



Facultad de Biología

Departamento de Microbiología

**La Familia de proteínas Hha-YmoA: estudios estructurales y papel regulador en
*Yersinia enterocolitica***

Programa de Doctorado: Microbiología Ambiental y Biotecnología (2001-2003).

Conformidad del director de tesis

Memoria presentada por J.
Ignacio Pons Ximénez para optar
al título de Doctor por la
Universidad de Barcelona

Dr. Antonio Juárez Giménez

J. Ignacio Pons Ximénez

Barcelona, 2006

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo pertenecen principalmente a las especies *Escherichia coli* y *Yersinia enterocolitica*. Las características genotípicas de estas cepas se detallan en las tablas 2.1., 2.2. y 2.3.

Tabla 2.1. Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo relevante	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
BL21 (DE3)	<i>hsdS</i> , <i>gal</i> , (λ Clts857, <i>ind1</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i> , <i>lacUV5-T7</i> gene 1)	Studier y Moffatt, 1986
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Bullock <i>et al.</i> , 1987
Hha-3	5K <i>hha::Tn5phoA</i>	Godessart <i>et al.</i> , 1988
S17-1	<i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> ; Rp4-2 (<i>TnI::ISR1 tet::Mu Km::Tn7</i>)	Simon <i>et al.</i> , 1983

Tabla 2.2. Cepas de *Y. enterocolitica* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo relevante	Referencia
W22703	Nal ^r , serotipo 0:9, R ⁻ M ⁺	Cornelis y Colson, 1975
W22711	W22703 <i>ymoA::Tn5-TcI</i>	Cornelis <i>et al.</i> , 1991
W22703SR18	W22703 <i>hns⁺</i> , <i>hns::Sm^r</i>	Rodríguez, 2005
W22703H	W22703 <i>hns::Sm^r</i>	Rodríguez, 2005

Tabla 2.3. Otras cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo relevante	Referencia
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium TR5877	<i>galE</i> r(LT) ⁻ m(LT) ⁻ r(s) ⁻ m(s) ⁺ <i>ilv542 metA22 trpB2 h1-6 nml</i> H2 (<i>fels2</i>) <i>flaA66 strA120 xly-404 metE551 hspL56 hspS29</i>	J. Casadesús
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium SV5015	<i>S. Typhimurium</i> SL1344, <i>his</i> ⁺	Qi <i>et al.</i> , 1996
<i>Klebsiella pneumoniae</i> C3	Serotipo 01:K66	I. Ørskov
<i>Proteus mirabilis</i> TT170.	Serovar O:3	CECT 170
<i>Aeromonas hydrophila</i> A3	Serotipo O:34	Merino y Tomás, 1988
<i>A. molluscorum</i> 869N		CECT 5868
<i>A. molluscorum</i> 848T		CECT 5864
<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>		CECT 846
<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>multocida</i>		CECT 4325

Las características y referencias de los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la tabla 2.1.4.

Tabla 2.1.4. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia
pLysE	<i>ori</i> _{p15A} , lisozima T7; Cm ^r	Studier <i>et al.</i> , 1990
pLysS	<i>ori</i> _{p15A} , lisozima T7; Cm ^r	Studier <i>et al.</i> , 1990
pET3b	<i>ori</i> _{PMB1} , promotor T7; Ap ^r	Studier <i>et al.</i> , 1990
pET3bHisHha	pET3b + 6 <i>xhis-hha</i> ; Ap ^r	Nieto <i>et al.</i> , 2000
pET3bHisHhaHNS	pET3b + 6 <i>xhis-hha</i> + <i>hns</i> ; Ap ^r	Este trabajo
pET3bHisHhaHNSlacO	pET3b <i>lacO</i> + 6 <i>xhis-hha</i> + <i>hns</i> ; Ap ^r	Este trabajo
pET3bHisHha-11	pET3bHisHha R50H; Ap ^r	Nieto <i>et al.</i> , 2002
pET3bHisHhaHNS-11	pET3bHisHha R50H + <i>hns</i> ; Ap ^r	Este trabajo

Plásmido	Descripción	Referencia
pET3bHisHha-42	pET3bHisHha M13I; Ap ^r	Rodríguez, 2005
pET3bHisHhaHNS-42	pET3bHisHha M13I + <i>hns</i> ; Ap ^r	Este trabajo
pET3bHNS	pET3b + <i>hns</i> ; Ap ^r	Este trabajo
pET3bHNSHis	pET3b + <i>hns-6xhis</i> ; Ap ^r	Nieto <i>et al.</i> , 2002
pET15b	<i>ori</i> _{PMB1} , promotor T7; Ap ^r	Studier <i>et al.</i> , 1990
pET15bHisHha'	pET15b + 6 <i>xhis-hha'</i> ; Ap ^r	Yee <i>et al.</i> , 2002
pET15bHisHha	pET15b + 6 <i>xhis-hha</i> ; Ap ^r	Este trabajo
pET15bHNSHis-64	pET15b + <i>hns-64-6xhis</i> ; Ap ^r	Este trabajo
pBR322	<i>ori</i> _{PMB1} ; Ap ^r , Tc ^r	Bolívar <i>et al.</i> , 1977
pUBM22	pBR322 + <i>hha</i> ; Ap ^r	Nieto <i>et al.</i> , 2000
pUBM22C18I	pBR322 + <i>hha</i> C18I; Ap ^r	Este trabajo
pUBM22C18S	pBR322 + <i>hha</i> C18S; Ap ^r	Este trabajo
pUBM22C18A	pBR322 + <i>hha</i> C18A; Ap ^r	Este trabajo
pUCYdgT	<i>ori</i> _{ColE1} (pUC19) + YdgT, Ap ^r	Paytubi, 2004
pBRYdgT	pBR322 + <i>ydgT</i> ; Ap ^r	Este trabajo
pET15bHisHhaC18I	pET15bHisHha C18I; Ap ^r	Este trabajo
pET15bHisHhaC18S	pET15bHisHha C18S; Ap ^r	Este trabajo
pET15bHisHhaC18A	pET15bHisHha C18A; Ap ^r	Este trabajo
pBRStpA	pBR322 + <i>stpA</i> ; Tc ^r	Rodríguez, 2005
pACYC184	<i>ori</i> _{p15A} ; Cm ^r , Tc ^r	Chang y Cohen, 1978
pACYCStpA	pACYC184 + <i>stpA</i> ; Cm ^r	Este trabajo
pJOB101	<i>ori</i> _{RSF1010} , <i>hns</i> ⁺ ; Ap ^r	Johansson <i>et al.</i> , 2001
pJOB101-Km	pJOB101, Ap::mini-Tn5KmI	Rodríguez, 2005
pANN202-312	pACYC184 + <i>hlyC</i> , <i>hlyA</i> , <i>hlyB</i> , <i>hlyD</i> ; Cm ^r	Godessart <i>et al.</i> , 1988
pCB26	pANN202-312 <i>hlyC</i> :: <i>lacZ</i> ; Cm ^r	Balsalobre, 1998

2.2.- MEDIOS DE CULTIVO Y ANTIBIÓTICOS

2.2.1.- MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo tanto líquidos como sólidos utilizados para el crecimiento se detallan a continuación.

• **LB** (Luria-Bertani; Sambrook *et al.*, 1989). Medio de cultivo líquido utilizado de forma habitual para el crecimiento bacteriano. En algunos experimentos se modificó la osmolaridad del medio cambiando la concentración de NaCl. El medio LB contiene NaCl a una concentración 170 mM, y la misma se aumentó a 0,5 M (29,22 g/l) o bien se disminuyó a 0 M.

LB	g/l
Peptona tripsica de caseína (Schärlau Microbiology)	10,0
Extracto de levadura (Schärlau Microbiology)	5,0
NaCl (Panreac)	10,0

Cuando fue requerida una fuente de carbono extra, ésta fue añadida a una concentración de 2 g/l.

• **LB agar.** Medio de cultivo sólido utilizado de forma habitual que consiste en añadir 15 g/l de agar para bacteriología (Schärlau Microbiology) al medio LB anteriormente mencionado.

• **LB modificado.** Medio de cultivo líquido utilizado para crecimientos en anaerobiosis.

LB modificado	g/l
Peptona tríptica de caseína (Schärlau Microbiology)	10,0
Extracto de levadura (Schärlau Microbiology)	5,0
NaCl (Panreac)	10,0
Na ₂ HPO ₄ (Merck)	9,0
KH ₂ PO ₄ (Merck)	4,5
* Glucosa (Panreac)	2

ajustar a pH 7,0

*añadir la glucosa una vez esterilizado el medio a partir de una solución estéril al 20 %

Para generar las condiciones de anaerobiosis, se llenaron completamente viales de vidrio con tapón de rosca de aproximadamente 20 ml cuando el medio estaba aún caliente. Cada uno de los viales se utilizó para una única medida del crecimiento.

- **Agar-sangre.** Medio de cultivo sólido utilizado para la detección de la actividad hemolítica externa de las cepas sometidas a estudio. Su composición es idéntica a la del LB agar más un 5 % (v/v) de sangre de carnero desfibrinada (Oxoid). La sangre se añade al medio ya estéril una vez su temperatura ha disminuido por debajo de los 50° C.

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

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

- **TSA** (Schärlau Microbiology). Medio de cultivo sólido utilizado de forma habitual para el crecimiento bacteriano.

TSA	g/l
Peptona de caseína	17,0
Peptona de soja	3,0
NaCl	5,0
K ₂ HPO ₄	2,5
Dextrosa	2,5
Agar para bacteriología	15,0

- **Caldo de corazón y cerebro** (BHI, Oxoid). Medio de cultivo rico utilizado para el crecimiento de bacterias con muchos requerimientos nutricionales

BHI	g/l
Extracto de cerebro	7,8
Extracto de corazón	9,7
Proteosa peptona	10,0
Dextrosa	2,0
NaCl	5,0
Na ₂ HPO ₄	2,5

Cuando fue requerido como medio sólido se suplementó con 15 g/l de agar para bacteriología.

- **McConkey agar** (Pronadisa). Medio selectivo para las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. Permite, además, diferenciar bacterias capaces de metabolizar la lactosa debido al viraje del indicador de pH a rojo por acidificación del medio, de las que no son capaces de metabolizarla.

McConkey	g/l
Peptona	20,0
Lactosa	10,0
Sales biliares	2,5
NaCl	5,0
Rojo neutro	0,05
Cristal violeta	0,001
Agar	15,0

- **M63.** Medio mínimo.

M63	g/l
Fuente de Carbono	4,0
KH ₂ PO ₄ (Merck)	13,6
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck)	2,0
FeSO ₄ ·7H ₂ O (Merck)	5·10 ⁻⁴
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Merck)	0,2

ajustar a pH 7,0 con KOH

2.2.2.- ANTIBIÓTICOS

Cuando fue necesario, los distintos 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 bidestilada, se esterilizó por filtración y se guardó a - 20° C. Se utilizó a una concentración final de 50 µg/ml.

▪ **Cloranfenicol (Cm).** (Fluka). Se preparó una solución concentrada de 100 mg/ml en etanol absoluto (Prolabo) y se guardó a - 20° C. Se utilizó a una concentración final de 12 µg/ml ó 25 µg/ml.

▪ **Tetraciclina (Tc).** (Hidrocloruro, 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 utilizó a una concentración final de 10 µg/ml.

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

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

▪ **Ácido Nalidíxico (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 utilizó a una concentración final de 35 µg/ml.

2.3.- MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

2.3.1.- ESTERILIZACIÓN

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

Por otro lado, las soluciones que por su composición no permitían su esterilización por este método fueron esterilizadas mediante filtración a través filtros estériles de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore).

2.3.2.- MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS

Las distintas cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se mantuvieron viables mediante dos procedimientos: (1) Resiembras en sus correspondientes medios sólidos con una periodicidad que oscilaba entre las 3 y 7 semanas en función de la cepa y manteniéndolas una vez crecidas a 4° C, y (2) congelándolas a -70° C. Para ello, cultivos líquidos crecidos durante toda la noche fueron centrifugados (3.000 xg, 10 minutos) y las células fueron resuspendidas en 1/5 del volumen del cultivo en glicerol 10 %. Esta suspensión se guardó a -70° C.

2.3.3.- INOCULACIÓN Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS

La inoculación de microorganismos en medio líquido se realizó a partir de cultivos líquidos crecidos durante toda la noche a una temperatura adecuada y en agitación. En la inoculación en medio líquido de cepas congeladas, se realizó siempre de forma previa un pase en medio sólido para comprobar homogeneidad del cultivo y morfología colonial.

La inoculación en medio líquido se realizó mediante diluciones, en general 1:50 ó 1:100, de un cultivo crecido durante toda la noche a un matraz erlenmeyer con medio estéril. Los cultivos fueron incubados a una temperatura adecuada en función de la cepa y el estudio a realizar y con una agitación de 200 rpm (incubador-agitador orbital, Braun).

Las medidas de crecimiento bacteriano fueron realizadas mediante dos procedimientos: (1) a través de recuento de células viables en placa (unidades formadoras de colonias, ufc) y (2) mediante determinación espectrofotométrica de la absorbancia de los cultivos líquidos a una densidad óptica de 600 nm (DO₆₀₀) (Espectrofotómetro modelo DU[®] 640, Beckman Coulter[™]).

2.4.- MÉTODOS DE TRANSFERENCIA GENÉTICA

2.4.1.- TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

En general, la transformación de células bacterianas se realizó mediante el método del CaCl₂ frío y, únicamente en aquellos casos en los que la eficiencia de transformación era muy baja, se utilizó el método de la electroporación.

2.4.1.1.- Transformación de células competentes obtenidas por tratamiento con CaCl₂

Se utilizó como base el método descrito por Cohen y colaboradores (1972).

A partir de un cultivo de la cepa a transformar crecido durante toda la noche se realizó una dilución 1:50 en medio estéril y se incubó hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial (2 a 4 horas en función de la cepa a 30-37° C y en agitación). A continuación, las células fueron recogidas por centrifugación (3.000 xg, 10 minutos a 4° C) y resuspendidas en ¼ parte del volumen inicial de CaCl₂ 50 mM frío (4° C). Tras una nueva centrifugación (3.000 xg, 5 minutos a 4° C), las células se concentraron 100 veces en CaCl₂ 50 mM frío. Las células competentes así obtenidas se mantuvieron en hielo un máximo de 24 horas antes de su transformación.

Para llevar a cabo el proceso de transformación propiamente dicho, alícuotas de 300 µl de células competentes se mezclaron con 2-10 µl de ADN plasmídico a introducir. La mezcla se incubó durante 30 minutos en hielo y, posteriormente, fue sometida a un choque térmico de 45 segundos a 42° C en un baño termostático, volviéndola a incubar de nuevo durante 2-3 minutos en hielo. A continuación, se añadieron 900 µl de medio estéril sin antibióticos a la mezcla y se incubó a 30-37° C durante 1 hora en agitación para permitir la expresión de los genes marcadores de resistencia a antibióticos codificados en el plásmido introducido. Finalmente, se sembraron las células en placas de medio sólido suplementadas con los antibióticos adecuados para la selección de transformantes, y se incubaron a una temperatura adecuada.

2.4.1.2.- Transformación por electroporación

2.4.1.2.1.- Electroporación de *Escherichia coli*

En aquellos casos en los que la transformación por el método del CaCl_2 frío descrito en el apartado anterior presentaba una baja eficiencia, se optó por la electroporación como método de incorporación de ADN (Dower *et al.*, 1988). Esta técnica permite la captación de ADN mediante la permeabilización de las membranas provocada por una descarga eléctrica.

A partir de un inóculo crecido durante toda la noche, se realizó una dilución 1:50 en medio fresco y se incubó en agitación a 30-37° C hasta alcanzar una DO_{600} aproximada de 0,5-0,8. Después de enfriar el cultivo en hielo, las células fueron lavadas mediante centrifugación (3.000 $\times g$, 10 minutos a 4° C) y resuspensión en agua bidestilada (Milli-Q_{plus}, Millipore) estéril y fría (4° C). El lavado de las células se repitió 3 ó 4 veces, reduciendo el volumen de resuspensión hasta 1/100 parte del volumen de cultivo inicial. De esta forma se consigue reducir la fuerza iónica de la suspensión celular. Una vez obtenidas las células electrocompetentes, se mezclaron 50 μl de estas células con 1-5 μl de la suspensión de ADN a transformar y la mezcla se transfirió a cubetas de electroporación de 1 mm de separación entre electrodos, manteniéndose unos minutos en hielo.

Una vez realizada la descarga eléctrica, las células fueron rápidamente resuspendidas en 1 ml de medio SOC sin antibióticos y transferidas a un tubo eppendorf que se incubó durante 1 hora a 30-37° C y en agitación, permitiendo de esta forma la expresión de los genes marcadores de resistencia a antibióticos. Las células transformantes fueron seleccionadas en medio sólido suplementado con los antibióticos necesarios para la selección y se incubaron a una temperatura adecuada.

En los casos en los que la electroporación no se realizó de forma inmediata a la obtención de células electrocompetentes, la resuspensión final de las células no se realizó en agua bidestilada estéril sino en glicerol 10 % y se mantuvo a -70° C hasta el momento de su utilización.

El electroporador utilizado fue el modelo Electroporador 2510 (Eppendorf) y las condiciones de electroporación utilizadas fueron las siguientes:

Condiciones de electroporación de <i>E. coli</i>	
Temperatura	4° C
Modo	2,5 kV/cm
Capacitancia	10 μ F (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 *Yersinia enterocolitica*

La eficiencia de transformación de *Y. enterocolitica* utilizando tanto el sistema de electroporación desarrollado en *E. coli* como el método del CaCl₂ frío es muy baja, por lo que se utilizó un método de electroporación que varía algunos de los parámetros y mejora considerablemente la eficacia de transformación (Conchas y Carniel, 1990).

A partir de un inóculo crecido durante toda la noche, se realizó una dilución 1:50 en medio fresco y se incubó en agitación a 28° C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5-0,8. El siguiente paso fue centrifugar el cultivo (3.000 xg, 10 minutos a 4° C) y resuspender las células en el mismo volumen de agua bidestilada estéril. Se repitió el lavado pero resuspendiendo las células en solución de transformación (272 mM sacarosa, 15 % glicerol), primero en un mismo volumen y después en 1/100 del volumen inicial. Finalmente, las células electrocompetentes así obtenidas se alicuotaron y mantuvieron a -70° C hasta el momento de su utilización.

El protocolo a seguir a partir de ese momento fue idéntico al descrito en el apartado anterior para *E. coli* variando únicamente el modo, que en lugar de 2,5 kV/cm fue de 1,25 kV/cm.

2.4.2.- CONJUGACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

(Herrero *et al.*, 1990)

A partir de cultivos de las cepas dadora y receptora de la conjugación crecidos durante toda la noche en ausencia de antibióticos se pusieron en contacto 100 µl de cada una de las cepas en 5 ml de una solución de MgSO₄ 10 mM. La mezcla fue filtrada mediante una membrana de 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore) y el filtro incubado sobre placas de LB-agar con el contenido retenido en la cara superior, durante 8 horas a 30° C. Pasado este periodo, se introdujo el filtro en un tubo con 5 ml de MgSO₄ 10 mM y se liberaron las células mediante agitación en vórtex. El crecimiento liberado fue plaqueado en un medio de cultivo adecuado suplementado con los marcadores para seleccionar el fenotipo de los conjugantes, e incubado durante 18-30 horas a 30-37° C.

2.5.- TÉCNICAS EXPERIMENTALES CON ADN

2.5.1.- AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO

2.5.1.1.- Aislamiento de ADN plasmídico por el método de la lisis alcalina

(Birnboim, 1983)

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 3-4 ml de cultivo, pero se pueden escalar los volúmenes de las soluciones si se parte de un volumen de cultivo mayor.

Se recogieron por centrifugación (3.000 xg, 10 minutos) las células de un cultivo crecido durante toda la noche y se resuspendieron en 250 µl de solución I, manteniendo la suspensión celular durante 10 minutos en hielo. A continuación, se añadieron 250 µl de solución II y se agitó 3-4 veces por inversión hasta observar clarificación de la preparación, manteniéndola posteriormente durante 10 minutos en hielo. Finalmente, se añadieron 250 µl de solución III, se agitó por inversión hasta observar la aparición de un

precipitado blanco y se mantuvo en hielo durante otros 10 minutos. Si el ADN plasmídico a aislar era de gran 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 la preparación (12.000 xg, 15 minutos) en una centrífuga tipo Eppendorf y se recogió el sobrenadante que contenía el ADN plasmídico.

Solución I	
Glucosa (Panreac)	50 mM
Tris-HCl (Roche)	25 mM
EDTA (Merck)	25 mM

ajustar a pH 7,5

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

Solución III	
Acetato sódico (Merck)	3 M

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

A continuación, se llevó a cabo la desproteización del ADN mediante dos mecanismos diferentes; por precipitación con cloruro de litio o por extracción con fenol.

2.5.1.1.1.- 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 idéntico de isopropanol, se agitó varias veces por inversión y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se centrifugó (12.000 xg, 10 minutos), se decantó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 200 µl de solución TE y se realizó un tratamiento con ARNasa A (apartado 2.5.1.1.3.) para eliminar restos de ARN.

A la suspensión se le añadieron 400 μ l de LiCl 5M (Merck) y 400 μ l de cloroformo, se agitó la mezcla vigorosamente, se centrifugó (12.000 xg, 10 minutos) y se recuperó la fase superficial. Para precipitar el ADN, se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto frío y 1/10 del volumen de solución III (apartado 2.5.1.1.) y se incubó la mezcla a -20° C durante un tiempo superior a 30 minutos. Finalmente, se centrifugó (12.000 xg, 10 minutos) y el precipitado obtenido se lavó con un volumen de etanol 70 % frío. Para la eliminación de restos de etanol, el precipitado se secó al vacío (Speed-Vac, Savant Instruments Inc.) y se resuspendió en un volumen adecuado de agua bidestilada estéril.

Solución TE	
Tris-HCl (Roche)	10 mM
EDTA (Merck)	1 mM

ajustar a pH 8,0

2.5.1.1.2.- 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 mediante la adición de dos volúmenes de etanol absoluto frío e incubándolo a -20° C durante un tiempo superior a 30 minutos. A continuación, se centrifugó la preparación (12.000 xg, 10 minutos a 4° C) y se eliminó el sobrenadante. La eliminación de restos de etanol se realizó mediante secado al vacío. El precipitado se resuspendió en 500 μ l de solución TE y se trató con ARNasa A.

La fenolización propiamente dicha consistió en la adición en primer lugar de $\frac{1}{2}$ de volumen de fenol (Sigma), previamente equilibrado con solución TE, en segundo lugar $\frac{1}{4}$ de volumen de fenol más $\frac{1}{4}$ de volumen de cloroformo y, finalmente, $\frac{1}{2}$ de volumen de cloroformo. En cada uno de estos tres pasos se mezcló la fase acuosa y la orgánica hasta conseguir un emulsión y se centrifugó (12.000 xg, 4 minutos), separándose las dos fases y recogiendo la fase superficial que contiene el ADN.

Una vez desproteizada la suspensión de ADN, se precipitó con etanol tal y como se ha explicado en el apartado anterior.

2.5.1.1.3.- Tratamiento de la suspensión de ADN con ARNasa A

El ADN obtenido por el método de lisis alcalina fue tratado con ARNasa A de páncreas bovino (Boehringer Mannheim) a una concentración de 100 µg/ml durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La solución de ARNasa A (Sambrook *et al.*, 1989) se preparó a partir de una solución madre de ARNasa A 10 mg/ml en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 15 mM, de la que se eliminaron las ADNasas mediante incubación a 100° C durante 5 minutos. La solución se guardó a -20° C.

2.5.1.2.- Aislamiento de ADN plasmídico mediante “kits” comerciales

Cuando se requirió un ADN plasmídico de gran pureza, ya fuese para restricciones o para secuenciación (apartado 2.5.3.3.), se utilizaron “kits” comerciales basados en la lisis alcalina y posterior adsorción del ADN plasmídico a una resina. Para cultivos de 3-5 ml se utilizó el “kit” Plasmix[®] (Talent). Para cultivos superiores a 40 ml se utilizó el “kit” Wizard[®] Plus SV Midiprep (Promega), siguiendo en cada caso las instrucciones de la casa comercial.

2.5.2.- UTILIZACIÓN DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN, LIGACIÓN Y MODIFICACIÓN DEL ADN

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

En el caso de enzimas de restricción, su cantidad en la reacción nunca superó el 10 % del volumen total para evitar la posible inactivación del enzima por la presencia de glicerol en las soluciones madre de los enzimas.

En todos los casos, la eliminación de los enzimas modificantes de la preparación se realizó o bien por fenolización (apartado 2.5.1.1.2.) o mediante el “kit” comercial Wizard[®] ADN Clean-Up System (Promega).

2.5.3.- TÉCNICAS BASADAS EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

2.5.3.1.- Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa

(Mullis *et al.*, 1986)

Para las reacciones de amplificación de ADN mediante PCR se utilizó una polimerasa termoestable nativa DynaZyme™ obtenida de *Thermus brockianus* y el tampón de amplificación (x 10) suministrado junto al enzima (Finnzymes Oy). Generalmente, la mezcla de reacción fue de 25 µl. Cuando fue requerida una mayor cantidad de producto amplificado, el volumen de amplificación se aumentó hasta 100 µl, y cuando la finalidad de la reacción de amplificación fue el escrutinio a partir de muchas muestras, este volumen se disminuyó hasta 10 µl, manteniendo siempre las proporciones de cada componente de la mezcla.

Como muestra (ADN molde) para la reacción de amplificación se utilizó o bien ADN previamente purificado o células enteras resuspendidas en 100 µl de agua bidestilada estéril y hervidas durante 5-10 minutos. Cuando la muestra eran células enteras de *Y. enterocolitica* se llevó a cabo a un proceso previo de desproteinización mediante fenolización (apartado 2.5.1.1.2.) para evitar la degradación del material amplificado por una ADNasa termoestable presente en esta bacteria. La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente:

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

(*) Se preparó un solución madre de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a una concentración de 10 mM de cada uno.

Las variables de la reacción de amplificación (temperatura de hibridación, tiempos y número de ciclos) se determinaron en función de las características del fragmento de ADN a amplificar y de los oligonucleótidos utilizados. El programa básico utilizado fue el siguiente:

94° C	<u>2'</u>
94° C Desnaturalización	30''
58° C Hibridación	30' \Rightarrow 30 ciclos
72° C Extensión	<u>30''</u>
72° C	7'

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

Los productos resultantes de las reacciones de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa (apartado 2.5.5.). En los casos en los que el ADN amplificado tuvo que ser procesado mediante enzimas (restricción, ligación, modificación) se procedió previamente a su purificación utilizando el “kit” Wizard[®] ADN Clean-up System (Promega).

2.5.3.2.- Mutagénesis mediante reacción en cadena de la polimerasa

Esta técnica permite introducir mutaciones puntuales en una secuencia de ADN mediante una polimerasa (Pfu Turbo[®] ADN polymerase, Stratagene) muy procesiva y fiable que amplifica a partir de dos cebadores complementarios que contienen en su interior la modificación nucleotídica requerida.

Para ello, el fragmento de ADN a mutagenizar fue clonado en un vector y se diseñaron oligonucleótidos, de entre 25 y 45 bases, complementarios entre sí y que contenían en el centro de su secuencia el cambio nucleotídico deseado. Seguidamente, se llevó a cabo la reacción de amplificación utilizando como molde el vector que contiene fragmento de ADN a mutagenizar clonado, aislado a partir de una cepa de *E. coli* (*dam*⁺). La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente:

Mezcla de reacción (50 μ l)	
Pfu Turbo [®] ADN polymerase (2,5 U/ μ l)	1 μ l
Tampón (x 10)	5 μ l
dNTPs 10 mM cada uno (Amersham Pharmacia Biotech)	1 μ l
Oligonucleótidos (100 ng/ μ l) (Sigma)	1 μ l
ADN molde (5-50 ng/ μ l)	1 μ l
H ₂ O bidestilada estéril	40 μ l

El ciclo de amplificación se detalla a continuación:

94° C		2'
94° C	Desnaturalización	30''
55° C	Hibridación	30'' \rightleftarrows 30 ciclos
72° C	Extensión	1 minuto/kb
72° C		10'

Una vez finalizado el ciclo de amplificación, se añadió directamente sobre los productos de PCR 1 μ l del enzima de restricción *Dpn* I 10U/ μ l (Promega) que reconoce específicamente el ADN metilado y, por tanto, únicamente degrada el ADN molde, y se incubó durante 1 hora y 30 minutos a 37° C en estático.

Finalmente, las muestras tratadas con *Dpn* I fueron transformadas en una cepa de *E. coli* (apartado 2.4.1.1.) y la presencia de la mutación comprobada mediante secuenciación (apartado 2.5.3.3.).

2.5.3.3.- Secuenciación

El ADN se secuenció por el método de Sanger (Sanger y Coulson, 1975) basado en la utilización de dideoxinucleótidos en ciclos de reacciones de amplificación de ADN. Se utilizó el “kit” ABI PRISM BigDye Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction Kit versión 2.0 (Biosystems), que proporciona una mezcla de reacción que

contiene la polimerasa termoestable, los dideoxinucleótidos marcados y no marcados y el tampón necesario para la reacción de secuenciación. Como muestra (ADN molde) se utilizaron tanto productos de reacciones de amplificación previamente purificados como ADN plasmídico aislado mediante “kit” comercial (apartado 2.5.1.2.).

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

^(*)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 amplificación utilizado fue el siguiente:

96° C	1'
96° C Desnaturalización	10''
50° C Hibridación	30''  25 ciclos
60° C Extensión	4'
72° C	7'

Una vez finalizada la reacción de amplificación se añadieron a la preparación 64 µl de etanol 95 % y 26 µl de agua bidestilada estéril. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, se centrifugó (12.000 xg, 30 minutos) y se lavó con 200 µl de etanol 70 %. Tras eliminar con mucho cuidado el etanol, la muestra se secó. Finalmente, la muestra fue analizada en el secuenciador ABI PRISM[®] 3700 ADN Analyzer de los Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

2.5.4.- OBTENCIÓN DE SECUENCIAS REGULADORAS POR HIBRIDACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

En ocasiones, para aumentar nuestra capacidad de regulación en vectores de expresión, fue necesaria la incorporación al sistema de secuencias operadoras obtenidas por hibridación de oligonucleótidos.

Se diseñaron oligonucleótidos cuya hibridación y posterior ligación nos permitieran obtener una secuencia reguladora con extremos cohesivos tras una digestión con enzimas de restricción determinados.

Para ello, los oligonucleótidos fueron resuspendidos en agua bidestilada estéril de forma que su concentración fuese de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se realizó una mezcla de hibridación compuesta por 5 μg de cada oligonucleótido, 10 μl del tampón suministrado junto al enzima T4 ADN Ligasa (Promega) y 80 μl de agua bidestilada estéril. La mezcla se incubó en agua a 80° C, se dejó enfriar lentamente y se trató con 5 unidades del enzima polinucleótidoquinasa (PNK, T4 Polynucleotide kinase 10 U/ μl , BioLabs) a 37° C durante 1 hora. Este enzima introduce grupos fosfato en extremos 5' para permitir la posterior ligación de las secuencias hibridadas.

2.5.5.- ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA

(Sambroock *et al.*, 1989)

El ADN se analizó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa (Pronadisa) a concentraciones de 0,8 %, 1 % y 2% (en función del tamaño de los fragmentos a analizar) en tampón TBE x 0,5, y posterior tinción en una solución de bromuro de etidio para su visualización por fluorescencia.

2.5.5.1.- Electroforesis en geles de agarosa

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

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

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

2.5.5.2.- Marcadores de tamaño molecular

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

Marcadores de tamaño molecular	
Tipo	Tamaño de los fragmentos (pares de bases)
Fago λ <i>Hind</i> III (Promega)	23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 564, 125
100 bp ladder (Biotools)	1.031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80

2.5.5.3.- Tinción con bromuro de etidio

Tras la electroforesis, se realizó la tinción del ADN 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).

2.5.6.- AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA MEDIANTE ELECTROELUCIÓN

Este método fue utilizado para aislar fragmentos de ADN, productos de restricciones o de PCR.

Tras la electroforesis de ADN en geles de agarosa y posterior tinción en bromuro de etidio (apartados 2.5.5.1. y 2.5.5.3.) se recortó el fragmento de agarosa que contenía la banda de ADN de interés, visualizándola con ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta de baja intensidad y elevada longitud de onda (VL-4.L, Fisher Bioblock). El fragmento de agarosa se introdujo en una membrana de diálisis de celulosa (Sigma) previamente tratada tal y como se describe en la bibliografía (Sambrook *et al.*, 1989), se llenó con tampón TBE x 0,5 y se sellaron herméticamente los extremos mediante pinzas para evitar la pérdida del contenido. Es importante comprobar la ausencia de burbujas de aire en este sellado que puedan interferir en el paso de la corriente.

Estas bolsas de diálisis se introdujeron en una cubeta de electroforesis horizontal quedando totalmente cubiertas por TBE x 0,5 y se aplicó a un voltaje de 100 V durante una hora. Transcurrido un tiempo suficiente para permitir que el ADN salga del fragmento de agarosa y quede retenido en la parte interna de la membrana de diálisis, se realizó una inversión de voltaje durante 10 segundos para despegarlo de la membrana, quedando suspendido en el TBE x 0,5 contenido en la bolsa de diálisis. La solución fue recogida para proceder a la purificación del ADN mediante fenolización y precipitación (apartado 2.5.1.1.2.) o mediante el “kit” Wizard[®] ADN Clean-up System (Promega).

2.5.7.- CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Para cuantificar y comprobar la pureza del ADN se realizaron medidas espectrofotométricas mediante el cuantificador de ácidos nucleicos GeneQuant de Pharmacia Biotech. Para ello, se realizó una dilución 1:100 de la muestra de ADN en 100 µl de agua bidestilada estéril y se midió la absorbancia a 260 nm y 280 nm. La

absorbancia a 260 nm nos indica la cantidad de ADN mientras que la relación DO_{260} / DO_{280} nos informa sobre su pureza. Si la relación DO_{260} / DO_{280} es superior a 1,8 se considera que hay poca contaminación proteica.

2.6.- TÉCNICAS EXPERIMENTALES CON ARN

La manipulación de ARN tuvo como objetivo analizar los niveles de ARN mensajero mediante RT-PCR (“Reverse Transcriptase PCR”).

2.6.1.- EXTRACCIÓN DE ARN CELULAR TOTAL

La extracción de ARN total de las distintas cepas bacterianas (en este caso de *Y. enterocolitica*) se realizó mediante el “kit” “RNeasy® Mini Kit” de Qiagen, siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Cultivos en medio LB de estas cepas se incubaron a 30° C hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6 para, a continuación, proceder al aislamiento del ARN.

2.6.2.- CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DEL ARN

Para cuantificar y comprobar la pureza del ARN se realizaron medidas espectrofotométricas siguiendo el mismo proceso descrito para la cuantificación del ADN (apartado 2.5.7.). La absorbancia a 260 nm nos indica la cantidad de ARN mientras que la relación DO_{260} / DO_{280} nos informa sobre su pureza.

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

Para la realización de la electroforesis de ARN y posterior tinción de los geles con bromuro de etidio se siguió el mismo procedimiento descrito para el ADN (apartado 2.5.5.), pero tomando algunas precauciones para evitar la contaminación con posibles

ARNasas y por tanto la degradación del ARN: la cubeta de electroforesis se lavó con SDS al 0,1 % y el TBE x 0,5 se esterilizó durante 45 minutos en el autoclave. El tanto por ciento de agarosa utilizado en los geles fue del 2 %.

2.6.4.- ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL ARN POR RT-PCR

El ARN aislado, que contiene el ARN procedente de la transcripción del gen sometido a estudio, se retrotranscribió a ADN copia (ADNc) mediante el enzima transcriptasa inversa, y fue amplificado por PCR.

2.6.4.1.- Digestión con ADNasa I

Antes de realizar la retrotranscripción, el ARN obtenido fue tratado con ADNasa I libre de ARNasa (Promega) para eliminar posibles restos de ADN de las muestras.

Se añadieron 2 unidades de ADNasa a 100 µl de muestra y se llevó a un volumen final con agua bidestilada estéril de 300 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 pero utilizando en este caso fenol ácido.

Una vez obtenida la preparación 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, e incubando la mezcla a -70° C durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo, la muestra fue centrifugada (12.000 xg, 10 minutos) y lavada con 100 µl de etanol 70 %. El precipitado obtenido se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada 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 mantuvo a 4° C.

2.6.4.2.- RT-PCR

Para esta técnica se utilizó el “kit” “Ready-to-Go RT-PCR Beads” (Amersham Biosciences) que suministra en tubos de PCR una bola deshidratada con todos los componentes necesarios para la reacción, exceptuando los oligonucleótidos y el ARN.

Antes de realizar el estudio comparativo del nivel de expresión de un gen determinado entre distintas cepas se realizaron pruebas con diferentes concentraciones de ARN para establecer un rango en el que la reacción no se saturase. A continuación, todas las diluciones de las muestras fueron incubadas a 80° C durante 5 minutos para eliminar posibles estructuras secundarias del ARN y mantenidas posteriormente en hielo hasta el momento de ser utilizadas.

Las cantidades de cada reactivo en la reacción de RT-PCR se describen a continuación:

Composición	Cantidad
Ready-to-Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences)	1 bola
Oligonucleótido RT (10 pmol / μ l) (Sigma)	2 μ l
Oligonucleótido PCR (10 pmol / μ l) (Sigma)	2 μ l
ARN	2 μ l
H ₂ O bidestilada estéril*	Hasta 50 μ l

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

El programa de RT-PCR utilizado fue el siguiente:

42° C	Retro-transcripción	60'
95° C	Inactivación RT	5'
95° C	Desnaturalización	30''
52° C	Hibridación	30'' \Rightarrow 40 ciclos
72° C	Elongación	30'
72° C	Finalización	10'
4° C		∞

Para confirmar que las muestras no contenían restos de ADN, se realizaron los correspondientes controles para cada una de ellas. En primer lugar, se añadió el agua correspondiente a la bola deshidratada y una vez disuelta se incubó durante 10 minutos a 95° C, inactivando de esta forma la transcriptasa inversa. A continuación, se añadieron el resto de componentes a la reacción y se procedió igual que con las muestras problema. La obtención de amplificación en las preparaciones que presenta inactiva la transcriptasa inversa es una prueba de la presencia de restos de ADN en la muestra.

Una vez finalizada la reacción, se analizaron 10 µl de cada una de las preparaciones mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % y tinción en bromuro de etidio.

2.7.- TÉCNICAS EXPERIMENTALES CON PROTEÍNAS

2.7.1.- OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS

En función de la finalidad de la obtención de extractos proteicos se utilizó distinta metodología.

2.7.1.1.- Obtención de extractos proteicos mediante disrupción celular por ultrasonidos

Esta metodología fue la utilizada para volúmenes de muestra inferiores a 10 ml. Alícuotas de cultivos sometidos a estudio fueron centrifugadas (3.000 xg, 10 minutos) y las células se resuspendieron en un volumen adecuado de tampón 1 (Tupper *et al.*, 1994). Seguidamente, se procedió a la lisis celular mediante sonicación (Ultrasonic-Homogenizer Labsonic 2000[®] de B. Braun) utilizando una sonda de titanio tipo aguja y aplicando una potencia de 50 W durante 3 minutos a intervalos de 0,9 segundos por segundo. Durante todo el proceso de sonicación la muestra se mantuvo en hielo. Finalmente, se separó la fracción soluble de la insoluble por centrifugación (12.000 xg, 30 minutos a 4° C) y las muestras se mantuvieron congeladas a -20° C hasta su utilización.

Tampón 1	
Tampón fosfato pH 7,0	10 mM
EDTA (Merck)	1 mM
β -mercaptoetanol (Sigma)	5 mM
PMSF (Merck)	0,1 mM
KCl (Merck)	0,5 M

2.7.1.2.- Obtención de extractos proteicos mediante disrupción celular por presión

Esta metodología fue la utilizada para volúmenes de muestra superiores a 10 ml y cuya finalidad era la purificación de proteína.

Cultivos sometidos a estudio fueron centrifugados (3.000 xg, 10 minutos) y el sedimento celular resuspendido en un volumen adecuado de tampón A. Seguidamente, se procedió a la lisis celular mediante aplicación de una presión de 1.000 psi (French[®] Pressure Cell Press, SLM AMINCO[®]). Finalmente, se separó la fracción soluble de la insoluble por centrifugación (12.000 xg, 30 minutos a 4° C) y las muestras se mantuvieron congeladas a -20° C hasta su utilización.

Tampón A	
Hepes (Sigma)	20 mM
KCl (Merck)	100 mM
MgCl ₂ (Merck)	5 mM
DTT (Bio-Rad)	0,5 mM
Imidazol (Merck)	20 mM

pH 7,9 ajustado con KOH

2.7.1.3.- Obtención de extractos proteicos para geles 2D-PAGE

Se centrifugaron 250 ml de cultivo (10.000 xg, 10 minutos a 4° C) y el precipitado celular se resuspendió en 5 ml de tampón de lavado, repitiendo esta

operación 4 veces. El precipitado de la cuarta centrifugación se resuspendió en 0,3 ml de tampón de resuspensión y se congeló a -20° C. Tras descongelar la muestra, se mezclaron 15 μ l con 300 μ l de tampón de lisis, se agitó con el vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Para finalizar, se centrifugó la muestra (10.000 xg, 20 minutos), se recogió el sobrenadante y se realizó una valoración de la concentración de proteínas por el método Bradford (apartado 2.7.2). La preparación se guardó a -70° C hasta el momento de analizarla mediante electroforesis.

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

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

(a) añadir justo antes de su utilización

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

ajustar a pH 8,0

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

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

2.7.2.- VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA POR EL MÉTODO DE BRADFORD

(Bradford, 1976)

Para determinar la cantidad de proteína presente en una preparación obtenida por cualquiera de los métodos descritos anteriormente, se utilizó el reactivo “Protein Assay Dye Reagent Concentrates” de Bio-Rad, siguiendo el procedimiento indicado por la casa comercial basado en la afinidad de las proteínas por el azul de Coomassie.

A partir de una solución de BSA (Promega) concentrada a 10 mg/ml, se preparó un banco de diluciones a 25, 12,5, 6,25, 3,125 y 1,56 ($\mu\text{g/ml}$). La recta patrón se construyó por duplicado a partir de 0,8 ml de cada una de estas diluciones más 0,2 ml de reactivo de Bradford, quedando así definida una recta de concentraciones 20, 10, 5, 2,5, 1,25 ($\mu\text{g/ml}$). Para valorar la concentración proteica de las muestras, se añadieron entre 5 y 50 μl de éstas más 0,2 ml de reactivo de Bradford y se completó con agua bidestilada hasta un volumen final de 1 ml.

A continuación, se realizó la lectura de la absorbancia a DO_{595} tanto de la recta patrón como de las muestras. La concentración proteica de la preparación se calculó por extrapolación a partir de los valores de absorbancia de la recta patrón, realizando una corrección según el volumen de muestra analizado.

2.7.3.- TÉCNICAS DE ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

2.7.3.1.- Geles de poliacrilamida

Las proteínas presentes en una muestra se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida, que permiten la separación en función de su peso molecular. Se utilizó el equipo MINI-PROTEAN IITM de Bio-Rad, con el que se obtienen geles verticales de 7,3 cm de altura, 8 cm de ancho y 0,75 o 1,5 mm de grosor.

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

(Laemmli, 1970)

Estos geles están formados por dos fases que difieren tanto en su composición como en su función. La fase de compactación es la fase superior, contiene un 5 % de acrilamida y ocupa $\frac{1}{4}$ parte del gel. La fase de resolución contiene un porcentaje de acrilamida que oscila entre el 10-15 % (generalmente 12,5 %) y es donde se produce la separación efectiva de las proteínas.

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

% T: Porcentaje de acrilamida + bis-acrilamida

% C: Porcentaje de bis-acrilamida respecto al total (T)

En la preparación del gel, primero se añadió la fase de resolución hasta cubrir las $\frac{3}{4}$ partes del espacio generado entre los vidrios de soporte del gel y se recubrió con agua bidestilada o una solución de agua saturada de n-butanol, permitiendo así la formación de una superficie superior horizontal tras la polimerización de la acrilamida. A continuación, se eliminó el agua destilada o la solución de agua saturada de n-butanol y se añadió la fase de compactación, colocando antes de su polimerización el peine que definiría los pocillos de carga. Una vez polimerizada se extrajo el peine, se lavaron los pocillos para eliminar restos de acrilamida y se colocó el gel en la cubeta de electroforesis junto con el tampón de recorrido.

Antes de cargar las muestras, se les añadió $\frac{1}{4}$ del volumen total de tampón de carga de proteínas x 4 y se incubaron 5 minutos a 100° C. Tras cargar las muestras con una microjeringuilla (Hamilton) se aplicó un voltaje de 40 V hasta el alineamiento de las muestras en la fase de compactación, momento en que se aumentó el voltaje a 100 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 6,8

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

ajustar a pH 8,8

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 (Bio-Rad)	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) y 0,8 g de bis-acrilamida (Bio-Rad) en 100 ml de agua bidestilada. Se filtró la solución con papel de filtro y se mantuvo a 4° C protegida de la luz.

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

(Schägger y von Jagow, 1987)

Estos geles permitieron obtener una mayor resolución en la separación de proteínas de bajo peso molecular (entre 5 y 50 kDa). Constan de tres fases: fase de compactación, con un porcentaje de acrilamida del 4 % y ocupa $\frac{1}{4}$ parte del gel, fase

espaciadora, con un 10 % de acrilamida y ocupa el mismo volumen que la fase de compactación, y fase de resolución, con un 16 % de acrilamida y ocupa la mitad del gel.

Tanto la preparación del gel como el tratamiento de las muestras siguió el mismo procedimiento descrito en geles de poli-acrilamida Tris-Glicina-SDS, pero variando la composición de los tampones y de la acrilamida utilizada.

	Fase de resolución	Fase espaciadora	Fase compactadora
% Acrilamida	16'5 % T, 3 % C	10 % T, 3 % C	4 % T, 3 % C
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 % (Panreac)	0,8 ml	-	-
Agua bidestilada	0,2 ml	0,7 ml	1,26 ml
APS 10 % (Bio-Rad)	20 µl	10 µl	15 µl
TEMED (Bio-Rad)	4 µl	2 µl	3 µl

% T: porcentaje de acrilamida + bis-acrilamida total

% C: porcentaje de bis-acrilamida respecto al 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 y 1,5 g de bis-acrilamida en 100 ml de agua bidestilada. La solución se filtró con papel de filtro y se mantuvo a 4° C protegida de la luz.

2.7.3.2.- Electroforesis bidimensional (2D-PAGE)

Mediante electroforesis bidimensional se consigue una mayor resolución en la separación de proteínas ya que, además de por tamaño, la separación también se realiza en función de su punto isoelectrico.

2.7.3.2.1.- Primera dimensión

Una vez obtenida la muestra tal y como se indica en el apartado 2.7.1.3., se procedió a la separación de las proteínas en función de su punto isoelectrico (pI). Se utilizaron tiras de 24 cm con un rango de pH 3-11 NL (ImmobilineDrystrip Gels, Amersham Biosciences) y el isoelectroenfoco se realizó en el equipo IPGphor (Amersham Biosciences) en la Unitat de Proteòmica dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona. Se añadieron 150 µg de proteína en un volumen final de 450 µl, en tampón de lisis (apartado 2.7.1.3) suplementado con una solución de anfilitos concentrada (IPG buffer, Amersham Biosciences) a una concentración de 0,5 % (v/v). Se cargaron los 450 µl de muestra en el centro del soporte de porcelana donde se sitúa la tira del isoelectroenfoco, la cual se introdujo con mucho cuidado de forma que se impregnara en su totalidad con la preparación, evitando de esta forma la concentración en un punto central de la muestra y la deshidratación de la acrilamida de la tira. Una vez cargada, se cubrió toda la superficie de la tira con IPG Cover Fluid (Amersham Biosciences) para evitar la evaporación y cristalización de la urea. A continuación, se colocaron los diferentes soportes de porcelana de cada muestra en el equipo IPGphor y se aplicó el programa de isoelectroenfoco que se detalla a continuación, con un tiempo de duración aproximado de 24 horas:

- Rehidratación de la tira: 10 h a 50 V.
- 1 h 30 min a 500 V.
- 1 h 30 min a 1000 V.
- 1 h 30 min a 2000 V.
- 1 h 30 min a 4000 V.
- 2 h a 8.000 V.
- 8000 V hasta 75.000 V/h.

Una vez finalizada la primera dimensión, si no se procedía de inmediato al desarrollo de la segunda dimensión, la tira se guardaba a -80° C en una pipeta de plástico de un sólo uso.

2.7.3.2.2.- Segunda dimensión

- *Preparación del gel:* se utilizó el sistema de montaje del equipo Ettan DALTsix (Amersham Biosciences) que permite la preparación de seis geles a la vez de dimensiones 24 x 20 cm y 1 mm de grosor. Se prepararon 450 ml de una solución de acrilamida / bis-acrilamida al 12 % con la que se rellenó el espacio entre los vidrios, dejando un espacio de 0,5 cm para permitir la colocación de la tira. A continuación, se añadieron 2 ml de agua saturada de n-butanol (50 ml de n-butanol en 5 ml de agua MilliQ) sobre cada gel, se dejó polimerizar y, transcurrida una hora, se descartó la solución de agua saturada de n-butanol y se lavó varias veces con agua bidestilada.

Solución acrilamida/bis 12 %	
H ₂ O Milli-Q	153 ml
30 % / 0,8 % acril/bis (Duracryl, Oxford Glycosystems)	180 ml
Tampón de resolución (apartado 2.7.3.1.1.)	112,5 ml
SDS 10 % (Merck)	4,5 ml
APS 10 % (Bio-Rad)	2,25 ml
TEMED (Bio-Rad)	380 μ l

- *Equilibrado de la tira*: antes de correr la segunda dimensión es necesario realizar el equilibrado de la tira. Para ello, se realizaron dos incubaciones de 15 minutos con agitación suave en tampón de equilibrado. En la primera incubación se añadieron a 10 ml de este tampón 100 mg DTT y en la segunda 250 mg de iodoacetamida (IAA).

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

ajustar a pH 8,8

- *Electroforesis*: tras el equilibrado de la tira, ésta se colocó sobre la superficie del gel. También se colocó en la parte superior derecha del gel un recorte de papel Whatman de 0,5 x 0,5 cm impregnado con 5 µl de marcador de peso molecular de precisión (Bio-Rad, apartado 2.7.3.3.). Para evitar el movimiento de la tira al añadir el tampón en la cubeta de electroforesis se selló con una solución de agarosa 0,5 % en tampón del cátodo. A continuación, se insertaron los casetes en la cubeta de electroforesis del sistema Ettan DALTsix y se rellenó con los tampones del ánodo y cátodo. Las condiciones de electroforesis se indican a continuación:

- 2,5 W/gel durante un mínimo de 30 minutos
- 100 W hasta que el frente se situaba a 1 mm del final del gel.

En todo momento se mantuvo la temperatura del sistema constante a 25° C para evitar la precipitación de la urea, que podría provocar el desdoblamiento de los “spots”.

Tampón del cátodo (x 10)	
Tris-base (Roche)	25 mM
Glicina (Sigma)	192 mM
SDS (Merck)	0,1 %

ajustar a pH 8,8

Tampón del ánodo (x 10)	
Dietanolamina (Sigma)	0,5 M
Ácido acético (Panreac)	0,5 M

2.7.3.3.- Marcadores de peso molecular

Se utilizaron dos marcadores de peso molecular:

- Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range, Bio-Rad: Utilizado en electroforesis monodimensional. Los pesos moleculares indicados a continuación son aproximados, ya que pueden variar en función del lote: 194 - 116 - 95 - 51 - 36 - 28 - 19 - 6.
- Precision Protein Standards, Bio-Rad: Utilizado en electroforesis bidimensional. Está compuesto por una mezcla de proteínas recombinantes con los siguientes pesos moleculares: 250 - 150 - 100 - 75 - 50 - 37 - 25 - 10.

2.7.3.4.- Tinción de geles de proteínas

2.7.3.4.1.- Tinción de proteínas con Azul de Coomassie®

Este tipo de tinción se utilizó para geles de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS y Tris-Tricina-SDS. La tinción se realizó sumergiendo los geles en solución de tinción durante unos 30 minutos. Para la destinción, se realizaron tres o cuatro lavados con ácido acético glacial (Panreac) 10% (v/v).

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

Filtrar la solución con papel de celulosa.

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

Para la tinción de geles de 2 dimensiones con nitrato de plata se siguió el protocolo que se detalla a continuación:

Tinción de proteínas con nitrato de plata		
Proceso	Reactivos	Tiempo
Fijación	Etanol 40 % Ácido acético 10 %	3h – O/N
Lavado	Agua MilliQ	5 minutos
Sensibilización	Acetato sódico 6,8 % (w/v) Tiosulfato sódico 0,3 % (w/v) Etanol 30 %	60 minutos
Lavado	Agua MilliQ	6 x 10 minutos
Plata	Nitrato de Plata 0,1 % (w/v)	30 minutos
Lavado	Agua MilliQ	3 x 20 segundos
Revelado	Carbonato sódico 3 % (w/v) Formaldehido 37 % (0,25 ml/l)	3-5 minutos
Lavado	Agua MilliQ	20 segundos
Stop	EDTA-Na ₂ 1,46 % (w/v)	10 minutos
Lavado	Agua MilliQ	3 x 5 minutos

2.7.4.- IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR MALDI-TOF / Q-TOF

Con esta técnica se obtiene el espectro total de la mezcla de péptidos que conforman una proteína obtenidos tras la digestión con tripsina, lo que da lugar a una “huella digital” de la masa de los péptidos de la proteína sometida a estudio. Este espectro total es el obtenido por un método que utiliza una fuente de ionización y la desorción de muestras asistida por un láser. Al tener cada proteína su propia “huella digital”, es posible comparar el espectro de la mezcla de péptidos de una proteína

problema con la base de datos del servidor MASCOT (Matriz Science) y averiguar, de esta forma, de que proteína se trata.

Para ello, se recortaron tanto bandas en geles de poliacrilamida de 1 dimensión como “spots” de geles de dos dimensiones, siempre con mucha precaución en la manipulación por la interferencia que generaría en los resultados la presencia de queratinas. Por este motivo fue necesario lavar con metanol todo el material en contacto con los geles, así como la utilización de guantes.

Todo el proceso de secuenciación por Maldi-Tof / Q-Tof fue realizado en la Unitat de Proteòmica dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

2.7.5.- SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

2.7.5.1.- Inducción de la expresión de proteínas

La sobreexpresión de proteínas se realizó mediante la construcción de plásmidos recombinantes que contienen el gen de interés clonado bajo la influencia del promotor de la polimerasa del fago T7 (Studier *et al.*, 1990). Para ello, se utilizaron los vectores de expresión de la serie pET, pET3b y pET15b, cuya diferencia radica esencialmente en la presencia en la versión más moderna del vector de una secuencia operadora *lac* frente al promotor de T7 y del gen *lacI*, que codifica una proteína que reprime la expresión en ausencia de inductor mediante su unión a secuencias operadoras *lac*. Los vectores de expresión derivados de pET3b fueron introducidos mediante transformación (apartado 2.4.1.1., con una modificación del protocolo exclusiva para esta transformación que fue la utilización de CaCl₂ 200 mM) en las cepas BL21 (DE3) (pLysE) y BL21 (DE3) (pLysS) (F' *lacI*^q). Los vectores de expresión de la serie pET15b fueron introducidos por transformación en la cepa BL21 (DE3). Todas estas cepas hospedadoras presentan el gen que codifica la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control de un promotor inducible por IPTG (isopropyl-β-D-galactopyranoside, Sigma).

Las colonias resultantes de la transformación fueron utilizadas como inóculo en medio LB suplementado con los antibióticos adecuados e incubadas a 37° C en agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ aproximadamente de 1,0, momento en que se indujo el sistema mediante adición de IPTG a una concentración final de 0,5 mM.

A partir del momento de la inducción, el protocolo seguido fue distinto en función del vector de expresión utilizado: mientras que en los sistemas de expresión basados en el plásmido pET3b el cultivo inducido se mantuvo durante 3h a 37° C en agitación, en los sistemas basados en el plásmido pET15b la temperatura se disminuyó hasta los 16° C y el tiempo de incubación se alargó hasta las 18-20 horas. En ambos casos, tras los respectivos periodos de incubación, las células fueron recogidas por centrifugación (3.000 xg, 10 minutos) y resuspendidas en un volumen adecuado de tampón A (apartado 2.7.1.2., 10 ml de tampón A por 500 ml de cultivo). Finalmente, las muestras fueron tratadas para la obtención de extractos proteicos o congeladas a -20° C hasta el momento de su utilización.

2.7.5.2.- Obtención de extractos celulares

La obtención de extractos proteicos se llevo a cabo mediante disrupción celular por presión (apartado 2.7.1.2.). En función de la localización de la proteína sobreexpresada (fracción soluble o fracción insoluble), se procedió directamente a su purificación o a la resolubilización de cuerpos de inclusión presentes en la fracción insoluble.

Cuando fue necesario, previa a la centrifugación para separar las fracciones solubles e insolubles, se realizó un tratamiento de la muestra con ADNasa I (Boehringer) durante 2 horas a 4° C.

2.7.5.3.- Solubilización de cuerpos de inclusión

Se realizaron dos lavados de la fracción insoluble con tampón LT precedidos por centrifugaciones (12.000 xg, 45 minutos a 4° C). Tras la segunda centrifugación, el precipitado se resuspendió en 8 ml de tampón SI, que contiene guanidina-HCl (desnaturalizante muy potente que solubiliza los cuerpos de inclusión). Finalmente, se añadió a la solución Tritón x 100 a una concentración final del 1 %, se centrifugó (12.000 xg, 30 minutos) y se extrajo el sobrenadante que contiene la proteína solubilizada.

Tampón LT	
Hepes (Sigma)	20 mM
KCl (Merck)	100 mM
β -mercaptoetanol (Sigma)	1 mM
Triton x 100 (Millipore)	1 %

ajustar a pH 7,9

Tampón SI	
Hepes (Sigma)	20 mM
KCl (Merck)	100 mM
Guanidina-HCl (Fluka)	6 M
β -mercaptoetanol (Sigma)	1 mM
Imidazol (Merck)	25 mM

ajustar a pH 7,9

2.7.5.4.- Purificación mediante Ni^{2+} -NTA agarosa

(Hochuli *et al.*, 1988)

Para la purificación de proteínas a las que se les había añadido una cola de 6 histidinas se utilizó el método de inmovilización por cromatografía de afinidad a metales.

2.7.5.4.1.- Purificación de proteína solubilizada a partir de cuerpos de inclusión

La muestra obtenida tras la resolubilización de los cuerpos de inclusión (apartado 2.7.5.3.) se mezcló con 1 ml de resina de níquel (Ni^{2+} -NTA Agarose, Quiagen) previamente lavada con tampón SI, y se incubó durante 1 hora a 4° C en agitación. Pasado este tiempo, la resina se lavó con tampón SI y, mediante goteo sobre una solución de tampón R en agitación con varilla magnética, se diluyó (1:10) rápidamente. El tampón R contiene NDSB 256 (N-phenyl-methyl-N,N-dimethylammonium-propane-sulfonate) que es un agente solubilizador y estabilizador de proteínas. La solución se mantuvo en agitación a 4° C durante 10 minutos, se recuperó la resina mediante centrifugación (3.000 xg, 5 minutos a 4° C), se lavó con tampón R y, finalmente, se eluyó la proteína mediante dos lavados de la resina con tampón R 200 mM imidazol.

Tampón R	
Hepes (Sigma)	20 mM
KCl (Merck)	100 mM
β -mercaptoetanol (Sigma)	1 mM
NDSB 256 (Sigma)	1 M
Imidazol (Merck)	25 mM

ajustar a pH 7,9

2.7.5.4.2.- Purificación por columna de afinidad

Cuando fue requerida una gran cantidad de proteína, su purificación se realizó mediante una columna de 2,5 cm de diámetro que contenía 5 ml de resina de níquel previamente lavada con tampón A, una bomba peristáltica (Econo Pump, Bio-Rad) y un colector de fracciones (Fraction Collector model 2110, Bio-Rad), que permite obtener muestras de hasta 4 ml.

El extracto clarificado se hizo pasar por la columna con un flujo de 0,25 ml/minuto. Seguidamente se lavó la columna con 20 ml de tampón A (1 ml/minuto), eliminando así la proteína unida a la resina de forma inespecífica, y se realizaron lavados cortos (2-3 ml) con tampón A con concentraciones crecientes de imidazol (50, 100, 150 mM, con un flujo de 0,25 ml/minuto). Finalmente, para la elución total de la proteína, se lavó la resina con 20 ml de tampón A 500 mM de imidazol. La regeneración de la columna se realizó mediante lavados de la resina con tampón A.

2.7.5.4.3.- Purificación por sistema discontinuo

El extracto obtenido se mezcló con 1 ml de resina de níquel y se incubó a 4° C en agitación con varilla magnética durante 2 horas. Transcurrido este periodo de tiempo, el extracto fue centrifugado y la resina resuspendida en 1 ml de tampón A. Se realizaron 5 lavados de un minuto de duración con 1ml de tampón A precedidos de centrifugaciones (12.000 xg, 3 minutos) para eliminar la proteína unida a la resina de forma inespecífica. Finalmente, se realizaron varios lavados de un minuto de duración

con 1 ml de tampón A con concentraciones crecientes de imidazol (50, 100, 150 y 500 mM) o directamente con tampón A 500 mM imidazol.

Todas las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación utilizando resina de níquel fueron analizadas mediante electroforesis en SDS-PAGE (apartado 2.7.3.1.), independientemente del procedimiento utilizado.

2.7.5.5.- Disociación de unión entre proteínas

Para conseguir la disociación de proteínas que copurifican por el método descrito anteriormente, previa a la elución de la proteína sobreexpresada, se realizaron lavados de la resina con concentraciones crecientes de KCl (0,5 M, 1 M y 2 M) en tampón A. Estas fracciones fueron también analizadas posteriormente mediante electroforesis en SDS-PAGE.

2.7.6.- INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS TRANSFERIDAS A MEMBRANA (WESTERN BLOTTING)

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

La inmunodetección de proteínas con anticuerpos específicos se llevó a cabo mediante la transferencia a un soporte sólido de muestras proteicas previamente separadas por electroforesis en SDS-PAGE.

2.7.6.1.- Electrotransferencia de proteínas a membrana

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm de poro (Trans-Blot[®] Transfer Medium, Bio-Rad) mediante un sistema de transferencia semi-seco utilizando el equipo Trans-Blot[®] Semi-dry Transfer Cell, Bio-Rad.

Para llevar a cabo la transferencia se depositó el gel de poliacrilamida sobre la membrana de nitrocelulosa, ambos previamente equilibrados en tampón de transferencia durante un tiempo mínimo de 10 minutos, y el conjunto se colocó entre papeles de filtro (Extra Thick Blot Paper, Bio-Rad) impregnados también con el mismo tampón, con la precaución de que no quedasen burbujas de aire entre los distintos componentes. Finalmente, se depositó el bloque entre el cátodo y el ánodo del equipo de transferencia y se aplicó un voltaje de 15 V durante 30 minutos.

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

pH 9,2 (no ajustado)

2.7.6.2.- Inmunodetección y revelado colorimétrico mediante fosfatasa alcalina

Todos los lavados e incubaciones que aparecen a continuación se realizaron a temperatura ambiente y agitación suave y constante.

Tras la transferencia, la membrana de nitrocelulosa fue sumergida en tampón de bloqueo durante 45 minutos para impedir uniones inespecíficas. Transcurrido ese tiempo, se realizó la incubación de la membrana durante una hora y 30 minutos en tampón de bloqueo que presenta diluido el anticuerpo primario específico contra la proteína a detectar. La eliminación del anticuerpo no unido de forma específica se realizó mediante 3 lavados de 10 minutos cada uno en tampón de bloqueo. A continuación, la membrana se incubó con anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (también diluido en tampón de bloqueo) durante 30 minutos. Tras esta segunda incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno en tampón de revelado. La función de estos lavados fue doble; eliminar el exceso de anticuerpo secundario y equilibrar la membrana en un tampón adecuado para llevar a cabo la reacción colorimétrica de revelado.

Para realizar el revelado, se incubó la membrana en una solución de sustrato cromogénico NBT/BCIP (4-Nitroblue tetrazolium chloride/5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-phosphate, Roche) diluido en tampón de revelado (dilución 1:50), en estático y protegida de la luz. Una vez se detectaron bandas con una intensidad adecuada, se paró la reacción colorimétrica lavando la membrana con abundante agua destilada. Finalmente, la membrana se secó con papel de celulosa para su conservación.

Tampón de bloqueo	
Tris (Roche)	10 mM
NaCl (Panreac)	500 mM
Tween-20 (Merck)	0,5 mM
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 secundario utilizados:

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	1:5.000	Conejo	Este trabajo

Anticuerpo secundario					
Anticuerpo	Enzima conjugado	Antígeno	Dilución de trabajo	Origen	Referencia
Anti-Rabbit IgG	Fosfatasa alcalina	IgG de conejo	1:30.000	Cabra	Sigma

2.7.7.- OBTENCIÓN DE SUERO INMUNE ANTI H-NS

2.7.7.1.- Obtención de proteína H-NS

La producción de proteína H-NS para obtención de anticuerpos específicos se realizó utilizando el plásmido pET3bHNSHis, que contiene clonado el gen *hns* seguido de una secuencia que codifica 6 aminoácidos histidina bajo el control del promotor de la ARN polimerasa del fago T7. La producción de proteína se llevó a cabo a partir de un cultivo de la cepa BL21 (DE3) (pLysE) (pET3bHNSHis) inducido con IPTG a 37° C durante 3 horas. La purificación se realizó mediante columna de afinidad (apartado 2.7.5.4.2.) y las fracciones obtenidas se analizaron mediante electroforesis en SDS-PAGE.

La proteína H-NS purificada se eluyó de la fracción 15 del gel de poliacrilamida, (figura 2.1.A). Para ello, se cargaron con el máximo volumen posible todos los carriles de un gel de poliacrilamida de un 1,5 mm de grosor, excepto los carriles de los extremos en los que se cargó marcador de tamaño molecular preteñido. Tras la electroforesis, se recortó un fragmento del gel que contenía uno de los marcadores de tamaño molecular y un carril de muestra para realizar una tinción con Coomassie (apartado 2.7.3.4.1.) que nos permitiera localizar exactamente la proteína en el gel y poder tomarlo como referencia a la hora de recortar la banda de interés en la porción del gel restante.

Los fragmentos recortados se introdujeron en tubos de 1,5 ml (Eppendorf), se añadió tampón del ánodo (apartado 2.7.3.1.2.) hasta cubrirlos completamente y se incubaron a 4° C en agitación orbital durante toda la noche.

Pasado este tiempo, se extrajo el tampón que contiene la proteína eluída de cada uno de los tubos y se concentró mediante centrifugación al vacío (Speed-Vac, Savant Instruments Inc.). La eficacia del procedimiento se comprobó mediante análisis electroforético (figura 2.1.B).

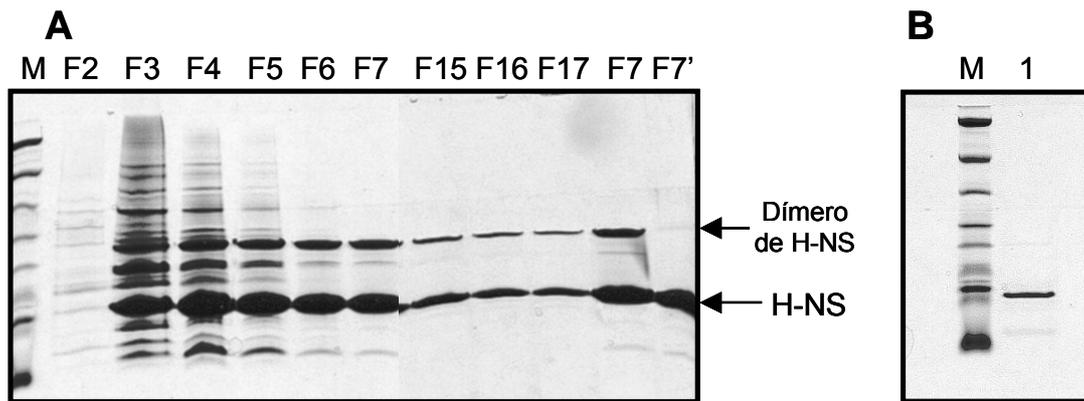


Figura 2.1. Purificación de la proteína H-NS a partir de 1 l de cultivo de la cepa BL21 (DE3) (pLysE) (pETHNSHis) inducido durante 3 horas a 37° C (A) y alícuota de proteína eluída de un gel de poliacrilamida (B). Análisis de las fracciones en SDS-PAGE y tinción con Coomassie. M, Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range de Bio-Rad; F2-F17, fracciones obtenidas mediante purificación con columna; F7', fracción 7 tratada con DTT 20 mM; 1, proteína H-NS purificada.

2.7.7.2.- Inmunización del conejo

La obtención de suero inmune se llevó a cabo en el estabulario de la Facultat de Farmacia de la Universidad de Barcelona. El animal utilizado fue el conejo.

La inmunización se realizó suministrando 3 dosis de antígeno separadas en el tiempo por 15 días. En cada una de estas dosis, se suministraron al animal entre 75 y 100 µg de antígeno diluido en el mismo volumen de coadyuvante de Freud (Sigma), mediante inyecciones subcutáneas multifocales (200 µl por punto). Mientras que en la primera dosis este coadyuvante de Freud fue completo (emulsión de agua y aceites no metabolizables que contiene células muertas de *Mycobacterium tuberculosis*), en la segunda y tercera dosis fue incompleto (no incluía células de *M. tuberculosis*).

2.7.7.3.- Obtención del suero inmune

Tras 15 días desde la aplicación de la última dosis, se extrajeron 4 ml de sangre del conejo inmunizado con la finalidad de valorar la calidad y cantidad de los

anticuerpos presentes. Para ello, se incubó la sangre durante 2 horas a 4° C, se centrifugó (12.000 xg, 3 minutos a 4° C) y se recogió el sobrenadante con el que se realizó la inmunodetección de proteínas transferidas a membrana (apartado 2.7.6.). Una vez comprobada la calidad y cantidad de los anticuerpos se procedió al desangrado del animal y la obtención del total del antisuero.

Las pruebas realizadas para comprobar calidad y cantidad de los anticuerpos demostraron que no reconocían la cola de 6 aminoácidos histidina, lo que permitió la utilización de estos anticuerpos en extractos que contuvieran proteína purificada mediante agarosa de níquel sin problemas por reacción cruzada.

2.7.8.- VALORACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

2.7.8.1.- Determinación de la actividad β -galactosidasa

(Miller, 1992)

A la DO_{600} escogida para medir la actividad β -galactosidasa, se recogieron alícuotas de entre 50-500 μ l del cultivo sometido a estudio y se llevaron a un volumen final 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 agitó la mezcla con un vórtex durante 15 segundos para lisar las células. A continuación, se incubó la muestra durante 5 minutos en un baño a 28° C y se añadió el ONPG (o-Nitrophenyl-b-D-galactopyranoside, Sigma; 4 mg/ml en tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,0). Se incubaron las muestras hasta la aparición de color amarillo de una absorbancia entre 0,3-0,6, momento en el que se detuvo la reacción mediante la adición de 0,5 ml de Na_2CO_3 1 M. Las muestras se dejaron reposar unos minutos y se midió la absorbancia a las longitudes de onda de 412 nm y 550 nm.

Tampón Z	
Na ₂ HPO ₄ (Merck)	60 mM
NaH ₂ PO ₄ (Merck)	40 mM
KCl	10 mM
MgSO ₄	1 mM
β- mercaptoetanol	50 mM
pH 7,0 (no autoclavar)	

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

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

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

U: Unidades Miller.

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

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

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

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