

2.- MATERIAL Y MÉTODOS

2.1.- MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo pertenecen a dos especies diferentes, *Escherichia coli* y *Yersinia enterocolitica*, ambas bacilos Gram-negativos y anaerobios facultativos, pertenecientes a la familia de las *Enterobacteriaceae*, orden ‘*Enterobacteriales*’, sección δ -Proteobacterias y “Phylum” ‘Proteobacteria’. Las características genotípicas de estas cepas se detallan en las tablas 2.1.1 y 2.1.2.

Tabla 2.1.1. Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo o fenotipo relevante	Fuente o referencia
5K	F ⁻ , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , <i>thr</i> , <i>thi</i> , <i>rpsL</i> , <i>leu</i> , <i>lacZ</i>	Juárez <i>et al.</i> , 1984
5K rif	5K, Rif ^r	Nieto <i>et al.</i> , 1998
BL21 (DE3)	<i>hsdS</i> , <i>gal</i> (λ Clts857, <i>ind-1</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin-5</i> , <i>lacUV5-T7 gene 1</i>)	Studier y Moffatt, 1986
BL21 (DE3)-Km	BL21 (DE3) Δ <i>hns</i> -Km	Zhang <i>et al.</i> , 1996
KL743	<i>zba-3000::Tn10</i>	Godessart <i>et al.</i> , 1988
BSN26	MC4100 <i>trp::Tn10</i>	Johansson <i>et al.</i> , 1998
BSN27	MC4100 <i>trp::Tn10</i> Δ <i>hns</i>	Johansson <i>et al.</i> , 1998
BSN28	MC4100 <i>trp::Tn10 stpA60::Km^r</i>	Johansson <i>et al.</i> , 1998
BSN26H	BSN26 <i>hha::Tn5</i>	Nieto <i>et al.</i> , 2000
BSN27H	BSN27 <i>hha::Tn5</i>	Nieto <i>et al.</i> , 2000
5K H11	5K <i>hha11</i>	Este trabajo
5K H18	5K <i>hha18</i>	Este trabajo
5K H21	5K <i>hha21</i>	Este trabajo
5K H29	5K <i>hha29</i>	Este trabajo
5K H39	5K <i>hha39</i>	Este trabajo
5K H42	5K <i>hha42</i>	Este trabajo
S17-1	<i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR⁻M⁺</i> RP4-2-Tc::Mu::Km:Tn7	Simon <i>et al.</i> , 1983
S17-1 λ pir	Trp ^r , Sm ^r , <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR⁻M⁺</i> RP4:2-Tc:Mu:Km Tn7 λ pir	Miller y Mekalanos, 1988
SY327 λ pir	Δ (<i>lac pro</i>) <i>argE</i> (Am) <i>rif</i> , <i>nalA</i> , <i>recA56</i> (λ pirR6K)	Miller y Mekalanos, 1988
SM10 λ pir	Km ^r , <i>thi-1</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>tonA</i> , <i>lacY</i> , <i>supE</i> , <i>recA::RP4-2-Tc::Mu</i> , λ pir	Miller y Mekalanos, 1988
CC118 λ pir	Δ (<i>ara leu</i>), <i>araD</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>thi-1</i> , <i>phoA20</i> , <i>rpsE</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> (Am), <i>recA1</i> , λ pir	Herrero <i>et al.</i> , 1990

Tabla 2.1.2. Cepas de *Y. enterocolitica* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo o fenotipo relevante	Fuente o referencia
Y754	Serotipo 0:9	Colección española de cultivos tipo
W22703	Na ^r , serotipo 0:9, R ⁻ M ⁺	Cornelis y Colson, 1975
W22711	W22703 <i>ymoA::Tn5-TcI</i>	Cornelis <i>et al.</i> , 1991
W22703-18	W22703 <i>hns-Sm</i>	Este trabajo
IP383	Serotipo 0:9, R ⁻ M ⁺	Carniel <i>et al.</i> , 1987

El fago P1_{vir} (Miller, 1992) utilizado como sistema de transducción generalizado. Las características y referencias de los plásmidos utilizados en este trabajo se refieren en la tabla 2.1.3.

Tabla 2.1.3. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Genotipo o fenotipo relevante	Referencia
pLysE	<i>ori</i> _{p15A} , Lisozima T7, Cm ^r	Studier <i>et al.</i> , 1990
pET3b	<i>ori</i> _{PMB1} , promoter T7, Ap ^r	Studier <i>et al.</i> , 1990
pET15b	<i>ori</i> _{PMB1} , promoter T7, Ap ^r	Studier <i>et al.</i> , 1990
pUC19	<i>ori</i> _{ColE1} , Ap ^r	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pBR322	<i>ori</i> _{PMB1} ; Ap ^r , Tc ^r	Bolívar <i>et al.</i> 1977
ptac85	Ap ^r , vector inducible por IPTG	Marsh, 1986
pACYC184	<i>ori</i> _{p15A} , Cm ^r , Tc ^r	Chang y Cohen, 1978
pHly152	<i>hlyR</i> ⁺ <i>hlyC</i> ⁺ <i>hlyA</i> ⁺ <i>hlyB</i> ⁺ <i>hlyD</i> ⁺	Noegel <i>et al.</i> , 1981
pANN202-312	<i>hlyC</i> ⁺ <i>hlyA</i> ⁺ <i>hlyB</i> ⁺ <i>hlyD</i> ⁺	Godessart <i>et al.</i> , 1988
pKO3	Cm ^r , <i>repA</i> (ts), <i>sacB</i>	Link <i>et al.</i> , 1997
pDFY436	<i>ori</i> _{p15A} , Cm ^r , <i>bglG-lacZ</i>	Caramel y Schnetz 1998
pDFY167	<i>ori</i> _{p15A} , Km ^r , <i>bglG-lacZ</i>	Caramel y Schnetz 1998
pUTmini-Tn5Km1	Ap ^r , Km ^r , <i>ori</i> _{R6K} , mini-Tn5Km1	Herrero <i>et al.</i> , 1990
pETHHA-1	Ap ^r	Nieto <i>et al.</i> , 2000
pETHISHHA	Ap ^r	Nieto <i>et al.</i> , 2000
pETHHAHIS	Ap ^r	Este trabajo

Plásmido	Genotipo o fenotipo relevante	Referencia
pETHISHHA11	Ap ^r	Este trabajo
pETHISHHA18	Ap ^r	Este trabajo
pETHISHHA29	Ap ^r	Este trabajo
pETHISHHA39	Ap ^r	Este trabajo
pETHISHHA42	Ap ^r	Este trabajo
pETHISHHAT1	Ap ^r	Este trabajo
pETHISHHAT2	Ap ^r	Este trabajo
pETHISHHAT3	Ap ^r	Este trabajo
pETHNSHIS	Ap ^r	Este trabajo
pETHISYMOA	Ap ^r	Este trabajo
pYNS-1	Ap ^r	Este trabajo
pETHisHhaHnsHyb	pET15b + HisHíbrida	Este trabajo
pUCHhaHnsHyb	pUC19 Híbrida <i>phns-hha-hns</i>	Este trabajo
pUCHhaHnsHyb2	Ap ^r	Este trabajo
pUCHhaHnsHyb30	Ap ^r	Este trabajo
pUCHhaHnsHyb45	Ap ^r	Este trabajo
pBRHhaHnsHyb	pBR322 + Híbrida “megaprimer “	Este trabajo
ptacHhaHnsHyb	ptac85 + Híbrida “megaprimer”	Este trabajo
R27	IncHI, Tc ^r	Grindley et al., 1972
R27 <i>hns</i>	R27 <i>hns</i> ::Tn5-Km	D.E.A. Núria Forns, 2003
R388	Su ^r , Tm ^r , IncW	Datta y Hedges, 1972
pGC1152	pYV <i>yop51-1152</i> ::mini-Mu <i>d1 lac</i>	Cornelis et al., 1987
pGCS757	pGCS752+operon fusión <i>virF-cat</i>	Cornelis et al., 1989
pJOB101	<i>ori</i> _{RSF1010} , <i>hns</i> ⁺ , Ap ^r	Johansson et al., 2001
pJOBLacO4	pJOB101 + 7LacO4 en <i>EcoRI</i> , Ap::mini-Tn5Km1	Este trabajo
pLAC22	pBR322, <i>lacI</i> ^Q , <i>lacPO</i>	Warren et al., 2000
pASK75	<i>Tet</i> ^{p/o} , <i>t</i> ^{pp} , <i>ori</i> _{ColEI} , <i>bla</i> , <i>tetR</i>	Skerra, 1994
pMAK705	Cm ^r , <i>ori</i> _{pSC101} (ts)	Hamilton et al., 1989
pKil194T	<i>ori</i> _{P15A} , <i>oriT</i> , <i>traJ</i> , <i>Plac</i> , <i>ccdB</i> , Km ^r	Gabant et al., 1998
pFS100	<i>ori</i> _{R6K} , <i>mob</i> _{RP4} , Km ^r , derivado de pGP704	Rubirés et al., 1997

Plásmido	Genotipo o fenotipo relevante	Referencia
pDMS197	<i>ori</i> _{R6K} , <i>oriT</i> , <i>sacB</i> , Tc ^r	Edwards <i>et al.</i> , 1998
pUT <i>hns</i> -Sm	<i>ori</i> _{R6K} , <i>hns</i> , <i>sacB</i> , Ap ^r , Sm ^r	Este trabajo
pKO3 <i>hns</i> -Sm	<i>repA</i> (ts), <i>sacB</i> , <i>hns</i> , Sm ^r , Cm ^r	Este trabajo
pLG338-30	<i>ori</i> _{pSC101} ; Ap ^r	Cunningham <i>et al.</i> , 1993
pLGHhaHnsHb2	pLG338-30 + HhaHnsHyb2	Este trabajo

2.2.- MEDIOS DE CULTIVO Y ANTIBIÓTICOS

2.2.1.- MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizaron diferentes medios de cultivo para el crecimiento bacteriano, a continuación se detalla su composición:

- **LB** (Luria-Bertani; Sambrook *et al.*, 1989). Medio de cultivo clásico que se utilizó de forma rutinaria para el crecimiento bacteriano en líquido.

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

- **LB agar**. Medio de cultivo utilizado para el crecimiento bacteriano en medio sólido. Su composición es la del medio LB suplementado con 15 g/l de agar para bacteriología (Schärlau Microbiology).

▪ **LB agar blando.** Medio empleado para la obtención y titulación de lisados fágicos. Su composición es la del medio LB suplementado con 6-8 g/l de agar.

▪ **Agar-sangre.** Medio de cultivo sólido que se utiliza para la detección de la actividad hemolítica externa de las cepas estudiadas. Su composición es igual a las placas de LB-agar más un 5 % de sangre de carnero desfibrinada (Oxoid). La sangre se añade al medio ya estéril y una vez que su temperatura es inferior a 50 °C.

▪ **Agar- β -glucósido** (Schnetzer *et al.*, 1987). Medio sólido suplementado con salicina y un indicador de pH. Este medio ha sido utilizado para la detección de mutantes *hns* debido a la desrepresión del operón *bgl* que en ellos se produce. Esta desrepresión provoca un cambio de acidez en el medio detectado a través del indicador de pH.

Medio agar- β -glucósido (g/l)	
Extracto de levadura (Schärlau Microbiology)	3
Triptona (Schärlau Microbiology)	6
Agar para bacteriología (Schärlau Microbiology)	15

Al medio autoclavado y atemperado se le añade:

Solución de salicina (Aldrich): Se prepara una solución madre al 5 % en agua destilada para que quede a una concentración final en el medio de 0'5 %. La salicina se disuelve con calor y se esteriliza mediante filtración.

Colorante indicador de pH: Esta solución contiene 50 % de etanol (Prolabo), 0'2 N de NaOH y 2 % de azul de bromotimol (Panreac). El colorante se diluye 100 veces en el medio.

▪ **SOC** (Hanahan *et al.*, 1991). Medio utilizado para la recuperación de células después de la electroporación.

Medio SOC (g/l)	
Peptona trípsica de caseína (Schärlau Microbiology)	20
Extracto de levadura (Schärlau Microbiology)	5
NaCl (Panreac)	0'58
KCl (Merck)	0'19
MgCl ₂	2'03
MgSO ₄	2'46
Glucosa (Panreac)	3'6

▪ **PB** (Penassay Broth). Medio de cultivo líquido utilizado para el crecimiento de las cepas en los ensayos de conjugación en líquido.

Medio PB (g/l)	
Extracto de carne (ADSA Micro)	1'5
Extracto de levadura (Schärlau Microbiology)	1'5
Peptona trípsica de caseína (Schärlau Microbiology)	5
Glucosa (Panreac)	1
NaCl (Panreac)	3'5
K ₂ HPO ₄	3'68
KH ₂ PO ₄	1'32

▪ **TSA** (Schärlau Microbiology). Medio de cultivo sólido utilizado para el crecimiento de las diferentes cepas de *Yersinia enterocolitica*.

Medio TSA (g/l)	
Peptona de caseína	17
Peptona de soja	3
NaCl	5
Fosfato dipotásico	2'5
Dextrosa	2'5
Agar para a bacteriología	15

Cuando fue necesario el medio fue suplementado con 5 mM de CaCl₂ o 1 mM de glucosa.

- **Agar-MacConkey.** Medio selectivo y diferencial para la familia de las *Enterobacteriaceae*.

Agar-MacConkey (g/l)	
Peptona	20
Lactosa	10
Sales biliares	2'5
NaCl	5
Rojo neutro	0'05
Cristal violeta	0'001
Agar	15

- **M63.** Medio mínimo mineral

M63 (g/l)	
KH ₂ PO ₄	13'6
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
FeSO ₄ *7H ₂ O	0'5 mg
MgSO ₄ *7H ₂ O	0'24
Glucosa	4

Ajustar pH 7'0 con KOH

- **M9.** Sales minerales

Sales M9 (g/l)	
Na ₂ HPO ₄	6
KH ₂ PO ₄	3
NaCl	0'5
NH ₄ Cl	1

Una vez autoclavado se le añadía 1 ml de MgSO₄ y 1 ml de CaCl₂ 200 mM previamente autoclavados.

2.2.2.- ANTIBIÓTICOS

Cuando fue necesario, los diferentes medios de cultivo fueron suplementados con diferentes antibióticos. Se prepararon soluciones concentradas de cada antibiótico siguiendo las indicaciones de la bibliografía (Sambrook *et al.*, 1989).

▪ **Ampicilina (Ap).** (Sal sódica; Roche). Se preparó una solución concentrada de 100 mg/ml en agua destilada, se esterilizó por filtración y se guardó a – 20 °C. Se utilizaba a una concentración final de 50 o 100 µg/ml.

▪ **Cloranfenicol (Cm).** (Fluka). Se preparó una solución concentrada de 50 mg/ml en etanol absoluto (Prolabo) y se guardó a - 20 °C. Se utilizaba a una concentración final de 34 o 50 µg/ml.

▪ **Tetraciclina (Tc).** (Hidrocarburo, Fluka). Se preparó una solución concentrada de 12'5 mg/ml en etanol 50 %, se esterilizó por filtración y se guardó a – 20 °C protegida de la luz. Se utilizaba a una concentración final de 12'5 µg/ml.

▪ **Kanamicina (Km).** (Sulfato ácido, Sigma). Se preparó una solución concentrada de 50 mg/ml en agua destilada, se esterilizó por filtración y se guardó a – 20 °C. Se utilizaba a una concentración final de 25 o 50 µg/ml.

▪ **Estreptomicina (Sm).** (Sulfato, Sigma). Se preparó una solución concentrada de 50 mg/ml en agua destilada, se esterilizó por filtración y se guardó a – 20 °C. Se utilizaba a una concentración final de 50 µg/ml.

▪ **Rifampicina (Rif).** (Fluka). Se preparó una solución concentrada de 50 mg/ml en agua destilada, añadiendo una solución de NaOH 2 N, gota a gota, para su completa disolución. La solución se esterilizó por filtración y se guardó a – 20 °C. Se utilizaba a una concentración final de 50 µg/ml.

▪ **Ácido Nalidixico (Nal).** (Sal sódica, Sigma). Se preparó una solución concentrada de 50 mg/ml en agua destilada, se esterilizó por filtración y se guardó a – 20 °C. Se utilizaba a una concentración final de 50 µg/ml.

▪ **Neomicina (Nm).** (Sulfato, Sigma). Se preparó una solución concentrada de 50 mg/ml en agua destilada, se esterilizó por filtración y se guardó a – 20 °C. Se utilizaba a una concentración final de 50 µg/ml.

2.3.- MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

2.3.1.- ESTERILIZACIÓN

Los medios de cultivo, el material de vidrio y de plástico y algunas de las diferentes soluciones utilizadas, fueron esterilizadas por calor húmedo en un autoclave, durante 15 minutos a 121 °C.

Las soluciones que no permitían ser esterilizadas de esta manera fueron esterilizadas por filtración a través de membranas estériles con un diámetro de poro de 0.22 µm (Millipore).

2.3.2.- MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS

Las diferentes cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se mantuvieron viables a través de dos métodos. Por una parte se fueron resembrando en sus correspondientes medios sólidos cada 6-7 semanas y guardándose a 4 °C. Por otra parte, también se mantuvieron a través de la congelación a – 70 °C. Para ello cultivos líquidos de 18 horas fueron centrifugados (4.000 xg, 10 minutos) y las células resuspendidas en glicerol 10 % hasta 1/5 del volumen de cultivo inicial. Esta suspensión se guardaba a – 70 °C.

Los bacteriófagos se mantenían a 4 °C en forma de lisado fágico en el mismo sobrenadante del cultivo en el cual fueron obtenidos. Además se añadían unas gotas de cloroformo para evitar la contaminación bacteriana.

2.3.3.- INOCULACIÓN Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS

La siembra de microorganismos en medio líquido se realizó a partir de cultivos líquidos previamente crecidos de 18 horas, de cultivos congelados o de cultivos en medio sólido.

En general, los inóculos en medio líquido se realizaban a través de diluciones 1:50 o 1:100 de un cultivo de toda la noche a un Erlenmeyer con medio estéril. Los cultivos fueron incubados a 37 °C, 30 °C o 25 °C en función de la cepa y del estudio a realizar y con una agitación de 200 rpm (incubador-agitador orbital, Braun).

Las medidas del crecimiento bacteriano fueron seguidas por dos procedimientos distintos, a través del recuento de viables en placa y del seguimiento espectrofotométrico de la densidad óptica de los cultivos líquidos a una longitud de onda de 600 nm (DO_{600}) (Espectrofotómetro modelo DU[®] 640, Beckman Coulter[™]).

2.4.- SISTEMAS DE TRANSFERENCIA DEL MATERIAL GENÉTICO

2.4.1.- TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

2.4.1.1.- Transformación bacteriana de células competentes obtenidas por tratamiento con $CaCl_2$

Se utilizó como base el método descrito por Cohen *et al.*, 1972.

A partir de un cultivo de toda la noche de la cepa a transformar, se inocularon 100 ml de LB y se incubaron a 37 °C en agitación hasta una DO_{600} aproximada de 0'3 (2 o 3 horas a 37 °C, 200 rpm). A continuación se recogieron las células por centrifugación (3.000 xg, 10 minutos) y se resuspendieron en 20 ml de $CaCl_2$ 50 mM frío (0 °C). Posteriormente se realizó una nueva centrifugación (3.000 xg, 5 minutos a 4 °C) y las células se resuspendieron en 1 ml de $CaCl_2$ 50 mM frío (0 °C). Las células competentes obtenidas por este proceso, se mantuvieron en hielo un mínimo de 30 minutos y un máximo de 24 horas antes de su transformación.

Para proceder a la transformación, se mezclaron 300 µl de células con 1-2 µl del ADN a introducir y la mezcla se mantuvo en hielo durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se sometieron las células a un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos en un baño termoestático y a continuación se colocaron de nuevo en hielo durante 2 minutos. Seguidamente se añadieron 900 µl de LB y se incubaron durante 1 hora a 37 °C, 200 rpm, para permitir la expresión de los genes marcadores de resistencia a antibióticos codificados por el plásmido introducido. Finalmente, se sembraron las células en placas de LB-agar suplementadas con los antibióticos adecuados para la selección de los transformantes y se incubaron durante 16-24 horas a 37 °C.

2.4.1.2.- Transformación por electroporación

2.4.1.2.1.- Electroporación de *Escherichia coli*

En algunos casos la transformación a través del método de CaCl₂ frío descrito anteriormente (apartado 2.4.1.1.) no tenía una buena eficiencia, en estos casos el método utilizado fue el de la electroporación (Dower *et al.*, 1988).

A partir de un inóculo crecido durante toda la noche, se realizó una dilución 1:50 en medio fresco y se incubó el cultivo hasta una DO₆₀₀ aproximada de 0'5-0'8. A continuación las células fueron lavadas 3 veces por centrifugación (3.000 xg, 10 minutos, 4 °C) y resuspendidas en agua bidestilada estéril reduciendo el volumen hasta 1/100 respecto al inicial. Una vez obtenidas las células electro-competentes, se mezclaron 45 µl con 1-5 µl de la solución de ADN a introducir y la mezcla se transfirió a cubetas de electroporación de 1 mm de separación entre los electrodos y se mantuvo durante unos minutos en hielo.

Una vez realizada la descarga, las células fueron resuspendidas en 1 ml de medio SOC sin antibióticos, se pasaron a un tubo de 10 ml y se incubaron durante 1 hora a 37 °C, 200 rpm para permitir la expresión de los marcadores fenotípicos (expresión de la resistencia a antibióticos). Las células transformantes fueron seleccionadas en placas de LB-agar suplementadas con los antibióticos necesarios para la selección y se incubaron durante 18-24 horas a 37 °C.

En algunas ocasiones, las células electro-competentes fueron guardadas a – 70 °C antes de su utilización, en estos casos, la resuspensión final de las células no se realizó en agua bidestilada, sino en glicerol 10 %.

El electroporador utilizado fue el modelo Electroporator 2510 (Eppendorf) y las condiciones de electroporación son las siguientes:

Condiciones de electroporación de <i>E. coli</i>	
Temperatura	4 °C
Modo	2'5 kV/cm
Capacitancia	10 µF (en descarga de 2'5 kV)
Resistencia	600 Ω
Tiempo de carga	< 8 segundos
Duración del pulso	5 ms

2.4.1.2.2.- Electroporación de *Y. enterocolitica*

(Conchas y Carniel, 1999)

La eficacia de transformación de *Y. enterocolitica* utilizando tanto el sistema de electroporación de *E. coli*, como la transformación a través de CaCl₂ frío es bastante baja. Por ello se utiliza un método de electroporación que varía algunas de las condiciones y que mejora considerablemente la eficiencia.

Se realizó una dilución 1:50 de un cultivo crecido durante toda la noche a 28 °C en medio estéril y se incubó durante 2-4 horas (hasta una DO₆₀₀ de 0'5-0'8) a 28 °C, 200 rpm. El siguiente paso fue centrifugar el cultivo (4.000 xg, 15 minutos, 4 °C), resuspender las células en agua bidestilada estéril y repetir el proceso, pero en este caso se resuspendieron las células en solución de transformación (272 mM sacarosa, 15 % glicerol). A continuación se repitió el paso de centrifugación y se resuspendieron las células en solución de transformación quedando una dilución 1/100 respecto al inicial. Finalmente, se alicuotaron y se congelaron y guardaron a – 70 °C hasta el momento de su utilización.

Una vez obtenidas las células electro-competentes, el protocolo a seguir fue igual al descrito en el apartado anterior (2.4.1.2.1.) para *E. coli*, únicamente variaba el modo, en lugar de 2'5 kV/cm, se utilizaban 1'25 kV/cm.

2.4.2.- CONJUGACIÓN

2.4.2.1.- Conjugación en medio sólido

(De Lorenzo *et al.*, 1990)

En este trabajo la conjugación en medio sólido fue utilizada para realizar la mutagénesis con el plásmido pUTmini-Tn5 (De Lorenzo *et al.*, 1990) y para la mutagénesis del gen *hms* en *Y. enterocolitica*, en la que se utilizó un vector derivado del plásmido pUT (Herrero *et al.*, 1990).

La conjugación se realizó a partir de un cultivo de toda la noche de la cepa dadora y otro de la cepa receptora, habitualmente crecidas sin antibióticos. En el caso de que hubiesen crecido con antibióticos, el primer paso fue centrifugar los cultivos (3.000 xg, 10 minutos), resuspender las células en LB y repetir el paso 3 veces para eliminarlos.

A partir de los cultivos limpios de antibióticos, se mezclaron 100 µl de la cepa dadora y 100 µl de la cepa receptora en 5 ml de MgSO₄ 10 mM, la mezcla fue filtrada a través de membranas de un diámetro de poro de 0'45 µm (Millipore). La membrana con las células retenidas se colocó en una placa de LB-agar con las células en la parte superior y se incubó durante 8 horas a 37 °C. El crecimiento obtenido sobre el filtro se resuspendió en 5 ml de MgSO₄ 10 mM y fue sembrado en placas de LB-agar suplementadas con los antibióticos correspondientes a la resistencia del marcador de la cepa receptora y del plásmido conjugativo. Las placas fueron incubadas durante 18-24 horas a 37 °C.

2.4.2.2.- Conjugación en medio líquido

(Taylor y Levine, 1980)

Este procedimiento de conjugación denominado de emparejamiento a corto plazo fue utilizado para la conjugación con el plásmido R27.

Se partió de cultivos en fase estacionaria de la cepa dadora y receptora crecidos en medio PB a 25 °C y sin agitación. A un 1 ml de medio PB preincubado a 25 °C se le añadió 0'4 ml de cultivo de la cepa receptora y 0'1 ml de cultivo de la cepa dadora del plásmido conjugativo. A continuación la mezcla fue incubada durante 2 horas a 25 °C sin agitación.

Los cultivos fueron sembrados en placas de agar MacConkey suplementadas con los antibióticos correspondientes y fueron incubadas a 37 °C durante 18-24 horas. La frecuencia de conjugación era calculada como el número de transcojugantes por célula dadora.

2.4.3.- TRANSDUCCIÓN CON EL BACTERIOFAGO P1 ν ir

(Miller, 1992)

El bacteriófago P1 ν ir es un derivado virulento del bacteriófago P1 al que le falta la capacidad de lisogenizar las células que infecta. Este bacteriófago fue utilizado en este trabajo para la construcción de cepas con mutaciones puntuales en el gen *hha*.

2.4.3.1.- Obtención de lisados de P1 ν ir

Se incubaron 10^7 partículas fágicas del fago P1 ν ir de un lisado preexistente, con 1 ml de un cultivo en fase exponencial de la cepa dadora en medio LB suplementado con CaCl₂ 5 mM. A continuación se incubó la mezcla durante 20 minutos a 37 °C sin agitación para permitir la adsorción del bacteriófago a la célula. Después del tiempo de incubación, se añadía 3 ml de agar-blando (suplementado con CaCl₂ 2 mM y glucosa 0'1 %) y se esparcía sobre placas de LB-agar (con CaCl₂ 2 mM y glucosa 0'1 %), finalmente se dejó solidificar el agar y se incubaron las placas de 16-24 horas a 37 °C.

La capa de agar-blando fue recogida en un tubo de centrifuga. Para ello, se añadieron 4 ml de LB y se barrió la placa con una asa de vidrio, añadiendo a continuación unas gotas de cloroformo y dejando la mezcla 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se separaron los restos celulares por centrifugación (3.000 xg, 30 minutos). Al sobrenadante obtenido, correspondiente al lisado fágico, se le añadieron unas gotas de cloroformo para conservarlo a 4 °C y evitar una posible contaminación bacteriana.

2.4.3.2.- Titulación de lisados de P1 ν ir

Se partía de un cultivo en fase estacionaria de la cepa receptora crecido en medio LB suplementado con CaCl₂ 2 mM y se realizó un inculo 1/50 que se dejó crecer hasta

mitad de la fase exponencial. A continuación se mezclaron 100 μ l de células mas 100 μ l de diferentes diluciones del fago en LB (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8}) y se incubaron 15 minutos a 37 °C sin agitación. Posteriormente se añadieron 3 ml de agar-blando (suplementado con CaCl_2 2 mM, glucosa 0'1 %) y se decantó sobre placas de LB-agar (suplementadas con CaCl_2 2 mM, glucosa 0'1 %). Las placas se incubaron a 37 °C durante 18-24 horas (sin invertir). La titulación del lisado se calculó a partir del recuento del número de calvas de lisis.

2.4.3.3.- Transducción con P1vir

A partir de un cultivo en fase estacionaria de la cepa receptora, se realizó un inóculo 1/50 en LB y se dejó crecer hasta mitad de la fase exponencial. A continuación se recogieron las células por centrifugación (3.000 xg, 10 minutos), se resuspendieron en 3 ml de tampón MC y se realizaron mezclas de 1 ml de células mas diferentes concentraciones de lisado fágico obtenido sobre la cepa adecuada, para obtener varias multiplicidades de infección (generalmente 100, 10 y 1 μ l). Las mezclas se incubaron a 37 °C en estático durante 15 minutos para permitir la adsorción del fago y luego se añadieron 0'2 ml de tampón citrato 0'1 M para inhibir la readsorción del bacteriófago. Finalmente se plaquearon 100 μ l sobre placas con las resistencias adecuadas para la selección de las células transductantes y se incubaron durante 18-24 horas a 37 °C.

Tampón MC	
MgSO ₄	0'1 M
CaCl ₂	5 mM

Tampón citrato	
C ₆ H ₈ O ₇	0'1 M
Ajustar el pH a 5'5 con NaOH, autoclavar	

2.4.4.- CURADO DE PLÁSMIDOS

En la mayoría de los casos, el curado de plásmidos fue obtenido a través de sucesivos subcultivos de la cepa portadora del plásmido en medio LB sin los marcadores de resistencia codificados por dicho plásmido. Las colonias aisladas obtenidas fueron repicadas por duplicado en placas del mismo medio de cultivo con y sin antibióticos;

aquellas colonias que crecieron en la placa sin antibiótico pero que no lo hicieron en la placa correspondiente con antibiótico, pertenecían a los curados del ADN plasmídico.

Para obtener curados de plásmidos derivados del plásmido de virulencia pYV en las cepas de *Y. enterocolitica*, también se realizaron sucesivos subcultivos de la cepa portadora del plásmido, pero en este caso el medio utilizado fue MOX (TSA suplementado con 20 mM MgCl₂ y 20 mM de oxalato de sodio), debido a la letalidad del Ca²⁺ en estas cepas. Igual que en el caso anterior las colonias fueron repicadas después en TSA con y sin antibiótico para comprobar cuales eran las colonias que realmente habían perdido el plásmido.

2.5.- MUTAGÉNESIS

2.5.1.- MUTAGÉNESIS QUÍMICA CON DES

La mutagénesis del gen *hha* se hizo por tratamiento con DES (Dietilsulfato; SO₄(OC₂H₅)₂ de Panreac) siguiendo el método descrito por Eisenstadt *et al.*, 1994 con pequeñas variaciones.

Se partió de un cultivo en fase estacionaria de la cepa que se quería mutagenizar y se realizó un inóculo 1/50 en 50 ml del medio adecuado. El cultivo se dejó crecer hasta una DO₆₀₀ aproximada de 0'8-1. A continuación se recogieron las células por centrifugación (3.000 xg, 10 minutos) y se resuspendieron en 50 ml de sales M9. Posteriormente se añadieron 25 µl de DES, incubando a 37 °C durante 2 horas en agitación, transcurrido ese tiempo, las células se lavaron dos veces con sales M9, se resuspendieron en 50 ml de LB y se dejaron incubando durante 1 hora más a 37 °C. Finalmente se plaquearon 100 µl del cultivo mutagenizado en placas con el medio y marcadores adecuados para la selección del fenotipo deseado.

2.5.2.- MUTAGÉNESIS POR REEMPLAZAMIENTO ALÉLICO CON pKO3

(Link *et al.*, 1997)

Este método fue utilizado para mutagenizar el gen *hns* de *Y. enterocolitica*. En primer lugar se colocó el gen de resistencia a la estreptomycinina dentro del gen *hns* de *Y. enterocolitica*, rompiendo de esta manera la pauta de lectura. A continuación se clonó esta construcción dentro del plásmido pKO3.

El siguiente paso fue electroporar la cepa objeto de la mutagénesis con el plásmido obtenido e incubarla en medio LB-agar con cloranfenicol (resistencia del plásmido) a 42 °C durante 18-24 horas. Se utilizó 42 °C como temperatura de crecimiento debido a que esta temperatura no es permisiva para el pKO3, de esta forma las colonias que pudieran crecer serían debidas a la integración del plásmido en el cromosoma de la cepa a través de recombinación homóloga.

Para obtener la mutación dentro del cromosoma bacteriano, las colonias obtenidas fueron incubadas en medio LB-agar con sacarosa 5 % a 30 °C (Blomfield *et al.*, 1991). El plásmido pKO3 contiene el gen *sacB* (levansucrasa de *Bacillus subtilis*), que es letal para la bacteria cuando crece en sacarosa. De esta forma las colonias que crecieran a 30 °C y fueran sensibles al cloranfenicol sólo podían ser el resultado de una segunda recombinación homóloga que provocaría la escisión del plásmido del cromosoma. Para finalizar, se realizó una PCR para comprobar si la copia del gen que quedaba en el cromosoma bacteriano era la salvaje o la mutagenizada.

2.5.3.- MUTAGÉNESIS POR INSERCIÓN CON pUTmini-Tn5

Los minitransposones mini-Tn5 son derivados del transposon compuesto Tn5. A cada uno de estos elementos les falta el gen que codifica para la transposasa e incluyen un gen que les confiere resistencia a un antibiótico flanqueado por una secuencia de 19 pb de los extremos I y O del Tn5. En nuestro caso se utilizó el mini-Tn5Km1 que contiene el gen que da resistencia a la kanamicina proveniente del Tn903 (Way *et al.*, 1984). El vector de transmisión, el plásmido pUT (De Lorenzo *et al.*, 1990) tiene un origen de replicación dependiente de la proteína π (derivado del plásmido R6K) y el origen de transferencia *oriT* derivado del plásmido autoconjugativo RP4. Además el plásmido pUT tiene el gen que codifica para la transposasa, necesaria para la transposición de los mini-Tn5.

El pUTmini-Tn5 es estable y con la capacidad de ser movilizable en la cepa S17-1 (λ pir), esta cepa produce la proteína π y expresa las funciones para la conjugación de RP4. En la mutagénesis el plásmido se transfiere por conjugación a una cepa no productora de la proteína y que por tanto no puede mantener el plásmido. Los conjugantes seleccionados por la resistencia al antibiótico codificada por el minitransposon son mutantes por inserción del mini-Tn5.

La ventaja que representa el uso de los minitransposones es que al no tener codificada la transposasa generan inserciones estables. Además en el caso concreto del mini-Tn5Km1 no tiene secuencias terminadoras de la transcripción flanqueando el gen de la kanamicina, lo que reduce los efectos polares.

El procedimiento que se siguió para realizar la mutagénesis es el descrito por De Lorenzo *et al.*, 1990 y explicado en el apartado de conjugación en medio sólido (apartado 2.4.2.1.).

2.5.4.- MUTAGÉNESIS CON pUTHns-Sm

El plásmido pUTHns-Sm fue utilizado para la mutagénesis del gen *hns* de *Y. enterocolitica*.

Igual que en el caso de los pUTmini-Tn5, el vector de transmisión que se utilizó es el pUT (De Lorenzo *et al.*, 1990), debido a su capacidad de ser movilizable (derivado de RP4). El procedimiento a seguir también fue el mismo (apartado 2.4.2.1.).

Se seleccionaron las conjugantes debido a la recombinación homóloga que se produce a través del gen *hns* y a la resistencia a estreptomycinina con la que se encuentra mutagenizado. Además, el vector pUTHns-Sm también posee el gen *sacB*, que es letal para las células cuando crecen en sacarosa y una segunda resistencia, en este caso a cloranfenicol. Igual que en el caso de la mutagénesis con el plásmido pKO3, este plásmido permitió seleccionar aquellas colonias que hubieron producido una segunda recombinación homóloga y escindido el mismo, a través del crecimiento en LB-agar suplementado con sacarosa 5 % a 30 °C y la sensibilidad a cloranfenicol. A continuación se comprobó por PCR si la cepa receptora contenía el gen salvaje o mutante.

2.6.- ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DEL ADN

2.6.1.- AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO

2.6.1.1.- Aislamiento de ADN plasmídico por lisis alcalina

(Birnboim, 1983)

Este fue el método utilizado de forma habitual. En función de la cantidad de ADN plasmídico requerido se partió de un volumen diferente de cultivo bacteriano. En el protocolo detallado a continuación, se indican las cantidades adecuadas para 5 ml de cultivo, pero se pueden escalar los volúmenes de soluciones en el caso de tener un volumen de cultivo mayor, siempre manteniendo la relación entre ellas (1: 2: 1'5).

Se recogieron por centrifugación las células de 5 ml de cultivo de toda la noche (3.000 xg, 10 minutos) y se resuspendieron en 300 µl de solución I, agitando 3-4 veces por inversión. Las células se mantuvieron 15 minutos en hielo. A continuación se añadieron 600 µl de solución II, se volvió a agitar 3-4 veces por inversión y se mantuvieron 10 minutos en hielo, posteriormente se añadieron 400 µl de solución III agitando por inversión y se mantuvieron otros 15 minutos en hielo. En caso de tener un plásmido de mayor tamaño, para favorecer la fase de renaturalización, el tiempo de incubación en hielo con la solución III se podía incrementar hasta 1 hora. Transcurrido este tiempo se centrifugó (15 minutos, 12.000 xg) en centrífuga tipo Eppendorf y se recogió el sobrenadante que contenía el ADN plasmídico.

Solución I	
Glucosa (Panreac)	50 mM
Tris-HCl (Roche)	pH 7'5, 25 mM
EDTA (Merck)	25 mM

Solución II	
NaOH (Panreac)	0'2 N
SDS (Merck)	1%

Solución III	
Acetato sódico (Merck)	pH 4'8, 3 M
pH ajustado con ácido acético glacial (Panreac)	

A continuación se llevó a cabo una desproteización del mismo, para la cual se utilizaron dos métodos diferentes: por precipitación con cloruro de litio o por extracción con fenol.

2.6.1.1.1.- Desproteización del ADN por precipitación con cloruro de litio

(Martínez y de la Cruz, 1988)

Al sobrenadante recogido de la lisis alcalina se le añadió un volumen igual de isopropanol y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 5 minutos a 12.000 xg, se decantó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 200 µl de TE y se le realizó el tratamiento con RNasa A (descrito en el apartado 2.6.1.1.3.) para eliminar posibles restos de ARN.

A la solución se le añadieron 400 µl de LiCl 5 M (Merck) y 400 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente, se centrifugó (15 minutos, 12.000 xg) y se recuperó el sobrenadante. Para precipitar el ADN se añadió 1/10 parte del volumen de solución III (apartado 2.6.1.) y 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se dejó 1 hora a - 20 °C. Finalmente se centrifugó (5 minutos, 12.000 xg), se hizo un lavado con 1 volumen de etanol 70 % frío, se secó al vacío (Speed-Vac, Savant Instruments Inc.) y se resuspendió en el volumen adecuado de agua bidestilada (Milli-Q_{plus}, Millipore) estéril.

Solución TE	
Tris-HCl (Roche)	pH 8'0, 10 mM
EDTA	1 mM

2.6.1.1.2.- Desproteización del ADN por extracción con fenol

A partir del sobrenadante obtenido en la lisis alcalina, se procedió a la concentración del ADN plasmídico por precipitación, añadiéndole dos volúmenes de etanol absoluto frío e incubándolo a - 20 °C durante 1 hora. A continuación se centrifugó (12.000 xg, 4 °C, 15 minutos) y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se secó utilizando un secador de vacío (Speed-Vac, Savant) y se resuspendió en un volumen de 700 µl de TE o agua bidestilada. En este punto se realizó el tratamiento con RNasa A (apartado 2.6.1.1.3).

La fenolización propiamente dicha consistió en añadirle a esta solución en primer lugar $\frac{1}{2}$ de volumen de fenol (Sigma, pH 7'9), después $\frac{1}{4}$ de volumen de fenol más $\frac{1}{4}$ de volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y finalmente $\frac{1}{2}$ de volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). En cada uno de estos tres pasos se mezcló la fase acuosa y la orgánica hasta conseguir una emulsión y se centrifugó (16.000 xg, 2 minutos) para separar las dos fases y recoger la fase acuosa que era donde se encontraba el ADN.

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

2.6.1.1.3.- Tratamiento del ADN con RNasa A

El ADN obtenido por el método de la lisis alcalina fue tratado con RNasa A de páncreas bovino (Boehringer Mannheim) a una concentración de 100 μ g/ml durante 30 minutos a 37 °C.

La solución de RNasa A (Sambrook *et al*, 1989) se preparó del siguiente modo: se realizó una solución de RNasa A 10 mg/ml en Tris-HCl 10 mM pH 7'5, NaCl 15 mM y se eliminaron las DNasas incubando la solución 5 minutos a 100 °C. La preparación se mantuvo a - 20 °C.

2.6.1.2.- Aislamiento de ADN plasmídico a través de “kits” comerciales

Cuando se necesitaba un ADN plasmídico de gran pureza, bien para restricciones (apartado 2.6.3.) o bien para secuenciación (apartado 2.6.5.), se utilizaron kits comerciales. Para cultivos de 5 ml se utilizó el “kit” Plasmix[®] (Talent). En el caso de cultivos de 100 ml Wizard[®] Plus SV Midiprep (Promega), siguiendo en cada caso las indicaciones de la casa comercial.

2.6.2.- AISLAMIENTO DE ADN CROMOSOMICO(Silhavy *et al.*, 1984)

Se recogieron las células de un cultivo de 100 ml en fase estacionaria por centrifugación (3.000 xg, 15 minutos), se resuspendieron en 5 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8'0, EDTA 50 mM y se congelaron a – 20 °C. A continuación se añadió 0'5 ml de una solución de lizozima (10 mg/ml en Tris-HCl 25 mM, pH 8'0) a las células congeladas y se descongelaron a temperatura ambiente agitando, a continuación se dejaron en hielo durante 45 minutos. Posteriormente se añadió 1 ml de solución STEP, se agitó y se colocó en un baño a 50 °C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se añadieron 6 ml de fenol equilibrado (Sigma, pH 7'9) y se centrifugó para recoger la fase acuosa (fase superior), a la cual se le añadieron 1/10 parte de volumen de acetato de sodio 3 M, se agitó y se añadió 2 volúmenes de etanol absoluto frío para precipitar el ADN.

El siguiente paso fue recoger el precipitado con una pipeta Pasteur sumergiéndola y removiendo suavemente. El ADN se transfirió a un tubo con 5 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7'5, 1 mM EDTA y 200 µg/ml de RNasa A y se dejó toda la noche a 4 °C. Una vez disuelto, se le añadió un volumen de cloroformo y se agitó para emulsionar. A continuación se centrifugó, se recogió la fase acuosa y se precipitó el ADN, recogéndolo con una pipeta Pasteur. Finalmente se disolvió en 2 ml de la anterior solución (sin RNasa A) y se guardó a 4 °C.

Solución STEP	
Tris-HCl (Roche)	pH 7'5, 50 mM
SDS (Merck)	0'5 %
EDTA (Merck)	0'4 M

Justo antes de utilizarla se añadía 1 mg/ml de proteinasa K

2.6.3.- RESTRICCIÓN, LIGACIÓN Y MODIFICACIÓN DEL ADN

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

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

En todos los casos, después del tratamiento con los diversos enzimas mencionados, el ADN se purificaba bien por fenolización (apartado 2.6.1.1.2), o mediante el “kit” comercial Wizard[®] DNA Clean-Up System de Promega.

2.6.4.- AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

(Mullis, 1986)

Para las reacciones de amplificación de ADN por PCR se utilizó una polimerasa termoestable nativa DynaZyme[™] (Pfu) obtenida de *Thermus brockianus* y el tampón de amplificación (10x) suministrado con el enzima (Finnzymes Oy). El volumen de las reacciones fue generalmente de 25 µl, de los cuales 24 µl correspondían a la mezcla de reacción y 1 µl a la muestra a amplificar. En algunos casos en que se necesitaba más cantidad de ADN, el volumen de reacción fue de 50 µl y cuando la PCR se utilizó para la búsqueda de clones, con muchas muestras, el volumen de reacción se ajustó a 10 µl, manteniendo siempre las proporciones de cada componente.

Se utilizó como muestra (ADN molde) células enteras resuspendidas en 100 µl de agua bidestilada y hervidas durante 5-10 minutos o bien ADN previamente purificado. En el caso de células de *Y. enterocolitica*, éstas fueron sometidas a un proceso de fenolización previo (apartado 2.6.1.1.3.) para evitar la interferencia de una DNAsa termosensible. La mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) se preparó con antelación de forma que todos estuvieran a una concentración de 10 mM. La mezcla de PCR que se utilizó generalmente fue la siguiente:

Mezcla de reacción (25 µl)	
ADN polimerasa DynaZyme [™] 2U/µl	0'5 U
Tampón 10x	2'5 µl
dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech)	1 µl
Oligonucleótidos (10 pmol/µl)	2 µl
Muestra	1 µl
H ₂ O bidestilada	16 µl

Los programas de amplificación (temperaturas, tiempos y número de ciclos) variaban según el gen a amplificar y los oligonucleótidos utilizados. En cada PCR concreta se especificará el programa. El programa básico utilizado fue:

94 °C	2'	
94 °C	Desnaturalización	30''
58 °C	Hibridación	30' \Rightarrow 30 ciclos
72 °C	Extensión	30''
72 °C		7'

El termociclador utilizado fue GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

Los productos de amplificación resultantes de la PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa (apartado 2.6.7.1.) En el caso de que el ADN amplificado fuera utilizado para un posterior tratamiento con enzimas de restricción, ligación o modificación, se procedió a la purificación del mismo mediante el kit comercial de Quiagen (QIAquick) para la eliminación de oligonucleótidos, dNTPs, sales, etc.

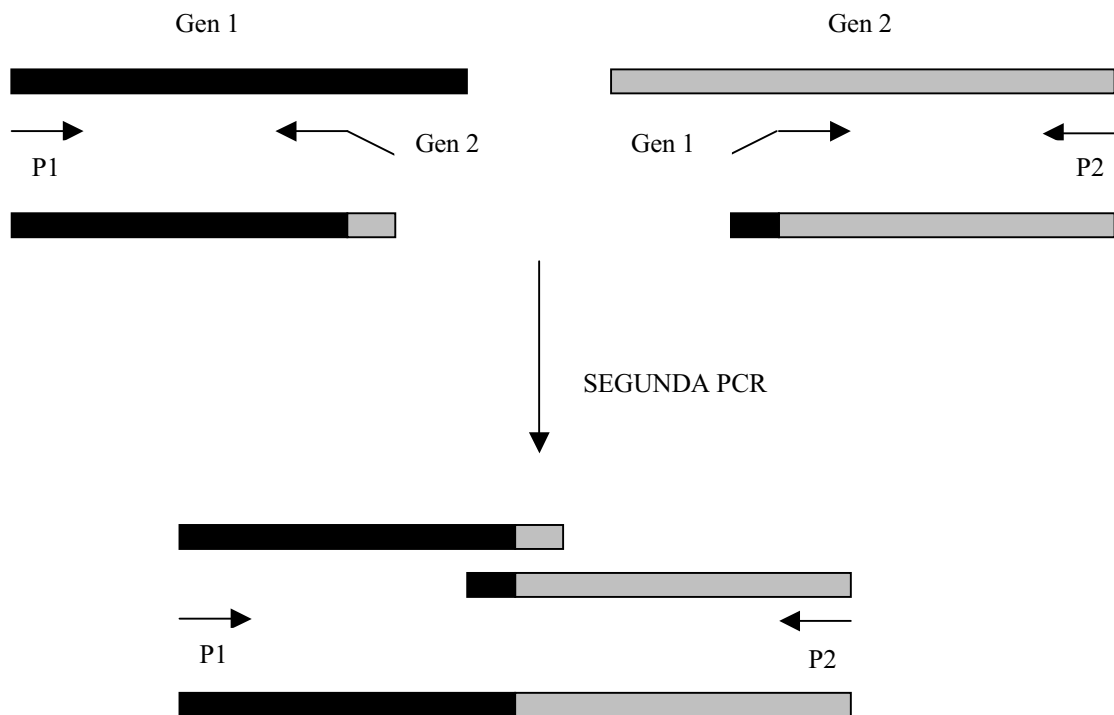
2.6.4.1.- Técnica del “mega-primer” PCR

(Sarkar y Sommer, 1990)

Técnica utilizada para la construcción de una proteína híbrida (Hha-HNS).

Para ello se procedió primero a la amplificación mediante PCR (apartado 2.6.4.) de la zona de cada gen que interesaba unir. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar estas regiones y que además tenían que definir la zona de unión entre ambas, contenían por una parte, la secuencia necesaria para amplificar el fragmento de interés y, por otra, incluían unos pocos nucleótidos de la secuencia perteneciente al fragmento del otro gen a amplificar. De esta forma, los dos fragmentos tenían una zona común por la cual eran capaces de hibridar y fueron utilizados como “mega-primer” para poder realizar la construcción de la proteína híbrida, mediante una segunda reacción de PCR.

En esta segunda PCR se hacía una mezcla de reacción como la descrita en el apartado anterior (2.6.4.) pero con unas pequeñas modificaciones, el molde en este caso fueron los dos fragmentos obtenidos en la anterior PCR y no se añadieron los oligonucleótidos hasta el ciclo 15 para permitir la hibridación de estos fragmentos. Los oligonucleótidos pertenecían al extremo de cada gen de manera que la PCR amplificaba ambos genes juntos.



2.6.5.- SECUENCIACIÓN

El ADN se secuenció por el método de Sanger (Sanger y Coulson, 1975), basado en la síntesis y terminación con dideoxynucleótidos, mediante ciclos de PCR. Se utilizó el “Kit” ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 2.0 (Biosystems), el cual proporciona una mezcla de reacción que contiene la polimerasa termoestable, los dideoxynucleótidos no marcados y marcados con un colorante y el tampón necesario para la reacción de secuenciación. Se utilizaron como ADN molde productos de amplificación previamente purificados (Wizard[®] DNA Clean-up System de Promega), o ADN plasmídico aislado con el “kit” Wizard[®] Plus SV Midipreps de la casa comercial Promega.

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

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

El programa de PCR utilizado fue:

96 °C	1'	
96 °C	Desnaturalización	10''
50 °C	Hibridación	30''
60 °C	Extensión	4'
72 °C		7'

} 25 ciclos

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

Las secuencias de ADN y de proteínas se obtuvieron del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) y European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk), además fueron analizadas localmente con programas GCG de la plataforma UNIX (adam.ird.ub.es). El programa Boxshade (www.embnet.org) fue utilizado para la visualización de alineamientos.

2.6.6.- RECOMBINACIÓN DE PROTEÍNAS INDEPENDIENTE DE SECUENCIA (SIPR)

Este método fue utilizado para construir una colección aleatoria de proteínas híbridas y se basa en el protocolo descrito por Sieber *et al.*, 2001 con algunas modificaciones.

En primer lugar se amplificaron mediante PCR (apartado 2.6.4.) los genes que se querían unir, dejando una gran distancia en la zona que no se ha de degradar. A continuación estos fragmentos fueron sometidos a una degradación a través de la nucleasa Bal31 (New England BioLabs). Siguiendo las instrucciones de la casa comercial se mezclaron:

50 μ l fragmento PCR
50 μ l buffer
2'5 μ l Bal31

Durante 15 minutos se sacó muestra cada minuto (5 μ l) y se pasó a un tubo con 20 μ l de EDTA 0'5 M para parar la reacción. A continuación se purificó la muestra (Wizard[®] DNA Clean-up System de Promega) y se hizo un tratamiento con Klenow (Promega) para rellenar los extremos, que quedasen romos y poder ligarlos mediante la T4 ligasa (USB), en ambas enzimas siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

2.6.7.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

(Sambroock, *et al.*, 1989)

El ADN se analizó mediante la electroforesis en geles horizontales de agarosa (Pronadisa), a concentraciones del 0'8 % al 2 % (en función del tamaño de los fragmentos a analizar) en tampón TBE x 0'5 y una posterior tinción en una solución de bromuro de etidio para su visualización por fluorescencia.

2.6.7.1.- Electroforesis en geles de agarosa

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

TBE x 5		Tampón de muestras x 5	
Tris (Roche)	pH 8'0, 450 mM	Tris (Roche)	pH 8'0, 10 mM
Ácido Bórico (Fluka)	450 mM	EDTA	1 mM
EDTA (Merck)	10 mM	Glicerol (Panreac)	60%
		Azul de bromotimol (Bio-Rad)	0'25 %
		Xilen cianol (Bio-Rad)	0'25 %

2.6.7.2.- Marcadores de tamaño molecular

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

Marcadores de tamaño molecular	
Tipo	Tamaño de los fragmentos (pares de bases)
Fago λ / <i>HindIII</i> (Promega)	23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 564, 125
Fago ΦX174 / <i>HaeIII</i> (Promega)	1.353, 1.078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72
100 bp ladder (Biotools)	1.031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80

2.6.7.3.- Tinción con bromuro de etidio

Para visualizar el ADN en los geles de agarosa, después de la electroforesis, se realizó una tinción con bromuro de etidio (Merck). El gel se sumergió durante 15-30 minutos en una solución de bromuro de etidio preservada de la luz y preparada en tampón TBE x 0'5 a una concentración de 0'5 µg/ml. Esta solución se preparó a partir de una

solución madre concentrada a 10 mg/ml, que se conservó a 4 °C, también preservada de la luz.

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

2.6.8.- AISLAMIENTO DE BANDAS DE ADN DE GELES DE AGAROSA: ELECTROELUCIÓN

Este método fue utilizado cuando era necesario purificar un determinado fragmento de ADN, producto de una restricción o de una PCR

Una vez se desarrolló la electroforesis en geles de agarosa y se tiñeron los geles en bromuro de etidio (apartados 2.6.7.1. y 2.6.7.3.), se recortó la banda del tamaño adecuado visualizándola con la ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta de baja intensidad y elevada longitud de onda (UVL-56, BLACK-RAY[®] LAMP) para no dañar el ADN. Una vez obtenido el bloque de agarosa, se colocó dentro de la membrana de diálisis de celulosa (Sigma), tratadas tal y como se describe en la bibliografía (Sambrook *et al.*, 1989). Después de introducirlo en la membrana, se llenó con TE y se cerró con pinzas por los extremos evitando que quedaran burbujas de aire.

Los sacos de diálisis se introdujeron en una cubeta de electroforesis horizontal de forma que quedaron totalmente cubiertas con TBE x 0'5 y se sometieron a un campo eléctrico durante 60-90 minutos a 5 V/cm. Transcurrido ese tiempo, suficiente para que el ADN salga del bloque de agarosa y quede en la membrana, se hizo una inversión de corriente durante 10 segundos para despegar el ADN de la membrana y poder recoger el tampón contenido en el saco de diálisis. Finalmente se procedió a la fenolización y precipitación del ADN (apartado 2.6.1.1.2.) o con el "Kit" Wizard[®] DNA Clean-up System de Promega.

2.6.9.- CUANTIFICACIÓN DEL ADN

En algunos casos el ADN fue cuantificado y comprobado su pureza a través de la medida espectrofométrica. Se realizó una dilución 1:200 del ADN a cuantificar en 1 ml de

agua bidestilada y se midió la absorbancia a 260 y 280 nm. La cantidad de ng/ μ l se obtenía a través de la siguiente fórmula:

$$50 \times [\text{D.O. } 260 \text{ nm}] \times \text{Dilución}$$

La relación entre $260/280 > 1,8$ nos indica que hay poca cantidad de proteína.

2.6.10.- ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ADN-PROTEÍNA: ENSAYOS DE RETARDO EN GEL

Los ensayos de retardo en gel de agarosa nos permitieron observar si existe interacción entre ADN-proteína, el sistema se basa en que el ADN cuando se encuentra unido a proteína presenta una migración diferente (más lenta) a cuando se encuentra solo.

La mezcla de diferentes cantidades de ADN y proteína se realizó utilizando los tampones adecuados (en este caso, debido a las proteínas utilizadas, se utilizaron tampón H-NS x 10, tampón Hha x 5 y tampón de unión x 10) y llegando a un volumen final de 20 μ l.

Mezcla de reacción (μl)	
H ₂ O	Hasta 20 μ l
Tampón H-NS x 10	1 – 0'1 μ l por cada μ l de H-NS utilizado
Tampón Hha x 5	2 – 0'1 μ l por cada μ l Hha o Híbrida utilizado
Tampón de unión x 10	2
EDTA 0'5 M pH 8'0	2
ADN	1
H-NS	De 1 – 14
Híbrida	De 1 - 14
Hha	De 1 - 14

2.7.- ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DEL ARN

2.7.1.- EXTRACCIÓN DE ARN CELULAR TOTAL

La extracción de ARN total de una célula bacteriana (en este caso de *E. coli*) se realizó utilizando el kit de la casa comercial Quiagen “RNeasy® Mini Kit” siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Cultivos en medio LB de las diferentes cepas a estudiar se dejaron crecer hasta una DO_{600} de 0'5 (fase exponencial) para a continuación proceder al aislamiento del ARN.

2.7.2.- CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DEL ARN

El ARN fue cuantificado a través de una medida espectrofotométrica siguiendo el mismo proceso descrito para la cuantificación del ADN (apartado 2.6.9.). La concentración de ARN se calculaba teniendo en cuenta que:

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

Además mediante esta medida se puede obtener una idea de la pureza del ARN:

- Si la relación $DO_{260} / DO_{280} < 2$, indica que hay contaminación con proteínas o fenol y no se puede realizar una cuantificación precisa.
- Si la relación $DO_{260} / DO_{280} = 2$, proporciona una estima de la pureza del RNA y permite calcular la concentración del RNA presente en la muestra.

2.7.3.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA Y TINCIÓN CON BROMURO DE ETIDIO

Para a la realización de la electroforesis de ARN y posterior tinción de los geles, se siguió exactamente el mismo procedimiento que el descrito para el ADN (apartado 2.6.7) pero teniendo algunas precauciones para evitar la contaminación con posibles RNasas y por tanto la degradación del ARN: la cubeta de electroforesis se limpió con SDS al 0'1 % y el TBE x 0'5 se esterilizó en el autoclave. El tanto por ciento de agarosa de los geles utilizado fue del 2 %.

2.7.4.- ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL ARN POR RT-PCR

El ARN aislado tal y como se describe en el apartado anterior (y que contiene el ARN procedente de la transcripción del gen de estudio) fue retro-transcrito a ADN copia (ADNc) con la transcriptasa inversa de M-MuLV y posteriormente este ADNc fue amplificado por PCR.

2.7.4.1.- Digestión con DNasa I

Antes de realizar la retrotranscripción, el ARN obtenido tal y como se describe en el apartado 2.7.1. fue tratado con DNasa I libre de RNasa 1 unidad / μl (Amersham Pharmacia), para eliminar el ADN de las muestras.

Se añadieron 10 unidades de DNasa a 50 μl de muestra que se llevaron a un volumen final con agua bidestilada estéril de 600 μl (Milli-Q_{plus}, Millipore). La mezcla fue incubada durante 1 h a 37 °C. A continuación, se eliminó el enzima de la muestra a través de la fenolización con fenol ácido.

Se añadió en primer lugar, 1 volumen de fenol ácido, después $\frac{1}{2}$ de volumen de fenol ácido más $\frac{1}{2}$ de volumen de cloroformo y finalmente 1 volumen de cloroformo. En cada uno de estos tres pasos se mezcló la fase acuosa y la orgánica hasta conseguir una emulsión y se centrifugó (16.000 xg, 2 minutos) para separar las dos fases y recoger la fase acuosa que era dónde se encontraba el ARN.

Una vez obtenida la muestra libre de ADN, se procedió a la precipitación del ARN añadiendo 2 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de volumen de Acetato de amonio 2'5 M

y llevando la mezcla a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó ($16.000\text{ }xg$, 10 minutos) y se lavó con $100\text{ }\mu\text{l}$ de etanol 70% . El precipitado obtenido se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en $50\text{ }\mu\text{l}$ de agua bidestilada (Milli-Q_{plus}, Millipore) estéril.

Preparación del fenol ácido: A partir 20 ml de fenol (Sigma) se realizaron de 3 a 4 lavados con Acetato sódico 0.2 M pH 5.2 (ajustado con ácido acético glacial). El fenol ácido se guardó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.7.3.2.- RT-PCR

En primer lugar se realizó la dilución de las muestras de ARN a la concentración adecuada en cada caso. A continuación, todas las muestras diluidas fueron incubadas durante 5 minutos a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para eliminar las posibles estructuras secundarias del ARN. Las muestras fueron después mantenidas en hielo hasta el momento de ser utilizadas.

Las cantidades utilizadas para cada reacción se describen a continuación:

RT-PCR	
Composición	Cantidad
Ready-to-Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences)	1 bola
Oligonucleótido RT ($10\text{ pmol} / \mu\text{l}$)	$2\text{ }\mu\text{l}$
Oligonucleótido PCR ($10\text{ pmol} / \mu\text{l}$)	$2\text{ }\mu\text{l}$
RNA	$2\text{ }\mu\text{l}$
H ₂ O Milli-Q*	Hasta $50\text{ }\mu\text{l}$

*Añadir el agua en primer lugar hasta que la bola deshidrata se disuelva y a continuación añadir el resto de componentes.

El programa de RT-PCR utilizado fue:

- Para el gen 16S

$42\text{ }^{\circ}\text{C}$	$60'$	
$95\text{ }^{\circ}\text{C}$	$5'$	
$95\text{ }^{\circ}\text{C}$ Desnaturalización	$30''$	} 40 ciclos
$58\text{ }^{\circ}\text{C}$ Hibridación	$40''$	
$72\text{ }^{\circ}\text{C}$ Extensión	$1'$	
$72\text{ }^{\circ}\text{C}$	$10'$	
$4\text{ }^{\circ}\text{C}$	∞	

- Para el gen *stpA*

42 °C	60'
95 °C	5'
95 °C Desnaturalización	30''
54 °C Hibridación	40''
72 °C Extensión	30''
72 °C	10'
4 °C	∞

40 ciclos

Para asegurarnos que la muestra no contenía contaminación por ADN se realizaron los correspondientes controles con cada una de las muestras. Para ello en primer lugar se añadió el agua correspondiente a la bola deshidratada y una vez disuelta se incubó durante 10 minutos a 95 °C y de esta forma se inactivó la transcriptasa inversa. A continuación se añadieron el resto de componentes a la reacción y se procedió igual que con las muestras problema.

Una vez finalizada la reacción se analizaron 10 µl de cada una de las muestras por electroforesis en gel de agarosa al 2 % y tinción en bromuro de etidio (apartado 2.6.7.).

2.8.- ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

2.8.1.- PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

2.8.1.1.- Inducción de la expresión de proteínas

La sobreexpresión de proteínas se realizó a través de la construcción de plásmidos recombinantes que incluyen el gen de interés clonado bajo el promotor de la RNA polimerasa de T7 (Studier *et al*, 1990). En este trabajo se utilizaron vectores de expresión de la serie pET3b y pET15b que fueron introducidos por transformación en las cepas hospedadoras. Estas cepas contienen el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control de un promotor inducible por IPTG (isopropyl-β-D-galactopyranoside).

Las cepas utilizadas fueron BL21 (DE3) pLysE o pLysS y su derivada BL21 (DE3) Δ*hns* Km^r también portadora de los plásmidos pLysE o pLysS. Estos plásmidos tienen el gen de la lisozima de T7 clonado y fueron utilizados cuando fue necesario disminuir los

efectos letales causados por la inducción del gen clonado bajo el promotor de T7 de la polimerasa.

Las colonias resultantes de la transformación fueron recogidas con LB y utilizadas como inóculo en 1 litro de LB (Ap50, Cm50). El cultivo fue incubado a 30 °C o 37 °C hasta una DO₆₀₀ de 1'0, en este punto se añadió IPTG (Promega) para obtener una concentración final en el medio de 0'5 mM. En el caso de los plásmidos derivados de pET3b, pasadas 2-3 horas desde el momento de la inducción, las células fueron recogidas por centrifugación (5.000 xg, 15 minutos) y se resuspendieron en 20 ml de tampón A. En el caso de los derivados de pET15b, la inducción se realizó O/N a 16 °C.

Tampón A	
Hepes	pH 7'9 ^(a) , 20 mM
Glicerol	10 %
KCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM
Imidazol	20 mM

(a) pH ajustado con KOH

2.8.1.2.- Obtención de extractos celulares.

Para la obtención de un extracto celular clarificado que contenga gran cantidad de la proteína inducida, se procedió a la lisis celular de la suspensión obtenida en el apartado anterior. Para ello se realizaron 3 pases del cultivo inducido a través de la French press (French[®] Pressure Cell Press, SLM AMINCO[®]) a 1.000 psi. A continuación el extracto fue centrifugado (12.000 xg, 30 minutos, 4 °C) para eliminar los restos de membranas, etc. y de esta forma obtener un extracto soluble.

Extractos solubles de cultivos no inducidos de *E. coli* o *Y. enterocolitica* fueron obtenidos de forma equivalente.

2.8.1.3.- Purificación por Ni²⁺-NTA agarosa

(Hochuli *et al.*, 1988)

Para la purificación de proteínas a las cuales se les había añadido una cola de 6 histidinas, después de la obtención del extracto, se utilizó el método de inmovilización por cromatografía de afinidad a metales.

El extracto obtenido tal y como se describe en el apartado anterior fue mezclado con 0'5 o 1 ml de resina de Ni²⁺-NTA agarosa (Quiagen) y se dejó en agitación durante 2 horas a 4 °C. Transcurrido este tiempo se centrifugó y concentró la resina en sucesivos pases hasta llegar a un volumen final de 1 ml. A continuación la proteína fue extraída de la matriz a través de varios pasos de lavados con tampón A conteniendo concentraciones crecientes de imidazol (5 de 1ml de 50 mM, 2 de 1ml de 100 mM y 2 de 1 ml de 200 mM). Las fracciones fueron guardadas a – 20 °C y analizadas posteriormente mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (apartado 2.8.3.1.)

En algunos casos en la purificación de proteínas tal y como se ha descrito, co-purifican otras proteínas. Para disociar estas proteínas que co-purifican, se realizaron, previamente a los lavados de elución, unos lavados con concentraciones crecientes de KCl (0'5 M, 1 M y 2M) y en ausencia de imidazol. Las fracciones fueron guardadas a – 20 °C y analizadas en geles de poliacrilamida (apartado 2.8.3.1.) igual que en el caso anterior.

2.8.2.- VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD (Microensayo).

(Bradford, 1976)

Para determinar la cantidad de proteína presente en una muestra, se utilizó el reactivo de Bio-Rad “Protein Assay Dye Reagent Concentrates”. Se siguió el procedimiento indicado por la casa comercial basado en el método descrito por Bradford, 1976, aprovechando la afinidad que presentan las proteínas por el azul de Coomassie.

Se preparó una solución concentrada de BSA (Boehringer Mannheim) a 25 mg/ml. A partir de esta solución madre se preparó un banco de diluciones en agua a 25, 12'5, 6'25, 3'125 y 1'56 (µg/ml). La recta patrón se construyó por duplicado a partir 0'8 ml de estas diluciones a las cuales se añadió 0'2 ml de reactivo, de forma que la cantidad de proteína

total de cada una de las diluciones pasó a ser de 20, 10, 5, 2'5 y 1'25 (μg) respectivamente. Para valorar las muestras se mezclaron entre 5 y 25 μl de éstas más 0'2 ml de reactivo Bradford y se completó el volumen hasta 1 ml con agua bidestilada.

A continuación se realizó la medida de DO_{595} tanto de la recta patrón como de las muestras. El valor de DO_{595} de la muestra problema se extrapoló a la recta patrón y se extrajo el valor correspondiente de μg de proteína. Este valor se dividió por el volumen (μl) de la muestra utilizado en el ensayo y se obtuvo de esta forma la concentración de proteína de la muestra problema ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

2.8.3.- TÉCNICAS DE ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

2.8.3.1.- Geles de poliacrilamida

Las proteínas de una muestra se separaron en función de su peso molecular a través de la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, utilizando generalmente el equipo MINI-PROTEAN IITM (Bio-Rad), que permite obtener geles verticales de 7'3 cm de altura, 8 cm de ancho y 0'75 o 1'5 mm de grosor.

2.8.3.1.1.- Geles de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS

(Laemmli, 1970)

Este tipo de geles están formados por dos tipos de fases cuya función y composición son diferentes: la fase de compactación y la fase de resolución (donde se produce la separación efectiva de las proteínas). La primera fase ocupa $\frac{1}{4}$ parte del gel y contiene un 5 % de poliacrilamida, mientras que en la fase de resolución el porcentaje oscila entre un 10-15 % en función de las proteínas que se quieran separar, siendo el 12'5 % el más utilizado en este trabajo.

	Geles de poliacrilamida	
	Fase de resolución 12'5 %	Fase de compactación 5 %
Acrilamida/Bis 30'8 %T, 2'6 %C	2'5 ml	0'8 ml
Tampón de resolución x 4	1'5 ml	-
Tampón de compactación x 4	-	1'25 ml
Agua bidestilada	2 ml	2'92 ml
APS 10%	30 μ l	35 μ l
TEMED (Bio-Rad)	5 μ l	10 μ l

%T: Porcentaje de acrilamida + bisacrilamida

%C: Porcentaje de bisacrilamida respecto al total (T)

Para preparar el gel, primero se añadió la fase de resolución entre los vidrios de soporte del gel y se recubrió con agua destilada, para facilitar que la poliacrilamida polimerizase formando una superficie superior horizontal. A continuación se eliminó el agua destilada y sobre la fase de resolución se añadió la fase de compactación, colocando el peine que definiría los pocillos de carga antes de que ésta polimerizase. Una vez polimerizado, se quitó el peine, se lavaron los pocillos con agua destilada para eliminar restos de poliacrilamida y se colocaron en la cubeta de electroforesis con el tampón de recorrido.

Las muestras antes de ser cargadas fueron incubadas de 5 a 10 minutos a 100 °C con el tampón de carga de proteínas x 4. (se añade $\frac{1}{4}$ del volumen total). Una vez cargadas las muestras con una microjeringa (Hamilton), se aplicó un voltaje de 50 V hasta que todas las muestras se alinearon en la fase de compactación, seguidamente se aplicó un voltaje de 120 V hasta el final de la electroforesis.

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

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

Ajustar a pH 8'8

Tampón de resolución x 4	
Tris (Roche)	0'5 M
SDS (Merck)	0'4 %

Ajustar a pH 6'7

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

Ajustar a pH 6'8

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

pH 8'3 (no ajustado)

Acrilamida/Bis-acrilamida 30'8 % T, 2'6 % C: Se disolvieron 30 g de acrilamida (Bio-Rad) más 0'8 g de Bis-acrilamida (Bio-Rad) en 100 ml de agua bidestilada. La solución fue filtrada con papel de filtro y a continuación se guardó a 4 °C protegiéndola de la luz.

Solución de APS al 10 %: Se preparó en el momento de ser utilizada una solución de APS (Bio-Rad) en agua destilada a una concentración de 100 mg/ml.

2.8.3.1.2.- Geles de poliacrilamida en Tris-Tricina-SDS

(Schägger y von Jagow, 1987)

Las electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida en Tris-Tricina-SDS se utilizaron para separar con más resolución aquellas proteínas de un peso molecular entre 5-70 Kilodaltons (kDa). Este tipo de geles constan de 3 fases, una fase de compactación del 4 %, una fase espaciadora del 10 % y una fase de resolución del 16 %; la primera y la segunda fase ocupan $\frac{1}{4}$ parte del gel cada una, mientras que la última ocupa la segunda mitad del gel.

La preparación del gel así como el tratamiento de las muestras siguió el mismo procedimiento que el descrito en el apartado anterior (2.8.3.1.1.) para los geles de poliacrilamida Tris-Glicina-SDS, pero varía la composición de los tampones y la acrilamida utilizada que se detallan a continuación:

	Fase de resolución 16'5 % T, 3 % C	Fase espaciadora 10 % T, 3 % C	Fase compactadora 4 % T, 3 % T
Acrilamida/Bis 49 % T, 3 % C	1 ml	0'3 ml	0'15 ml
Tampón de gel	1 ml	0'5 ml	0'45 ml
Glicerol 50 %	0'8 ml	-	-
Agua bidestilada	0'2 ml	0'7 ml	1'26 ml
APS 10 %	20 μ l	10 μ l	15 μ l
TEMED	4 μ l	2 μ l	3 μ l

%T: porcentaje de acrilamida + Bisacrilamida total

%C: porcentaje de bisacrilamida respecto a la concentración total (T).

Tampón de recorrido			
Tampón del ánodo		Tampón del cátodo	
Tris (Roche)	0'2 M	Tris (Roche)	0'1 M
		Tricina (Bio-Rad)	0'1 M
		SDS (Merck)	0'4 %
Ajustar a pH 8'9		pH 8'25 (no ajustado)	

Tampón de gel x 3	
Tris (Roche)	3 M
SDS (Merck)	0'3 %
Ajustar a pH 8'45	

Acrilamida/Bis-acrilamida 49'5 % T, 3 % C: Se disolvieron 48 g de acrilamida (Bio-Rad) más 1'5 g de Bis-acrilamida (Bio-Rad) en 100 ml de agua bidestilada. La solución fue filtrada con papel de filtro y a continuación se guardó a 4 °C protegiéndola de la luz.

2.8.3.2.- Marcadores de tamaño molecular

Se utilizaron dos tipos de marcadores de tamaño molecular:

- SDS-PAGE Standard, Low Range de Bio-Rad. Mezcla de proteínas de entre 14'5 y 97'4 kDa.
- Pre-stained SDS-PAGE Standard, Broad Range de Bio-Rad. Mezcla de proteínas pre-teñidas de entre 6'4 a 198 kDa aproximadamente. Este marcador se utilizó sobretodo en el caso de que las proteínas fuesen transferidas a membrana debido a que además de servir como marcador de tamaño molecular, también servía como control de la transferencia. Cuando se utilizó este marcador, se tenía que tener presente que los pesos que indicados son orientativos, ya que el tamaño molecular puede variar según el lote debido a la reacción de tinción realizada por el fabricante.

Marcadores de tamaño molecular	
Tipo	Tamaño de las proteínas (kDa)
Low Range	97'4, 66'2, 45, 31, 21'5, 14'4
Pre-stained, Broad Range	206, 117, 79, 48, 34'7, 28'6, 21'3, 7'6

2.8.3.3.- Tinción de proteínas con Azul de Coomassie

La tinción se realizó incubando los geles durante un mínimo de 30 minutos y un máximo de 12 horas en la solución de tinción y en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente el gel se destiñó a través de una serie de lavados con una solución de ácido acético glacial (Panreac) 10 %, de manera que quedasen teñidas únicamente las proteínas.

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

Filtrar la solución con papel de filtro

2.8.4.- INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS TRANSFERIDAS A MEMBRANA (Western blot)

(Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981)

Las proteínas una vez separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (apartado 2.8.3.1.) fueron transferidas a un soporte sólido para permitir su posterior inmunodetección a través de anticuerpos específicos. Esta técnica de inmunodetección de proteínas recibe el nombre de “Western blotting”.

2.8.4.1.- Electrotransferencia de proteínas a membrana

Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa de 0'45 μm (Bio-Rad), en un proceso que utiliza el sistema de transferencia semi-seco y el aparato de transferencia Trans-Blot[®] Semi-dry Transfer Cell de Bio-Rad[®].

Tanto el minigel de poliacrilamida como la membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) fueron equilibrados en tampón de transferencia durante un mínimo de 15 minutos.

Para el montaje de la transferencia, se depositó el gel de poliacrilamida sobre la membrana de nitrocelulosa y el conjunto se colocó entre papeles de filtro (Whatman 3 MM) mojados con el mismo tampón (3 por cada lado). Durante todo el montaje de la

transferencia se vigiló que no quedara aire entre los componentes. Finalmente todo el bloque se colocó entre el cátodo y el ánodo del aparato y se procedió a la transferencia de las proteínas aplicando un voltaje de 15 V durante 30 minutos. En los casos en los que el gel de poliacrilamida fue más grueso, el tiempo de transferencia se aumentó a unos 45-90 minutos.

Tampón de transferencia	
Tris (Roche)	48 mM
Glicina (Fluka)	39 mM
Metanol (Merck)	20 %
SDS (Merck)	1'3 mM

pH 9'2 (no ajustado)

2.8.4.2.- Revelado de membranas por fosfatasa alcalina

Todos los lavados e incubaciones de la membrana se realizaron a temperatura ambiente y en una agitación suave y constante.

Después de la transferencia, la membrana de nitrocelulosa fue sumergida en tampón de bloqueo durante 45 minutos para bloquear los posibles lugares de unión inespecífica. Transcurrido ese tiempo, se realizó la incubación con el anticuerpo primario contra la proteína que se quería detectar. Para ello el anticuerpo se diluía en 10 ml de tampón de bloqueo y se incubó sobre la membrana en agitación durante 1 hora. Para eliminar el posible exceso de anticuerpo unido inespecíficamente, se realizaron 3 lavados con tampón de bloqueo de 10 minutos cada uno. A continuación la membrana se incubó de nuevo durante 30 minutos con el anticuerpo secundario (conjugado con fosfatasa alcalina) diluido también en tampón de bloqueo. En este caso el exceso de anticuerpo secundario fue eliminado a través de 3 lavados de 10 minutos con tampón de revelado (10 ml), estos lavados servían al mismo tiempo para equilibrar la membrana en este tampón y a continuación proceder a la realización de la reacción colorimétrica.

En este momento se procedió al revelado propiamente dicho, se incubó la membrana a temperatura ambiente con 10 ml de tampón de revelado a los que se le añadió 200 µl de solución del sustrato cromogénico NBT/BCIP (4-Nitroblue tetrazolium chloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate;Roche). La incubación se siguió en estático y protegida de la luz para permitir la reacción colorimétrica catalizada por la

fosfatasa alcalina. Una vez se detectaron las bandas con la intensidad adecuada, se paró la reacción lavando la membrana con agua destilada y finalmente se secó para su conservación.

Tampón de bloqueo	
Tris (Roche)	10 mM
NaCl (Panreac)	500 mM
Tween-20 (Merck)	0'5 %
Azida sódica (Merck)	0'02 %

Ajustar a pH 8'2

Tampón de revelado	
Tris (Roche)	100 mM
NaCl (Panreac)	100 mM
MgCl ₂ (Merck)	50 mM

Ajustar a pH 9'5

A continuación se detallan los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este trabajo.

Anticuerpos primarios				
Anticuerpo	Antígeno	Dilución de trabajo	Origen	Referencia
Anti-Hha # 1	Hha	1:1.000	Conejo	Balsalobre <i>et al.</i> , 1996
Anti-H-NS	H-NS	1:10.000	Conejo	Cedido por el Dr. B. Eric Uhlin (Umea University, Suecia)

Anticuerpo secundario					
Anticuerpo	Enzima conjugado	Antígeno	Dilución de trabajo	Origen	Referencia
Anti-Rabbit IgG	Fosfatasa alcalina	IgG de conejo	1:5.000	Cabra	Chemicon

2.8.5.- PREPARACIÓN DE PROTEÍNAS PARA EL MÉTODO DE DEGRADACIÓN DE EDMAN

La degradación de Edman es un proceso utilizado tradicionalmente para obtener la secuencia de aminoácidos en proteínas. Esta técnica, a través de una reacción química, permite digerir uno a uno los aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína de interés. La degradación de Edman puede obtener con facilidad hasta 20 aminoácidos de este extremo y su orden.

2.8.5.1.- Transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF

Se llevo a cabo la separación de la proteína por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizantes preparados como se describió anteriormente (apartado 2.8.3.1.2.), pero la acrilamida utilizada fue desionizada. Se siguieron las recomendaciones habituales (Packman, 1993).

Antes de cargar las muestras en el gel, se hizo un pre-corrída a 120 V durante 20 minutos añadiendo al tampón de recorrido ácido mercaptoacético o ácido tioglicólico (Panreac) a una concentración final 2 mM. A continuación se cargo la muestra y se desarrollo la electroforesis.

Posteriormente las proteínas fueron transferidas (apartado 2.8.4.1.) del gel a una membrana de PVDF (Sequi-blot PVDF Membrana para secuenciación de proteínas, 0'2 µm, Bio-Rad). La membrana fue previamente tratada 5 minutos con metanol y otros 5 minutos más con tampón de transferencia (composición también detallada en el apartado 2.8.4.1.).

Después de la transferencia se hicieron 3 lavados de 10 minutos en agua bidestilada y una vez finalizados los lavados se tiñó el gel durante 5 minutos con la solución de Coomassie A:

Solución de Coomassie A	
Azul brillante de Coomassie [®] R-250 (Fluka)	0'1 %
Metanol (Merck)	50 %

Para desteñir la membrana parcialmente se realizó un lavado con solución de distinción, de manera que se pudiera/n observar la/las banda/s que se querían recortar, pero que no se destiñera del todo.

Solución de distinción	
Metanol (Merck)	50 %
Ácido acético glacial (Panreac)	10 %

A continuación se dejó secar la membrana al aire y se recortó la banda de la proteína a secuenciar con una hoja de bisturí. Este fragmento se podía guardar en un tubo tipo Eppendorff a - 20 °C hasta el momento de la secuenciación.

Desionización de la acrilamida: A partir de una solución de acrilamida recién preparada como se describe en el apartado 2.8.3.1.2, se le añadió una resina de intercambio iónico AG 501-X8(D) (Bio-Rad) al 5 %. La mezcla se dejó 2 horas en agitación a temperatura ambiente y una vez transcurrido este tiempo se filtró utilizando papel de filtro.

2.8.5.2.- Secuenciación N-terminal

La secuenciación N-terminal por degradación de Edman fue realizada por el Dr. Francesc Canals en el servicio de Proteómica y de Bioinformática del Instituto de Biotecnología y de Biomedicina “Vicent Villar i Palasí” de la UAB.

Una vez secuenciados los aminoácidos del extremo N-terminal, se utilizaba la secuencia obtenida para realizar una búsqueda de homologías en bases de datos y para la identificación de la proteína.

2.8.6.- VALORACIONES ENZIMÁTICAS

2.8.6.1.- Valoración de la actividad hemolítica en la fracción externa.

A partir de un cultivo de toda la noche de la cepa hemolítica, se realizó una dilución 1/100 en 100 ml de LB y se dejó crecer en las condiciones adecuadas hasta una DO_{600} de 0'4 y 0'8. A continuación se centrifugó 1 ml de cultivo (3.000 xg, 5 minutos) y se recogieron alícuotas del sobrenadante de 10, 50 y 200 μ l que se ajustaron a 200 μ l con medio LB. A la mezcla se le añadieron 1200 μ l de una solución de eritrocitos previamente lavados. También se realizó un control en el cual se mezclaron 200 μ l de LB con 1200 μ l de eritrocitos lavados.

Las mezclas se incubaron durante 1 hora a 37 °C sin agitación y transcurrido ese tiempo se centrifugaron (14.000 xg, 30 segundos). La hemoglobina liberada por la lisis de los eritrocitos fue cuantificada a través de la medida del aumento de DO_{543} respecto al control.

La fórmula utilizada para el cálculo de las unidades de actividad hemolítica externa de hemólisis fue:

$$\text{Unidades de hemólisis} = \frac{(\text{DO}_{543\text{nm}} - \text{DO}_{543\text{nm control}}) \times 1000}{\text{DO}_{600\text{nm}} \times t \times V}$$

t: Tiempo de incubación a 37 °C, expresado en minutos

V: Volumen de sobrenadante de la muestra incubado, expresado en ml

Solución de eritrocitos: Se partió de 3 ml de sangre desfibrinada de carnero (Oxoid) que se centrifugaron (12.000 xg, 30 segundos) y se resuspendieron en el mismo volumen de una solución de NaCl 0'9 % frío. Este proceso se repitió 3 o 4 veces hasta que el sobrenadante descartado quedó transparente. Finalmente, a los 3 ml de eritrocitos lavados se les añadió 60 ml de NaCl 0'9 % y 10 ml CaCl₂ 200 mM fríos. Esta suspensión se mantuvo en hielo hasta el momento de ser utilizada.

2.8.6.2.- Determinación de la actividad CAT (Cloranfenicol acetil transferasa)

La valoración de la actividad CAT se realizó a partir de extractos celulares siguiendo el procedimiento descrito por Rodríguez y Tait (1983), pudiéndose diferenciar dos fases en todo el proceso: obtención de extractos celulares y medida de la actividad CAT de los extractos.

2.8.6.2.1.- Preparación del extracto celular

Se realizó una dilución 1:100 de la cepa a ensayar, inoculándola en medio LB suplementado con los antibióticos necesarios excepto el cloranfenicol e incubando en las condiciones adecuadas hasta alcanzar la DO₆₀₀ deseada.

Se recogieron 3 ml del cultivo bacteriano y se centrifugaron (3.000 xg, 10 minutos), a continuación se resuspendieron las células en 1 ml de tampón TDTT y se volvieron a centrifugar (14.000 xg, 3 minutos, 4 °C) resuspendiendo en 300 µl de TDTT. A partir de este punto todas las manipulaciones se realizaron en hielo.

Las células se rompieron por sonicación (sonicador Labsonic 1510, Braun) a 90 W durante intervalos hasta que la suspensión quedó clarificada. Posteriormente se centrifugó la muestra (14.000 xg, 15 minutos, 4 °C) para eliminar los restos celulares y el sobrenadante constituyó la muestra para el ensayo. Ésta suspensión fue mantenida en hielo hasta el momento del ensayo (menos de 12 horas) o congelada a – 20 °C (en este caso la actividad CAT se mantiene hasta 1 mes).

Tampón TDTT	
Tris-HCl	pH 7'8, 50 mM
1,4-Dithiothreitol (Boehringer Mannheim)	30 µM

2.8.6.2.2.- Ensayo de la actividad CAT

En una cubeta de cuarzo de 1 ml se añadieron 588 µl de la mezcla de reacción y se ajustó a cero la absorbancia a una longitud de onda de 412 nm (Espectrofotómetro modelo DU[®] 640, Beckman CoulterTM). Se añadieron 20 µl de la muestra del extracto crudo (obtenido como se explica en el apartado anterior) a la cubeta, se agitó por inversión y se siguió la variación de la DO₄₁₂ durante 2 minutos. Si transcurrido este tiempo para medir la acetilación residual ésta era constante, se añadieron 12 µl de Cm 5 mM y se agitó por inversión. A continuación se siguió el aumento de DO₄₁₂ durante 5 minutos: si el incremento se ajustaba a una recta, se anotaron los valores de la absorbancia inicial y final del período. Si, por el contrario, el incremento de densidad óptica seguía una parábola (muestra con elevada actividad CAT), se diluyó la muestra de extracto en TDTT hasta obtener una recta.

Mezcla de reacción (10 ml)	
Acetil-CoA 5 mM	0'2 ml
DTNB 10 µM	1 ml
Cm	12 µl
H ₂ O bidestilada	8'8 ml

Acetil-CoA 5 mM: 20 mg de acetil-CoA (sal de litio, Sigma) en 5 ml de agua bidestilada. La solución se pudo mantener a – 20 °C hasta 1 año.

DTNB 10 μ M: 40 mg de DTNB (5,5' dithio-bis(2- nitrobenzoic acid), Sigma) en 10 ml de Tris-HCl 1 M pH 7'8. Se preparó en el momento del ensayo.

Cm 5 mM: 32 mg de cloranfenicol (Fluka) en 30 ml de agua bidestilada. También fue preparado en el momento del ensayo.

2.8.6.2.3.- Cálculo de la actividad CAT

Con las medidas de absorbancia a DO_{412} en los tiempos indicados en el apartado anterior, se calculó la actividad CAT con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad CAT (nmoles / min}\cdot\text{ml)} = (\Delta DO_{412}) \times (1 / \text{CE}) \times (V_t / V)$$

ΔDO_{412} : valor que resulta de restar el incremento de absorbancia antes de añadir el Cm (acetilación residual) al incremento observado después de añadir el Cm: (A_{412} 7 min - A_{412} 5 min) - (A_{412} 2 min - A_{412} 0 min).

CE: 0.0136. Es el coeficiente de extinción que convierte el valor en nmol/min.

V_t : volumen total de la reacción en el ensayo (620 μ l).

V: volumen de extracto añadido a la reacción (20 μ l)

El valor de la actividad CAT se expresa como actividad específica CAT (nmoles / min x mg prot), por ello se determinaba la concentración de proteína de los extractos crudos a través del método de Bradford (apartado 2.8.2.):

$$\text{Actividad CAT específica (nmoles / min}\cdot\text{mg)} = (\text{nmoles / min}\cdot\text{ml}) \times (1 / \text{mg prot /ml})$$

2.8.6.3.- Determinación de la actividad β -galactosidasa

(Miller, 1992)

A la DO_{600} escogida para medir la actividad β -galactosidasa de un cultivo de la cepa objeto de estudio, se recogieron alícuotas de entre 50 μ l - 100 μ l que se llevaron a un volumen de 1ml completando con tampón de ensayo (tampón Z).

Se añadieron 50 μ l de cloroformo y 25 μ l de SDS 0'1 % y se agitaron con un vórtex durante 15 segundos para permeabilizar las células. A continuación se incubó la muestra durante 5 minutos en un baño termostático a 28 °C y se añadió el ONPG (o-Nitrophenyl-b-D-galactopyranoside; 4 mg/ml en tampón fosfato sódico 0'1 M pH 7'0; Sigma). Se incubaron las muestras a 28 °C hasta la aparición de color amarillo, momento en el que se paró la reacción con 0'5 ml de Na_2CO_3 1 M. Se dejaron reposar las muestras unos minutos y se midió la absorbancia a las longitudes de onda de 412 nm y 550 nm.

Tampón Z	
Na_2HPO_4 (Merck)	60 mM
NaH_2PO_4 (Merck)	40 mM
KCl (Merck)	10 mM
$MgSO_4$	1 mM
β -mercaptoetanol	50 mM

pH 7'0 (no autoclavar)

Tampón fosfato	
A) Na_2HPO_4 0'1 M	61 ml
B) NaH_2PO_4 0,1 M	39 ml

Añadir B sobre A hasta llegar a pH 7'0 y autoclavar

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

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

U: Unidades Miller.

DO_{412} y DO_{550} : valores de absorbancia a las longitudes de onda de 412 nm y 550 nm una vez detenida la reacción.

DO_{600} : valor de absorbancia a 600 nm del cultivo al tomar la muestra.

t: tiempo transcurrido en minutos desde la adición de ONPG hasta detener la reacción con Na_2CO_3 .

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