.

§ Hacer una precarrera, conectando la fuente a 150 V durante 15-30 min. El objetivo es homogeneizar el gel de acrilamida para evitar variaciones durante la carrera con las muestras.

§ Preparar las mezclas de reacción.

§ Cargar las reacciones en los pozos del gel.

§ Poner a correr el gel a muy baja potencia durante aproximadamente 10 min, hasta que las muestras hayan salido del pozo.

§ La electroforesis se realiza a 150 V y sin que el amperaje pase de 20 mA.

§ Tras este tiempo de electroforesis, sacar el soporte y preparar el gel para la transferencia.

Soluciones

Tampón glicina 5 x

A 500 ml de agua ultrapura se le añaden:

§ Glicina (Roche Diagnostics S.L.)	192.7 g
§ Tris Base (SIGMA)	30.28 g

§ EDTA (AMRESCO)

3.92 g

Mezclar de manera que se disuelvan todos los componentes y ajustar el pH a 8.5. Llevar a un volumen final de 1 L con agua ultrapura. Se usa como tampón de electroforesis a una concentración 1 x.

2.6.4.4. Transferencia

Antes de poder realizar el revelado y la detección de los fragmentos, éstos deben transferirse del gel de acrilamida a una membrana de biodina. El procedimiento es el siguiente:

- § Cortar una membrana de biodina cargada positivamente (*Biodyne[®] B Membrane* de PALL Gelman Laboratories) del tamaño del gel.
- § Sacar uno de los cristales del soporte del gel, de manera que quede expuesta toda la superficie del mismo.
- § Colocar la membrana sobre el gel de poliacrilamida, con cuidado, evitando la formación de burbujas de aire entre la membrana y el gel.
- § Colocar tres trozos de papel 3MM sobre la membrana.
- § Volver a colocar el cristal que se había retirado anteriormente y poner un peso encima para facilitar la transferencia del DNA desde el gel a la membrana. Dejar aproximadamente 30 min.
- § Sacar la membrana y fijar el DNA utilizando el equipo *UV Stratalinker 2400* (Stratagene).
- § Se puede guardar la membrana para su posterior revelado, manteniéndola en papel 3MM a 4°C.

2.6.4.5. Revelado y detección.

Los fragmentos de DNA utilizados en estos experimentos están marcados con digoxigenina. Para detectarlos se lleva a cabo una reacción colorimétrica, utilizando los reactivos del *DIG DNA Labeling and Detection kit Nonradiactive* de Roche Diagnostics S.L. y se sigue el protocolo descrito por el fabricante. Básicamente:

- € Equilibrar la membrana con Tampón 1 durante 1 min.
- € Bloquear la membrana con Tampón 2 durante 30-60 min con agitación lenta.
- € Preparar la solución de anticuerpo, diluyendo el anticuerpo (*Antidigoxigenin-AP Fab Fragment*) 1:5000 (2 μ l/ 10 ml Tampón 2).
- € Eliminar el Tampón 2 e incubar la membrana durante 30 min con la solución de anticuerpo. La agitación debe ser muy lenta y la membrana debe estar completamente cubierta de solución para permitir que el anticuerpo se una al DNA.
- € Eliminar la solución de anticuerpo y realizar tres lavados de 10 min con Tampón 1 con agitación rápida, esto permitirá la eliminación del anticuerpo no unido.
- € Preparar la solución colorimétrica fresca, como se describió anteriormente. Protegerla del contacto con la luz.
- € Eliminar el Tampón 1 y equilibrar la membrana durante 3-5 min con Tampón 3.

-
- ε Eliminar el Tampón 3 y cubrir la membrana con solución colorimétrica; mantenerla en la oscuridad sin agitación hasta que se desarrolle el color. Esto puede tardar entre unos minutos hasta 12-16 h.
 - ε Cuando ya se visualizan las bandas, lavar la membrana con agua destilada, para detener la reacción.
 Secar y guardar la membrana.

Soluciones

Tampón 1

A 1500 ml de agua ultrapura se le añaden:

§ NaCl (Panreac)	17.5 g
§ Ácido maléico (Merck)	23.2 g
§ NaOH (Panreac)	16.0 g

Mezclar hasta su completa disolución, ajustar el pH a 7.5, llevar a un volumen final de 2 l con agua ultrapura y esterilizar en el autoclave (121°C 15 min).

Tampón 2

A 100 ml de Tampón 1 se le añade 1 g de agente de bloqueo (producto lácteo en polvo NESTLÉ).

Tampón 3

A 1500 ml de agua ultrapura se le añaden:

§ NaCl (Panreac)	11.68 g
§ Trizma HCl (SIGMA)	1.60 g
§ MgCl ₂ ·6H ₂ O (Merck)	20.00 g
§ Tris-Base (SIGMA)	23.16 g

Disolver todos los componentes, ajustar el pH a 9.5 y llevar a un volumen final de 2 l con agua ultrapura.

Solución colorimétrica

Por cada 10 ml de Tampón 3 se añadirán:

§ Solución de NBT	45 μ l
§ Solución de BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolilfosfato)	35 μ l

Esta solución se prepara en el momento de usarla y solamente la cantidad que sea necesaria, ya que es fotosensible y no se recomienda su conservación.

NBT

Para preparar 1 ml de solución se añadirá:

§ NBT (4-Nitroblue tetrazolium chloride crystals) (Roche Diagnostics S.L.)	75 mg
§ N, N dimetilformamida (Panreac)	700 μ l

-
- § Agua ultrapura 300 μ l
Mezclar por agitación con un vórtex; la solución se puede guardar a -20°C .

BCIP

Para preparar 1 ml de solución se añadirá:

- § BCIP (*5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate 4-toluidine salt powder*)
(Roche Diagnostics S.L.) 50 mg
§ N,N-dimetilformamida (Panreac) 1 ml

Mezclar por agitación con un vórtex; la solución se puede guardar a -20°C .

2.7. Ensayo de protección frente a la DNAsal o de *footprinting*

Esta técnica permite detectar la región de unión a un fragmento de DNA de una proteína, ya que ésta protege a la dicha región y no podrá ser digerida por la DNAsal, haciendo inaccesible la porción de DNA ante cualquier enzima (Galas *et al.*, 1978). El fragmento de DNA a estudiar se marca por un extremo con fluorescencia, de modo que la digestión con DNAsal, que corta inespecíficamente el DNA, dará lugar cortes a lo largo de la secuencia del fragmento. No obstante, si existe una región protegida frente a la restricción de la DNAsal, no existirán fragmentos de ese tamaño concreto, por lo que en un gel de electroforesis vertical se observará una región sin bandas.

Los ensayos de protección frente a la DNAsal se llevaron a cabo utilizando el secuenciador *ALF* (Pharmacia Biotech) de manera similar a la descrita en trabajos precedentes (Rodríguez-García *et al.*, 1997; Patzer y Hantke, 2000).

- § Amplificar mediante PCR un fragmento de entre 100 y 200 pb. El ensayo se realiza sobre las dos cadenas de DNA, la codificante y la no codificante, por lo que se amplifican dos fragmentos, cada uno marcado en un extremo diferente. Esto se consigue utilizando los oligonucleótidos Cy-5 reverso marcado en un caso y en el otro Cy5-universal marcado (Tabla 2.2).
- § Se lleva a cabo una reacción de unión de 20 μ l con:
- Agua ultrapura
 - Fragmento de DNA marcado (100 ng)
 - Tampón de unión de *footprinting*
 - DNA inespecífico (*Herring Testes Carrier DNA* (Clontech))
(1 mg ml⁻¹).
 - Proteína (cantidad apropiada)

Esta reacción se hace a volumen final 18 μ l. Tras 20 min incubándose a 30°C se le añaden 2 μ l de glicerol para que quede a una concentración final del 5%.

- § Tras 10 min de incubación a 30°C se añaden 0.005 unidades de DNasa I (Roche).
§ Se deja actuar durante 3 min a 30°C .

- § Se para la reacción usando 180 µl de tampón Tris (1M) con EDTA 40mM, y se añaden 200 µl de agua ultrapura.
- § Fenolizar la reacción con 450 µl de fenol-cloroformo.
- § Realizar un lavado con 450 µl de cloroformo-isoamílico.
- § Precipitar el DNA con etanol y añadir 6 µl de solución STOP.
- § Cargar en un gel de electroforesis vertical análogo al utilizado para secuenciar (punto 2.4.6.2). Junto con las reacciones de *footprinting* se carga una reacción de secuenciación del DNA a estudiar (pGEM-T con el fragmento clonado) (punto 2.4.6.2).

Se comparan los fluorogramas obtenidos, es decir, los diferentes fragmentos amplificados por PCR, marcados con fluorescencia y separados según su tamaño. Comparando los fluorogramas obtenidos de la muestra de DNA con y sin proteína, se detecta una ausencia de fragmentos de restricción en la región de DNA protegida por la unión proteica. Esta zona protegida se traduce en secuencia identificándola en la secuencia del fragmento clonado en pGEM-T.

Soluciones

Tampón de unión de *footprinting* 5 x

En un volumen final de 10 ml añadir:

- | | | |
|---|-------------------|--------|
| § | Tris pH 7.4 | 50 mM |
| § | MgCl ₂ | 50 mM |
| § | CaCl ₂ | 5 mM |
| § | KCl | 500 mM |

Esta será la solución stock que debe almacenarse a 4°C. En el momento de realizar la mezcla de reacción se añade DTT M (1,4 *Dithiothreitol* 0.0765g/ml) (Roche Diagnostics S.L.) a 500 µl de tampón en stock a una concentración final de 2 mM.

Tampón de dilución de la DNAsaI

En un volumen final de 10 ml añadir:

- | | | |
|---|-----------------|-------|
| § | Tris HCl pH 7.6 | 20 mM |
| § | NaCl | 50 mM |
| § | Glicerol | 10% |

En el momento de hacer las diluciones se añade DTT M (1,4 *Dithiothreitol* 0.0765g/ml) (Roche Diagnostics S.L.) y BSA (*Bovine Serum Albumine*)(SIGMA) a unas concentraciones finales de 1mM y 10 µg/ml respectivamente.

Solución STOP

- | | | |
|---|--|-------|
| € | Formamida | 10 ml |
| € | Azul dextran 2000 (Amersham Biosciences) | 50 mg |

Disolver y repartir en tubos. Almacenar a -20°C.

2.8. Métodos biocomputacionales

2.8.1. Comparaciones genómicas y bases de datos

Las comparaciones genómicas completas de los microorganismos estudiados en el presente estudio (Tabla 2.3) fueron obtenidas de la base de datos *NCBI Genbank*. Las búsquedas manuales para asegurar la conservación de los genes del regulón LexA y para verificar genes que predeciblemente pertenecían a dicho regulón se llevaron a cabo de forma rutinaria usando el servidor TBLASTX contra la base de datos *nr* (Atschul *et al.*, 1990) o mediante búsqueda del nombre del gen en las bases de datos de *NCBI Genbank* o *TIGR CMR2*.

Tabla 2.3. Microorganismos estudiados mediante métodos biocomputacionales

Microorganismo	Número de acceso
<i>Bacillus subtilis</i> 168	AL009126
<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705	AE014295
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	BA000040
<i>Brucella melitensis</i> 16M	AE008918
<i>Brucella suis</i> 1330	AE014292
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	AE005673
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824	AE001437
<i>Clostridium perfringens</i> 13	BA000016
<i>Clostridium tetani</i> E88	AE015927
<i>Corynebacterium efficiens</i> YS-314	BA000035
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032	BA000036
<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655	U00096
<i>Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum</i> ATCC 25586	AE009951
<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	AE017180
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> IL 1403	AE005176
<i>Listeria innocua</i> CLIP 11262	AL592022
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e	AL591824
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF 303099	BA000013
<i>Mycobacterium leprae</i> TN	AL450380
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC 1551	AE000516
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	AL123456
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009	BX571963
<i>Rickettsia conorii</i> Malish 7	AE006914
<i>Rickettsia prowazekii</i> Madrid E	AJ235269
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	AL591688
<i>Staphylococcus aureus</i> Mu50	BA000017
<i>Staphylococcus aureus</i> MW2	BA000033
<i>Staphylococcus aureus</i> N315	BA000018
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	AE015929
<i>Streptococcus agalactiae</i> NEM316	AL732656
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	AE014133

<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4	AE005672
<i>Streptococcus pyogenes</i> SSI-1	BA000034
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	AL645882

2.8.2. Software generador de consensos

En los análisis biocomputacionales de la composición del regulón LexA se utilizó RCGScanner (Erill *et al.*, 2003); un programa que integra un algoritmo para la predicciónh de motivos de reconocimiento. El primer paso de dicho algoritmo consiste en una búsqueda de repeticiones directas o inversas definidas por el usuario de la forma X-n-Y, donde X y Y son secuencias conocidas o estimadas *a priori* y n es una secuencia nucleotídica variable. El programa escanea la secuencia de DNA buscando el motivo X-n-Y y permitiendo hasta un *mismatch* (un cambio) en cualquiera de ambas secuencias X o Y. Para reducir el número de falsos positivos, tras localizar un motivo de unión el programa escanea las regiones adyacentes y almacena sólo las secuencias reguladoras que se encuentran cerca (normalmente a 300 pb, todos los parámetros del programa son ajustables por el usuario) de un ORF (*Open Reading Frame* o marco de lectura abierto). Una vez que la búsqueda está completada, el programa deduce una matriz de motivo consenso basada en conocimiento experimental (Berg, 1988), que puede ser suministrada directamente o inferida automáticamente. Si hay suficientes datos experimentales para una determinada especie, como es el caso del regulón LexA de *E. coli*, el programa deduce la matriz consenso a partir de una colección de motivos reguladores introducidos por el usuario.

Por el contrario, cuando no se disponen de suficientes datos experimentales, el programa realiza una aproximación suponiendo que la estructura del regulón se conserva en especies bacterianas relacionadas (Gelfand *et al.*, 2000b). En este caso, el programa adopta como *input* (entrada) las secuencias proteínicas de los genes que forman parte del regulón en especies en las que éste se ha establecido experimentalmente, y las usa como muestra en la base de datos NCBI Genbank a través de su servidor TBLAST sobre especies no estudiadas. Proteínas homólogas por encima de un valor determinado (típicamente el 80%) son consideradas ortólogos (Rajewsky *et al.*, 2002) y sus regiones promotoras son escaneadas en busca de posibles motivos reguladores. Si se encuentran, estos motivos reguladores serán usados para inferir una matriz consenso para las especies en cuestión, que el programa la usará para filtrar posibles motivos reguladores según su índice de heterología (HI), una medida estadística de la divergencia con respecto a la secuencia consenso (Berg y von Hippel, 1987; Berg, 1988).

En este estudio se llevaron a cabo dos filtraciones complementarias: una filtración directa, donde se seleccionan las secuencias de acuerdo a su valor de HI ($HI > 6$); y una filtración recursiva, más flexible e implementada de manera similar a la descrita en publicaciones previas (Gelfand *et al.*, 2000a). En el método recursivo una población inicial de motivos reguladores (los filtrados por el método directo) sirve para definir una matriz consenso inicial, que se aplica como filtro a todas las secuencias encontradas. Los motivos que han pasado este filtro componen la siguiente población. Sus miembros sirven para definir una nueva matriz consenso con la que volver a filtrar todos los motivos encontrados, y el proceso se itera hasta que no existen diferencias significativas entre poblaciones consecutivas (convergencia).