



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

Facultat de Biologia

Departament de Microbiologia

**Les famílies de proteïnes Hha/YmoA i H-NS: regulació global de
l'expressió gènica a *Escherichia coli* i paper en la conjugació plasmídica.**

Núria Forns Fradera

Tesi Doctoral

Barcelona, abril 2006

2. MATERIALS I MÈTODES

2.1 SOQUES BACTERIANES, BACTERIÒFAGS I PLÀSMIDS

Totes les soques utilitzades en aquest treball, pertanyen a l'espècie d'*Escherichia coli* de la família de les Enterobacteriaceae, bacils Gram-negatius i anaerobis facultatius. Les característiques genotípiques es detallen a la taula 2.1.1.

Taula 2.1.1 Soques d'*Escherichia coli* utilitzades en aquest treball.

Soca	Genotip rellevant	Referència / Origen
5K	F ⁻ , <i>hdsR</i> , <i>hdsM</i> , <i>thr</i> , <i>thi</i> , <i>leu</i> , <i>lacZ</i>	Juárez <i>et al.</i> , 1984
5K <i>hns</i>	5K <i>hns</i> ::ampR	Forns <i>et al.</i> , 2005
Hha3	5K <i>hha</i> ::Tn5 <i>phoA</i>	Godessart <i>et al.</i> , 1988
YdgT	5K Δ <i>ydgT</i>	Paytubi <i>et al.</i> , 2004
Hha3 YdgT	Hha3 Δ <i>ydgT</i>	Paytubi <i>et al.</i> , 2004
Hha3 <i>hns</i>	Hha3 <i>hns</i> ::ampR	Forns <i>et al.</i> , 2005
5K Rif	5K, Rif ^r	Nieto <i>et al.</i> , 1998
RG192	K-12 Δ <i>lac</i> , Δ <i>ara-leu</i> , Rif ^r	Taylor i Grant, 1997
BSN26	MC4100 <i>trp</i> ::Tn10	Johanson <i>et al.</i> , 1998
BSN26Y	BSN26 Δ <i>ydgT</i>	Paytubi <i>et al.</i> , 2004
BSN26H	BSN26 Δ <i>hha</i>	Nieto <i>et al.</i> , 2000
BSN27	MC4100 <i>trp</i> ::Tn10 Δ <i>hns</i>	Johanson <i>et al.</i> , 1998
BSN27H	BSN27 Δ <i>hha</i>	Nieto <i>et al.</i> , 2000
BNS26HY	BSN26 Δ <i>ydgT</i> , Δ <i>hha</i>	Paytubi <i>et al.</i> , 2004
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hdsR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB lacI^d Z</i> Δ M15 Tn10 (Tc ^r)]	Bullock <i>et al.</i> , 1987
BL21 (DE3)	<i>hdsS</i> , <i>gal</i> , (λ <i>CIts857</i> , <i>ind1</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i> , <i>lacUV5-T7 gene1</i>)	Studier i Moffatt, 1986
BL21 (DE3)- Km	BL21 (DE3) Δ <i>hns</i> ::Km ^r	Zhang <i>et al.</i> , 1996
PND2000	MC4100, λ RS88[<i>degP-lacZ</i>]	Danese <i>et al.</i> , 1995

S17-1 λ pir	Tp ^r , Sm ^r , <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hdsR</i> ⁻ H ^r , RP4:2- Tc:Mu:Km Tn7, λ pir	Miller i Mekalanos, 1988
S614	CSH50 Δ bgl-AC11 Δ lacZ(<i>pro</i> ⁺) <i>hns</i> ::ampR	Dersch <i>et al.</i> , 1993

A la taula 2.1.2 es mostren els plàsmids utilitzats i se'n detallen les característiques i referències d'aquests.

Taula 2.1.2 Plàsmids utilitzats en aquest treball.

Plàsmid	Descripció	Referència / origen
pLG338-30	<i>ori</i> _{psc101} ; Ap ^r	Cunningham <i>et al.</i> , 1993
pUC19	<i>ori</i> _{colE1} ; Ap ^r	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pANN202-312	pACYC184 + <i>hlyC</i> , <i>hlyA</i> , <i>hlyB</i> , <i>hlyD</i> ; Cm ^r	Goebel i Hedgpeth, 1982
pANN202-312R	pACYC184 + <i>hlyR</i> , <i>hlyC</i> , <i>hlyA</i> , <i>hlyB</i> , <i>hlyD</i> ; Cm ^r	Godessart <i>et al.</i> , 1988
pDFY436	<i>ori</i> _{p15A} , Cm ^r , <i>bglG-lacZ</i>	Caramel i Schnetz, 1998
pSINATRA131	pRS415 + <i>degP-lacZ</i>	Danese <i>et al.</i> , 1995
R27	IncHI1, Tc ^r	Grindley <i>et al.</i> , 1972
R27- <i>hha</i>	R27 <i>hha</i> ::mini-Tn5Km1	Forns <i>et al.</i> , 2005
R27- <i>hns</i> -Cm	R27 Δ <i>hns</i> :: <i>cat</i>	Forns <i>et al.</i> , 2005
R27- <i>hns</i>	R27 Δ <i>hns</i>	Forns <i>et al.</i> , 2005
R27- <i>hha-hns</i>	R27- <i>hha</i> Δ <i>hns</i>	Forns <i>et al.</i> , 2005
pKD3	<i>oriR</i> γ , Cm ^r , Ap ^r	Datsenko i Wanner, 2000
pKD46	<i>oriR101</i> , <i>repA101</i> (ts), <i>araBp</i> - <i>gam-bet-exo</i> (Red helper plasmid, Ts; Ap ^r)	Datsenko i Wanner, 2000
pCP20	<i>FLP</i> ⁺ , λ cI857 (ts), λ p _R Rep (ts), Km ^r	Cherepanov i Wackernagel, 1995
pUTmini-Tn5Km1	Ap ^r , Km ^r , ori R6K, mini- Tn5Km1	De Lorenzo <i>et al.</i> , 1990

pET15b	<i>ori</i> _{PMB1} , promotor T7, Ap ^r	Novagen (Madisson, WI)
pET-HISHHA1	pET3b + 6xHis- <i>hha</i> ; Ap ^r	Nieto <i>et al.</i> , 2000
pET15b-HISHHA1	pET15b + 6xHis- <i>hha</i> ; Ap ^r	Aquest treball.
pET-ORF164	pET15b + orf164 de R27; Ap ^r	Aquest treball.

En aquest treball es va utilitzar el fag lític P1 *vir* (Miller, 1992) com a eina per a la transducció generalitzada.

2.2 MEIDS DE CULTIU I ANTIBIÒTICS

2.2.1 MEDIS DE CULTIU

Es van utilitzar diferents medis de cultiu per al creixement bacterià, a continuació se'n detalla la seva composició:

- **LB** (Luria-Bertani; Sambrook *et al.*, 1989): medi de cultiu líquid utilitzat de manera rutinària per al creixement bacterià.

Composició LB g/l	
Peptona trípsica de caseïna (Schärlau Microbiology)	10
Extracte de llevat (Schärlau Microbiology)	5
NaCl (Panreac)	10

La composició d'aquest medi podia variar segons les condicions en que es volgués fer créixer els bacteris. Si en condicions normals la molaritat de NaCl era de 170 mM, en d'altres casos s'augmentava l'osmolaritat del medi portant la concentració de NaCl a 0,5M o en cas contrari es disminuïa utilitzant LB sense NaCl.

- **LB agar:** Medi de cultiu sòlid compost de LB suplementat amb 15 g/l d'agar per a bacteriologia (Schärlau Microbiology). Aquest medi s'utilitzava habitualment pel creixement bacterià en placa.

• **Agar-sang:** Medi de cultiu sòlid format per LB agar al que se li afegeix un 5% (v/v) de sang desfibrinada estèril de xai (Oxoid) quan aquest ja ha estat prèviament esterilitzat amb l'autoclau i s'ha atemperat aproximadament a uns 50°C. Aquest medi s'utilitzava per a la detecció en placa d'activitat hemolítica externa de les soques estudiades.

• **Agar- β -glucòsid** (Schnetzer *et al.*, 1987): Medi sòlid suplementat amb salicina i un indicador de pH. Aquest medi s'ha utilitzat per a la selecció de mutants *hns* ja que en aquests hi ha una desrepressió de l'operó *bgl*, detectable pel canvi de color de l'indicador de pH.

Composició Agar- β -glucòsid g/l	
Extracte de llevat (Schärlau Microbiology)	3
Triptona (Schärlau Microbiology)	6
Agar per a bacteriologia (Schärlau Microbiology)	15

* Autoclavar el medi i un cop refredat, afegir salicina al 0,5% i blau de bromotimol al 0,02% a partir de les solucions mare.

Solució de salicina: Es va preparar una solució mare de salicina al 5 % (p/v) en aigua, es va escalfar per facilitar-ne la dissolució i es va esterilitzar per filtració.

Solució de blau de bromotimol: Es va preparar una solució al 2 % (p/v) en etanol 50 % (v/v) i NaOH 0,2N.

• **LB agar-tou:** Medi utilitzat en l'obtenció i titulació de lisats fàgics. La composició és la del medi LB suplementat amb 6 g/l d'agar per a bacteriologia.

• **SOB** (Hanahan *et al.*, 1991): Medi de cultiu líquid utilitzat per al creixement bacterià en els experiments d'inactivació de gens cromosòmics (veure apartat 2.5.1).

Composició SOB g/l	
Peptona trípsica de caseïna (Schärlau Microbiology)	20
Extracte de llevat (Schärlau Microbiology)	5
NaCl (Panreac)	0,58
KCl (Merck)	0,19
MgCl ₂ + MgSO ₄ * (Merck, Merck)	20 mM

*A partir d'una solució mare Mg²⁺ 2M (MgCl₂ 1 M, MgSO₄ 1 M).

• **SOC** (Hanahan *et al.*, 1991): Medi de cultiu líquid utilitzat en l'inactivació de gens cromosòmics per fragments de PCR. S'utilitzava com a medi de recuperació de les cèl·lules després de l'electroporació. Es tracta de medi SOB suplementat amb glucosa 20 mM.

• **Brou de Penassay (BP)** (Grove i Randall, 1955): Medi de cultiu líquid utilitzat pel creixement de les soques pels assajos de conjugació del plàsmid R27.

Composició BP g/l	
Peptona trípsica de caseïna	5
Extracte de llevat	1,5
Extracte de carn (ADSA Micro)	1,5
Glucosa (Panreac)	1
NaCl (Panreac)	3,5
K ₂ HPO ₄ (Merck)	3,68
KH ₂ PO ₄ (Merck)	1,32

• **Agar MacConkey** (Schärlau Microbiology): Medi selectiu i diferencial per la família de les Enterobacteriaceae utilitzat pels assajos de conjugació del plàsmid R27 i per saber si una enterobactèria és lactosa positiva.

Composició Agar MacConkey g/l	
Peptona trípsica de caseïna	20
Lactosa	10
Sals biliars	2,5
NaCl	5
Roig neutre	0,05
Cristall violeta	0,001
Agar per a bacteriologia	15

• **LB agar suplementat amb X-Gal:** s'utilitzava per saber si una soca és capaç de degradar la lactosa (Lac⁺) degut a la presència de l'enzim β -galactosidasa. El X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosid) és un substrat anàleg a la lactosa que pot ser degradat per la β -galactosidasa donant color blau a les colònies. Es prepara una solució mare de X-Gal (Roche) a 80 mg/ml dissolt en dimetilformamida (Probus) i s'afegeix al LB agar ja autoclavat a una concentració final de 80 g/ml.

• **TSA (Schärlau Microbiology):** Medi de cultiu sòlid utilitzat per al creixement bacterià en general.

Composició TSA g/l	
Peptona de caseïna	17
Peptona de soja	3
NaCl	5
Fosfat dipotàssic	2,5
Dextrosa	2,5
Agar per a bacteriologia	15

Tots els medis citats es van esterilitzar en l'autoclau, durant 15 minuts a una temperatura de 121°C.

2.2.2 ANTIBIÒTICS

Quan va ser necessari, els diferents medis de cultiu esmentats es van suplementar amb antibiòtics. Aquests antibiòtics s'afegien al medi a partir d'una solució concentrada preparada seguint les instruccions de la bibliografia (Sambrook *et al.*, 1989).

Ampicil·lina (Ap): (Sal sòdica, Roche). Es va preparar una solució concentrada de 100 mg/ml en aigua destil·lada, es va esterilitzar per filtració i es va guardar a -20°C. Les concentracions finals que es varen utilitzar eren de 25, 50 o 100 µg/ml, segons el número de còpies dels plàsmids que codificaven per la resistència a l'antibiòtic. Per la resistència codificada al cromosoma s'utilitzava a concentracions de 50 µg/ml.

Cloramfenicol (Cm): (Fluka). A partir d'una solució concentrada de 100 mg/ml en etanol absolut (Prolabo) i guardada a -20°C, es va utilitzar a concentracions finals de 25 o 50 µg/ml segons el plàsmid que codificava per la resistència.

Kanamicina (Km): (Sulfat àcid, Sigma). Es va preparar una solució mare de 50 mg/ml en aigua destil·lada, es va esterilitzar per filtració i es va guardar a -20°C. La concentració final en el medi ha estat de 25 µg/ml, ja que s'ha utilitzat per a resistències codificades a nivell cromosòmic.

Tetraciclina (Tc): (Hidroclorur, Fluka). Es va preparar una solució a una concentració final de 12,5 mg/ml en etanol al 50% (v/v), es va esterilitzar per filtració i es va guardar a -20°C protegida de la llum. La concentració final en el medi va ser de 15 µg/ml.

- **Rifampicina (Rif):** (Fluka). Es va preparar una solució mare de 50 mg/ml en aigua destil·lada i es va anar afegint gota a gota NaOH 2N fins a la completa dissolució. Es va esterilitzar per filtració i es va guardar a -20°C. La concentració final en el medi ha estat de 50 µg/µl.

- **Estreptomicina (Sm)** (Sulfat, Sigma): Es va preparar una solució concentrada de 50 mg/ml en aigua destil·lada, es va esterilitzar per filtració i es guardà a -20°C. S'utilitzava a una concentració final de 50 µg/µl.

- **Espectinomicina (Sp)** (Sigma): Es va preparar una solució concentrada de 50 mg/ml en etanol 30 %, es va esterilitzar per filtració i es guardà a -20°C. S'utilitzava a una concentració final de 50 µg/µl.

2.3 MÈTODES MICROBIOLÒGICS

2.3.1 ESTERILITZACIÓ

Els medis de cultiu, material de vidre i plàstic i les solucions utilitzades en aquest treball, es van esterilitzar per calor humit i pressió en l'autoclau durant 15 minuts a 121°C i 2 atmosferes.

Per contra, les solucions que no permetien ser esterilitzades per aquest mètode, es van esterilitzar per filtració a través de filtres estèrils de 0,22 µm de diàmetre de porus (Millipore).

Per l'eliminació de RNases, quan era necessari, s'autoclavaven les solucions durant 45 min a 121°C i 2 atmosferes, o bé es netejava amb SDS 0,1% (p/v) el material no apte per a ser esterilitzat en l'autoclau.

2.3.2 MANTENIMENT DE MICROORGANISMES

Totes les soques d'aquest treball es van mantenir viables de dues maneres. En primer lloc, es tenien cultius en placa de cada una d'elles i s'anaven resembrent en els seus corresponents medis sòlids cada 6-7 setmanes. Per altra banda, també es mantenien per congelació a -70°C, en glicerol al 20% (v/v).

Els bacteriòfags es mantenien a 4°C en forma de lisat fàgic en el mateix sobrenedant del cultiu del qual es van obtenir i amb unes gotes de cloroform per tal d'evitar contaminació bacteriana.

2.4 MÈTODES DE TRANSFERÈNCIA GENÈTICA

2.4.1 TRANSFORMACIÓ BACTERIANA

Per tal de dur a terme la transformació de cèl·lules bacterianes es van utilitzar dues estratègies diferents. Normalment, es va utilitzar el mètode del CaCl_2 fred, però en els casos en que l'eficiència de transformació era molt baixa, o en la tècnica d'inactivació de gens cromosòmics utilitzant fragments de PCR, el mètode seguit va ser l'electroporació.

2.4.1.1 Transformació de cèl·lules competents obtingudes mitjançant tractament amb CaCl_2 (Cohen *et al.*, 1972)

A partir d'un inòcul crescut tota la nit es realitzava una dilució 1:50 en medi fresc i s'incubava fins a assolir la meitat de la fase exponencial (2 o 3 hores després d'inocular, a 37°C i 200 rpm). En aquest punt del creixement, el cultiu es centrifugava ($3000 \times g$, 10 minuts, 4°C) i es ressuspensia en la meitat de volum de CaCl_2 50 mM estèril i fred (4°C). Es repetia la centrifugació però aquest cop menys temps ($3.000 \times g$, 5 minuts, 4°C) i les cèl·lules es ressuspensien ara en 1/20 del volum inicial de CaCl_2 50 mM fred. Les cèl·lules competents obtingudes per aquest procés s'incubaven en gel un mínim d'1 hora i un màxim de 24 hores abans de ser transformades.

Alíquotes de 100 μl de cèl·lules competents es van posar en contacte amb un volum d'1 a 10 μl de DNA plasmídic. La barreja es va incubar durant 30 minuts en gel i posteriorment es va sotmetre a un xoc tèrmic de 45 segons a 42°C en un bany termoestàtic. A continuació s'afegia a les cèl·lules 900 μl de LB sense suplementar amb cap antibiòtic i s'incubaven a 37°C durant 1 hora a 200 rpm per tal de permetre l'expressió dels marcadors fenotípics transmesos (expressió de les resistències a antibiòtics). La transformació va ser sembrada en medi sòlid suplementat amb els marcadors selectius del plàsmid.

2.4.1.2 Electroporació (Dower *et al.*, 1988)

Quan la transformació pel mètode del CaCl₂ fred descrit en l'apartat anterior no permetia la transferència de DNA, el mètode utilitzat era l'electroporació. Aquesta tècnica permet la captació de DNA mitjançant la permeabilització de les membranes provocada per una descàrrega elèctrica. Per aquesta tècnica l'eficàcia de transformació augmenta considerablement, obtenint entre 10⁹-10¹⁰ transformants per µg de DNA.

A partir d'un inòcul crescut tota la nit es realitzava una dilució 1:50 en medi fresc i s'incubava fins a assolir una DO₆₀₀ de 0,5 aproximadament. Després de refredar en gel el cultiu (generalment 10 ml), aquest es va centrifugar repetides vegades a 3.000 x g, 10 minuts a 4°C i ressuspendre successivament en 1; 0,5; 0,1 i finalment en 0,005 volums de glicerol 10% estèril i fred (4°C). D'aquesta manera es va aconseguir disminuir la força iònica de la suspensió cel·lular. Es barrejaven 50 µl de cèl·lules obtingudes per aquest procés amb 1-5 µl d'una suspensió de DNA, es mantenia la barreja uns minuts en gel i a continuació es transferia a cubetes de 2 mm de separació entre elèctrodes (BTX).

L'electroporador utilitzat era el Electroporator 2510 (Eppendorf). Les condicions d'electroporació van ser les que es mostren a la següent taula:

Condicions d'electroporació d' <i>E. coli</i>	
Temperatura	4°C
Mode	2,5 kV / Resistència d'alt voltatge
Capacitància	No utilitzar en mode d'alt voltatge
Resistència	R5 (129 Ω)
Voltatge de la descàrrega	2 kV
Força del camp elèctric aplicat	10 kV / cm (màxim)
Duració del pols	5 ms

Un cop realitzada la descàrrega elèctrica, se li afegia 1 ml de LB o de medi SOC segons el cas, sense suplementar amb cap antibiòtic, i es passava a un tub eppendorf. La suspensió s'incubava a 37°C durant 1 hora a 200 rpm per tal de permetre l'expressió dels marcadors fenotípics transmesos (expressió de les

resistències a antibiòtics). Les cèl·lules transformades es van seleccionar en medi sòlid suplementat amb els marcadors corresponents.

2.4.2 CURAT DE PLÀSMIDS

El curat de plàsmids es va obtenir en la majoria dels casos per successius subcultius de la soca portadora del plàsmid en medi LB sense els marcadors de resistència codificats pel plàsmid. Després del subcultiu es van sembrar dilucions adequades en plaques de medi LB sense antibiòtics. Les colònies obtingudes es van ressemmar per duplicat en plaques del mateix medi de cultiu amb i sense antibiòtics. Les colònies que creixien a la placa sense antibiòtic però que no ho feien a la placa amb antibiòtic corresponien a curats del DNA plasmídic.

2.4.3 CONJUGACIÓ

2.4.3.1 Conjugació en medi sòlid

La conjugació en medi sòlid es va dur a terme pel plàsmid pUTmini-Tn5Km1, utilitzat per realitzar la mutagènesi amb el plàsmid pUTmini-Tn5 (De Lorenzo *et al.*, 1990).

Es va partir de cultius de tota la nit de les soques donadora S17-1 λ pir pUTmini-Tn5Km1 amb Ap (100 μ g/ml) i Km (25 μ g/ml), i de la soca receptora amb els antibiòtics pels quals presenta resistència. Aquests cultius es van centrifugar durant 10 min a 3.000 x g i les cèl·lules es van ressuspendre en LB, repetint-ho tres vegades successives per tal de rentar els antibiòtics. Finalment, les cèl·lules es van ressuspendre en el mateix volum de MgSO₄ 10 mM. Alíquotes de 0,1 ml a 1 ml de les soques donadora i receptora es van barrejar en un volum final de 5 ml de MgSO₄ 10 mM i es varen filtrar a través de filtres de 0,22 μ m de porus (Millipore). El filtre amb les cèl·lules cara amunt es col·locà sobre una placa amb medi LB agar i s'incubà 6 h a 30°C. El creixement obtingut sobre el filtre es va ressuspendre en 2 ml de MgSO₄ 10 mM. Aquesta suspensió va ser sembrada en plaques de LB agar suplementat amb els

antibiòtics corresponents a la soca receptora més l'antibiòtic corresponent al minitransposó, en aquest cas la kanamicina.

2.4.3.1 Conjugació en medi líquid

Aquest protocol es va dur a terme per conjuguar el plàsmid R27 i es va seguir el procediment descrit per Taylor i Levine, 1980.

Es va partir de cultius de tota la nit (16-18 h) de la soca donadora i de la soca receptora crescudes en BP a la temperatura a la què es volgués dur a terme l'aparellament i sense agitació. A 1 ml de BP preincubat a la temperatura desitjada se li afegien 0,4 ml del cultiu de la soca receptora i 0,1 ml del cultiu de la soca donadora del plàsmid R27. Aquesta barreja era incubada durant 2 h a la mateixa temperatura sense agitació.

Per tal de calcular la freqüència de conjugació del plàsmid es feia un recompte de viables de la soca donadora i de les colònies transconjugants. Es van sembrar les dilucions adequades en plaques d'agar MacConkey suplementades amb els antibiòtics corresponents a la soca donadora per una costat, i per un altre es van sembrar les dilucions adequades en agar MacConkey suplementat amb els antibiòtics selectius per la soca transconjugant. La freqüència de conjugació es va calcular com la relació de cèl·lules transconjugants respecte les cèl·lules donadores.

2.4.4 TRANSDUCCIÓ GENERALITZADA AMB EL BACTERIÒFAG P1 *vir*

(Miller, 1992)

El bacteriòfag P1_{vir} és un derivat virulent del bacteriòfag P1 al que li manca la capacitat de lisogenitzar les cèl·lules que infecta. Aquest bacteriòfag va ser utilitzat en aquest treball per a la introducció de mutacions (que portaven associades un marcador) per recombinació homòloga. Com a pas previ a la transducció generalitzada, primer es va haver d'obtenir un lisat de la soca donadora de la mutació.

2.4.4.1 Obtenció de lisats de P1vir

Es van barrejar 10^7 partícules fàgiques de P1vir d'un lisat preexistent amb 1 ml d'un cultiu en fase exponencial en medi LB suplementat amb CaCl_2 5 mM de la soca donadora. Es va seguir amb una incubació de 20 minuts a 37°C sense agitació per permetre la unió cèl·lula-fag. Passat aquest temps, s'hi van afegir 2,5 ml de LB agar-tou (suplementat amb CaCl_2 2 mM i glucosa 0,1%), es va estendre la barreja sobre una placa de LB agar (CaCl_2 2 mM i glucosa 0,1%), es va deixar solidificar i la placa s'incubà a 37°C sense invertir. Passades 18-24 hores, es van afegir 2 ml de LB a la capa de LB agar-tou, es va recollir amb la nansa de vidre i es va introduir en un tub de centrífuga juntament amb unes gotes de cloroform. Es va agitar vigorosament i les restes cel·lulars i d'agar es van separar per centrifugació ($12.000 \times g$, 10 min). El sobrenedant obtingut, corresponent al lisat fàgic, es va conservar a 4°C amb unes gotes de cloroform.

2.4.4.2 Titulació dels lisats de P1vir

Alíquotes de 100 μl d'un cultiu crescut durant tota la nit de la soca *E. coli* 5K en LB suplementat amb CaCl_2 5 mM es van barrejar amb 100 μl de diferents dilucions del lisat de P1vir. Després d'incubar la barreja a 37°C durant 10 minuts sense agitació, s'hi van afegir 2,5 ml de LB agar-tou suplementat amb CaCl_2 2 mM i glucosa 0,1%, i es decantà sobre una placa de LB agar (amb CaCl_2 2 mM i glucosa 0,1%). Es varen incubar les plaques a 37°C durant 18-24 h. La titulació del lisat es va fer a partir del recompte del número de calbes de lisi.

2.4.4.3 Transducció amb P1vir

Les cèl·lules d'un cultiu de tota la nit de la soca receptora per a ser transduïda es van centrifugar i ressuspendre en el mateix volum de tampó MC. Es varen barrejar 100 μl de la suspensió de cèl·lules amb 100 μl de diferents dilucions del lisat fàgic, per tal de tenir varies multiplicitats d'infecció (generalment 1:0,1; 1:1; 0,1:1). Després d'incubar la barreja durant 20 minuts a 37°C sense agitació, s'hi van afegir

0,2 ml de tampó Citrat per inhibir la readsorció del bacteriòfag. Es va sembrar la barreja de transducció en plaques de LB agar, suplementades amb els marcadors necessaris per a la selecció de les cèl·lules transductants, i s'incubaren a 37°C.

Composició tampó MC	
MgSO ₄	0,1 M
CaCl ₂	5 mM

Composició tampó Citrat	
C ₆ H ₈ O ₇	0,1 M

Afegir 4,4 g de NaOH per cada 500 ml de tampó, ajustar el pH a 5,5 amb NaOH i autoclavar.

2.5 TÈCNIQUES DE MUTAGÈNESI

2.5.1 MUTAGÈNESI AMB mini-Tn5

Els minitransposons són derivats del transposons compostos, en aquest cas del Tn5. A aquests elements els manca el gen que codifica la transposasa i inclouen un gen que confereix resistència a un antibiòtic flanquejat per una seqüència de 19 pb dels extrems I i O del Tn5. El vector de transmissió d'aquests transposons és el plàsmid pUT (Herrero *et al.*, 1990). Aquest plàsmid té un origen de replicació dependent de la proteïna π (derivat del plàsmid R6K) i l'origen de transferència *oriT* derivat del plàsmid conjugatiu RP4. A més a més, el plàsmid pUT té el gen que codifica la transposasa, necessària per la transposició, adjacent al lloc on està clonat el mini-Tn5. El plàsmid pUTmini-Tn5 es manté estable i amb capacitat de ser mobilitzat en la soca S17-1 λ pir, la qual produeix la proteïna π i expressa les funcions per a la conjugació de RP4. En la mutagènesi amb mini-Tn5 es transfereix el plàsmid pUTmini-Tn5 per conjugació a una soca no productora de la proteïna π . En la soca receptora de la conjugació, el plàsmid pUTmini-Tn5 no es pot mantenir estable, de

manera que els transconjugants seleccionats per la resistència a l'antibiòtic codificada pel minitransposó són mutants per inserció del mini-Tn5.

Les avantatges de l'ús dels minitransposons són les següents:

- La reducció de la mida dels minitransposons facilita la manipulació pel clonatge de les insercions.

- Al no tenir codificada la transposasa, els minitransposons generen insercions estables en el cromosoma i la soca mutant pot ser novament mutagenitzada pel mateix sistema amb altres minitransposons que codifiquin antibiòtics diferents.

Aquesta mutagènesi es va dur a terme per mutagenitzar el gen *orf182* del plàsmid R27. El procediment seguit va ser descrit per De Lorenzo *et al.*(1990), i està detallat a l'apartat 2.4.2.1.1 (Conjugació amb el plàsmid pUTmini-Tn5Km1).

2.5.2 INACTIVACIÓ DE GENS CROMOSÒMICS UTILITZANT FRAGMENTES DE PCR (Datsenko i Wanner, 2000)

Amb aquesta metodologia és possible reemplaçar una seqüència cromosòmica amb un gen de resistència per a un antibiòtic, generat per PCR, utilitzant oligonucleòtids amb extensions homòlogues corresponents al gen a disrupcionar. Aquestes extensions permetran la recombinació mitjançada per la recombinasa Red en les regions flanquejants del gen. Després de la selecció de mutants, la resistència pot ser eliminada utilitzant un plàsmid auxiliar que expressa la recombinasa FLP, que actua en la repetició directe FRT adjacent al gen de la resistència.

Vam utilitzar aquesta tècnica per mutagenitzar el gen *orf164* del plàsmid R27.

2.5.2.1 Generació del fragment de PCR

La resistència a antibiòtic (Cm) del plàsmid pKD3 es va amplificar utilitzant oligonucleòtids que en l'extrem 5' continguessin seqüències homòlogues (d'entre 35 i 50 nucleòtids) al gen a disrupcionar (H1 i H2) més la seqüència corresponent a P1 i P2 del plàsmid pKD3 (veure figura 2.5.1). En total els oligonucleòtids mesuraven entre 56 i 70 nucleòtids. D'aquesta manera, en amplificar la resistència a cloramfenicol per PCR (apartat 2.6.4) utilitzant el plàsmid com a motlle, es genera un

fragment que conté la resistència a cloramfenicol flanquejada pels llocs FRT, les seqüències corresponents a P1 i P2 i seqüències homòlogues al gen que es vol disrupcionar. Després de l'amplificació es va purificar el fragment per electroelució (apartat 2.6.7) i posteriorment es va digerir amb l'enzim de restricció *DpnI* per tal d'eliminar el DNA motlle utilitzat en la PCR, ja que aquest enzim digereix el DNA metilat. Posteriorment es repurificava el fragment.

2.5.2.2 Transformació a la soca d'*E. coli* pKD46

El plàsmid pKD46 codifica la recombinasa Red de λ , sota el control d'un promotor induïble per L-arabinosa, i és fàcilment curable per creixement a 37°C ja que té un origen de replicació termosensible. La recombinasa Red, a més d'afavorir la recombinació, inhibeix l'exonucleasa V, permetent així l'entrada a la cèl·lula d'un fragment de PCR sense que aquest sigui digerit. El plàsmid portador de la recombinasa presenta resistència a ampil·lina (100 µg/ml).

Es va fer créixer la soca que es volia mutagenitzar transformada amb el plàsmid pKD46 a 30°C en medi SOB suplementat amb ampil·lina i L-arabinosa 10 mM (Sigma) fins a una DO₆₀₀ de 0,6. Quan la soca va arribar a aquest punt del creixement, es van obtenir cèl·lules electrocompetents.

Alíquotes de 25 µl d'electrocompetents es van electroporar amb 10-100 ng de producte de PCR (condicions de l'electroporació a l'apartat 2.4.1.2). Un cop realitzat el xoc elèctric, se'ls va afegir 1 ml de medi SOC i es van mantenir durant 1 hora a 37°C per tal d'afavorir la recombinació i l'expressió del marcador.

La selecció es va fer sembrant la meitat de les cèl·lules en plaques de medi sòlid TSA suplementades amb cloramfenicol (marcador de la mutació). La resta de transformants es van deixar entre 18-24 hores a temperatura ambient i es van sembrar passat aquest temps en el mateix medi. Les plaques es van deixar a 37°C entre 2 i 3 dies.

Un cop obtinguda alguna possible colònia es va curar el plàsmid pKD46, mitjançant diverses sèmres en plaques de TSA sense antibiòtic i a 43°C.

Per a comprovar que la inserció era correcte, es van fer amplificacions de fragments per PCR utilitzant diferents parells d'oligonucleòtids. En la figura 2.5.3 es mostra un esquema del procés.

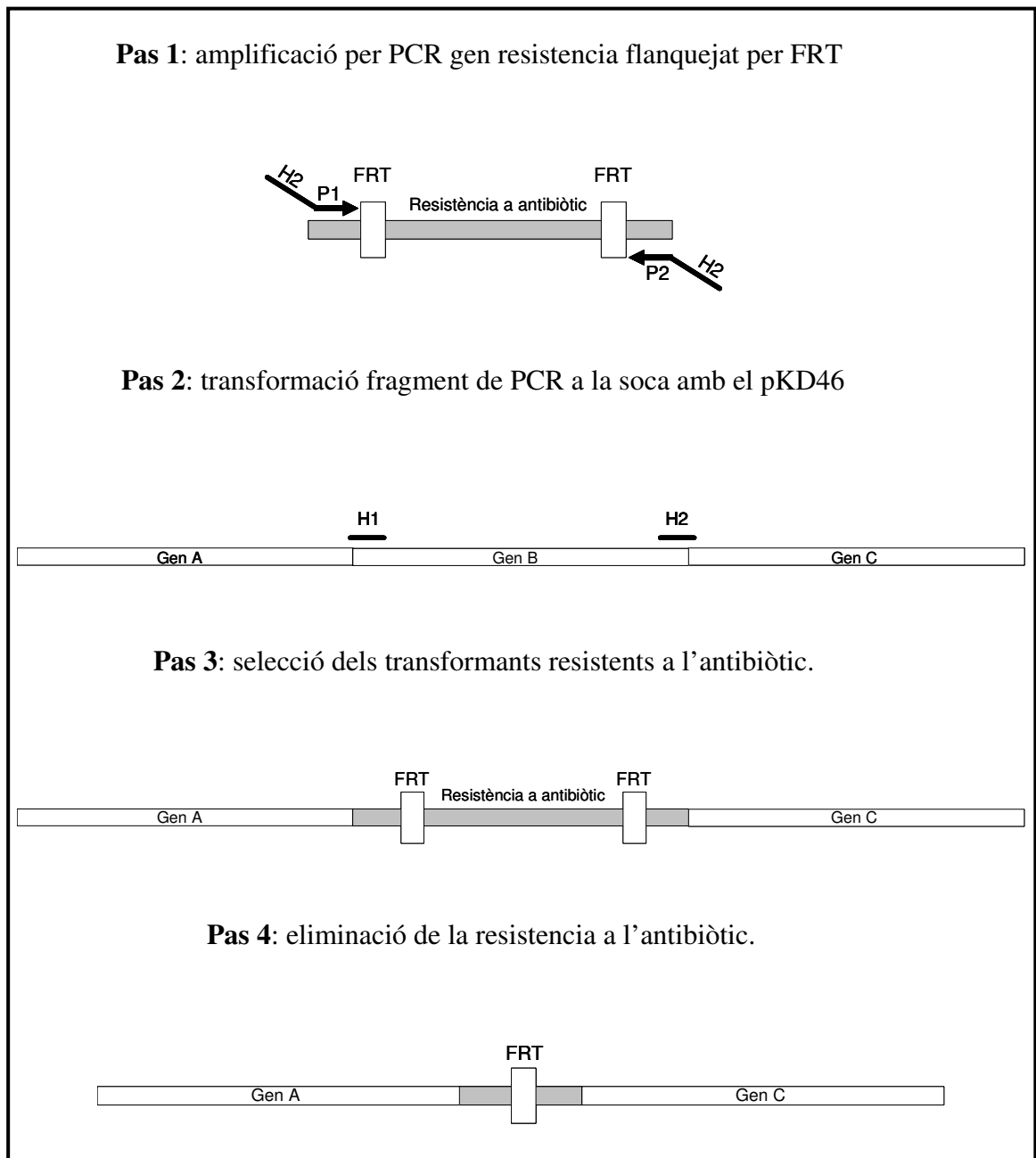


Figura 2.5.2 Estratègia de disrupció gènica. H1 i H2 referits a les regions d'homologia del gen. P1 i P2 referits a les regions d'homologia del pKD46.

2.5.2.3 Eliminació de la resistència a l'antibiòtic

El mutant obtingut i comprovat es va transformar amb el plàsmid pCP20, plàsmid que codifica per la recombinasa FLP induïble per temperatura (43°C), resistent a ampicil·lina i cloramfenicol, i amb replicó termosensible. La transformació es va sembrar en plaques de TSA amb ampicil·lina i es van incubar a 30°C durant 16 hores. Els transformants obtinguts, es van sembrar en medi no selectiu i incubar a 43°C per tal d'afavorir la pèrdua del plàsmid. Es va comprovar que les colònies crescudes en aquestes condicions ja no contenien el plàsmid, ja que normalment, la majoria de pèrdues de la resistència flanquejada per seqüències FRT és simultània a la pèrdua del plàsmid pCP20. Si tot i així el plàsmid no es perdia, es curava tal i com s'indica en l'apartat 2.4.2.

Es van fer amplificacions per PCR utilitzant diferents oligonucleòtids, per a comprovar que el gen de resistència al cloramfenicol s'havia perdut i que el gen original estava delectat.

2.6 TÈCNiques EXPERIMENTALS AMB DNA

2.6.1 AÏLLAMENT DE DNA PLASMÍDIC

2.6.1.1 Obtenció de preparacions de DNA plasmídic pel mètode de la lisi alcalina (Birnboim, 1983)

Les cèl·lules obtingudes al centrifugar 3 ml de cultiu de tota una nit (3.000 x g, 10 min) es van ressuspèndre en 100 µl de solució I. Es varen afegir 200 µl de solució II i 150 µl de solució III, agitant la suspensió per inversió i incubant durant 5 minuts després d'haver afegit cada solució. Després de centrifugar (16000 x g, 5 min) es va recollir el sobrenedant, se li va afegir 2 volums d'etanol absolut (Prolabo) pre-refredat a -20°C, i es va mantenir 1 hora a -20°C per tal de precipitar el DNA. El DNA plasmídic es va recuperar centrifugant 15 minuts a 16.000 x g a 4°C, rentant el sediment de DNA amb etanol 70% pre-refredat a -20°C i assecant-lo en una

centrífuga de buit (Speed-Vac, model 100, Savant Instruments Inc.). El precipitat final es ressuspenia en el volum desitjat d'aigua bidestil·lada estèril, normalment entre 40 i 100 µl si s'havia d'utilitzar per transformar (veure apartat 2.4.1) o bé en 500 µl si s'havia de fenolitzar.

El mateix protocol es va adaptar per a l'extracció de DNA plasmídic a partir de volums més grans de cultiu, augmentant les quantitats de les solucions I, II i III utilitzades i mantenint les proporcions entre elles (1:2:1,5).

Composició solució I	
Glucosa (Panreac)	55 mM
EDTA (Merck)	10 mM
Tris-HCl (Roche)	25 mM

Ajustar a pH 8,0

Composició solució II	
NaOH (Panreac)	0,2 M
SDS (Merck)	1% (p/v)

Composició solució III	
Acetat sòdic (Merck)	3 M

Ajustar a pH 4,8 amb àcid acètic glacial (Panreac)

2.6.1.2 Tractament del DNA amb RNasa A

El DNA obtingut pel mètode de la lisi alcalina va ser tractat amb RNasa A de pàncreas boví (Roche) a una concentració de 50 µg/ml durant 30 minuts a 37°C, abans de la seva extracció amb fenol:cloroform.

Solució RNasa A (Sambrook *et al.*, 1989): Es va preparar una solució de 5 mg de RNasa A/ml en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 15 mM. Es van eliminar les DNases incubant la solució durant 5 minuts a 100°C. La preparació es va mantenir a 4°C.

2.6.1.3 Desproteïnitació amb fenol:cloroform

Per a la desproteïnitació del DNA, es va fer una extracció fenòlica amb una solució de fenol equilibrat a pH 7,9 (Sigma) i cloroform:alcohol isoamílic (24:1). Pel tractament amb fenol:cloroform, es va utilitzar ½ volum de fenol, posteriorment ¼ volum de fenol amb ¼ volum de cloroform:alcohol isoamílic, i finalment ½ volum de cloroform:alcohol isoamílic. En cada un dels passos es barrejava la fase aquosa i l'orgànica fins aconseguir una emulsió, a continuació es centrifugava a 16.000 x g durant 2 min per tal de separar les dues fases i es recollia la fase aquosa.

Un cop desproteïnitat, el DNA es va precipitar afegint 1/10 del volum de solució III (apartat 2.6.1.1) i 2 volums d'etanol absolut pre-refredat a -20°C. Després de mantenir la barreja un mínim de 60 min a -20°C, les preparacions es varen centrifugar (16.000 x g, 15 min, 4°C). El precipitat de DNA es rentava amb etanol 70 % pre-refredat a -20°C i s'assecava en una centrífuga de buit. Finalment el DNA es ressuspenia en el volum desitjat d'aigua bidestil·lada estèril.

2.6.1.4 Aïllament de DNA plasmídic amb “kits”

Com a mètode ràpid de purificació de DNA plasmídic, a partir de cultius bacterians de tota la nit de 5 ml, es va seguir el protocol del “kit” Plasmix[®] de la casa comercial Talent, el fonament del qual es basa en la lisi alcalina seguida d'una adsorció del DNA plasmídic a una matriu de sílica. Les preparacions obtingudes per aquest mètode eren utilitzades generalment per a restriccions del DNA (veure apartat 2.6.2)

2.6.1.5 Aïllament de DNA plasmídic: protocol ràpid per a “screening” de DNA plasmídic

És un mètode d'aïllament de DNA ràpid que permet visualitzar la mida dels plàsmids, i per tant, ens va ser molt útil per distingir quines colònies s'havien transformat amb un plàsmid en el qual se li havia introduït un insert en un experiment de clonació.

Es partia de 2 ml de cultius crescuts durant tota la nit. Es centrifugaven a 3.000 x g durant 10 min i el “pallet” de cèl·lules es ressuspensia en 100 µl de solució I (veure apartat 2.6.1.1) més RNasa A (50 µg/ml) i s’agitava amb vòrtex. Seguidament, s’afegien successivament 200 µl de solució II (veure apartat 2.6.1.1) i 200 µl de cloroform i es deixava 3 min a temperatura ambient. Després s’afegia solució III (apartat 2.6.1.1), s’agitava amb vòrtex i es centrifugava a 16.000 x g durant 5 min. Al sobrenedant obtingut se li afegien dos volums d’etanol pre-refredat a -20°C i es deixava una hora a -20°C per precipitar el DNA. El DNA plasmídic es va recuperar centrifugant 15 minuts a 16.000 x g a 4°C, rentant el sediment de DNA amb etanol 70% pre-refredat a -20°C i assecant-lo en una centrífuga de buit (Speed-Vac, model 100, Savant Instruments Inc.). El precipitat final es ressuspensia en 50 µl d’aigua bidestil·lada estèril.

2.6.2 OBTENCIÓ DE DNA TOTAL

Per l’obtenció de DNA total es va seguir el mètode descrit per Marmur (1961), amb petites modificacions, a partir de cultius de tota la nit en 200 ml de medi. Es recollien les cèl·lules per centrifugació a 11.300 x g durant 10 min i es ressuspensien en 20 ml de NaCl 0,15 M, EDTA 10 mM pH 8,0. S’afegien 0,4 ml de lisozim (10 mg/ml en Tris 0,25 M pH 8,0) i s’incubava durant 10 min en gel. Seguidament s’hi afegien 4 µl d’una solució de proteïnasa K (10 mg/ml, Merk) i 1,05 ml de SDS 20% (p/v) i s’agitava durant 15 min en un bany a 80°C fins que es produïa la lisi. Es deixava refredar la barreja a temperatura ambient i s’hi afegien 5,26 ml de NaClO₄ 5 M (Merk) i 13,16 ml de cloroform:alcohol isoamílic (24:1). Aquesta barreja es mantenia durant 30 min en agitació suau i després es separaven les dues fases per centrifugació a 9.800 x g durant 20 min. Es recollia el sobrenedant i es repetia l’extracció amb cloroform:alcohol isoamílic. El sobrenedant obtingut es transferia a un vas de precipitats i se li afegien dos volums d’etanol (Prolabo) pre-refredat a -20°C. El DNA es recollia amb una pipeta pasteur tancada, per adsorció espontània del DNA al vidre, es ressuspensia en 6 ml de SSC x0,1 i després s’ajustava la concentració de SSC a 1x afegint 0,34 ml de SSC x20.

El RNA de la preparació s’eliminava amb RNasa A (Roche) a una concentració de 50 µg/ml (veure apartat 2.6.1.2) i incubant durant 30 min a 37°C.

La preparació de DNA es desproteïnitza afegint 3,4 ml de fenol equilibrat a pH 7,9 (Sigma) i 3,4 ml de cloroform:alcohol isoamílic (24:1). S'agitava suaument i es centrifugava 10 min a 3.000 x g. Es repetia l'extracció amb fenol i cloroform:alcohol isoamílic dos cops més, i es precipitava el DNA obtingut afegint 1/10 volums de solució III (apartat 2.6.1.1) i un volum d'isopropanol, tot això es mantenia a -20°C dues hores. Es recollia el DNA obtingut per centrifugació durant 10 min a 3.000 x g, es rentava amb etanol al 70% pre-refredat a -20°C, s'assecava en una centrífuga de buit i finalment es ressuspensia en 1-2 ml de TE.

Composició SSC x20	
NaCl	3 M
Citrat sòdic (Merk)	0,3 M

Ajustar el pH a 7,0

Composició TE	
Tris-HCl (Roche)	10 mM
EDTA (Merk)	1 mM

Ajustar el pH a 8,0

2.6.3 ÚS D'ENZIMS DE RESTRICCIÓ, L·LIGACIÓ I MODIFICACIÓ

Pel tractament del DNA amb enzims de restricció (Gibco, Promega, Roche), es va utilitzar els tampons (x10) subministrats amb els enzims i es van seguir les indicacions proporcionades pel proveïdor. La quantitat d'enzim per reacció no superava mai el 10% del volum total ja que l'activitat enzimàtica podria resultar-ne inhibida a causa del glicerol que contenen les preparacions d'enzims.

Pel tractament del DNA amb d'altres enzims com la fosfatasa alcalina (Roche) o la lligasa de T4 (USB) es van utilitzar els tampons subministrats amb l'enzim (x10) i es van seguir les instruccions proporcionades per les cases comercials.

Després del tractament amb cada un dels enzims anteriors, el DNA es purificava mitjançant el "kit" comercial Wizard[®] DNA Clean-up System de Promega.

2.6.4 AMPLIFICACIÓ DE FRAGMENTES DE DNA MITJANCANT LA REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Per a les reaccions d'amplificació de DNA per PCR es va utilitzar la polimerasa termoestable DynaZyme™ i el tampó d'amplificació (x10) subministrat amb l'enzim (Fynnzymes Oy). Es tracta d'una DNA polimerasa nadiua i es van seguir les instruccions generals de la bibliografia i dels subministradors de l'enzim. Generalment l'amplificació es va fer des de colònia. El volum de les reaccions era generalment de 25 µl. Les barreges de la reacció contenien:

Producte	Quantitat (µl)
H ₂ O bidestil·lada estèril	17
Tampó x 10	2,5
dNTP 10 mM (Amersham Biosciences)	1
Oligonucleòtids 30 ng/µl	1,5 µl cadascun
DNA polimerasa DynaZyme™ 2U/µl	0,5
Mostra*	1

*Es ressuspenia 1 colònia en 50 µl d'aigua bidestil·lada estèril i s'incubava 5-10 minuts a 100°C.

En els casos en que es pretenia fer un anàlisi massiu de clons s'utilitzava l'enzim BIOTAQ DNA Polimerase de la casa Bioline amb el tampó de reacció (x 10) subministrat amb l'enzim. Aquesta és una polimerasa termoestable recombinant expressada a *E.coli*. Es van seguir les instruccions generals de la bibliografia i dels subministradors de l'enzim. Les barreges de la reacció eren de 10 µl i contenien:

Producte	Quantitat (µl)
H ₂ O bidestil·lada estèril	6,6
Tampó x 10	1
dNTP 10 mM (Amersham Biosciences)	0,4
Oligonucleòtids 30 ng/µl	0,6 µl cadascun
DNA polimerasa Bioline 2,5 U/µl	0,1
MgCl ₂ 50 mM (Bioline)	0,3
Mostra*	0,5

*Es ressuspensia 1 colònia en 50 µl d'aigua bidestil·lada estèril i s'incubava 5-10 minuts a 100°C.

Els programes d'amplificació (temperatures, temps i número de cicles) que variaven segons el gen a amplificar i els oligonucleòtids utilitzats, s'especificaran en l'apartat de resultats.

El termociclador utilitzat en tots els casos era un GeneAmp PCR System 2400 de Perkin Elmer.

Els productes d'amplificació resultants de la PCR s'analitzaven per electroforesi en gels d'agarosa (veure apartat 2.6.5). En els casos que el DNA amplificat s'hagués de tractar amb enzims de restricció es procedia a la purificació d'aquest mitjançant el "kit" comercial Wizard[®] DNA Clean-up System de Promega.

2.6.5 SEQÜENCIACIÓ

El DNA es va seqüenciar pel mètode de Sanger, basat en la síntesi i terminació amb dideoxinucleòtids, mitjançant cicles de PCR. Es va utilitzar el "kit" ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit versió 2.0 (Biosystems).

Mescla de la reacció (10 µl)		
Mix de seqüenciació		4 µl
Oligonucleòtids		1,6 pmol
Mostra	ADN plasmídic	200-500 ng
	Producte PCR	segons pb ^(a)
H ₂ O bidestil·lada		Fins a 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 utilitzat va ser el següent:

Desnaturalització inicial: 96°C, 1'	} ⇒ x 25 cicles
Desnaturalització: 96°C, 10''	
Hibridació: 50°C, 35''	
Elongació: 60°C, 4'	

Un cop finalitzada la reacció, als 10 µl se li afegien 64 µl d'etanol 95% i 26 µl d'aigua bidestil·lada estèril. La barreja es deixava precipitar durant 15 minuts a temperatura ambient i a continuació es centrifugava durant 20 minuts a 16000 x g, s'extreia l'etanol i se li tornava a afegir 200 µl d'etanol ara al 70% i es centrifugava de nou durant 5 minuts a 16.000 x g. Es treia l'etanol amb cura i s'assecava en una centrífuga de buit. La mostra es va analitzar en el seqüenciador ABI PRISM[®] 3700 DNA Analyzer als Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

2.6.6 ELECTROFORESI DE DNA EN GELS D'AGAROSA (Sambroock *et al.*, 1989)

El DNA plasmídic, total o els productes de PCR es van analitzar mitjançant electroforesi en gels horitzontals d'agarosa.

2.6.6.1 Preparació del gel i tampons d'electroforesi

Es varen preparar els gels horitzontals d'agarosa (Pronadisa) a concentracions del 0,8 % o del 2 % depenent del tamany del DNA a analitzar. El tampó utilitzat tant en els gels com en la cubeta d'electroforesi era TBE x 0,5, que es preparava a partir d'una solució mare de TBE x 5.

Composició TBE x 5	
Tris-HCl (Roche)	45mM
Àcid Bòric (Bio-Rad)	45 mM
EDTA (Merck)	1 mM

pH 8,0, no ajustat.

2.6.6.2 Preparació de les mostres

A les mostres a analitzar se'ls va afegir 1/5 volum de tampó de mostres:

Composició Tampó de mostres x 5	
Bromofenol Blue (Bio-Rad)	0,25 %
Xilen Cianol (Bio-Rad)	0,25 %
Glicerol (Panreac)	60 %
Tris-HCl pH 8,0 (Roche)	10 mM
EDTA (Merk)	1 mM

Guardar a 4°C protegit de la llum.

2.6.6.3 Marcadors de tamany molecular

Tant per a determinar el tamany com per a quantificar la quantitat de DNA present en una mostra, es carregaven en els gels 0,1 µg de marcadors de DNA de tamany molecular conegut.

Tipus	Tamany dels fragments (parells de bases)
Fag λ / <i>HindIII</i> (Promega)	23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 564, 125
Fag Φ X174 / <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

Per gels de baix percentatge d'agarosa es va utilitzar el primer marcador, en canvi, pels gels d'elevat percentatge d'agarosa es van utilitzar el segon i tercer marcador.

2.6.6.4 L'electroforesi

Totes les electroforesis de DNA realitzades en aquest treball es van dur a terme en cubetes horitzontals MUPID-2 de Cosmo Bio. Després de carregar les mostres en els corresponents pouets, se'ls aplicava un voltatge de 50 a 100V.

2.6.6.5 Tinció del DNA amb Bromur d'etidi

Per tal de visualitzar el DNA en gels d'agarosa, es realitzava una tinció post-electroforètica amb bromur d'etidi (Merck). El gel es submergia durant un temps comprès entre 15-30 minuts en una solució de bromur d'etidi preservat de la llum a una concentració de 0,5 μ g/ml en tampó TBE x 0,5 (apartat 2.6.6.1). Aquesta solució es preparava a partir d'una solució mare concentrada de 10 mg/ml, que es guardava a 4°C preservada també de la llum.

Un cop tenyits els gels, es van observar amb llum ultraviolada i es van fotografiar (ImageMaster[®] VDS de Pharmacia).

2.6.7 AÏLLAMENT DE BANDES DE DNA A PARTIR DE GELS D'AGAROSA: ELECTROELUCIÓ

Quan es van necessitar fragments específics de DNA després d'una digestió o d'una amplificació per PCR, es va haver de recórrer al mètode de l'electroelució.

Després de la realització de l'electroforesi del DNA en agarosa i posterior tinció amb bromur d'etidi (veure apartat 2.6.6), es varen retallar les bandes d'interès visualitzades amb l'ajut d'un transil·luminador de longitud d'ona llarga i baixa intensitat per tal de no malmetre el DNA (UVL-56, BLACK-RAY[®] LAMP). Un cop teníem el bloc d'agarosa amb el DNA d'interès, es va col·locar dins una membrana de diàlisi (Sigma) prèviament tractada tal i com es descriu a la bibliografia (Sambrook *et al.*, 1989). Després d'introduir el bloc al tub, es va omplir totalment de TBE x 0,5 i es va tancar pels extrems amb pinces procurant que no hi quedés cap bombolla d'aire.

Es van introduir les membranes dins una cubeta d'electroforesi horitzontal plena de TBE x 0,5 (veure apartat 2.6.6) i es va procedir a l'electroelució del DNA de l'agarosa durant 60-90 minuts a 100 V. Transcorregut aquest temps, es va connectar la cubeta durant 10 segons amb polaritat inversa per desprendre el DNA de la membrana. Es va recuperar tot el tampó del sac de diàlisi i es va purificar el DNA bé per fenolització i precipitació amb etanol (apartat 2.6.1.3) o bé amb el "kit" comercial Wizard[®] DNA Clean-up System de Promega.

2.6.8 ESTUDI DE LA INTERACCIÓ DNA-PROTEÏNA: ASSAIGS DE RETARD EN GEL

Els assaigs de retard en gel d'agarosa ens permetien observar si existia interacció entre DNA-proteïna. El sistema es basa en què el DNA quan es troba unit a una proteïna presenta una migració diferent (més lenta) respecte de quan es troba sol.

Per aquest assaig es va seguir el mètode descrit per Madrid *et al.* (2002b). La barreja de diferents quantitats de DNA i proteïna (H-NS i/o Hha) es va realitzar en un volum final de 20 µl. Es van afegir també els següents tampons a una concentració final de: tampó H-NS x0,5; tampó Hha x0,5; tampó d'unió x1 i EDTA 25 mM. Tots aquests tampons es van afegir a partir de solucions mare més concentrades (tampó H-NS x10, tampó Hha x5, tampó d'unió x10 i EDTA 0,5 M); a més pel tampó H-NS i

tampó Hha es va ajustar la quantitat necessària tenint en compte les quantitats de proteïna H-NS i Hha afegides a cada barreja.

Un cop fetes les barreges, es van incubar durant 20 minuts a temperatura ambient per tal d'afavorir la formació de complexos DNA-proteïna. Immediatament després es va procedir a fer una electroforesi en gel d'agarosa de manera habitual (apartat 2.6.6).

Composició tampó H-NS x10	
Hepes (Sigma)	200 mM
KCl (Merk)	2 M

Ajustar pH a 7,0 amb KOH i autoclavar.

Composició tampó Hha x5 *	
Tampó fosfat potàssic pH 7,0	50 mM
Glicerol	50 %

Composició Tampó fosfat potàssic 500 mM	
A) K ₂ HPO ₄ (Merk)	500 mM
B) KH ₂ PO ₄ (Merk)	500 mM

Afegir B sobre A fins arribar a pH 7,0 i autoclavar.

Composició tampó d'unió x10	
Tris-HCl (Roche)	0,4 M
KCl (Merk)	1 M
DTT (Roche)*	10 mM

Ajustar pH a 8,0 i autoclavar

* Afegir-lo després d'autoclavar a partir d'una solució mare de DTT 1 M guardada a -20°C.

2.6.9 HIBRIDACIÓ DE DNA: “SOUTHERN BLOT”

Aquesta tècnica es va utilitzar per detectar la presència de miniTn5 en mostres de DNA total de soques mutagenitzades amb miniTn5, i comprovar que només es trobava una única còpia.

2.6.9.1 Transferència de DNA a membranes

El DNA total es digeriria amb l'enzim adequat i les mostres s'analitzaven en una electroforesi en agarosa 0,8 % (veure apartat 2.6.6). El gel es tenyia i es fotografiava abans de la transferència. Es desnaturalitzava el gel submergint-lo 15 min en NaOH 250 mM i s'equilibrava 5-10 min en TBE x0,5. Es transferia el DNA a membranes de niló (Nylon membranes positively charged, Roche) utilitzant la unitat de transferència del Mini-Protean II (Bio-Rad) a 60 volts durant una hora, en TBE x0,5, en agitació i refrigeració. El DNA es fixava a la membrana per “crosslinking” amb llum UV durant 3 min.

2.6.9.2 Hibridació de DNA

Abans de la hibridació amb la sonda es feia una fase de prehibridació de 2 h en solució d'hibridació a la temperatura adequada (50°C) al forn d'hibridació. La hibridació es feia durant tota la nit a la mateixa temperatura en tampó d'hibridació més la sonda marcada desnaturalitzada. Les mostres es van hibridar amb l'oligonucleòtid TN5-3 DIG (a una concentració final de 33 pmol/ml) marcat amb digoxigenina. El marcador es va hibridar en les mateixes condicions que la mostra però es va utilitzar un sonda corresponent a DNA de λ marcada per "random primer" amb digoxigenina.

Després d'eliminar la solució d'hibridació es van fer una sèrie de rentats: dos rentats de 5 min en SSC x 2 i SDS 0,1%; dos rentats de 15 min en SSC x 0,1 i SDS 0,1%; i finalment dos rentats de 15 min en SSC x 0,04 i SDS 0,1%. Les solucions de rentat es preparaven a partir de les solucions mare concentrades de SSC x20 (veure apartat 2.6.2) i de SDS 20%.

Composició solució d'hibridació	
SSC	x 5
Solució de bloqueig (Roche)*	1%
Laurosil sarcosinat (Sigma)	0,1%
SDS	0,02%

*A partir d'una solució mare al 10% de reactiu de bloqueig en tampó maleat, autoclavada i guardada a 4°C.

Composició tampó maleat	
Àcid maleic (Merk)	100 mM
NaCl	150 mM

Ajustar pH a 7,5 amb NaOH i autoclavar.

2.6.9.3 Detecció immunològica de la digoxigenina

Es feia un primer rentat ràpid amb tampó maleat i es passava al bloqueig de la membrana: 30 min en tampó maleat més agent de bloqueig al 1%. Després s'incubava la membrana amb anticossos anti-digoxigenina conjugats amb fosfatasa alcalina (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments 75 U/μl, Roche) en una dilució 1:5.000 en tampó maleat més agent de bloqueig al 1%, durant 30 min. Abans del revelat es van fer dos rentats de 20 min en tampó maleat i Tween-20 (Merk) al 0,3% i s'equilibraren les membranes 5 min en tampó 3. El revelat es va fer afegint 10 ml de tampó 3 amb NBT/BCIP (NBT/BCIP Stock Solution, Roche) deixant-ho estàtic fins a l'aparició de bandes. La reacció s'aturava amb aigua destil·lada.

Composició tampó 3	
Tris-HCl (Roche)	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	50 mM

Ajustar pH a 9,5.

2.7 TÈCNIQUES EXPERIMENTALS AMB RNA

2.7.1 EXTRACTIÓ DE RNA CEL·LULAR TOTAL

2.7.1.1 Extracció de RNA mitjançant fenol acídic calent

Aquest mètode es va utilitzar en alguns casos per l'anàlisi del RNA per RT-PCR. El mètode d'extracció de RNA cel·lular total emprat fou el del fenol acídic calent (Koronakis *et al.*, 1988).

Cultius en medi LB de la soca a estudiar varen ser incubats a 37°C fins a arribar a la DO₆₀₀ desitjada. A continuació, es van centrifugar 50 ml de cultiu (11.000 x g, 10 min, 4°C) i el sediment cel·lular es va ressuspendre en 600 µl de fenol acídic (pH 5,2) pre-escalfat a 60°C per a posteriorment afegir-li 600 µl de solució AES, agitar la barreja i deixar-la en incubació a 60°C durant 15 min. Acte seguit, es va posar la barreja en gel durant 10 min i es va agitar freqüentment de la mateixa manera que en l'anterior incubació. Després de centrifugar la barreja (16.000 x g, 3 min) es va prendre la fase aquosa i es va repetir l'extracció dues vegades més, ara només amb fenol acídic. La fase aquosa recollida després de la tercera centrifugació es va extraure amb un volum de cloroform:alcohol isoamílic (24:1) per tal d'eliminar possibles restes de fenol de la mostra. El RNA obtingut es va precipitar amb 2-3 volums d'etanol absolut fred durant un mínim de 2 hores a -70°C, centrifugar (16.000 x g, 5 minuts), rentar amb etanol 70 % fred i es va ressuspendre en 200 µl d'aigua bidestil·lada estèril (autoclavada durant 45 min). Tot el material utilitzat era lliure de RNases, i sinó era rentat amb SDS 0,1%.

Composició solució AES	
Acetat Sòdic	50 mM
EDTA (Merck)	1 mM
SDS (Merck)	0,5%

Ajustar pH a 5,2 amb àcid acètic glacial i autoclavar 45 min.

Preparació del fenol acídic: A partir 20 ml de fenol (Sigma) es van fer de 3 a 4 rentats amb Acetat sòdic 0,2 M pH 5,2 (ajustat amb àcid acètic glacial i posteriorment esterilitzat per autoclau durant 45 min). El fenol acídic es va guardar a 4°C.

2.7.1.2 Extracció de RNA mitjançant “kits”

Per un posterior anàlisi de l'expressió gènica amb microxips i també per dur a terme les RT-PCR, es van fer extraccions del RNA cel·lular total utilitzant el kit RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) seguint les instruccions de la casa comercial.

Cultius en medi líquid LB o BP de les diferents soques a estudiar es van fer créixer fins a la DO_{600} desitjada per, a continuació, procedir amb l'aïllament de RNA total.

2.7.1.3 Quantificació espectrofotomètrica del RNA

Es varen realitzar mesures d'absorbància a 260 i 280 nm amb l'espectrofotòmetre GeneQuant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech). La relació entre els valors resultants de la lectura a ambdues longituds d'ona ens dóna una idea de la puresa del RNA:

Si la relació $DO_{260} / DO_{280} < 2$, indica que hi ha contaminació amb proteïnes o fenol i no es pot realitzar una quantificació precisa.

Si la relació $DO_{260} / DO_{280} = 2$, proporciona una estima de la puresa del RNA i ens permet calcular la concentració del RNA present a la mostra tenint en compte que:

$$1 \text{ Unitat de } DO_{260} = 40 \mu\text{g RNA / ml}$$

2.7.2 ELECTROFORESI DE RNA EN GELS D'AGAROSA I TINCIÓ AMB BROMUR D'ETIDI

Per a la realització d'electroforesis de RNA i posterior tinció dels gels, es va seguir exactament el mateix procediment que el descrit pel DNA (apartat 2.6.6) amb algunes precaucions per tal d'evitar la degradació del RNA: la cubeta d'electroforesi es va rentar amb SDS al 0,1 % per inhibir les possibles RNases existents en aquesta i el TBE x 0,5 es va esterilitzar per autoclau durant 45 min.

El tant per cent d'agarosa dels gels va ser del 0,8%.

2.7.3 ANÀLISI SEMI-QUANTITATIU DELS RNA PER RT-PCR

L'anàlisi del nivell de transcripció d'un gen es va realitzar mitjançant la RT-PCR. El RNA procedent de la transcripció del gen objecte d'estudi va ser retro-transcrit amb la transcriptasa inversa de M-MuLV a DNA còpia i posteriorment aquest DNA va ser amplificat per PCR.

2.7.3.1 Digestió amb DNasa I

El RNA obtingut segons el procediment descrit en l'apartat 2.7.1, va ser tractat amb DNasa I lliure de RNasa 10 unitats/ μ l (Amersham Biosciences) per tal d'eliminar possibles restes de DNA, que podien interferir en els anàlisis posteriors. Es van afegir 20 unitats de DNasa en 50 μ l de mostra i es van portar a un volum final amb aigua de 600 μ l. La barreja es va incubar durant 1 hora a 37°C. Transcorregut aquest temps es va eliminar l'enzim amb un rentat 1:1 amb fenol acídic (apartat 2.7.1.1), 1 rentat amb ½ fenol acídic: ½ cloroform i 2 rentats 1:1 amb cloroform i es va precipitar el RNA a -70°C amb 2 volums d'etanol absolut i 1/10 de volum d'acetat d'amoni 2,5 M (autoclavat 45 min). Passades 2 hores es va centrifugar la mostra durant 10 minuts a 4°C i es va rentar amb 100 μ l d'etanol 70%. Es va deixar assecar el pellet a temperatura ambient i es va ressuspndre en 50 μ l d'aigua bidestil·lada estèril (autoclavada 45 min).

La mostra obtinguda es va quantificar mitjançant la lectura espectrofotomètrica a les longituds d'ona de 260 i 280 nm (apartat 2.7.1.2).

2.7.3.2 RT-PCR

Per aquesta tècnica es va utilitzar el “kit” Ready-to-Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences), que subministra en tubs de PCR una bola deshidratada amb tots els components necessaris per la reacció, exceptuant els oligonucleòtids i el RNA. Per afegir la concentració adequada de RNA per l'anàlisi de nivell d'expressió d'un gen determinat, va ser necessari fer una prova amb diferents concentracions de RNA i trobar el rang pel qual la reacció no estigués saturada. Per tal d'eliminar possibles estructures secundàries del RNA, totes les mostres ja diluïdes es van incubar durant 5 minuts a 80°C en el termociclador. A continuació es van mantenir en gel fins a ser utilitzades.

Les quantitats utilitzades per a cada reacció es descriuen a la següent taula:

Components RT-PCR	
Ready-to-Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences)	1 bola
Oligonucleòtid RT 10 pmols/ μ l	2 μ l
Oligonucleòtid PCR 10 pmols/ μ l	2 μ l
RNA (300 ng/ μ l)	2 μ l
H ₂ O bidestil·lada estèril (autoclavada 45 min)	Fins a 50 μ l

* Afegir l'H₂O en primer lloc fins que la bola deshidratada es dissolgui i a continuació afegir la resta de components.

El programa bàsic de RT-PCR utilitzat va ser el següent, (la temperatura d'hibridació variava en funció de l'oligonucleòtid utilitzat):

Retro-transcripció: 42°C, 1h	
Inactivació Transcriptasa inversa: 95°C, 5'	
Desnaturalització: 95°C, 30''	} \Rightarrow x 40 cicles
Hibridació: 55°C, 30''	
Elongació: 72°C, 1'	
Finalització: 72°C, 10'	

Per tal d'assegurar-nos que la mostra no contenia cap traça de DNA, es van realitzar els corresponents controls amb cada una de les mostres. Per fer-ho, en primer lloc es va afegir l'aigua corresponent a la bola deshidratada i un cop dissolta es va mantenir durant 10 minuts a 95°C per tal d'inactivar la transcriptasa inversa. A continuació se li van afegir la resta de components de la reacció i es va procedir igual que amb les mostres problema.

Un cop finalitzada la reacció, es va analitzar 10 µl de cada una de les mostres per electroforesi en gel d'agarosa al 2% i tinció en bromur d'etidi (apartat 2.6.6).

2.7.4 ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA MITJANCANT MICROXIPS

Aquesta tècnica es va utilitzar per tal d'estudiar l'expressió gènica dels gens responsables de la conjugació del plàsmid R27 en diferents fons genètics mutants *hha* *hns* tant en les còpies dels gens plasmídics com cromosòmics; i per fer un estudi de l'expressió gènica global de la soca d'*Escherichia coli* doble mutant *hha ydgT* en comparació amb la soca mutant *hns*.

2.7.4.1 Fabricació dels microxips

2.7.4.1.1 Síntesi de les sondes i preparació dels microxips

En l'estudi de l'expressió dels gens responsables de la conjugació del plàsmid R27 es van fabricar els microxips a la Plataforma de Transcriptòmica del Parc Científic de Barcelona.

Les sondes específiques utilitzades en aquest estudi van ser sintetitzades per la casa comercial MWG-biotech en base a la seqüència nucleotídica de cada una de les ORF que esperàvem detectar (35 sondes corresponents als gens responsables de la conjugació, més dues sondes corresponents a gens cromosòmics que ens servien de controls positius; veure Taula 2.7.4.1). Les sondes van ser dissenyades evitant possibles hibridacions creuades. Consistien en oligonucleòtids de 50 nucleòtids que en els seu extrem 5' hi tenien un residu amino per facilitar la posterior unió al suport

de vidre. També van ser impreses com a controls negatius sondes corresponents a gens humans i d'*Arabidopsis thaliana*, i les solucions de ressuspensió utilitzades.

Finalment, també van ser impreses unes sondes control: Microarray ScoreCard reagents (Amersham Biosciences). Es tracta d'unes sondes control que s'imprimeixen al xip i que són homòlogues a unes solucions de mRNA ("Spike mix") que s'hibridaran juntament amb la nostra mostra. El resultat de la hibridació de les sondes control amb els "Spike mix" ens servirà per la validació de diferents aspectes de l'experiment amb els microxips (marcatge del RNA, uniformitat de la hibridació, límits de detecció, rangs dinàmics de detecció, precisió dels valors relatius) i per la normalització de les dades obtingudes.

Totes les sondes van ser dissoltes en Universal Spotting Solution (Corning) a una concentració final de 40 μM i després van ser impreses amb el robot QArray sobre portaobjectes UltraGAPII tractats amb aminosilane (Corning). Cada portaobjectes contenia 16 rèpliques de cada sonda ja que només hi havia 66 sondes diferents; en total hi havia doncs 1056 punts.

Els microxips acabats d'imprimir eren mantinguts durant 48 hores en un dessecador. Després, els oligonucleòtids impresos eren immobilitzats irradiant-los amb llum UV de 600 mJ d'energia. Es van guardar en un ambient sec a temperatura ambient fins al moment de ser utilitzats.

Taula 2.7.4.1 Sondes utilitzades per la fabricació dels microxips per l'anàlisi de la conjugació de R27.

Sonda	Seqüència 5'-3'	Nucleòtids (Número d'accés NC002305)	Gen
R27-01	TCCGGGGCGGCGAGACCTGACTAGGTTATCTGAAAACCTGACCAATCA	111870..113285	<i>trhH</i>
R27-02	AAGAACAACACTGGCAACACTCGATAATCCGGCCCGCTCAATAGGTAACATA	Complement (36519..37304)	<i>trhE</i>
R27-03	CAAACGATTAGACTTATTCAAGGAGTGGAGGGACGCAAAATGGCTGCCGAT	Complement (100712..101815)	R0118
R27-04	AATCCCAGGTTCAATTTGATTCCAAACAATAATTGTAGTCACTCAATCATTT	21987..22508	R0017
R27-05	GCCATCATACCTCTATTCCATGAGGAGATCGGTAAATGACTCGATTAACG	110782..110910	<i>trhX</i>
R27-06	GAATAAAAACGGTATTTACACACAAAAACACTGCACCCTTAACCTGGATT	20208..21155	<i>trhO</i>
R27-07	TTTGATTACTGGTTAAAACAAGTGTGCAACCCCTTACTCAAAAACCCATT	Complement (32115..32867)	<i>htdI</i>
R27-08	AAGAGCGTCAGACTCGTGTACTACGGGCCCAAGCCTGATTAAGATAA	Complement (35284..36516)	<i>trhK</i>
R27-09	GAATCGATAATTACCGCCCTTCGCCCTATCTGAGTCTAAGAGCGGTCAGTG	Complement (16077..16640)	<i>htdK</i>
R27-10	GGTCAAAACCGTCTTGTGGACTACTATACGTCAATAGCTGAGCAGCAGTG	Complement (33494..34852)	<i>trhB</i>
R27-11	CTTCGATATCAGTACCATACAGAAAACGACTATGAGGACTGAAAATGATT	21155..21994	R0016
R27-12	CGTCCACGTCATCGGCAATAGCACGGTATTCCCAGGAAGTTAGATTAG	109710..110222	<i>trhY</i>
R27-13	GCGGACCCAGTGAACTATCTGAATGTGGTGGAAAGTTTAGGAGGTGCATA	110834..111880	<i>trhF</i>
R27-14	AAGCTGAAATACGTGGTATTGGAACAAAATCGCGGCAGAGGAGAAATTGA	Complement (9378..10886)	<i>trhW</i>
R27-15	ATTGGGAATTGCACCTCAACCGTTTGTGGTCTAACTTTCAAAAACCTTATGT	Complement (100063..100725)	<i>traJ</i>
R27-16	GTGAGTATGGTCAGAAAGGATTCCCGGAAAACCTCTGAAAATCAAAATAA	4082..4954	R0004
R27-17	TTAGTAGTCGTTACTTTACCGATCCATTTATCAGAAAACCTCTATCTTGA	Complement (37316..37633)	<i>trhL</i>
R27-18	AACGCTTAAAGGTGACGGAAAATAATCGGCATAGATAACTATGTTTACA	Complement (8181..9128)	<i>trhU</i>
R27-19	ATATGCAACAGCAACAGGAGCAACGAAAGCAGTTTCGTCAAAACGGTATT	Complement (31155..32105)	<i>trhV</i>
R27-20	ACGCTCAGGAAAACTTTTACAGGCCGATACCTGGAGTACAGAAAGTGCCTCA	Complement (101815..103899)	<i>traG</i>

R27-21	TTTTGGCAGCACTGCGACACTGTCCAAAAAACCTTAAATCGTGGGAAGCAA	Complement (11659..15879)	R0009
R27-22	TAATGGAAATTA CTGCGTTACGACACTATGTTTACATGCCACCCTCAGGAT	108907..109707	<i>trhR</i>
R27-23	AAGGATAATGAAGTTATGTCCGGTACATGGTTCTTTAAGAAGAGAGATATG	Complement (16637..17071)	<i>htdF</i>
R27-24	CCCCGTTAAACGTGACCAAATGACAGTAATGCAGCAGCGGTTTCATATAGAT	22505..22897	<i>trhG</i>
R27-25	TGAAAGTTAAGCGGATTCAGCAACCAAAGAAATGGAGTTAATAATGGACAT	Complement (34842..35282)	R0030
R27-26	CGGCGAAGCAATTGAGATTCTGTACGAACAAGAAAGTTGCGAGCAAAATCAG	Complement (28465..31146)	<i>trhC</i>
R27-27	TGAATAATACAAATGAACCATATCAGTCGAGAATTGAGAAAAGCTAAAAAGC	113294..117283	<i>trhG</i>
R27-28	GTGAGGTACAATCTCTTCCAGGCGAACCTAAAAGAAAGTGAGATTCGATAAA	Complement (32973..33485)	R0028
R27-29	CTGACCGCAGTCATGTAATTGAAAAGTACGGAACGCAGCTAAAATGCCGCTGA	Complement (103899..106934)	<i>trai</i>
R27-30	AACTGGGACGAAAAGTCCCGTCAATACTCAAATAATCAGAGGTGGCACAAATGA	Complement (107664..108149)	<i>traH</i>
R27-31	TTGGGGGATCACCGCCGACAAATTTGGCTGTATCAACTCAGGCTTATGTGC	Complement (17061..17513)	<i>htdA</i>
R27-32	GGTCAACTTATGTAGATCCAATTACAGGTAAGGAAATACCAAATAATTA	Complement (4982..8158)	<i>trhN</i>
R27-33	GTGAAAATACGGCATACCTGCCGAGACCATTGAAAAGAGAATTAACATAATCC	Complement (10873..11385)	<i>trhP</i>
R27-34	AATTGAAAAGAGGCTGCCGAAAAGTAGAACAGAAATCCCCCTTTGACAGAAATA	Complement (2116..3900)	<i>trhI</i>
R27-35	ATGCTGGTTATGGCAAACGGTGAAAATAATATCAGCTCGTTCCTGGATGC	Complement (37685..38038)	<i>trhA</i>
Sonda	Seqüència 5'-3'	Nucleòtids (Número d'accés NC000913)	Gen
Zwf	AATCTCGATGTCAATGACACTGCTGCATTCAGCCGTCTCGGGCGGATGCT	Complement (1932863..1934338)	<i>zwf</i>
rRNA16S	TGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAGGTAACCGTAGGGGAACC	223771..225312	<i>rrsH</i>

2.7.4.1.2 Xips comercials

Per l'anàlisi de l'expressió gènica total d'*Escherichia coli* es van utilitzar els microxips comercials MWG *E. coli* K12 V2 Array (MWG-Biotech). Les sondes utilitzades per fer els microxips de MWG són oligonucleòtids de 50 nucleòtids dissenyats a partir de les regions codificadores dels gens continguts a la base de dades CodeSeq®. Cada oligonucleòtid era dissenyat per ser específic a la seqüència del seu gen.

Els microxips MWG *E. coli* K12 V2 Array contenen 4.288 sondes específiques, que representaven el genoma complet de la soca d'*Escherichia coli* K12 segons les bases de dades NCBI/Genbank (número d'accés NC00913, U00096.1); a més, cada xip contenia 48 sondes control d'*Arabidopsis thaliana* i 321 controls interns. En total tenien 4608 punts.

2.7.4.2 Marcatge del RNA

Els nivells relatius de mRNA eren determinats per una hibridació a dos colors en paral·lel sobre els microxips d'oligonucleòtids descrits a l'apartat anterior. El marcatge dels mRNA's es va dur a terme utilitzant el "kit" CyScribe Post-Labeling Kit (Amersham Biosciences), més el "kit" de purificació de cDNA CyScribe GFX Purification Kit (Amersham Biosciences), seguint les instruccions del fabricant, amb alguns canvis. En tots els casos es van marcar 10 µg de RNA total, aïllat segons es descriu en l'apartat 2.7.1.2, del qual se n'havia eliminat les possibles contaminacions de DNA fent una digestió amb DNasa I (apartat 2.7.3.1), s'havia quantificat (apartat 2.7.1.3) i s'havia visualitzat la seva qualitat mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa (apartat 2.7.2). Es feia un marcatge indirecte amb fluorocroms, en el qual hi havia dos passos bàsics:

- En primer lloc es sintetitzava el cDNA modificat amb grups amino-alil (AA) per retro-transcripció, utilitzant dUTP unit a grups AA.
- En un segon pas es duia a terme una reacció d'esterificació entre els grups AA i els fluorocroms, que podien ser la Cyanina3 (Cy3) o la Cyanina5 (Cy5).

Gràcies al fet de disposar de dos fluorocroms diferents, vam poder fer un marcatge diferencial de mostres; així, vam poder hibridar dues mostres diferents sobre el mateix microxip alhora, marcant una mostra amb Cy3 i l'altra amb Cy5.

Al final obteníem el cDNA marcat dissolt en aigua bidestil·lada. Es barrejaven els dos cDNAs, un marcat amb Cy3 i l'altre marcat amb Cy5, corresponents a les dues mostres que es volien comparar i es deixava evaporar tota l'aigua amb una centrífuga de buit (Speed-Vac, model 100, Savant Instruments Inc.), obtenint així un sol "pellet" de cDNA preparat per hibridar-lo sobre el microxip..

En el cas de l'anàlisi de l'expressió dels gens responsables de la conjugació de R27, al RNA total a marcar se li va afegir 1 µl dels RNAs control Spike Mix (Lucidea Universal ScoreCard, Amersham Biosciences) que hibriden amb les sondes control (Microarray ScoreCard reagents, Amersham Biosciences) per després validar l'experiment i poder corregir les dades obtingudes. Vam utilitzar oligonucleòtids específics per sintetitzar els cDNA's corresponents a les ORFs que volíem detectar (Taula 2.7.4.2) a una concentració de 25 pM cadascun, i oligo-dT per marcar els RNAs control (seguint les indicacions del subministrador). Els oligonucleòtids específics es van dissenyar tenint en compte la seqüències de les sondes impreses al microxip, que corresponien als dos gens cromosòmics (controls positius) i als gens de R27 responsables de la conjugació del plàsmid. Aquests gens en el plàsmid estan distribuïts en 2 regions, la regió Tra1 i la regió Tra2 (Taula 2.7.4.2).

Per l'anàlisi de l'expressió gènica global d' *Escherichia coli* es va marcar el RNA total utilitzant oligonucleòtids específics corresponents a tots els mRNAs d'*E. coli* K12, soca MG1655 (*E. coli* cDNA Labeling Primers, Sigma Genosys).

Taula 2.7.4.2 Oligonucleòtids específics utilitzats per marcar els mRNAs corresponents a les ORF de R27 i als controls positius.

Gens Tra1	Seqüència nucleotídica 5'-3'
TraJ	ACATAAGTTTTTGAAAGTTA
R0118	TTATCCGCAGCCATTTG
TraG	TGAGGCACTTCTGTACT
TraI	AGGCGCATTTAGCTGC
TraH	TCATTGTGCCACCTCTG
TrhR	ATCCTGACGGTGGCAT
TrhY	CTAATCTAACTCTTCCTG
TrhX	CGTTAATCGAGTCATTTAC
TrhF	TATGCACCTCCTAAACTT
TrhH	TGATTGGTCAGGTTTCA
TrhG	TCATTCAGCCAGCTTTTA
Gens Tra2	Seqüència nucleotídica 5'-3'
TrhI	TTATTCTGTCAAAGGGGAT
R0004	TTATTTTGATTTTCAGAGTTTT
TrhN	ATATTTTGGTATTTTCCTTAC
TrhU	TGTAAACATAGTTATCTATG
TrhW	CAATTCTCCTCTGCCG
TrhF	AATAGTTAATTCTCTTTCAAT
R0009	TTTGCTTCCCACGATT
HtdK	CACTGACCGCTCTTAG
HtdF	CATACTCTTCTTAAAGA
HtdA	GCACATAAGCCTGAGTT
TrhO	AATCCAGGTAAAGTGGT
R0016	AATCATTTTCAGTCCTCAT
R0017	AAATGATTGAGTGACTACA
TrhZ	ATCTATATGAACCGCTG
TrhC	CTGATTTGCTCGCAACT
TrhV	AATACCGTTTGACGAAAC
HtdT	AATGGGTTTTTGAGTAAG
R0028	TCAATTATCGAATCTCACT
TrhB	CACTGCTGCTCAGCTA
R0030	ATGTCCATTATTA ACTCCA
TrhK	TTATCTTTTAATCAGGCTT
TrhE	TTAGTTACCTATTGACGG
TrhL	CCATCAAGAATAGAGGTT
TrhA	GCATCCAGGAACGAG
Controls positius	Seqüència nucleotídica 5'-3'
rrsH	GGTCCCCTACGGTA
zwf	ACTCAGCATCGCGCC

2.7.4.3 Hibridació del RNA

2.7.4.3.1 Hibridació manual

Els microxips d'*Escherichia coli* MWG *E. coli* K12 V2 Array (MWG-Biotech) es van hibridar amb les mostres de cDNA marcat seguint les instruccions del fabricant. No va ser necessari cap tractament previ ni pre-hibridació.

Es pre-escalfaven 120 µl del tampó d'hibridació subministrat per MWG-Biotech 10 min 42°C. Es ressuspensia el "pellet" corresponent als dos cDNAs marcats que es volien hibridar sobre el microxip amb els 120 µl del tampó d'hibridació i es deixaven 3 min a 95°C per desfer totes les possibles estructures secundàries. S'incubava 3 min en gel i després es deixava a 42°C mentre es preparava el microxip. S'havia de localitzar primer l'àrea impresa amb les sondes del microxip, després s'hi dipositava al damunt la solució d'hibridació, que s'estenia sobre tota l'àrea impresa amb l'ajuda d'un cubreobjectes flexible subministrat pel fabricant. El microxip es dipositava dins d'una cambra d'hibridació (Corning) i la cambra es mantenia dins un bany ajustat a 42°C durant 16 hores.

Seguidament, es passava a fer una sèrie de rentats als microxips hibridats per tal d'eliminar la mostra marcada que no s'havia hibridat i les hibridacions inespecífiques. Els rentats es feien en gerres de tinció de vidre on s'hi dipositaven els microxips hibridats. Es feia un primer rentat amb tampó 1 (SSC x2, SDS 0,1%) pre-escalfat a 30°C durant 5 min en agitació suau. El següent dos rentats més de 5 min cadascun, en agitació suau, amb el tampó 2 (SSC x1) i el tampó 3 (SSC x0,1), també pre-escalfats a 30°C. Els microxips s'assecaven centrifugant-los durant 7 min a 2.000 rpm.

Les solucions de rentat es preparaven a partir de les solucions mare concentrades de SSC x20 (veure apartat 2.6.2) i SDS 10% esterilitzades per filtració.

2.7.4.3.2 Hibridació automàtica

Pels microxips per l'estudi de la conjugació de R27 es va dur a terme una hibridació automàtica.

Prèviament a la hibridació, es feia un pretractament dels microxips per tal de disminuir el soroll de fons o “background”. Els microxips eren submergits en una solució que contenia 150 ml de 1-metil-2-pirrolidinona (Sigma), 3 g de succínic anhidric (Sigma) i 17 ml de borat sòdic (Sigma) 0,2 M.

Per bloquejar la superfície no impresa dels microxips, es feia una pre-hibridació a 50°C durant 20 min en un tampó de pre-hibridació (BSA 1%, SSC x3,5 i SDS 0,1%).

El “pellet” corresponent als dos cDNAs marcats que es volien hibridar sobre el microxip es ressuspensia en 230 µl de tampó d’hibridació (formamida 50%, SSPE x6, solució Denhardt x2,5 i SDS 0,5%). La hibridació i els rentats es feien amb el sistema automàtic robotitzat Lucidea SlidePro (Amersham). La hibridació es va dur a terme durant 15 hores a 42°C. Tot seguit es van fer una sèrie de rentats seqüencials amb el tampó I (SSC x2, SDS 0,1%), d’astringència mitjana; el tampó II (SSC x0,1 i SDS 0,1%), d’astringència alta; i el tampó III (SSC x0,1). Els microxips es van assecar amb aire.

Composició solució de pre-hibridació	
BSA (Sigma)	1%
SSC	X3,5
SDS	0,1%

Composició solució d’hibridació	
Formamida (Sigma)	50%
SSPE *	x6
Solució Denhardt (Eppendorf)	x2,5
SDS	0,5%

S’esterilitzava per filtració.

* a partir d’una solució de SSPE x 20

Composició SSPE x 20	
NaCl	3 M
NaH ₂ PO ₄	0,2 M
EDTA	19 mM

Ajustar el pH a 7,4 amb NaOH. Autoclavar.

Les solucions compostes per SSC o per SDS es preparaven a partir de les solucions mare concentrades de SSC x20 (veure apartat 2.6.2) i SDS 10% esterilitzades per filtració.

2.7.4.4 Lectura dels microxips

Cadascun dels microxips hibridats era escanejat amb l'escaner Genepix 4000B (Axon Instruments) fent servir les opcions per defecte. Aquest és un escaner específic per microxips i optimitzat per detectar els fluorocroms Cy3 i Cy5. El fluoròfor Cy3 té una longitud d'ona d'excitació de 550 nm i una longitud d'ona d'emissió de 570 nm; el fluoròfor Cy5 té una longitud d'ona d'excitació de 649 i una longitud d'ona d'emissió de 670. Aquest escaner té dos làsers que escanegen simultàniament a 532 nm (per detectar Cy3) i a 635 nm (per detectar Cy5). La llum emesa pels dos fluoròfors és captada per un fotomultiplicador (PMT) i el PMT converteix els fotons emesos en una senyal elèctrica que es convertirà en una imatge digital de colors falsos. En la imatge digital veurem la senyal emesa per Cy3 de color verd i la senyal emesa per Cy5 de color vermell. En realitat tindrem tres imatges, la imatge de la senyal provinent del Cy3 (figura 2.7.4 C), per tant una imatge en color verd ; una imatge de la senyal provinent del Cy5 (figura 2.7.4 B), en color vermell; i la imatge composta de les dues imatges anteriors, on els punts on hi ha senyal provinent del dos fluorocroms seran de color groc (figura 2.7.4 A).

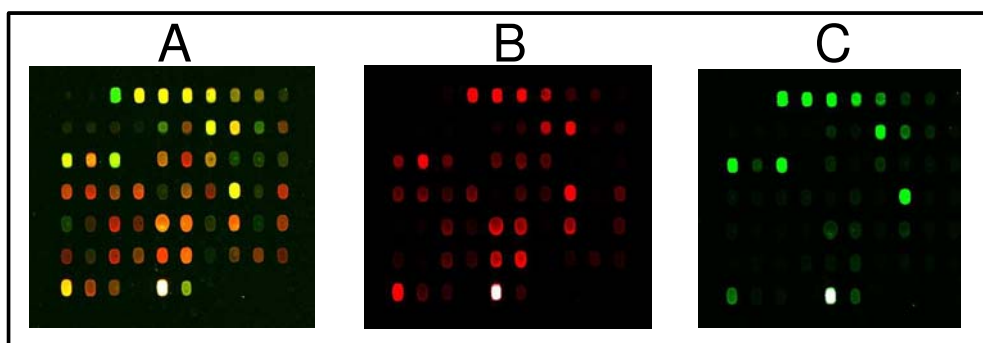


Figura 2.7.4 Exemple dels tres tipus d'imatges obtingudes després d'escanejar un microxip. A: imatge composta de les imatges B+C. B: imatge de la senyal provinent de Cy5. C: imatge de la senyal provinent de Cy3.

La quantificació de la imatge es va fer amb el software GenepixPro. Es tractava de plantar una plantilla que s'ajustava a la imatge obtinguda, de manera que es definia l'àrea de cada punt. El programa calcula la intensitat de cada punt per cada canal, pel canal verd i pel canal vermell per separat. També calcula el soroll de fons o "background" local per cada punt, per poder fer després una correcció d'aquest. A partir d'aquí obteníem tota una sèrie de dades que s'havien de processar.

2.7.4.5 Processament i anàlisi de les dades

L'anàlisi de les dades obtingudes la va realitzar el Dr. Alex Sánchez del Departament de Bioestadística de la Facultat de Biologia.

L'objectiu de l'estudi de la conjugació de R27 va ser detectar els gens que s'expressaven diferencialment entre les soques mutants i la salvatge a dues temperatures de creixement. En concret ens interessava:

- Quins gens s'expressaven diferent en cada mutant respecte el salvatge.
- En cada mutant i en el salvatge, quins gens s'expressaven diferentment a temperatura alta que a temperatura baixa.
- Quins gens s'expressaven diferentment entre els mutants, a cada temperatura.

En l'estudi de l'expressió gènica global de *Escherichia coli* l'objectiu va ser la detecció dels gens que s'expressaven diferencialment entre dos mutants i el tipus salvatge. En concret ens interessava:

- Quins gens s'expressaven diferent en cada mutant respecte el tipus salvatge.
- Quins eren els gens que s'expressaven diferentment entre els mutants.
- Quins gens expressats diferencialment en un dels mutants estudiats ho eren també en l'altre.

2.7.4.5.1 Selecció i anàlisi de les imatges

Les imatges van ser escanejades amb el programa GENEPIX fent servir les opcions per defecte. Algunes de les imatges no van sortir prou bé, aparentment degut

a un rentat insuficient. Aquestes es van tornar a rentar i escanejar un o dos cops més.

Per tal de determinar les imatges més adients es va calcular:

- per cada imatge i en cada canal la raó “Senyal/Fons”
- la correlació amb les altres imatges
- es va dur a terme una inspecció visual

De la consideració simultània d'aquests tres factors s'escolliren de forma subjectiva les millors imatges en cada cas.

2.7.4.5.2 Control de qualitat

Les imatges obtingudes van ser sotmeses a inspecció visual i es prepararen alguns gràfics de diagnòstic que permetien detectar si apareixien problemes o alteracions importants.

Una forma típica de determinar si un experiment havia sortit bé va ser a través de les correlacions entre rèpliques en dels xips. En principi la màxima correlació s'hauria d'observar entre rèpliques tècniques, basades en alíquotes de la mateixa mostra i després d'aquesta esperaríem que fos més gran entre rèpliques biològiques. Calia tenir en compte però que aquí hi havia tants controls com gens de manera que això pot afectar seriosament a aquest diagnòstic.

El programa GENEPIX va generar uns indicadors per a aquells punts que no va considerar acceptables. Aquests valors es van tenir en compte posteriorment per al filtrat.

2.7.4.5.3 Preprocessament de les dades

2.7.4.5.3.1 Eliminació del “background”

L'objectiu d'aquest procés va ser mirar d'eliminar el senyal degut a hibridació no específica del que es deu pròpiament a la hibridació. Un dels procediments més habituals és restar el fons (Rb o Gb) del senyal (R o G) per a cada color (R i G). Altres procediments més sofisticats permeten ajustar aquest procediment de forma

que per exemple s'eviten intensitats negatives al restar o es redueixen artefactes com les "cues de faisà" que apareixen si només hi ha senyal en un dels canals.

El mètode utilitzat aquí és l'anomenat d'"Edwards", que permet fer una correcció no lineal i sembla funcionar millor que la subtracció simple.

2.7.4.5.3.2 Filtratge

En principi no es van eliminar punts sinó que es van ponderar amb un pes de 0.1, per a que influïssin poc en les anàlisis. Aquests punts van ser els seleccionats com dolents per GENEPIX i també els punts amb valors que superessin uns certs llindars habituals superiors o inferiors (senyal inferior a dos cops el fons o senyal superior a 65000).

2.7.4.5.3.3 Normalització

L'objectiu de la normalització és eliminar biaixos sistemàtics que apareixen en les dades deguts, per exemple, a un funcionament diferent de les agulles d'impressió o a una absorció diferent dels colorants.

La normalització sol basar-se en assumir que la majoria dels gens del xip no estan expressats diferencialment, i, a partir d'això i de les desviacions observades d'aquesta suposició, estima la transformació que cal fer sobre les dades.

Aquesta era una suposició vàlida per a els xips per l'estudi de l'expressió de *E. coli*. Tot i que es disposava de controls interns i d'*Arabidopsis*, una primera exploració suggeria que es podia dur a terme una normalització basada en tots els punts i és el que es va fer.

En el cas dels xips per l'estudi de la conjugació de R27 sabíem que aquesta suposició no era certa, ja que s'esperava que molts gens estiguessin expressats. Els xips contenien però una sèrie de punts de control, amb raons d'expressió conegudes:

- Els controls de calibració ("Calibration") estaven dissenyats per tenir una raó de 1:1 i els controls de raó ("Ratio"), que estaven dissenyats per tenir raons de 1:3, 3:1, 1:10 o 10:1.

Vam poder basar-nos en les desviacions observades d'aquestes expressions "controlades" per a la normalització. Per a això s'aplicà el mètode anomenat "composite", implementat a LIMMA, que ens va permetre utilitzar només els punts

de control desitjats. La idea era que com els punts control haurien d'haver quedat centrats, es corregiren els punts de forma que hi quedessin i es va assumir que la mateixa correcció era vàlida per a la resta de gens.

Un cop normalitzades les dades de cada xip es va determinar si calia fer una normalització simultània de tots els xips. Això podia ser adient si es volia comparar xips entre ells (per exemple comparació entre mutants o entre temperatures). Atès que aquest procediment podia reduir artificialment la variabilitat dels xip es solia determinar si era necessari a partir de l'observació de la variabilitat de tots els xips: Si hi havia grans diferències (a simple vista) era millor aplicar-ho.

2.7.4.5.4 Anàlisi de les dades

En el cas dels xips per l'estudi de l'expressió dels gens responsables de la conjugació de R27, per determinar quins gens estaven diferencialment expressats entre condicions (mutants i temperatures) es va ajustar un model lineal de dos factors (Mutació i Temperatura).

Tot i que el nombre de rèpliques biològiques era massa baix com per aspirar a obtenir cap significació estadística en les conclusions, el fet que hi haguessin punts replicats (16 per microxip) va fer que els resultats es poguessin considerar "acceptablement" fiables.

Es van considerar dues aproximacions possibles:

OPCIÓ 1: Model d'un factor a 6 nivells

$$Y_{ij} = c_i + e_{ij},$$

$c_1 = M1Alta$ (mutant 1 a alta temperatura), $c_2 = M1Baixa$ (mutant 1 a baixa temperatura),.... $i=1, \dots, 6$

OPCIO 2: Model de dos factors amb interacció

$$Y_{ijk} = a_i + b_j + ab_{ij} + e_{ijk}$$

a: Mutant, $i=1, \dots, 3$; b: Temperatura, $j=1, 2$. ab: Interacció entre el mutant i la temperatura.

$$M_{ij} = a_i + b_j + ab_{ij}$$

Amb aquests dos models les preguntes d'interès es formularien com:

- Quins gens s'expressen diferent en cada mutant respecte el tipus salvatge?

$$(c_1+c_2)/2, (c_3+c_4)/2, (c_5+c_6)/2$$

$$a_1, a_2, a_3$$

- Quins gens s'expressen diferent en cada mutant i cada temperatura respecte el tipus salvatge?

$$c_1, c_2, c_3, c_4, c_5, c_6$$

$$a_1+b_1+ab_{11}, \dots$$

Aquesta anàlisi es va basar en les dades normalitzades dins dels microxips.

- En cada mutant i en el salvatge, quins gens s'expressen diferentment a temperatura alta que a temperatura baixa?

$$c_1-c_2, c_3-c_4, c_5-c_6$$

$$M_{i1}-M_{i2}=(b_1-b_2)+(ab_{i1}-ab_{i2})$$

Aquesta anàlisi es va basar en les dades normalitzades entre dels microxips.

- Quins gens s'expressen diferentment entre els mutants a cada temperatura?

$$c_1-c_3, c_1-c_5, c_3-c_5, c_2-c_4, c_2-c_6, c_4-c_6$$

$$M_{1j}-M_{2j}=(a_1-a_2)+(ab_{1j}-ab_{2j})$$

Pels xips que ens permetien estudiar l'expressió gènica de *E. coli* vam fer servir el model següent per cada gen:

OPCIO 1: Model d'un factor a 2 nivells

$$Y_{ij}=c_i + e_{ij},$$

$$c_1=E[\log(W/M_1)], c_2=E[\log(W/M_2)]$$

On *W* era la soca salvatge, *M1* era el mutant tipus 1 i *M2* era el mutant tipus 2. La diferència *M1/M2* no es podia estimar directament i es va obtenir a partir de les expressions relatives anteriors, és a dir, tenint en compte que:

$$\log(W/M_2)-\log(W/M_1)=\log[(W/M_2)/(W/M_1)]=\log[M_1/M_2]$$

La manera d'estimar aquesta diferència va ser a partir de les dues raons estimades, es a dir:

$$E[\log(M1/M2)] \approx c_2 - c_1$$

Amb aquest model les qüestions que vam respondre eren:

- Quins gens s'expressaven diferent en cada mutant respecte el tipus salvatge: c_1 , c_2
- Quins gens s'expressaven diferent entre el mutant 1 i el mutant 2: $-c_1 + c_2$

En tots els tipus de xips l'anàlisi del model es va dur a terme fent servir la metodologia dels models lineals amb estimació bayesiana de la variança desenvolupada per Smyth (2004; 2005) i implementada al paquet LIMMA de R.

Tot i que el nombre de rèpliques biològiques va ser molt baix com per aspirar a obtenir una gran significació estadística en les conclusions, els ajustos que feia aquest mètode permetien fer una ordenació dels gens de més a menys diferencialment expressats, que es considera "acceptablement" fiable.

Els resultats de les anàlisis eren llistes de gens (una per a cada qüestió o contrast) on apareixen els gens ordenats de major a menor grau d'expressió diferencial. L'ordenació es va basar en diversos criteris relativament equivalents (estadístic t-moderat, p-valor, estadístic-B). Les taules contenien varies columnes, el significat de les quals es el següent:

Row: Fila del sector.

Column: Columna del sector.

Name: Identificador (1) del punt.

ID: Identificador (2) del punt.

Status: Tipus de punt (gen, calibració, etc.).

M: logaritme base dos de la raó d'expressió.

A: Intensitat del punt.

T: Estadístic t-moderat: quan més gran, major expressió diferencial.

P.Value: p-valor ajustat: quan més petit, major expressió diferencial.

B: mesura bayesiana de la probabilitat que un gen estigui expressat envers de que no ho estigui. T, p i B indiquen el mateix.

En línies generals un valor alt de B corresponia amb un valor alt de T i un de baix de p.

Tot i que, atès el baix nombre de rèpliques biològiques, no semblava raonable posar un punt de tall per sobre del qual es considerés els gens diferencialment expressats i per sota del qual no es considerés així, es va agafar com a guia que els gens per al qual el B-estadístic fos més gran de zero van ser candidats a estar diferencialment expressats.

Un altre criteri raonable, i més habitual, consistia en considerar diferencialment expressats aquells gens amb un p-valor inferior al 1%.

En la pràctica, tots dos criteris donaven resultats similars però no necessàriament coincidents “en la frontera”. El que era més important, però era tenir clar que, amb mostres petites (per exemple menys de 5 rèpliques per condició experimental) les condicions de validesa d’aquestes tècniques són impossibles de verificar i per els resultats s’ha de considerar que la pregunta “Quants gens diferencialment expressats em dona la tècnica?” és tan important com aquesta altra: “Quants dels gens diferencialment expressats estic disposat/da a verificar experimentalment?”

2.8 TÈCNiques EXPERIMENTALS AMB PROTEÏNES

2.8.1 OBTENCIÓ D’EXTRACTES

2.8.1.1 Fraccionament cel·lular

Es va obtenir la fracció interna total (periplasma més citoplasma) o bé les fraccions periplasmàtiques i citoplasmàtiques per separat de cultius de diferents soques per analitzar el contingut de proteïnes a cada compartiment cel·lular. Les fraccions obtingudes es van quantificar pel mètode de Bradford (apartat 2.8.2) i analitzar posteriorment mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida (apartat 2.8.3.1.1).

2.8.1.1.1. Fracció interna

Per l'obtenció de la fracció interna, es van centrifugar 10 ml de cultiu a 3000 x g durant 10 min, i el "pellet" cel·lular es va ressuspendre en 1 ml de tampó de xoc més 100 µl d'una solució de lisozim (5 mg/ml). Després de 20 min en gel es va congelar i descongelar la suspensió de cèl·lules, i es va centrifugar durant 1 min en una microcentrífuga. El sobrenedant obtingut es va utilitzar com a fracció interna.

Composició tampó de xoc	
Tris-HCl (Roche)	33 mM
EDTA (Merck)	1 mM
Sacarosa (BDH)	20%
PMSF *	1 mM

Ajustar a pH 8,0, autoclavar i conservar a 4°C.

* A partir d'una solució 10 mM en isopropanol. Afegir just abans del seu ús.

2.8.1.1.2 Fracció periplasmàtica

Es van centrifugar (3.000 x g, 10 min) 10 ml d'un cultiu en la fase de creixement que ens interessés i el precipitat cel·lular es va ressuspendre en 1 ml de tampó de xoc, més 100 µl d'una solució fresca de lisozim (1 mg/ml). La barreja es va deixar 3 min en gel i posteriorment es va centrifugar durant 30 segons a 16.000 x g. Es va recollir el sobrenedant, corresponent a la fracció periplasmàtica.

2.8.1.1.3 Fracció citoplasmàtica

El sediment obtingut en l'apartat anterior, es va ressuspendre en 1 ml de tampó de xoc, més 100 µl d'una solució de lisozim (5 mg/ml). La barreja es va deixar 20

minuts en gel i després es va congelar i descongelar. Es va centrifugar (16.000 x g, 1 min) i es va recollir el sobrenedant, corresponent a la fracció citoplasmàtica.

2.8.2 VALORACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES PEL MÈTODE DE BRADFORD (MICROASSAIG) (Bradford, 1976)

Per a la determinació de quantitat de proteïna present en una mostra es va utilitzar el reactiu “Protein Assay Dye Reagent Concentrates” de Bio-Rad. Es va seguir el procediment indicat per la casa comercial basat en el mètode descrit per Bradford al 1976 segons el qual les proteïnes presenten afinitat pel Blau de Coomassie.

Es va preparar una solució concentrada de BSA (Boehringer Mannheim) de 25 mg/ml. A partir d'aquesta solució de BSA es prepararen les dilucions 25, 12,5, 6,25, 3,125 i 1,56 ($\mu\text{g/ml}$). La recta patró es va construir per duplicat a partir de 0,8 ml de cada una d'aquestes dilucions més 0,2 ml de reactiu de Bradford. Així, les quantitats de proteïna de les diferents dilucions que formarien la recta patró serien de 20, 10, 5, 2,5 i 1,25 (μg). Per la determinació de la concentració de proteïna de les mostres assajades, es varen afegir entre 1 i 100 μl de cada mostra problema a barreges de 0,2 ml de reactiu de Bradford més la quantitat corresponent d'aigua fins a arribar a 1 ml de volum total.

A continuació es passava a realitzar la lectura de l'absorbància a DO_{595} de totes les mostres. La concentració de proteïna de les mostres es va calcular extrapolant a partir de la recta patró els valors de l'absorbància de les mostres problema i fent la correcció segons el volum de mostra assajat.

2.8.3 PRECIPITACIÓ DE PROTEÏNES PER ACETONA

En alguns casos les fraccions proteiques obtingudes tenien una concentració de proteïnes massa baixa per poder ser analitzades en gels d'acrilamida tenyits amb Blau de Coomassie (apartat 2.8.4). Per aquesta raó es concentraven mitjançant una precipitació amb acetona i una ressuspensió de les proteïnes en un volum inferior al inicial.

Per a això, s'afegien 3 volums d'acetona freda (a 4°C) a la fracció proteica. S'agitava i es deixava tota la nit a 4°C en posició vertical. Després de centrifugar-ho durant 30 min a 16.000 x g a 4°C, es decantava el sobrenedant ràpidament i el sediment de proteïnes s'assecava en una centrífuga de buit (Speed-Vac, model 100, Savant Instruments Inc.) i es ressuspensia en 1/20 volums d'aigua bidestil·lada. Es repetia tot el procés de precipitació afegint altre cop 3 volums d'acetona freda, agitant bé i deixant la barreja a 4°C un mínim de 2 h en posició vertical. Transcorregut aquest temps es centrifugava durant 30 min a 16.000 x g a 4°C, es decantava el sobrenedant ràpidament i el sediment de proteïnes s'assecava en una centrífuga de buit (Speed-Vac, model 100, Savant Instruments Inc.) i es ressuspensia en 1/10 volums d'aigua bidestil·lada.

2.8.4 PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES

2.8.4.1. Inducció de l'expressió de proteïnes

Per a la sobreexpressió de proteïnes es van construir una sèrie de plàsmids recombinants, que incloïen el gen d'interès clonat sota el promotor de la RNA polimerasa de T7 (Studier *et al.*, 1990). Es va utilitzar el vector d'expressió pET15b, que era introduït per transformació a la soca hoste adequada. Aquesta soca conté el gen de la RNA polimerasa del fag T7 sota el promotor induïble per IPTG (isopropil-D-galactopiranosid). La soca utilitzada va ser la BL21 (DE3)-Km.

Les colònies resultants de la transformació van ser recollides amb LB i utilitzades com a inòcul de 1 litre o de 500 ml, segons el cas, de medi LB suplementat amb Ap (50 g/ml) i/o Km (25 g/ml). El cultiu va ser incubat a 37°C fins a arribar a una DO₆₀₀ de 1; en aquest punt se li va afegir al medi IPTG (Promega) a una concentració final de 0,5 mM. La inducció de l'expressió de la proteïna d'interès es va dur a terme durant tota la nit a 16°C.

A continuació les cèl·lules van ser recollides per centrifugació (5.000 x g, 15 min) i es van ressuspensiar en 20 ml de tampó A si partíem d'un litre de cultiu, o amb 10 ml de tampó A en el cas de partir de 500 ml de cultiu.

Composició tampó A	
Hepes (Sigma)	20 mM
Glicerol (Panreac)	10 %
KCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM
Imidazol (Merck)	20 mM

Ajustar a pH 7,9 amb KOH.

2.8.4.2 Obtenció d'extractes cel·lulars

Per al'obtenció d'un extracte cel·lular que contingués gran quantitat de proteïna induïda, es va procedir a la lisis cel·lular de la suspensió obtinguda en l'apartat anterior. Per a això, la suspensió es va passar dos cops a través de la French press (French[®] Pressure Cell Press, SLM AMINCO[®]) a 1.000 psi. A continuació l'extracte es va centrifugar (durant 30 min, a 12.000 x g, a 4°C) per eliminar les restes cel·lulars i obtenir l'extracte soluble.

2.8.4.3 Purificació per Ni²⁺-NTA agarosa (Hochuli, 1988)

Per la purificació de proteïnes a les quals se'ls hi havia afegit una cua de 6 histidines, després de l'obtenció de l'extracte, es va utilitzar el mètode d'immobilització per cromatografia d'afinitat a metalls.

Es van barrejar els 10 o 20 ml d'extracte cru obtingut tal i com s'explica en l'anterior apartat amb 500 µl o 1 ml de reïna de Ni²⁺-NTA agarosa (Qiagen) respectivament i es va deixar en agitació suau durant 2 hores a 4°C.

Transcorregut aquest temps, es va centrifugar i ressuspendre la reïna varies vegades fins a quedar en un volum final de 1 ml. A partir d'aquest punt, es van fer 5 rentats amb 500 µl o 1 ml de tampó A (segons el volum del cultiu inicial) i 3 rentats amb tampó A més imidazol 200 mM, per tal d'eluir les proteïnes unides a la matriu. Les fraccions es van guardar i analitzar posteriorment per electroforesi en gel de poliacrilamida en Tris-Tricina-SDS (veure apartat 2.8.5.1.2).

Tampó A		
Producte	Tampó A (20 mM Imidazol)	Tampó A' (200 mM Imidazol)
Hepes pH 7,9*	20 mM	20 mM
KCl	100 mM	100 mM
MgCl ₂	5 mM	5 mM
Glicerol	10 %	10 %
Imidazol	50 mM	200 mM

* pH ajustat amb KOH.

2.8.5 TÈCNiques D'ELECTROFORESI DE PROTEÏNES

2.8.5.1 Gels de poliacrilamida desnaturalitzants

La separació en funció del tamany molecular de les proteïnes d'una determinada mostra es va realitzar mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida desnaturalitzants utilitzant l'equip MINI-PROTEAN II™ de Bio-Rad, que permet obtenir gels verticals de 7,3 cm d'alçada, 8 cm d'amplada i 0,75 o 1,5 mm de gruix.

2.8.5.1.1 Gels de poliacrilamida en Tris-Glicina-SDS (Laemmli, 1970)

Aquests tipus de gels estan formats per dues fases: la fase de compactació i la fase de resolució. La primera correspon a la ¼ part superior del gel i conté un 5% de poliacrilamida en tots els casos. La segona fase ocupa la resta del gel i els percentatges més utilitzats de poliacrilamida van ser de 10%, 12,5% i 15% segons els mides de les proteïnes que es volguessin separar en cada cas. La composició de cada fase es mostra a la següent taula:

	Fase de Resolució			Fase de Compactació
	10%	12,5%	15%	5%
Acrilamida/Bis 30,8%T, 2,6%C	2 ml	2,5 ml	3 ml	0,8 ml
Tampó de Resolució x 4	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	-
Tampó de Compactació x 4	-	-	-	1,25 ml
Aigua bidestil·lada	2,5 ml	2 ml	1,5 ml	2,92 ml
APS 10%	30 µl	30 µl	30 µl	35 µl
TEMED (Bio-Rad)	5 µl	5 µl	5 µl	10 µl

% T: Percentatge d'acrilamida + bisacrilamida

% C: Percentatge de bisacrilamida respecte el total (T)

Un cop introduïda la fase de resolució entre els vidres, s'afegia aigua bidestil·lada per afavorir la polimerització del gel i per tal que la fase quedés formant una superfície superior horitzontal.

En afegir posteriorment la fase de compactació, s'introduïa en el gel encara no polimeritzat la pinta per formar els pous. Els gels es posaven en les cubetes amb tampó de Recorregut x1 abans de carregar les mostres. El tampó de Recorregut es preparava a partir de tampó de Recorregut x10.

Les mostres es van carregar després d'afegir-hi tampó de mostres x 4 i de incubar-les durant 5-10 minuts a 100°C.

Després de carregar les mostres s'aplicava un voltatge de 50 V fins que les mostres s'havien compactat. A continuació, s'augmentava el voltatge a 120 V fins al final de l'electroforesi.

Tot seguit es detalla la composició de les solucions utilitzades:

Composició tampó de Resolució x4	
Tris (Roche)	1,5 M
SDS (Merck)	0,4 %

Ajustar a pH 8,8

Composició tampó de Compactació x4	
Tris (Roche)	0,5 M
SDS (Merck)	0,4 %

Ajustar a pH 6,8

Composició tampó de Recorregut	
Tris (Roche)	0,25 M
SDS (Merck)	1 %
Glicina (Fluka)	1,92 M

pH 8,3 (no ajustat)

Composició tampó de Mostres x4	
Glicerol (Panreac)	20 %
β -mercaptoetanol (Bio-Rad)	10 %
SDS (Merck)	4,6 %
Tris (Roche)	0,125 M
Blau Bromofenol (Millipore)	0,2 %

Ajustar a pH 6,8

Acrilamida/Bis-acrilamida 30,8%T, 2,6% C: Es van dissoldre 30 g d'acrilamida (Bio-Rad) més 0,8 gr de Bis-acrilamida (Bio-Rad) en d'aigua bidestil·lada. Un cop dissolt es va enrasar a 100 ml, es va filtrar amb paper de cel·lulosa i es va guardar a 4°C preservant la solució de la llum.

Solució d'APS al 10%: Es va preparar una solució d'APS (Bio-Rad) en aigua destil·lada a una concentració de 100 mg/ml.

2.8.5.1.2 Gels de poliacrilamida en Tris-Tricina-SDS (Schägger i von Jagow, 1987)

Les electroforesis en gels desnaturalitzants de poliacrilamida en Tris-Tricina-SDS es van utilitzar per a separar amb més resolució proteïnes de pes molecular comprès entre 5 i 50 kDa. Aquest tipus de gels consten de tres fases: fase de compactació, fase espaiadora i fase de resolució. La primera i segona fase ocupen $\frac{1}{4}$ part del gel cada una i l'última fase ocupa la segona meitat del gel.

Per a la preparació del gel i de les mostres, es va seguir el mateix protocol descrit en l'apartat 2.8.4.1.1 però en aquest cas varia la composició dels tampons utilitzats. El tampó de recorregut també era diferent, en aquest cas s'utilitzaven dos tampons diferents, el tampó de l'ànode i el tampó del càtode.

La composició d'aquest tipus de gels era sempre la mateixa i es mostra a continuació:

	Fase de resolució 16,5%T 3%C	Fase espaiadora 10%T 3%C	Fase de compactació 4%T 3%C
Acrilamida/Bis 49,5%T 3%C	1 ml	0,3 ml	0,15 ml
Tampó del Gel	1 ml	0,5 ml	0,45 ml
Glicerol 50 %	0,8 ml	-	-
Aigua bidestil·lada	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: Percentatge d'acrilamida + bisacrilamida total

% C: Percentatge de bisacrilamida respecte T

Tot seguit es detalla la composició de les solucions utilitzades:

Acrilamida/Bis-acrilamida 49,5% T, 3% C: Es dissolien 48 g d'acrilamida (Bio-Rad) més 1,5 g de bis-acrilamida (Bio-Rad) en aigua bidestil·lada. Un cop dissolt s'enrasava a 100 ml, es filtrava amb paper de cel·lulosa i es guardava a 4°C preservat de la llum.

Composició tampó de l'ànode

Tris (Roche)	0,2 M
--------------	-------

Ajustar a pH 8,9

Composició tampó del càtode

Tris (Roche)	0,1 M
--------------	-------

Tricina (Bio-Rad)	0,1 M
-------------------	-------

SDS (Merck)	0,4 %
-------------	-------

pH 8,25 no ajustat

Composició tampó del Gel x3

Tris (Roche)	3 M
--------------	-----

SDS (Merck)	0,3 %
-------------	-------

Ajustar a pH 8,45

2.8.5.2 Marcadors de pes molecular

Es van utilitzar tres tipus de marcadors de pes molecular:

SDS-PAGE Standard, Low-Range de Bio-Rad: Barreja de proteïnes de 14,5 a 97,4 kDa.

Pre-stained SDS-PAGE Standard, Broad Range de Bio-Rad: barreja de proteïnes pre-tenyides de 6,4 a 198 kDa aproximadament. Aquest marcador es solia utilitzar quan les proteïnes eren transferides a membrana ja que a més de servir de marcador de pes molecular també serveix com a control de la transferència. Cal tenir present però, que aquest marcador ens dóna pesos orientatius ja que el tamany molecular pot variar de lot a lot degut a la reacció de tinció portada a terme pel fabricant.

Precision Protein Standards de Bio-Rad: es tracta d'una barreja de proteïnes recombinants que abarquen pesos moleculars entre 10 i 250 kDa.

La següent taula mostra el tamany de les proteïnes de cada marcador:

Tipus	Tamany de les proteïnes (kDa)
Low Range	97,4; 66,2; 45; 31; 21,5; 14,4
Pre-stained, Broad Range	195; 106; 54; 41; 27; 21; 15; 6,5
Precision Protein Standards	250; 150; 100; 75; 50; 37; 25; 15; 10

2.8.5.3 Tinció de gels de proteïnes amb Blau de Coomassie®

La tinció es va realitzar incubant els gels en solució de tinció durant 30 minuts. Un cop passat aquest temps es va destenyir mitjançant varis rentats amb àcid acètic glacial (Panreac) al 10 % (v/v).

Composició solució de Tinció	
Blau brillant de Coomassie® R-250 (Fluka)	0,5 ‰
Àcid acètic glacial (Panreac)	10 %
Isopropanol (Merck)	25 %

Un cop dissolt el colorant, la solució es filtra amb paper de cel·lulosa.

2.8.6 SEQÜENCIACIÓ I IDENTIFICACIÓ DE PROTEÏNES

2.8.6.1 Seqüenciació N-terminal per degradació d'Edman (Edman, 1970)

La degradació d'Edman és un procediment tradicionalment utilitzat per a determinar la seqüència d'aminoàcids de proteïnes. Aquest mètode permet digerir un a un els aminoàcids de l'extrem amino-terminal de la proteïna d'interès mitjançant una reacció química, de manera que permet determinar els aminoàcids d'aquest extrem i l'ordre. La degradació d'Edman permet seqüenciar amb facilitat fins a uns 20 aminoàcids.

2.8.6.1.2 Transferència de la proteïna a membrana PVDF (Packman, 1993)

Per tal d'obtenir la proteïna en les condicions adients per a la seva seqüenciació per degradació d'Edman es va aïllar des de membrana de PVDF. En primer lloc es va córrer la mostra en un gel de poliacrilamida desnaturalitzant (veure apartat 2.8.5.1) utilitzant acrilamida desionitzada i afegint àcid tioglicòlic (Panreac) al tampó de recorregut a una concentració final de 2 mM.

Abans de carregar les mostres al gel, es va fer un pre-escalfament a 120 V durant 10-20 minuts. Tot seguit es va carregar la mostra i es va desenvolupar l'electroforesi.

Un cop acabada l'electroforesi, es van transferir les proteïnes del gel a una membrana de PVDF (Sequi-blot PVDF Membrana per a seqüenciació de proteïnes, 0,2 µm, Bio-Rad). Tant el gel com la membrana s'equilibraven en tampó de transferència. En el cas de les membranes de PVDF, però, previ al tampó de transferència, la membrana s'havia de mullar completament amb metanol i no s'havia de permetre que s'assequés mai. El gel de poliacrilamida es dipositava sobre la membrana, i el conjunt es col·locava entre papers de filtre (Whatman 3 MM) mullats amb el mateix tampó (tres per cada costat). Aquest bloc es dipositava entre el càtode i l'ànode de l'aparell i es procedia a la transferència de les proteïnes amb l'equip Trans-Blot® SD-Semy-Dry Transfer Cell de Bio-Rad, tot aplicant un voltatge de 15 V durant generalment 30 minuts. Si el gel era més gruixut o la proteïna molt gran, aleshores s'augmentava el temps de transferència a 45-60 minuts.

Composició tampó de transferència	
Tris (Roche)	48 mM
Glicina (Fluka)	39 mM
Metanol (Merck)	20 %
SDS (Merck)	1,3 mM

pH 9,2 no ajustat.

Després de la transferència, es van realitzar 3 rentats de la membrana amb aigua bidestil·lada. Després dels rentats es va passar a tenyir la membrana durant 5 min amb una solució de Coomassie® no fixativa:

Composició solució de Coomassie®	
Blau brillant de Coomassie® R-250 (Fluka)	0,1 %
Metanol (Merck)	50 %

Un cop dissolt el colorant, la solució es filtra amb paper de cel·lulosa

Per destenyir la membrana parcialment es va fer un rentat amb solució de destinció fins que es podia observar la/les banda/es a retallar però sense que es destenyís del tot.

Solució de destinció	
Metanol (Merck)	50 %
Àcid acètic glacial (Panreac)	10 %

Es va deixar assecar la membrana a l'aire i després es va retallar la banda d'interès amb una fulla de bisturí. Aquest fragment podia ser emmagatzemat a -20°C fins al moment de la seqüenciació.

Desionització de l'acrilamida: A partir d'una solució d'acrilamida fresca preparada com es descriu en l'apartat 2.8.5.1, se li va afegir un 5 % de reïna d'intercanvi iònic AG 501-X8(D) (Bio-Rad). Es va deixar 2 hores en agitació a temperatura ambient. Un cop passades les 2 hores es va filtrar amb paper de cel·lulosa.

2.8.6.1.2 Seqüenciació N-terminal

La seqüenciació N-terminal per degradació d'Edman la va realitzar el Dr. Francesc Canals al Servei de Proteòmica i de Bioinformàtica de l'Institut de Biotecnologia i de Biomedicina "Vicent Villar i Palasí" de la UAB.

Un cop seqüenciats de l'ordre de 8-10 aminoàcids de l'extrem N-terminal es va utilitzar la seqüència obtinguda per la identificació de la proteïna mitjançant una cerca d'homologies en bancs de dades.

2.8.7 TÈCNiques D'IMMUNODETECCIÓ DE PROTEÏNES (“WESTERN BLOT”) (Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981)

Les proteïnes separades per electroforesi en gels de poliacrilamida (apartat 2.8.5.1) eren transferides a un suport sòlid per a ser posteriorment detectades mitjançant anti-sèrums específics.

2.8.7.1 Transferència de proteïnes a membrana per sistema semi-sec

Les proteïnes separades per electroforesi van ser electrotransferides del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocel·lulosa (Trans-blot[®] Transfer medium, 0,45 µm, Bio-Rad).

Tant el gel com la membrana s'equilibraven en tampó de transferència (apartat 2.8.6.1.2). El gel de poliacrilamida es dipositava sobre la membrana, i el conjunt es col·locava entre papers de filtre (Whatman 3 MM) mullats amb el mateix tampó (tres per cada costat). Aquest bloc es dipositava entre el càtode i l'ànode de l'aparell i es procedia a la transferència de les proteïnes amb l'equip Trans-Blot[®] SD-Semy-Dry Transfer Cell de Bio-Rad, tot aplicant un voltatge de 15 V durant generalment 30 minuts. Si el gel era més gruixut o la proteïna molt gran, aleshores s'augmentava el temps de transferència a 45-60 minuts.

2.8.7.2 Immunodetecció i revelat quimioluminiscent pel sistema ECLTM

Després de la transferència, la membrana de nitrocel·lulosa es bloquejava durant 1 hora en tampó TBS-Tween més l'agent de bloqueig, llet descremada en pols al 5% (p/v). A continuació es van realitzar 3 rentats de 10 minuts cada un en tampó TBS-Tween i després es va incubar 1 hora amb l'anticòs primari contra la proteïna que es volia detectar diluït en 10 ml de tampó TBS-Tween. L'excés d'anticòs unit inespecíficament s'eliminava rentant la membrana 3 vegades amb tampó TBS-Tween (10 minuts cada rentat). La membrana s'incubava altra vegada durant 1 hora amb l'anticòs secundari conjugat amb peroxidasa diluït en 10 ml de tampó TBS-Tween. L'excés d'anticòs secundari s'eliminava amb 3 rentats de 10 minuts amb tampó TBS-Tween. Per iniciar la reacció quimioluminiscent de revelat, la membrana es va

incubar durant 5 minuts en estàtic amb el reactiu que conté el substrat per la peroxidasa de l'anticòs secundari, seguint les indicacions de la casa comercial (ECL™ Western blotting, Amersham Biosciences). Posteriorment la membrana es va embolicar amb film de plàstic i es va col·locar dins un cassette d'autoradiografia Gevomatic 18 x 24 amb pantalles amplificadores Curix C-2 (Agfa) per exposar-hi una pel·lícula (Hyperfilm MP, Amersham Biosciences). Després d'un temps determinat que podia variar entre 5 i 45 minuts d'exposició, es va revelar el film automàticament (RG II, Fuji X-Ray, Film Processor).

Composició tampó TBS-Tween	
Tris (Roche)	20 mM
NaCl (Panreac)	136 mM
Tween-20 (Merck)	0,1 %

Ajustar el pH a 7,6.

A continuació es mostra una taula amb els anticossos primaris policlonals i secundaris utilitzats en aquest treball:

Anticossos primaris				
Anticòs	Antigen	Dilució	Origen	Referència
Anti-Hha # 1	Hha	1:1.000	Conill	Balsalobre <i>et al.</i> , 1996
Anti-H-NS	H-NS	1:10.000	Conill	Cedit pel Dr. B. Eric Uhlin (Umea Univerity, Suècia)
Anti-YdgT	YdgT	1:100.000	Conill	Paytubi <i>et al.</i> , 2004.
Anti-Hisx6	Hisx6	1:3000	Ratolí	Amersham Biosciences

Anticossos secundaris					
Anticòs	Enzim conjugat	Antigen	Dilució	Origen	Referència
Anti-Mouse IgG	Peroxidasa	IgG de conill	1:10.000	Ase	Amersham Biosciences
Anti-Rabbit IgG	Peroxidasa	IgG de conill	1:10.000	Ase	Amersham Biosciences

2.8.8 VALORACIONS D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES

2.8.8.1 Determinació de l'activitat β -galactosidasa (Miller, 1992)

A la DO_{600} escollida per mesurar l'activitat β -galactosidasa d'un cultiu de la soca objecte de l'estudi, es recolliren alíquotes d'entre 50 μ l i 100 μ l que es portaren a un volum final de 1 ml amb tampó Z.

Es van afegir 50 μ l de cloroform i 25 μ l de SDS 0,1 % s'agità la barreja amb un vòrtex durant 10 s per tal de trencar les cèl·lules. A continuació es va incubar durant 5 min en un bany termoestàtic a 28 °C i se li va afegir ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, Sigma; 4 mg/ml en tampó fosfat sòdic 0,1 M pH 7,0). Les mostres es van incubar a 28°C fins a l'aparició de color groc, moment en el qual s'aturava la reacció amb 0,5 ml de Na_2CO_3 1 M. Es van deixar reposar les reaccions uns minuts i es va mesurar l'absorbància a les longituds d'ona de 420 nm i 550 nm.

Composició tampó 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 ajustat.

Composició tampó fosfat	
A) Na_2HPO_4	0'1 M
B) NaH_2PO_4	0,1 M

Afegir B sobre A fins arribar a pH 7,0 i autoclavar.

Amb els valors de l'absorbància obtinguts es va calcular l'activitat β -galactosidasa amb la següent fórmula:

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

U: Unitats Miller.

DO₄₂₀ i DO₅₅₀: valors d'absorbància a las longituds d'ona de 420 nm i 550 nm un cop aturada la reacció.

DO₆₀₀: valor de l'absorbància a 600 nm del cultivo a l'agafar la mostra.

t: temps transcorregut en minuts des de l'addició d'ONPG fins a aturar la reacció amb Na₂CO₃.

V: volum de cultiu utilitzat per la determinació de l'activitat (ml).

2.8.8.2. Valoració d'activitat hemolítica en la fracció externa

A partir d'un cultiu de tota la nit d'una soca hemolítica es va fer una dilució 1/100 en 100 ml de medi LB i es va incubar a 37°C a 200 rpm. Quan el cultiu va arribar a DO₆₀₀ de 0,4 i 0,8 es va recollir 1 ml de cultiu i es va centrifugar a 3.000 x g durant 5 min. Alíquotes de 10, 50 i 200 µl es van ajustar a 200 µl amb LB i es van barrejar amb 1200 µl d'una suspensió d'eritròcits. La barreja es va incubar durant 1 hora a 37°C sense agitació. A continuació es van centrifugar les barreges durant 30 segons a 16.000 x g. Es va procedir a llegir la DO₅₄₃ de cada sobrenedant com a reflex de l'hemoglobina alliberada al medi.

Les unitats d'hemolisina es van calcular segons la següent fórmula:

$$\text{Unitats d'hemòlisi} = \frac{(\text{DO}_{543\text{nm}} - \text{DO}_{543\text{nm control}}) \times 1000}{\text{DO}_{600\text{nm}} \times t \times V}$$

On **t** indica temps expressat en minuts i **v** indica volum en ml de mostra.

Preparació suspensió d'eritròcits: Es partia de 3 ml de sang desfibrinada de xai (Oxoid) que es centrifugaven durant 30 segons a 16.000 x g. Els eritròcits es van

ressuspendre en el mateix volum de NaCl 0,9% fred. Aquest rentat es va repetir 3 o 4 vegades fins que el sobrenedant després de centrifugar quedava transparent. Als 3 ml d'eritròcits rentats se'ls afegia després 60 ml més de NaCl 0,9% i 10 ml de CaCl₂ 200 mM, freds. Aquesta suspensió es mantenia en gel.

2.8.8.3. Valoració de l'activitat β -glucosidasa en extractes cel·lulars

Aquest mètode es va posar a punt amb la Dra. Josefina Martínez.

A partir d'un cultiu de tota la nit de la soca que es vogueu assajar es va fer una dilució 1/100 en 100 ml de medi LB i es va incubar a 37°C a 200rpm. Quan el cultiu va arribar a DO₆₀₀ de 0,8 es van recollir 10 ml de cultiu i es van centrifugar a 3.000 x g durant 10 min. Les cèl·lules es van ressuspendre en 0,75 ml d'aigua bidestil·lada estèril, es van afegir 75 μ l d'una solució de lizozim (1 mg/ml) i es va deixar 20 min en gel. Aquest era l'extracte que es feia servir per assajar l'activitat β -glucosidasa.

L'activitat β -glucosidasa dels extractes es va mesurar mitjançant la fluorescència emesa pel MUF (4-metilumbeliferona) que es despenia de la hidròlisi del 4-MUF- β -D-glucopiranosid (MUGIc) duta a terme per la β -glucosidasa. La fluorescència emesa es va mesurar amb un fluorímetre (Espectrofluorímetre Hitachi F-2000) que ens va permetre la determinació de la intensitat d'emissió de fluorescència amb un nivell de sensibilitat de 700 volts. Mitjançant la funció automàtica Pre-Scan, es determinaren els espectres d'excitació i d'emissió del MUF (Sigma) en les condicions d'assaig habituals (en Tris-HCl 100 mM pH 8,0). Així es fixaren les longituds d'ona òptimes d'excitació en 360 nm i d'emissió en 450 nm.

Es van afegir 0,3 ml de l'extracte a 5,7 ml de Tris-HCl 100 mM pH 8,0 pre-escalfat a 37°C. Seguidament se li van afegir 24 μ l de MUGIc (Sigma) 25 mM (dissolt en N,N-dimetilformamida, DMF). La concentració final de MUGIc a la reacció va ser sempre de 100 μ M. Es va fer una lectura de la fluorescència a temps zero (T₀) i es va seguir incubant la reacció a 37°C. Es van fer lectures de la fluorescència a diferents temps de manera que obteníem una recta que ens relacionava la intensitat de fluorescència en funció del temps. Així, vam determinar la velocitat de la reacció d'hidròlisi del MUGIc, que corresponia a la pendent de la recta (increment d'intensitat per minut, $\Delta I/\text{min}$). A més, es feien dos tipus de blanc en cada experiment:

- Blanc de la mostra: 0,3 ml d'un extracte més 5,7 ml de Tris-HCl 100 mM pH 8,0 pre-escalfat a 37°C.

- Blanc del reactiu: s'afegien 24 μ l de MUGIc 25 mM a 6 ml de Tris-HCl 100 mM pH 8,0 pre-escalfat a 37°C.

Es van fer les mateixes lectures de fluorescència dels blancs que per la mostra i així vam veure si hi havia un increment de la fluorescència en funció del temps, que en cap cas es va detectar.

El resultat obtingut ($\Delta I/\text{min}$), s'havia de corregir en funció de la quantitat de proteïna de cada extracte. Per aquesta raó es va fer una valoració de la concentració de proteïnes pel mètode de Bradford (apartat 2.8.2) de cadascuna de les barreges de reacció on hi havia l'extracte diluït en Tris-HCl 100 mM pH 8,0.

Per passar les unitats d'intensitat (UI) a activitat enzimàtica (mols de MUF) es va fer una recta patró amb diferents concentracions de MUF. A partir d'una solució mare de MUF 5mM dissolt en DMF es va fer el següent banc de dilucions en Tris-HCl 100 mM pH 8,0: 625 nM, 312,5 nM, 156,25 nM, 78,12 nM, 39,06 nM, 19,53 nM i 9,77 nM. Es va mesurar la fluorescència de cada dilució de MUF i es va fer la recta de regressió. Com que el valor obtingut de les mostres eren increments d'intensitat, el que es va tenir en compte de la recta de regressió va ser només la pendent (m).

Per calcular l'activitat β -glucosidasa de cada extracte es va aplicar la següent fórmula:

$$\text{pmol MUF/min g} = \frac{\Delta I/\text{min}}{m \times C}$$

m = pendent de la recta patró (pmol MUF/ $\Delta I \times \mu$ l)

C = concentració de proteïna (μ g/ μ l)

2.9 MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ

Aquesta tècnica s'utilitza per l'observació dels pilis conjugatius de les soques portadores del plàsmid R27 i els seus derivats.

L'observació dels cultius bacterians es va fer mitjançant una tinció negativa. Es va partir de cultius de tota la nit (16-18 h) de la soques portadores del plàsmid conjugatiu crescudes en medi BP a la temperatura a la què es volgués fer l'anàlisi de la formació dels pilis, i sense agitació. Aquestes eren les mateixes condicions en què es van cultivar les soques quan es volia dur a terme una conjugació. Al tractar-se d'un cultiu estàtic, per realitzar la tinció negativa, es van agafar les cèl·lules de la zona més profunda del tub, on n'hi havia més concentració per tal de poder tenir més quantitat de bacteris i així fer més fàcil l'observació de pilis en les mostres. Es va diluir el cultiu a 1/2 en aigua bidestil·lada i es diposità una gota de 50 μ l sobre una superfície coberta amb Parafilm. Sobre la gota es diposità una reixeta de coure que contenia una membrana de formvar i s'hi va deixar durant 1 minut per tal de fixar la mostra sobre la reixeta. Seguidament, es feren tres rentats amb aigua bidestil·lada que duraven 1 minut en total. Aquests rentats es van fer dipositant la reixeta seqüencialment sobre tres gotes de 50 μ l d'aigua bidestil·lada que havíem dipositat sobre la superfície coberta amb Parafilm. Després dels rentats es va procedir a la tinció negativa, dipositant la reixeta sobre una gota de 50 μ l d'acetat d'uranil 2% durant 1 minut. Un cop feta la tinció, es va retirar l'excés d'acetat d'uranil amb paper de filtre.

La observació es va fer amb un microscopi electrònic de transmissió JEOL1010 a 80 kV, el qual portava incorporat un sistema de digitalització d'imatges (càmera CCD MegaViewIII). El programa d'anàlisi d'imatges utilitzat va ser analySIS®.

Tant la tinció negativa com l'observació al microscopi es van dur a terme a la Unitat de Microscòpia Electrònica i Reconeixement molecular *in situ* del Parc Científic de Barcelona.