



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**"Clonación del gen que codifica la proteína accesoria h
con función putativa de decoración en bacteriófagos
Mu-like de *Pseudomonas aeruginosa*"**

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIÓLOGIA

PRESENTA:

Isaac Reyes Montealegre

DIRECTOR: Dr. Gabriel Guarneros Peña

CO-DIRECTOR: Dr. Adrián Cazares Lopez



Agosto-2017

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 8 del Departamento de Genética y Biología Molecular a cargo del Dr. Gabriel Guarneros Peña, en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el período de Enero de 2016 a Mayo de 2017 (N° de expediente 13031)

Agradecimientos

Al Dr. Gabriel Guarneros Peña por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo y compartir conmigo sus conocimientos para la realización de este proyecto.

Al Dr. Adrián Cazares López por ayudarme en mi formación como científico en el laboratorio, sus invaluable consejos y enseñanzas fueron la cumbre que permitió realizar este proyecto.

Al M. en C. Marco Magos, su enorme disposición para ayudarme a trabajar en el laboratorio y su amistad hicieron la realización de este proyecto mucho más fácil y grata.

A los integrantes del laboratorio 3 y 8 del Departamento de Genética del CINVESTAV, quienes me brindaron su apoyo y consejos durante el desarrollo de esta tesis.

A todos mis amigos de la carrera de Biología, su increíble y genuina amistad fueron una increíble aventura para mí en el transcurso de la carrera y con quienes estaré siempre en deuda por haberme acompañado en esta asombrosa etapa de mi vida.

A mi familia Reyes Correa, quienes me abrieron las puertas de su casa, cuidaron de mí y me brindaron todo su apoyo y cariño incondicional haciéndome sentir como en casa.

Dedicatoria

A mi familia, mi madre Rossi y mi padre Jaime, las personas más increíbles e invaluableles que forman parte de mi vida y que siempre estare en deuda y agradecido con ellos, ustedes son la fuerza que impulsa mi espíritu para aspirar a ser una mejor persona , su enorme cariño y dedicación hacia mi son los cimientos que me permitieron seguir adelante con mis metas y por eso les debo todo.

A mi hermana Jessica, quien a pesar de siempre orillarme a perder los estribos, ha sido mi compañera y amiga durante toda mi vida y con quien siempre puedo contar para cualquier cosa, gracias por compartir tantos momentos conmigo y por hacerme percibir ese deseo de superación y salir adelante en todos los aspectos.

Índice

Contenido	Página
Índice	I
Índice de Figuras	III
Índice de Tablas	IV
Resumen	1
1. Introducción/Antecedentes	2
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.2 Los bacteriófagos	4
1.3 Fagos Mu	8
1.4 Fagos <i>Mu-like</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : PaMx73 y H70	12
1.5 El “pangenoma” de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y los fagos <i>Mu-like</i>	13
1.6 Proteínas de decoración	15
2. Hipótesis	21
3. Justificación	21
4. Objetivos	22
4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivos particulares	22
5. Materiales y Métodos	22
5.1 Cepas bacterianas	22
5.2 Bacteriófagos	22
5.3 Plásmidos	23
5.4 Oligonucleótidos	23
5.5 Tapices bacterianos	24
5.6 Obtención del título de fagos	24
5.7 Preparación de stock de fagos	24
5.8 Preparación de lisados fágicos por placa confluyente	25
5.9 Concentración de fagos por polietilenglicol	25
5.10 Purificación de fagos por gradientes discontinuos de Cloruro de Cesio	25
5.11 Construcción de lisógenas	26
5.12 Extracción de ADN fágico	26
5.13 Extracción de plásmido	27
5.14 Preparación de células electrocompetentes de <i>P.aeruginosa</i>	27

5.15 Preparación de células quimiocompetentes de <i>E.coli</i> -DH5 α	27
5.16 Electroporación en <i>P.aeruginosa</i>	28
5.17 Transformación química en <i>E.coli</i>	28
5.18 Geles de agarosa y electroforesis	29
5.19 Purificación de bandas de gel de agarosa	29
5.20 Clonación del ORF <i>h</i> mediante PCR	29
5.21 Ligación en pJET1.2/Blunt – pUCP24_L3	31
5.22 PCR de colonia – Tamizaje de candidatos	32
5.23 Ensayos de restricción	33
5.24 Secuenciación de DNA	33
5.25 Electroforesis en geles de poliacrilamida Tris-Glicina (SDS-PAGE)	35
5.26 Tinción con Coomasie	36
5.27 Western Blot	36
5.28 Transferencia	36
5.29 Inmunodetección	37
6. Resultados	38
6.1 Propagación de bacteriófagos en la cepa hospedera PA14	38
6.2 Lisados fágicos por placa confluyente/Precipitación con polietilenglicol PEG-8000	39
6.3 Purificación de fagos por gradientes discontinuos de Cloruro de Cesio	39
6.4 Tipificación de ADN fágico	40
6.5 Clonación del ORF <i>h</i> en un vector de expresión	41
6.6 Subclonación del ORF <i>h</i> en pJET1.2	42
6.7 Clonación en pUCP24_L3	44
6.8 Transformación en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de la construcción denominada pUCP24_L3_ih_70	47
6.9 Construcción de lisógenas	50
7. Discusión	52
8. Conclusiones	57
9. Perspectivas	58
10. Bibliografía	59
11. Anexos	64

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de los ciclos lítico y lisogénico fago λ	7
Figura 2. Ruta de ensamblaje genérica de los bacteriófagos del orden <i>Caudovirales</i>	8
Figura 3. Viriones del bacteriófago Mu	9
Figura 4. Bacteriófago Mu	11
Figura 5. Micrografía de los viriones <i>Mu-like</i> PaMx73 y H70	13
Figura 6. Lapso de tiempo de inactivación de fagos T4 a pH 10.6	16
Figura 7. Dec se une al fago P22 y estabiliza sus cápsides	17
Figura 8. Esquema del proceso de expansión de la cápside y su subsecuente decoración por la proteína gpD	19
Figura 9. Propagación de bacteriófagos PaMx73 y H70 en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	39
Figura 10. ADN extraído de los fagos purificados por Cesio	40
Figura 11. Tipificación de los fagos PaMx73 y H70	41
Figura 12. Vector de transición pJET1.2	43
Figura 13. Clonación del ORF <i>h</i> en pJET1.2.	43
Figura 14. Doble restricción del inserto <i>h</i> y el vector de expresión pUCP24 L-3 para la reacción de ligación	45
Figura 15. Ligación del ORF <i>h</i> en pUCP24L-3	46
Figura 16. Secuencia de la construcción pUCP24_L3_ih_70	47
Figura 17. Electroporación en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa PA14 con la construcción pUCP24_L3_ih_70	49
Figura 18. Tamizaje de candidatas producto de la transformación en PA14	50
Figura 19. PCR de colonia de la lisógena construida de la cepa PA14/pUCP24_L3_ih_70 con el fago 39016	51
Figura 20. Cinética de crecimiento de PA14 transformada con el plásmido construido	69

Índice de Tablas

Tabla 1. Pangenoma de los fagos Mu-like	15
Tabla 2. Oligos ocupados para la clonación y secuenciación del ORF <i>h</i>	23
Tabla 3. Título de fagos propagados en PA14	38
Tabla 4. Título de fagos obtenidos por la técnica de placa confluyente	39
Tabla 5. Título de fagos obtenidos después de purificar por Cloruro de Cesio	40

Resumen

Los bacteriófagos son parásitos intracelulares que dependen totalmente de las maquinarias biológicas de su célula hospedera alterando drásticamente su metabolismo para sintetizar los componentes del fago. Una de las estructuras de los fagos de doble cadena que requiere un pre-ensamblaje y que es la encargada de empaquetar y proteger el genoma del bacteriófago es la cápside. Para los fagos de doble cadena, la resistencia de las partículas fágicas ante agentes externos depende totalmente de la cápside y cuyo paso final para su maduración usualmente requiere de la unión específica de proteínas de decoración o cementación. Estas proteínas decorativas imparten una estabilidad mecánica o resistencia ante condiciones adversas de pH o temperatura. Estas proteínas pueden ser dispensables o indispensables para el crecimiento del fago y son consideradas como elementos accesorios que incrementan la adecuación del virión dependiendo del nicho exacto que el fago ocupe. De la colección de bacteriófagos Mu-like que contamos en nuestro laboratorio, PaMx73 y H70 contienen al ORF *h*, en base a homología de secuencia, este gen accesorio podría codificar a una nueva proteína con función putativa de decoración para fagos que infectan a *Pseudomonas aeruginosa*. El objetivo de este trabajo consistió en proporcionar las herramientas biológicas necesarias para poder caracterizar la función de esta nueva proteína. Para esto, se clonó el gen *h* localizado en la región accesoria H (RGP-H) del genoma del bacteriófago H70 en un vector plasmídico. Ésta clonación se realizó en la cepa de *Escherichia coli* DH5 α y en la cepa PA14 de *Pseudomonas aeruginosa*, lo que se corroboró mediante secuenciación del plásmido construido que lleva al gen *h*. De igual manera se construyó una bacteria lisógena que posee nuestro gen clonado en un plásmido y al mismo tiempo alberga un fago que no posee el ORF *h* en su genoma (fago 39016), esto nos permitiría visualizar un fenotipo de decoración mediante la expresión de la proteína *h* en presencia de los viriones de 39016 liberados por la cepa lisógena. Caracterizar una nueva proteína de decoración en *Pseudomonas* permitiría determinar el papel que juegan estos elementos accesorios y como permiten incrementar la adaptación fágica ante una amplia gama de ambientes y condiciones adversas.

“Clonación del gen que codifica la proteína accesoria *h* con función putativa de decoración en bacteriófagos Mu-like de *Pseudomonas aeruginosa*”

1. Introducción y Antecedentes

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram-negativa perteneciente a la gamma proteobacteria, misma a la que pertenecen las enterobacterias [1, 2]. Como todas las proteobacterias, *P. aeruginosa* presenta en su morfología una pared celular compuesta de tres capas lipídicas distintas: una membrana interna o membrana citoplasmática, la capa de peptidoglicano y una membrana externa. La membrana externa está compuesta de fosfolípidos, proteínas, y lipopolisacáridos (LPS) [3]. *P.aeruginosa* es un bacilo aerobio no esporulado que mide aproximadamente de 0.5 a 0.8 µm por 1.5 a 3.0 µm. Casi todas las cepas presentan motilidad mediante un flagelo polar aunque algunas cepas presentan de dos a tres flagelos. *P.aeruginosa* es capaz de producir pigmentos como la pioverdina y la piocianina, utilizados en su identificación bioquímica [4], éstos pigmentos no son tóxicos en animales, sin embargo, Piocianina retrasa el crecimiento de otras bacterias y por lo tanto podría facilitar la colonización de *P.aeruginosa* [3].

P.aeruginosa se ha convertido en una de las causas más comunes de infecciones nosocomiales siendo ésta responsable del 10-20% de infecciones hospitalarias en todo el mundo. [5]. A pesar que *P.aeruginosa* no representa una amenaza importante para personas saludables, ésta es un patógeno oportunista que puede provocar serias infecciones crónicas y agudas en pacientes inmunocomprometidos así como también *P.aeruginosa* puede provocar severas complicaciones en pacientes con fibrosis quística donde la infección es la principal causa de morbilidad y mortalidad [6].

Uno de los aspectos que *P.aeruginosa* posee para poder adaptarse a diversas condiciones ambientales y poder colonizar diversos nichos ecológicos yace en su versatilidad metabólica. *P.aeruginosa* a pesar de ser un organismo aerobio no fermentativo puede crecer en condiciones anóxicas utilizando el nitrato como electrón aceptor. Además es capaz de usar más de 75 diferentes compuestos orgánicos, puede crecer en medios donde solo se suministre como fuente de recurso el acetato en vez de

carbón y sulfato de amonio por hidrógeno [3]. Este organismo crece bien entre 25° C y 37° C, pero también puede crecer de manera más lenta o al menos sobrevivir a altas o bajas temperaturas [7].

La membrana externa de las bacterias gram negativas es una membrana semipermeable que permite la difusión de solutos hidrofílicos pequeños y tiene muy baja permeabilidad para los compuestos hidrofóbicos [8]. La permeabilidad de la membrana externa depende principalmente de las porinas, que son proteínas formadoras de poros con una baja especificidad y de los sistemas de transporte específicos [9]. La baja permeabilidad de las porinas de la membrana externa de *P.aeruginosa* tiene un papel importante en el alto nivel de resistencia natural a los antibióticos de esta bacteria [10]. La principal razón de tal resistencia es su membrana externa que presenta un gran número de transportadores que exportan de la célula una extensa variedad de antibióticos como macrólidos, cloranfenicol, tetraciclina y trimetoprima [10, 11]. Conjuntamente, las cepas son capaces de producir β -lactamasas de espectro extendido causantes de la resistencia hacia la amplia gama de antibióticos β -lactámicos [12].

P.aeruginosa es un organismo de vida libre el cual posee un genoma destacable de largo tamaño de aproximadamente 6.6 Mbp con un alto porcentaje en GC (~66.6 %). Los análisis comparativos realizados sobre el genoma de *P.aeruginosa* revelan que esta bacteria es un mosaico consistente de regiones altamente conservadas intercaladas con material genético accesorio. El *core* genómico de *P.aeruginosa* definido como el grupo de genes compartidos por todas las cepas corresponde al 90% del genoma. En contraparte, el genoma accesorio considera los genes encontrados solo en algunas cepas y que tienden a agruparse en loci denominados Regiones de Plasticidad Genómica (RGPs por sus siglas en inglés). En total, el *core* genómico de *P.aeruginosa* contiene ~5,320 secuencias codificantes. [13]. En conjunto, el *core* genómico y las regiones accesorias contienen un número desproporcionalmente grande de genes que codifican proteínas de membrana externa que funcionan en adhesión, motilidad, eflujo de antibióticos, exportación de factores de virulencia y sistemas de detección ambiental de dos componentes. Adicionalmente, y en concordancia con la versatilidad metabólica de la bacteria, cuenta con un gran número de genes codificando enzimas y sistemas de

transporte involucrados en la captura y metabolismo de una amplia variedad de nutrientes [13, 14]. Adicionalmente, *P.aeruginosa* posee un alto porcentaje muy inusual de genes reguladores (8.4 %), posee una proporción significativamente mayor que otros genomas bacterianos. [14].

Tomando en cuenta el tipo de genoma y el mosaicismo que presenta *P.aeruginosa*, los elementos genéticos accesorios son los que permiten describir como esta bacteria es capaz de poseer una adaptación a nichos específicos y que éstas regiones accesorias suelen ser adquiridas por transferencia horizontal posiblemente a causa de la alta tasa de recombinación entre la población de esta bacteria. [15, 16]. Dentro de este tipo de genoma, se encuentran los profagos y los elementos *phage-like*, que han mostrado ser determinantes en la diversidad intraespecífica de *P.aeruginosa* [17].

Como se puede observar, *P.aeruginosa* tiene una extraordinaria capacidad de adaptarse a diversos ambientes y tiene, además, la particularidad de no presentar una población clonal. Esto es, la población de estas bacterias comparte una gran parte de su genoma a través de mecanismos de recombinación. Estas características plantean una serie de interrogantes acerca de la manera en que esta bacteria ha evolucionado. Los estudios genómicos conducidos sobre cepas de *P.aeruginosa* han permitido elucidar aspectos claves sobre la biología de este patógeno. Uno de los hallazgos más interesantes es como la adquisición de genoma accesorio en esta bacteria es la principal causa de la generación constante de nuevas cepas. Esto aunado al hecho de que los bacteriófagos contribuyen a un alto porcentaje de dicho genoma accesorio permite confirmar la interacción constante que mantienen estos microorganismos en la naturaleza. Esto apoya la hipótesis de que los fagos son determinantes en la evolución de las poblaciones bacterianas y plantea la posibilidad de que podrían contribuir a la versatilidad ecológica de *P.aeruginosa* [18].

1.2 Los bacteriófagos

Los virus son la forma de vida más abundante del planeta [19] e infectan prácticamente todos los organismos, desde bacterias hasta mamíferos. Se trata de parásitos intracelulares estrictos ya que su desarrollo se lleva a cabo íntegramente en el interior de la célula hospedera, a expensas de su maquinaria biológica. Los bacteriófagos, también

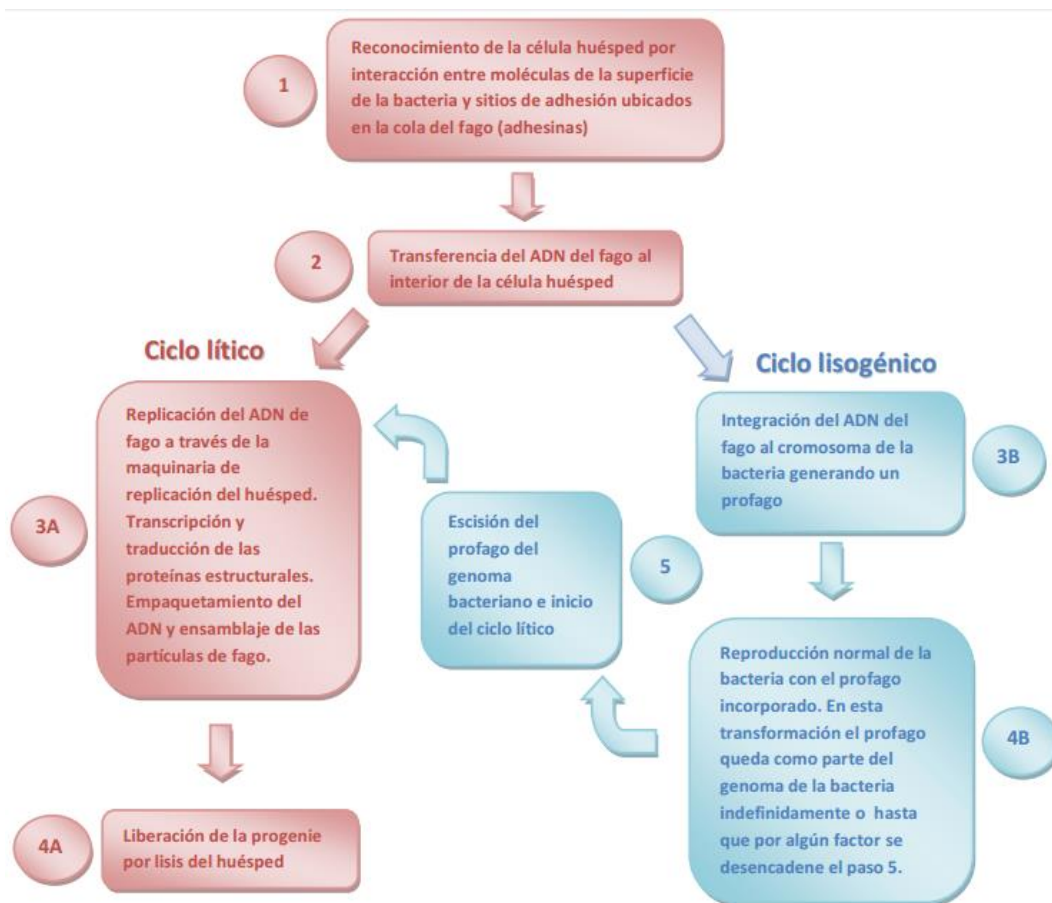
conocidos como fagos, son virus que infectan específicamente a bacterias. Los bacteriófagos son los entes biológicos más abundantes de la tierra, estimados en un total de 10^{31} en todo el planeta [20] lo cual sugiere que son los agentes biológicos más abundantes y la fuente de diversidad génica más grande [21-23], también juegan un rol determinante en el balance de los ecosistemas bacterianos considerándolos como los principales motores de la evolución bacteriana [18, 24, 25], los fagos han facilitado el desarrollo de la biología molecular resolviendo cuestiones fundamentales sobre los mecanismos de herencia, fenómenos de transferencia horizontal de genes y su regulación [26].

Los bacteriófagos son parásitos intracelulares obligados que se multiplican dentro de las bacterias haciendo uso de algunas o todas sus maquinarias biosintéticas. Tras la infección, el genoma viral altera drásticamente el metabolismo de la célula huésped para que ésta comience a sintetizar los componentes del fago. Los fagos se ensamblan a partir de un número pequeño de proteínas y son capaces de llevar a cabo múltiples funciones: encapsidar su genoma, abandonar la célula que infectan (fuera de las células los virus pueden sobrevivir en condiciones extremas), proteger el ácido nucleico de agentes externos, reconocer una célula hospedera, mediar la entrada al interior celular y, finalmente, liberar el ácido nucleico en el momento preciso para que la infección proceda [27]

La morfología de la cápside y las características del genoma son los principales criterios a considerar por el Comité Internacional de taxonomía de virus (ICTV) para la clasificación de bacteriófagos. Los fagos con cola, ADN de doble cadena (ADNdc) y genoma monopartita forman el grupo más grande y están clasificados en el orden *Caudovirales* al que pertenecen tres familias: *Myoviridae* (fagos con colas largas contráctiles como T4 y Mu), *Siphoviridae* (fagos con colas largas no contráctiles como T1 y λ) y *Podoviridae* (fagos con cola corta no contráctil como P22 y T7) [28, 29]

Los bacteriófagos también pueden clasificarse en dos grandes grupos en función del tipo de ciclo vital que presenten: fagos líticos o virulentos y temperados [30](Figura 1). Los fagos líticos emplean la maquinaria bacteriana para amplificar su genoma y producir nuevas partículas virales capaces de iniciar un nuevo ciclo de infección y su posterior

liberación mediante la lisis de la bacteria [31]. Por su parte, los fagos temperados o lisogénicos pueden seguir tanto la vía lítica como la vía lisogénica. Esta última se caracteriza porque el fago permanece en un estado de latencia (profago) en su ciclo infectivo, reprimiendo su expresión génica y en la mayoría de los casos, la posterior integración de su genoma en el cromosoma bacteriano [32] o bien, éste se puede mantener en forma de plásmido en el interior de la bacteria como es el caso del colifago P1 [33]. Cuando la bacteria con el profago es sometida a diversas condiciones de estrés (p. ej. Disminución de nutrientes o presencia de agentes mutagénicos), se activan determinados genes virales que provocan que el fago inicie su ciclo lítico, multiplicándose dentro de la bacteria y provocando finalmente su lisis [34].



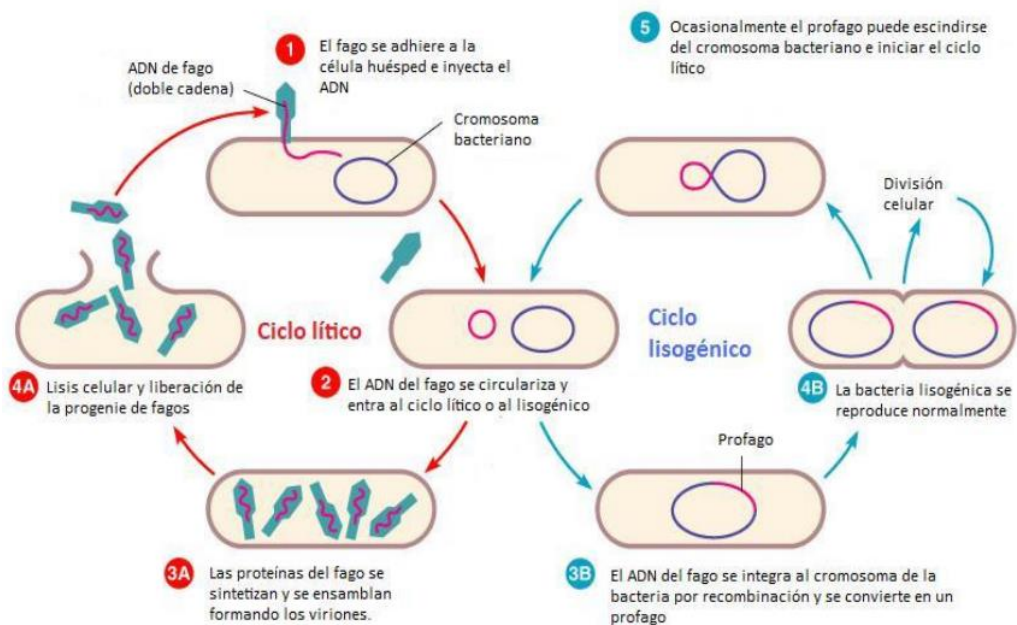


Figura 1. Esquema de los ciclos lítico y lisogénico (correspondiente al fago λ) explicados en el diagrama. Esta imagen fue obtenida del libro “Microbiology: an introduction” décima edición [35]

Bacterias que contienen un profago son conocidas como lisógenas. Cepas de este tipo presentan la propiedad de ser inmunes o resistentes a la infección por el mismo tipo de fago que albergan o por otros fagos emparentados con el fago temperado original [36]. Este ciclo de vida lisogénico puede mantenerse estable por miles de generaciones y los bacteriófagos pueden alterar el fenotipo de la bacteria hospedera mediante la expresión de genes que se encontraban reprimidos durante el curso normal de la infección en un proceso denominado como conversión lisogénica [18]. Un ejemplo muy estudiado es del gen asociado con *Vibrio cholerae* el cual codifica las toxinas que causan los síntomas del cólera [37]. Entre los fagos temperados mejor estudiados se encuentran λ , P1 y Mu, cada uno de ellos con características de desarrollo distintivas [38]

La formación de los bacteriófagos con cola es un proceso secuencial y unidireccional, que se resume en varias etapas, como se muestra en la Figura 2, el proceso consiste en: I.- Formación de una precabeza usando como componentes principales las proteínas de la cápside, el conector y la proteína de andamiaje. II.- Empaquetamiento del ADN en el interior de la precabeza usando la energía liberada de la hidrólisis de ATP. Un motor molecular se encarga de la translocación del ADN viral en el interior de la precabeza, y

este motor está formado en la mayoría de los bacteriófagos por tres componentes: el conector y dos subunidades de terminasa. III.- Maduración hacia una cápside poliédrica; un proceso que ocurre simultáneamente con el empaquetamiento del ADN. IV.- Unión de la cola a esta cápside madura y generación del virión [39]. Las cápsides son estructuras poliédricas muy estables, mayoritariamente icosaédricas, compuestas por múltiples copias de la misma proteína, llamada proteína mayoritaria de la cápside. Por lo tanto, las partículas infectivas serán el producto final de una ruta morfogénica compleja y bien regulada tanto a nivel genético como bioquímico [40].

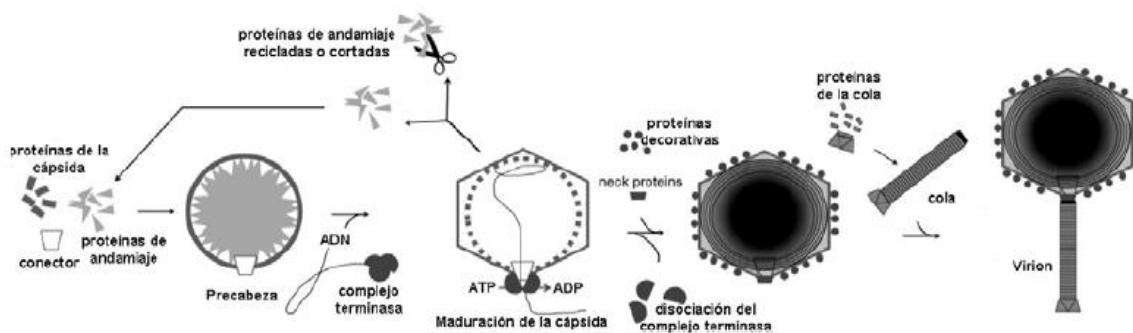


Figura 2. Ruta de ensamblaje genérica de los bacteriófagos del orden *Caudovirales*. Figura adaptada de [39].

En años recientes, el interés en el estudio de los bacteriófagos ha tenido un resurgimiento importante debido al reconocimiento de su diversidad genética [41], su importancia ecológica y evolutiva [42, 43], su participación constante en transferencia horizontal de genes [44] y a la reconsideración de su enorme potencial terapéutico y biotecnológico [45-47]

1.3 Fagos Mu.

El bacteriófago Mu, o fago Mu, es un bacteriófago temperado como el fago lambda λ , pertenece a la familia Myoviridae y el fago está compuesto de una cabeza icosaédrica, una cola contráctil, y seis fibras de la cola (Figura 3). Todos los fagos temperados conocidos emplean una de los tres diferentes sistemas para su ciclo lisogénico: integración/excisión de fago lambda, transposición de Mu, o el mecanismo de partición de plásmido del fago N₁₅. [48-50]. El fago Mu posee la propiedad inusual de replicación

mediante transposición [51]. Los elementos transponibles son secuencias de ADN que pueden moverse de una locación a otra como unidades génicas discretas en el genoma de la célula hospedera. Los transposones se encuentran en tanto procariontes como eucariontes y juegan un papel importante en la variación genética. [52, 53].



Figura 3. Viriones del bacteriófago Mu. Micrografía electrónica de viriones del fago de doble cadena Mu, el fago mutador. [54].

Éste fago fue nombrado Mu debido a que genera mutaciones cuando éste se integra al cromosoma de la célula hospedera [55]. Las mutaciones son producto del genoma de Mu el cuál puede ser insertado por dentro de los genes hospederos, por lo tanto, interrumpe las secuencias codificantes [56]. Por lo tanto, una célula infectada con Mu, muy probablemente obtendrá un fenotipo mutante. Mu es un fago muy útil en genética bacteriana porque puede ser usado fácilmente para generar bacterias mutantes [49].

El virión de Mu contiene aproximadamente 39 Kbp de DNA, pero solamente 37.2 kbp constituyen el actual genoma de Mu [57]. La región adicional de material genético es DNA del hospedero unido a los extremos del genoma de Mu, 50-150 pb al extremo izquierdo y 1-2Kbp al extremo derecho. Estas secuencias del hospedero representan ADN adyacente a la posición donde Mu fue insertado en el genoma de su hospedero anterior [58]. Cuando un virión Mu es formado, un fragmento de ADN que contiene el genoma de Mu lo suficientemente largo para rellenar la cápside es escindido del hospedero. El ADN es empaquetado hasta que la cápside esté totalmente ocupada por el ADN de doble

cadena (dcADN), sin embargo, la localización del extremo derecho donde el ADN es cortado varía de un virión a otro. Por esa razón como se observa en la figura del mapa genético de Mu, hay una secuencia variable de ADN hospedero en el extremo derecho del fago (a la derecha del sitio *attR*). Por lo tanto, cada virión que surge de una sola infección en una célula es genéticamente único teniendo diferentes regiones de flaqueo de ADN hospedero [59].

La replicación en Mu es completamente diferente a otros fagos de ADN de doble cadena (dcADN) debido al genoma de Mu el cual se replica como una molécula larga de ADN (Figura 4a). Mu al infectar una célula hospedera, el ADN es inyectado y protegido de restricciones provocadas por el hospedero mediante un sistema de modificación el cual modifica varios residuos de adenina por acetilación [49]. En contraste con lambda λ , la integración del ADN de Mu al genoma hospedero es un requerimiento esencial para el crecimiento del fago y desarrollo de las vías líticas y lisogénicas del mismo. La integración requiere de la actividad de la enzima transposasa, producto del gen *a* (Figura 4b). Un duplicado de 5 pares de bases de ADN hospedero es generado en el sitio diana donde el ADN de Mu es integrado [60]. Como se muestra en la figura 4b, ésta duplicación de ADN hospedero ocurre debido a los sitios cohesivos realizados en el punto del genoma donde Mu es insertado. Los segmentos de cadena sencilla son transformados a hebra de doble cadena como parte del proceso de integración de Mu. La duplicación de fragmentos cortos de DNA hospedero es un mecanismo típico de los elementos transponibles [60].

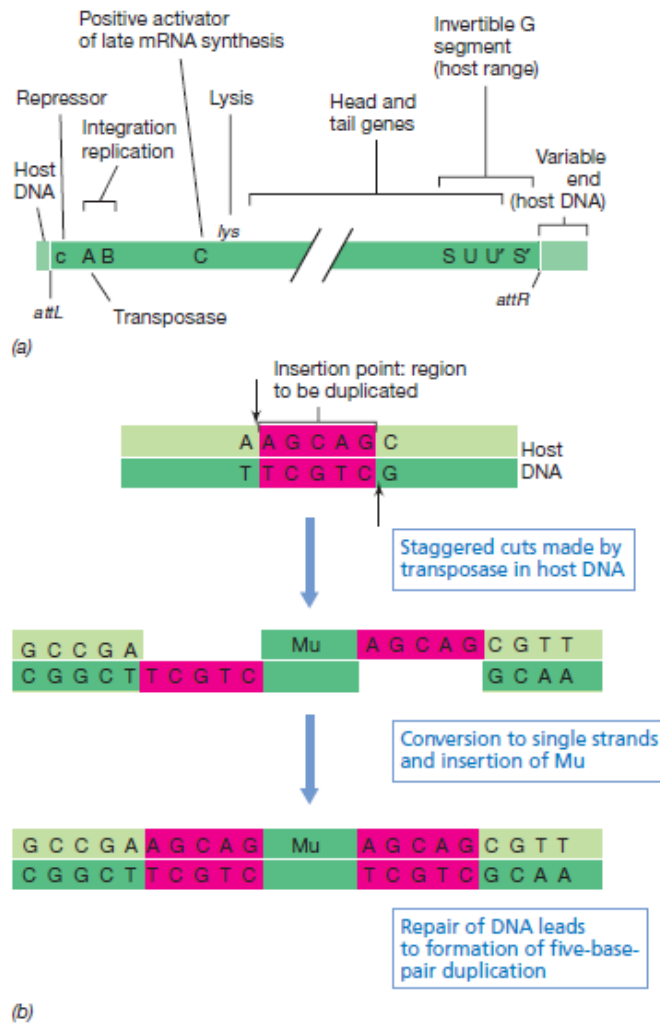


Figura 4. Bacteriófago Mu. A) Mapa genético del genoma de Mu. Nótese la diferencia entre el gen *c*, el cual codifica una proteína represora y el gen *C* que codifica para una proteína activadora. B) Integración de Mu al genoma hospedero, se muestra la generación de una duplicación del ADN del huésped de 5 pares de bases. [60]

Mu puede entrar en la ruta lítica si la acción del represor de Mu (el producto del gen *c*) se ve abatida o si el fago es inducido por una lisógena. En cualquier caso, el ADN de Mu es replicado por transposición repetida en múltiples sitios en el genoma del hospedero [61]. Inicialmente, solo los genes tempranos de Mu son expresados, sin embargo, si la proteína *C* es expresada (*C* es un activador positivo de la transcripción tardía), las proteínas de la cabeza y de la cola son sintetizadas. Eventualmente, la célula es lisada y viriones maduros son liberados. El estado lisogénico de Mu requiere la suficiente

acumulación de la proteína represora para prevenir la transcripción del ADN integrado de Mu [60].

Como esta tesis se centra en analizar la expresión y el papel que juega una proteína putativa de decoración en bacteriófagos Mu-like de *Pseudomonas aeruginosa*, analizaremos más en detalle, para el caso de los fagos temperados PaMx73 y H70, sus características morfológicas generales así como también su contexto genómico que compete a la codificación y análisis en secuencia del gen codificante para la proteína hipotética de decoración.

1.4 Fagos *Mu-like* de *Pseudomonas aeruginosa*: PaMx73 y H70.

En este proyecto se trabajó con los fagos Mu-like temperados de *Pseudomonas aeruginosa*, a los cuales caracterizaron y compararon su genoma. PaMx73 fue aislado de una muestra ambiental de agua [62], y H70 fue aislado de una cepa clínica. Ambos viriones comparten una morfología característica de la familia Siphoviridae, esto es, presentan cabezas isométricas (~54 nm en diámetro) y colas largas flexibles no contráctiles (Figura 5) Al comparar su secuencia genómica, se puede observar que ambos genomas son homólogos y presentan una marcada sintenia, esto es, comparten una distribución similar de sus genes homólogos. La secuencia genómica de PaMx73 posee 56 ORFs contenidos en un tamaño de 36, 570 pares de bases, por otro lado, H70 presenta 58 ORFs en 37, 362 pb [62, 63]. El porcentaje de GC en ambos genomas fue 64%, ligeramente más bajo que el 66% presente en la cepa hospedera de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 [64].

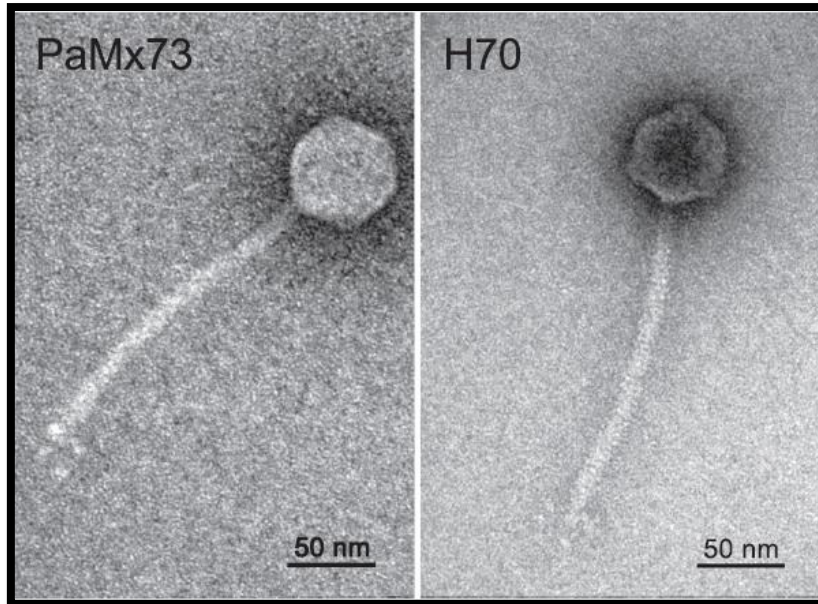


Figura 5. Micrografía de los viriones *Mu-like* PaMx73 y H70. Las partículas fágicas se muestran teñidas negativamente con acetato de uranilo 2% y visualizadas a una magnificación de 200, 000x [63].

1.5 El “pangenoma” de *Pseudomonas aeruginosa* y los fagos *Mu-like*.

Cuando comparamos genomas bacterianos para el análisis y estudio de la evolución del genoma en diferentes escalas de tiempo, el escenario que se presenta, para el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, es un marcado mosaicismos compuesto por: regiones génicas que albergan genes conservados entre diferentes cepas de *Pseudomonas* (región que se le denomina core genómico) y regiones que presentan un indeterminado número de genes variables (denominada región accesoria) localizados en regiones delimitadas en el cromosoma. La suma del core genómico y las regiones accesorias se denomina “pangenoma” [16].

Estudios comparativos de las secuencias genómicas de bacteriófagos con cola muestran una arquitectura de mosaico que ressemble a la mencionada arriba para *Pseudomonas*, esto probablemente surgió de extensas transferencias horizontales de genes y eventos no homólogos de recombinación genética de secuencias ancestrales

[65]. Curiosamente, los genes de algunos grupos de bacteriófagos están conformados por regiones sumamente conservadas y regiones variables [66, 67], parecido a la arquitectura vista en bacterias, lo que sugiere que los fagos pudieron haber surgido por un mecanismo evolutivo en donde los fagos adaptan su genoma accesorio en favor de la sobrevivencia de los mismos en un amplio rango de nichos ecológicos, lo cual representa una importante fuerza evolutiva que influencia la composición genómica tanto en fagos como en bacterias [16]. De acuerdo con la terminología para *Pseudomonas*, en bacteriófagos Mu-like, la región de genes conservados se denomina “core genómico” y el grupo de ORFs variables, el cual es diferente para cada fago, se denomina “genoma accesorio”. Se especula que los genes accesorios son adquiridos por transferencia horizontal incrementando la capacidad de supervivencia del fago por medio de mecanismos adaptativos a las condiciones particulares impuestas por el hospedero [63].

Al analizar el genoma accesorio de los fagos Mu-like, puede uno percatarse del grado de variabilidad que muestran los fagos entre sí, la comparación genómica muestra una amplia variación de ORFs de 34 hasta 100 codones que son o fago-específicos o son compartidos por un grupo fágico [63] (Tabla 1.)

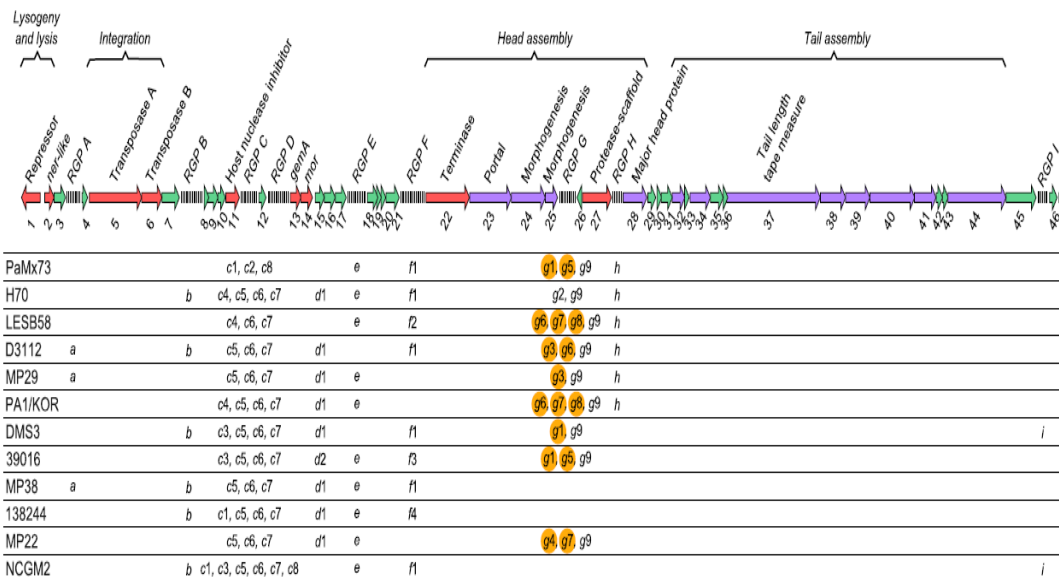


Tabla 1. Pangenoma de los fagos Mu-like. Representación del core genómico de los fagos Mu-like El core genómico es el conjunto de ORFs conservados representados por flechas de colores y enumerados del 1 al 47. El color rojo indica ORFs con función asignada, color verde indica función desconocida y color morado indica genes que codifican proteínas estructurales identificadas por espectrometría de masas en PaMx73. Las barras de color gris nombradas RGP A hasta I indican la posición en la que se encuentran los genes accesorios en el genoma denominada regiones de plasticidad genómica (Regions of Genomic Plasticity por sus siglas en inglés). Nótese la RGP H donde se encuentra alojado el gen *h* que es el ORF que codifica a la proteína putativa de decoración.

Como se mencionó antes, la relevancia del genoma accesorio tanto en fagos como bacterias, es la “plasticidad” que presentan estos genes accesorios y que permiten una mayor adecuación para los fagos y las bacterias a las condiciones impuestas por el medio en el que se encuentran. Un ejemplo muy interesante de genes accesorios que han adquirido interés en los últimos años en bacteriófagos son aquellos que codifican proteínas accesorias como es el caso de las proteínas decorativas o de cementación [65]. Estos genes se consideran como elementos accesorios debido a que se encuentran ausentes en genomas fágicos cercanamente emparentados y pueden conferir una ventaja adaptativa para los viriones bajo ciertas condiciones [33].

1.6 Proteínas de decoración.

Una clase de proteínas que componen la cabeza de los bacteriófagos y que usualmente se encuentran localizadas en la superficie de la cápside son las proteínas de decoración. Estas proteínas se unen (o decoran) la superficie exterior de la proteína mayoritaria de la cabeza posterior a su ensamblaje [33].

Se tiene reportado que las proteínas de decoración imparten una mayor estabilidad o fuerza estructural a la cápside, sin embargo, bajo ciertas condiciones estas proteínas son dispensables para el crecimiento fágico [68].

El fago T4, un fago de ADN de doble cadena perteneciente a la familia *Myoviridae*, posee dos proteínas accesorias, Soc con una masa molecular de 9-kDa y Hoc con una masa molecular de 40-kDa, ambas proteínas decoran la superficie de la cápside de T4 (Figura 7) [69]. Hoc y Soc son dispensables para la formación de la cápside y sólo se unen al virus una vez que la cápside ha sufrido una expansión en la última etapa de maduración de la cápside [70]. Estas moléculas Hoc (155 copias en la cápside) confieren

un efecto marginal en la estabilidad de la cápside. Sin embargo, las moléculas Soc (870 copias en la cápside) ayudan a estabilizar las cápsides en altas temperaturas y en condiciones extremas de pH [71-73]. La Figura 6 muestra el monitoreo de la unión de la proteína Soc en condiciones alcalinas de pH realizado a un grupo de fagos silvestres (Wild type – Wt) y a un grupo de fagos mutantes que carecen de los genes *soc* y *hoc* (*T4hoc*, *T4soc*, *T4soc hoc*). El efecto que juega Soc en la inactivación de los fagos mutantes y la resistencia que presentan los fagos silvestres en condiciones alcalinas a pH de 10.6 sugiere que es una proteína de decoración con función de estabilidad dispensable que le permite al fago T4 colonizar diversos nichos bajo ciertas condiciones.

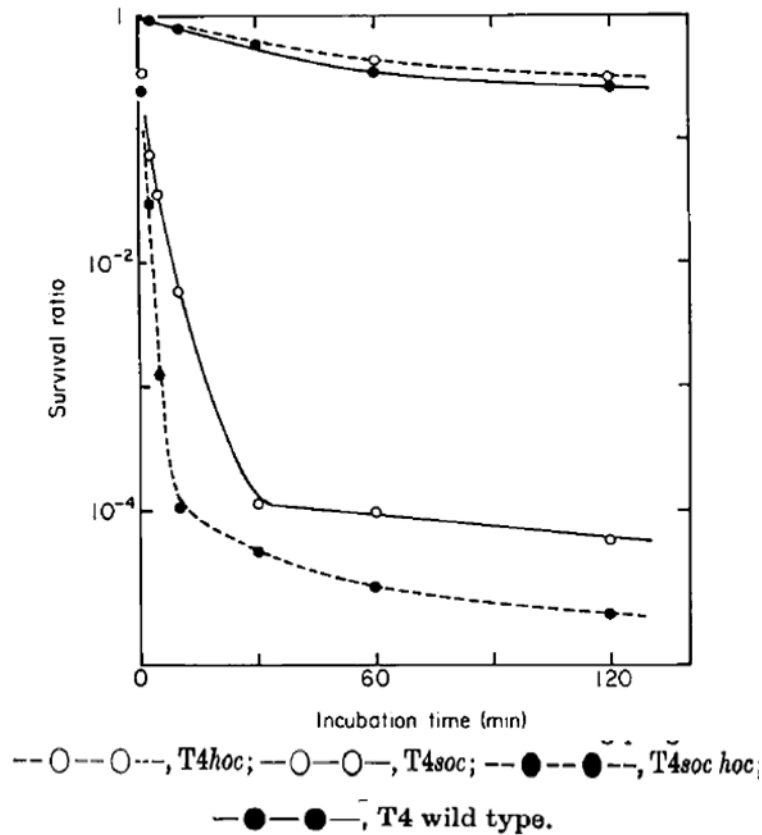


Figura 6. Lapso de tiempo de inactivación de fagos T4 a pH 10.6 Una suspensión de fagos purificados se incubaron en buffer 0.2 M-glicina/NaOH a pH 10.6 a 37°C. Los fagos sobrevivientes fueron plaqueados en cajas de *E.coli* para su cuantificación [70].

Para el bacteriófago L, fago temperado de doble cadena que infecta a *Salmonella entérica*, posee una proteína mayoritaria estructural de decoración con una masa molecular de aproximadamente 15 kDa que no tiene una proteína análoga en el fago más emparentado que es P22. (Figura 7A.) [74]. El número de moléculas presentes por virion L es de ~180 y éstas no se unen a cápsides inmaduras, solo a cápsides expandidas [68]. Una propiedad relevante de la proteína Dec es su capacidad de unirse y decorar la cápside del fago P22 estabilizando sus viriones en presencia de agentes quelantes como EDTA (Figura 7B), éste compuesto quelante de Mg^{2+} es conocido por desestabilizar muchos fagos de doble cadena [75], la decoración de las cápsides en P22 con la proteína Dec del fago L ocurre tomando en cuenta que la proteína mayor de la cabeza de L y P22 no son del todo idénticas, poseen un 99.1% de similitud a nivel de aminoácidos [68].

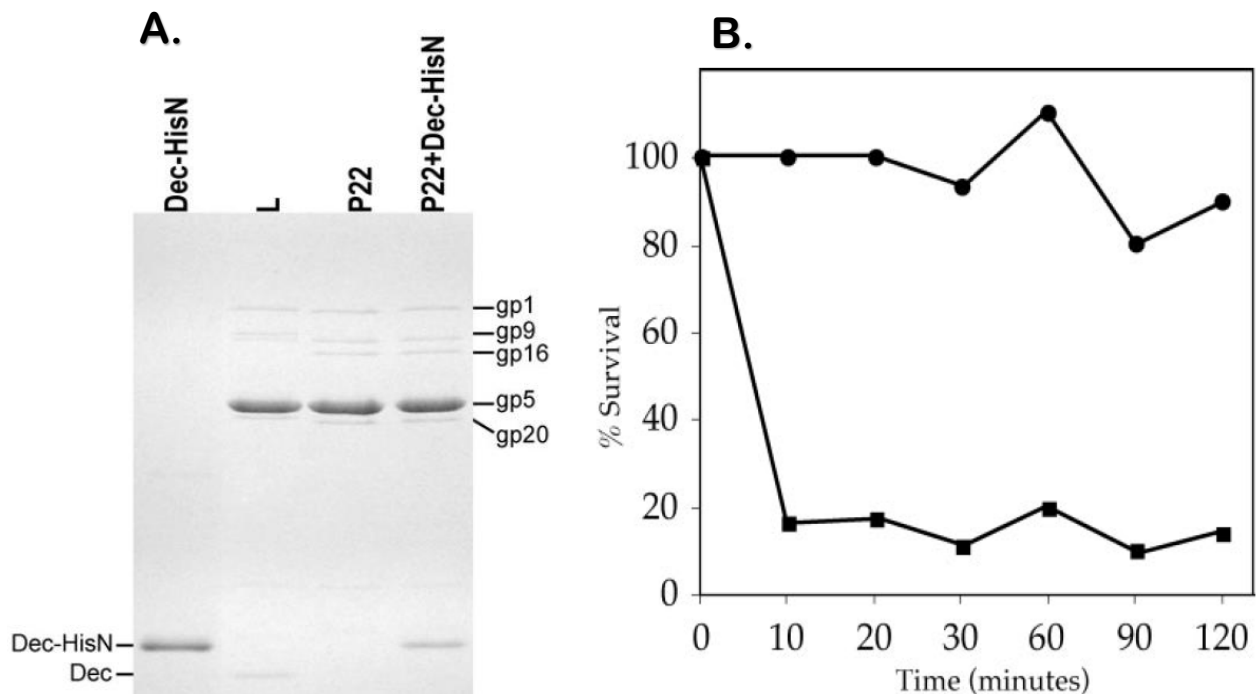


Figura 7. Dec se une al fago P22 y estabiliza sus cápsides **A.** Los fagos P22 y la proteína Dec (etiqueta de histidinas en el amino-terminal) fueron separados en un gel de poliacrilamida de 12.5%. El carril 4 muestra la unión de Dec a las cápsides de P22 **B.** Dec estabiliza a viriones P22 en presencia de EDTA 83 mM a 50°C, la unión de Dec con P22 (círculos) estabiliza dramáticamente los viriones incluso después de 120 min, los fagos sin proteína Dec (cuadrados) fueron destruidos en su totalidad (80%) por el tratamiento después de 10 min.

Basándose en el papel que juega la proteína Dec sobre las cápsides del fago L y P22 y su capacidad de unirse a la superficie de viriones y no a la procápside y tomando en cuenta que ésta proteína no es esencial para el ensamblaje de la cápside de L, éstos autores optaron por clasificar a Dec como una proteína de decoración. [68]

Uno de los fagos mejor estudiados en *Escherichia coli* es el fago lambda λ . Su mecanismo de empaquetamiento genético y ensamblaje de cápside han sido objeto de estudio recientemente debido a que proporcionan un modelo ideal que permite comprender el ensamblaje viral en virus de doble cadena dcADN [76]. Una de las proteínas que ha adquirido reciente interés en el estudio de expansión de cápside de λ y el empaquetamiento de ADN es la proteína decorativa gpD. Su proteína de decoración ha sido dilucidada con detalle desde su mecanismo de unión a la cápside, el efecto que ejerce sobre la misma y hasta su conformación estructural [77-79]. El fago λ pertenece al orden de los *Caudovirales*, familia *Siphoviridae*, posee una cabeza icosaédrica y su genoma es lineal y de doble cadena con una cola no contráctil [33]. En el fago λ ocurre un escenario en particular respecto al empaquetamiento de su genoma y la proteína decorativa gpD, se tiene reportado que la proteína gpD es esencial e indispensable para empaquetar el contenido genómico de 48.5 kbp del bacteriófago λ . [80]. A pesar que el fago λ requiere ~405 copias de la proteína gpD para empaquetar el genoma completo, fagos mutantes que presentan genomas cortos (que representan menos del 87% del total genómico de los ~48 kbb de fagos silvestres) son viriones viables, aunque requieren elevadas concentraciones de Mg^{2+} para que sean partículas viables debido a que las partículas fágicas presentan una importante sensibilidad hacia agentes quelantes tales como el EDTA [78, 80]. Los agentes quelantes remueven iones de magnesio Mg^{2+} los cuáles contrarrestan las cargas negativas de los fosfatos del DNA. Los fagos se inactivan debido a la remoción de estos iones de Mg^{2+} presuntamente debido a la disrupción de la cápside causada por la expansión del ADN [81]. Esta es evidencia directa del papel que juega gpD en el empaquetamiento del ADN durante el ensamblaje del fago, gpD es estrictamente requerida para el empaquetamiento total genómico de 48.5 kbp de λ previniendo un “sobreempaquetamiento” mediante una plasticidad limitada impartida por la acción de gpD sobre la cápside. [78].

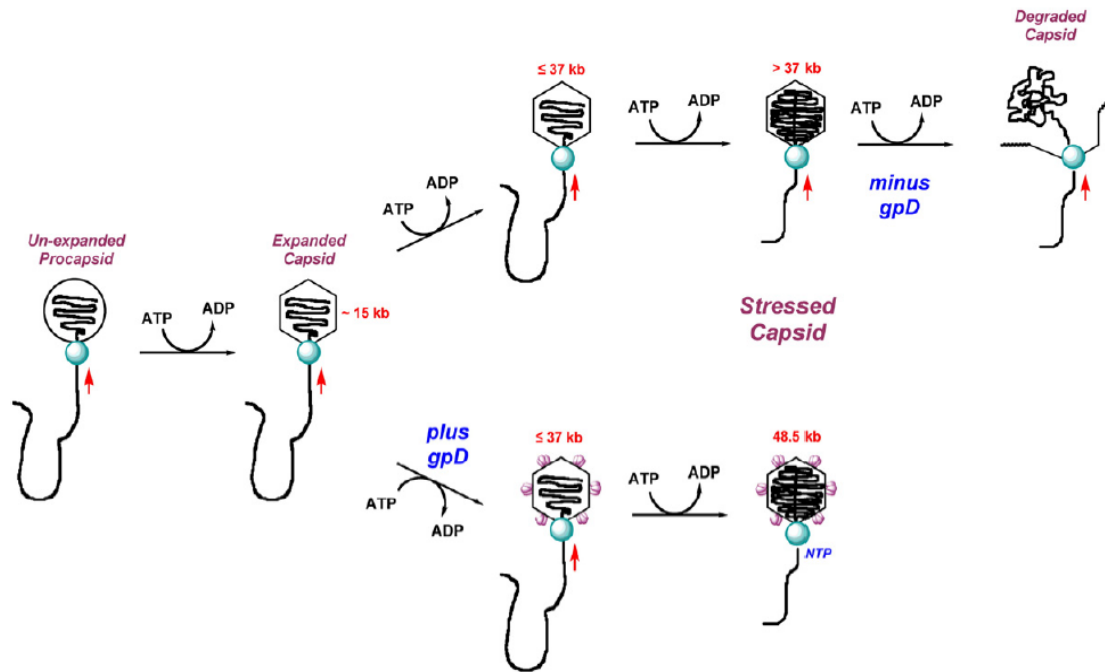


Figura 8. Esquema del proceso de expansión de la cápside y su subsecuente decoración por la proteína gpD. El empaquetamiento de los primeros 15 kb del ADN concatamérico de lambda inicia la expansión de la cápside. La cápside expandida puede albergar hasta 37 kb de ADN dúplex; sin embargo, adicional empaquetamiento de ADN estresa a la cápside, resultando en la ruptura de la cabeza del fago cuando gpD está ausente (ruta superior). Cuando gpD se une a la cápside expandida (ruta inferior), la proteína provee la estabilidad estructural suficiente para que el genoma completo de 48.5 kbp pueda ser empaquetado y se acomode en la cápside. [78].

El mecanismo de unión de gpD a la cápside comienza cuando la procápside del fago lambda sufre una expansión subsecuente al inicio del empaquetamiento del ADN y su translocación al interior de la cabeza (Figura 8). Un re-arreglo conformacional de la cápside vírica durante el empaquetamiento del genoma es una característica común en las vías de desarrollo de muchos fagos de ADN de doble cadena. En diversos casos, incluyendo al bacteriófago λ , HK97 y P22, las cápsides sufren una etapa de transición de procápside a expansión de cápside [82-84]. Las cápsides expandidas son frágiles y requieren estabilización la cuál es proporcionada por la proteína de 11.4 kDa gpD en el fago lambda, posterior al empaquetamiento de ~15 kb de ADN viral, la expansión de la cápside expone un área de superficie hidrofóbica a la cual la proteína de cementación gpD se adhiere [76, 79]. La cápside expandida sufre un arreglo estructural obteniendo un

diámetro angular icosaédrico de ~60 nm y 2 nm de grosor y con los sitios hidrofóbicos expuestos para la unión de gpD, cabe mencionar que gpD es monómero en solución y no se une a la procápside, sin embargo, la proteína se une como trímero a la cápside expandida y esta interacción de la proteína gpD con la proteína mayor de la cabeza gpE estabiliza la cápside expandida contrarrestando la enorme presión interna que se genera al empaquetar el genoma completo de lambda de 48.5 kbp de longitud [78].

Para los fagos Mu-like PaMx73 y H70 utilizados en el presente trabajo, [63] proporcionaron evidencias respecto a una región accesoria presente en ambos genomas fágicos, la región de plasticidad genómica H (sus siglas en inglés RGP-H) en la cual solo un ORF se encuentra presente en dicha región denominado ORF *h*. Mediante un análisis de espectrometría de masas y haciendo uso de la plataforma I-TASSER, se determinó la posible estructura tridimensional que mostraba una correspondencia con la estructura de la proteína gpD del fago lambda y una masa molecular de ~13.8 kDa (Fig 10). A pesar que la proteína *h* y gpD no presentan similitud en secuencia, sus genes son sinténicos; se encuentran localizados entre genes que codifican a una proteína de andamiaje y a la proteína mayoritaria de la cabeza en sus genomas correspondientes [81, 85]. Otra evidencia importante respecto a la proteína *h* es que comparten tamaño de masa molecular con otras proteínas de decoración como es el caso de Soc del fago T4, la proteína Dec del fago L y gpD del fago lambda, éstas proteínas presentan un tamaño similar dentro de un intervalo de ~9-14 kDa. [68, 69, 78]. Basándonos en las evidencias descritas arriba, se sugiere que la proteína *h* en los fagos Mu-like PaMx73 y H70 es probablemente una nueva proteína accesoria de decoración en estos fagos de *Pseudomonas aeruginosa* aunque se requiere de información experimental adicional que permita caracterizar y validar esta suposición.

2. Hipótesis

El ORF *h* en el genoma de los fagos Mu-like PaMx73 y H70 de *Pseudomonas aeruginosa* codifica una nueva clase de proteína de decoración que no ha sido reportada previamente. La clonación de dicho ORF en un plásmido de expresión en *P. aeruginosa* permitirá la caracterización experimental de la proteína y la determinación de su función en la biología de los fagos que la portan.

3. Justificación

Con base en la evidencia obtenida hasta el momento, el gen *h* localizado en el genoma accesorio de un grupo de fagos Mu-like de *P. aeruginosa* posee una función putativa de decoración de cápside que podría conferir una ventaja adaptativa a los fagos que la portan bajo diversas condiciones de estrés. Debido a que la determinación de dicha función requiere de la caracterización experimental de la proteína codificada en el gen *h*, en este trabajo se propone clonar el gen en cuestión en un plásmido que permita su expresión en células de las bacterias *E.coli* y *P. aeruginosa*. La obtención de dicha construcción es un paso esencial hacia el diseño de experimentos que permitan la caracterización de la proteína fágica de estudio. Por lo tanto, los resultados del presente estudio son relevantes en la asignación funcional de genes accesorios fágicos lo cual permitirá develar conocimiento sobre la variabilidad genética de los mismos y el papel que juegan dichos elementos accesorios en la adaptación fágica a una amplia gama de ambientes y condiciones adversas.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Generar clones que permitan evaluar la expresividad del ORF *h* en cepas de *E.coli* y *Pseudomonas aeruginosa* para la caracterización de la proteína de decoración.

4.2 Objetivos particulares

- Propagar los bacteriófagos PaMx73 y H70 en la cepa PA14 de *P. aeruginosa*. Purificar los fagos propagados mediante gradientes discontinuos de Cloruro de Cesio y extraer el DNA de los fagos purificados.
- Determinar la expresión del plásmido construido pUCP24_L3_ih_70 en células de *P. aeruginosa* cepa PA14
- Aislar lisógenas de los fagos Mu-like JBD30 y 39016 a partir de células de la cepa PA14 transformada con el plásmido construido para poder evaluar un fenotipo de estabilidad de cápside en viriones en presencia de la proteína

5. MATERIALES Y MÉTODOS

- 5.1 Cepas bacterianas

La cepa de *P. aeruginosa* PA14 fue proporcionada por el Dr. George O'toole de Geisel School of Medicine, Dartmouth College, E.U.A. También se usaron las cepas de *E. coli* DH5 α .

- 5.2 Bacteriófagos

El fago H70 fue aislado de una cepa clínica [63] y PaMx73 proviene de una muestra de agua [62]. Ambos pertenecen a la colección del Laboratorio 3 del Dpto. de Genética y Biología Molecular del Cinvestav, Unidad Zacatenco.

- 5.3 Plásmidos

El plásmido ocupado en este trabajo es una versión modificada del vector pUCP24, denominado pUCP24_L3, éste vector presenta un sitio de corte *EcoRI* antes del codón de inicio de *lacZα*, esto con la finalidad de evitar generar fragmentos fusionados y así poder clonar cualquier gen sin ningún fragmento adicional.

- 5.4 Oligonucleótidos

En la Tabla 2 se muestra el nombre de cada oligo utilizado con su respectiva secuencia.

PRIMERS	Longitud	Tm°	GC%	Producto en pb.
Forward_ <i>h</i> 5-3' EcoR1 GAATTCATGACTGCCCTGACCACCG	25 nt	61.96	63.16	435
Reverse_ <i>h</i> 4x_HisTag 5-3' HindIII AAGCTTTTAA <u>GTGTTGTGACGGTGGTTGTG</u> TTCCACCCACACGCCG	46 nt	60.38	57.89	
SMC Forward pUCP24 5-3' GGCGATTAAGTTGGGTAACG	20 nt	59.46	50%	212
SMC Reverse pUCP24 5-3' GGCTTTACACTTTATGCTTCC	21 nt	57.70	42%	
RGP-B Forward GATACCTGACCCGCAACGG	19 nt	65.0	63%	224→PaMx73
RGP-B Reverse AGATGCCGATGGGGATCAGT	20 nt	64.3	55%	920→H70
RGP-H Forward GACCACCGACCGCAACA	17 nt	65.2	65%	387
RGP-H Reverse TATTCCACCCACACGCCGTC	20 nt	66.2	60%	

Tabla 2. Oligos ocupados para la clonación, tipificación y secuenciación del ORF *h*. En rojo se muestran las secuencias palindrómicas añadidas de los sitios de restricción *EcoRI* y *HindIII* del set de primers que se utilizaron para clonar el ORF *h*. La secuencia subrayada en azul corresponde a la etiqueta de cuatro histidinas intercaladas. Los primers externos denominados RGP B y los internos denominados RGP H hibridan en secuencias aledañas a las regiones de plasticidad genómica (RGPs).

- 5.5 Tapices bacterianos

Se inocularon 3ml de medio LB líquido con una colonia de la cepa bacteriana y se incubó en agitación continua (200 rpm) por toda la noche a 37 °C.

Posteriormente, en un tubo de ensayo estéril se adicionaron 300µl del cultivo bacteriano y 3 ml de medio TΦ suave previamente derretido. Se mezcló en vórtex y se vertió sobre una caja petri preparada con medio TΦ sólido para formar un tapiz bacteriano. Se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubó a 37 °C.

- 5.6 Obtención del título de fagos

Se hicieron diluciones de un stock de fagos empezando con una dilución 1:100 (factor de dilución 10²) de la siguiente manera: 990 µl de medio TMG más 10 µl del stock de fago. Después se siguieron con los factores de dilución de 10⁴, 10⁶ y 10⁸. Se gotearon 5 µl de cada una de las diluciones sobre un tapiz bacteriano, se dejaron secar y se incubó toda la noche a 37°C. Se determinó el título con la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{\text{No. de placas}}{\text{Vol. goteado en ml}} \right) \times [\text{Inverso de la última dilución con placas}] = \text{ufp/ml en el lisado}$$

Donde: ufp = unidades formadoras de placas

- 5.7 Preparación de stocks de fagos

A partir de un *stock* de fagos se obtuvieron placas aisladas goteando diluciones seriales en un tapiz de la cepa en la se puede propagar el fago deseado. En caso de H70 y PaMx73 se usó la cepa PA14. Se tomó una placa con la punta de un palillo estéril y se estrió una línea en medio de una caja Petri con TΦ. Se hizo un tapiz bacteriano sobre esta caja cuidando que se distribuyera bien el fago para purificarlo. La caja se dejó incubando toda la noche a 37°C. Se dieron tres pases más del fago. Con una pipeta Pasteur, se tomaron 35 placas del tapiz con fago y se colocaron en un tubo EPPENDORF con 1 ml de medio TMG. El tubo EPPENDORF se puso en movimiento constante durante dos horas a 4°C. Luego, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se

recuperó el sobrenadante. Finalmente se hicieron diluciones para obtener el título del *stock* y se guardó a 4°C.

- **5.8 Preparación de lisados fágicos por placa confluyente**

En un tubo Eppendorf se agregó 1 ml de medio SM y se colocaron 25 placas líticas del fago. El tubo se mantuvo en agitación continua a 4°C durante la noche. Posteriormente se adicionaron 100 µl de cloroformo y se agitó por 10 min, se centrifugó a 10 500 g por 10 min y se recuperó el sobrenadante que contiene a los fagos. Se tomaron 70 µl del sobrenadante y se mezclaron con 300 µl de un cultivo bacteriano de toda la noche para formar un tapiz bacteriano. Se incubó a 37°C por toda la noche y con un espátula se raspo el tapiz bacteriano y se colocó en un tubo falcón, se agregaron 25 ml de medio LB y se mantuvo en agitación a 4°C por 2 hrs. Finalmente, se centrifugó a 10 509 g por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se almaceno a 4°C.

- **5.9 Concentración de fagos por polietilenglicol**

A 25 ml de lisado fagico con un título mínimo de 1×10^{10} se le agregó DNAsa y RNAsa a una concentración final de 1µg/ml y se incubó a 37°C/30 min. Posteriormente se adicionó Polietilenglicol 8000 (PEG-8000) y Cloruro de Sodio (NaCl) a una concentración final del 16% y 1M respectivamente. Se incubó en hielo durante toda la noche y se centrifugó a 10,509 g por 30 min. Se decantó el sobrenadante y la pastilla de fago se resuspendió en 1ml de medio SM. Se agregó un volumen de cloroformo, se agitó en vortex y se centrifugó a 8,944 g por 10 min para eliminar el PEG-8000. Se tomó la fase acuosa y se almacenó a 4°C.

- **5.10 Purificación de fagos por gradientes discontinuos de Cloruro de Cesio**

El gradiente discontinuo se realizó utilizando cuatro soluciones de cloruro de cesio con una densidad de 1.7, 1.5, 1.3 y 1.08. La muestra del fago que se precipito con PEG se diluyó con 1 volumen de la solución con densidad de 1.08 y se colocó en la parte superior del gradiente. Una vez preparado el gradiente se centrifugó a 22,000 rpm durante 2 hrs

30 min a 4°C utilizando tubos ultra-clear de Beckman de 12.5 ml y una ultracentrífuga Optima XL-100K de Beckman con el rotor SW40Ti. Posteriormente, se extrajo la banda del fago utilizando una jeringa con aguja de 25G. La banda del fago se dializó con solución de diálisis para eliminar el exceso de sales.

- **5.11 Construcción de lisógenas**

Para construir la lisógena PA14_ih_70 (39016) se hicieron diluciones de un stock de fagos con el fin de obtener placas aisladas en un tapiz bacteriano. En el centro de cada placa se observó crecimiento bacteriano. Con un asa de siembra se tomó con cuidado dicho centro y se estrió en una caja Petri con LB. Se dieron tres pases a las colonias lisógenas candidatas. Después se corroboró que fueran lisógenas, esto es, que liberen fagos y que no permitan una segunda infección por el mismo fago (inmunidad).

a) Liberación de fago. Se puso un cultivo líquido de toda la noche en medio LB (ver ANEXO 1) de la colonia candidata a 37°C con movimiento. Después, 1 ml del cultivo se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se gotearon 5 µl sobre un tapiz de la cepa parental PA14. Se incubó toda la noche a 37°C.

b) Inmunidad. Con el mismo cultivo de toda la noche de la colonia candidata, se hizo un tapiz y se gotearon diluciones del *stock* de fago original y del sobrenadante. Se incubó toda la noche a 37°C.

- **5.12 Extracción de DNA fágico**

A la muestra de fago dializada se le agregó un volumen equivalente de fenolcloroformo, se mezcló con vórtex y se centrifugo a 5,724 g por 5 min. Se tomó la fase acuosa y se agregó un volumen de cloroformo, se mezcló con ayuda del vórtex y se centrifugó a 5,724 g por 5 min. Se tomó la fase acuosa y se adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto para precipitar el ADN. Se centrifugó a 17,530 g por 30 min para empastillar el ADN. Se lavó con etanol al 70% y se centrifugo a 8,944 g por 10 min. Se

decantó el sobrenadante y se secó a baja temperatura. Finalmente se resuspendió en 20 µl de agua inyectable estéril y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

- **5.13 Extracción de plásmido**

Se utilizó el kit de extracción Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega. A partir de un cultivo de toda la noche de 5 ml, se empastillaron las células en una microcentrifuga a 10, 000 rpm por 5. Posteriormente se siguieron las indicaciones del kit para el tratamiento y purificación de la muestra. Finalmente se transfirió la columna del kit a un tubo EPPENDORF de 1.5 ml. Se adicionaron 100 µl de agua libre de nucleasas a la columna y se centrifugó a 14, 000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y el tubo se almacenó a -20° C hasta su posterior uso.

- **5.14 Preparación de células electrocompetentes de *P. aeruginosa*.**

Se utilizó el método de preparación de acuerdo con Choi, Kumer, Schweizer (2006), se inoculó un cultivo de la cepa PA14 en 6 ml de LB durante toda la noche a 37° C con agitación a 210 rpm. Al día siguiente se empastillaron las células en una microcentrifuga a 10, 000 rpm durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Se hicieron 4 lavados del pellet obtenido utilizando 1 ml de sacarosa 300 mM y centrifugando a 10, 000 rpm durante 1 minuto. Finalmente se resuspendieron las células en 100 µl de sacarosa 300 mM formando alícuotas que se almacenaron a -70° C durante 2 horas para su posterior electroporación.

- **5.15 Preparación de células quimiocompetentes de *E.coli* – DH5α alpha**

Las células competentes fueron preparadas utilizando el método de CaCl₂ basado en [86, 87]. En 5 mL de LB líquido se inoculó una colonia perteneciente a la cepa de *E.coli* DH5α y se dejó crecer durante 12-16 horas con agitación vigorosa a 37° C. Posteriormente se inoculó 5 mL del cultivo en 500 mL de medio LB líquido para su crecimiento a 37° C con agitación. Se realizaron mediciones de la OD₆₀₀ del cultivo cada 10 minutos posterior a 1 hora de crecimiento hasta alcanzar la densidad óptica de 0,35-0.45. Se transfirieron las células a tubos cónicos de 50 mL y se dejaron incubar en hielo

por 20 min. Las células se centrifugaron a 4° C durante 10 min. a x 3,000 g, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en 30 mL de CaCl₂ 0.1 M frío y se incubaron en hielo por 30 min. Se centrifugaron las células nuevamente a 4° C durante 10 min. a x 3,000 g, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 30 mL de CaCl₂ 0.1 M frío incubando las células por 20 minutos en hielo. Se centrifugaron una vez más a x 2,000 g por 15 minutos a 4° C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 30 mL de CaCl₂ 85 mM/15% glicerol frío, se centrifugó a x 1,000 g por 15 minutos a 4° C, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 2 mL de CaCl₂ 85 mM/15% glicerol frío. Se transfirieron 140µL en tubos EPPENDORF de 1.5 mL para formar 13 alícuotas que se congelaron usando nitrógeno líquido. Las alícuotas se almacenaron a -70° C.

- **5.16 Electroporación en *P. aeruginosa***

Se descongelaron las alícuotas guardadas a – 70° C después de 2 horas de reposo y se mezclaron con distintas cantidades de DNA plasmídico (1.0, 1.5 y 2.0 ng) para asegurar una mejor eficiencia de transformación. La muestra se transfirió a una celda de 1 mm de BioRad y se dejó incubando en hielo durante 30 minutos. Posterior al tiempo de reposo en hielo, la cubeta se colocó en el electroporador Gene Pulser de Biorad y estableciendo los parámetros de 2.2 kV, resistencia de 200 Ω y 25 µF de capacitancia, se procedió a dar el pulso. Inmediatamente seguido del pulso, se agregó 1 ml de LB previamente calentado para recuperar las células de la cubeta y depositarlas en un nuevo EPPENDORF de 1.5 ml. Las células se dejaron en recuperación por 2 horas a 37° C con agitación de 300 rpm. Al finalizar el tiempo de recuperación, las células se empastillaron a 8,000 rpm por 5 minutos y se resuspendieron en 100 µl de LB para su posterior plaqueo en cajas de LB con Gentamicina a una concentración de 50 µg/mL dejando las cajas incubando a 37° C durante toda la noche.

- **5.17 Transformación química en *E.coli***

Se puso a descongelar una alícuota de 100 µl de células DH5α quimiocompetentes previamente guardadas a -70° C, la alícuota se mezcló con 5 µl de reacción de ligación o 1 µl (20-80 ng) de plásmido. La reacción se incubó en hielo durante 30 min. Inmediatamente se le aplicó un choque térmico a las células a 42° C durante 5 minutos,

nuevamente se incubaron en hielo por 3 minutos. Posteriormente se agregó 1 ml de medio LB precalentado y las células se dejaron en recuperación durante 1 hora a 37° C con agitación. Se empastillaron las células a 10, 000 rpm durante 3 minutos, se resuspendieron las células en 100 µl de LB y se plaquearon en cajas de LB con el antibiótico correspondiente.

- **5.18 Geles de agarosa y electroforesis.**

La preparación de geles de agarosa se realizó a una concentración de 1%. En una balanza analítica se pesó 1 g de agarosa de bajo punto de fusión de Biorad. La agarosa se disolvió en 100 ml de buffer TAE 1X y se derritió por 3 minutos. Se vertió en un molde de electroforesis y se colocaron los peines para dejar solidificar por completo el gel. Se colocó el molde con el gel en una cámara de electroforesis de Biorad y se vertió en la cámara buffer de corrida TAE 1X y se programó la corrida electroforética a 90-100V durante 1 hora. %. Como marcador de peso molecular se utilizó Long Range DNA Ladder de Jena Bioscience.

- **5.19 Purificación de bandas de gel de agarosa**

Para la purificación de bandas de agarosa se utilizó el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega. Una vez identificada la banda de interés en el gel, con un bisturí se escindió la banda y se pesó en una balanza analítica. A partir de este paso se siguieron las recomendaciones establecidas por el kit para la purificación y recuperación del material genético. Finalmente, la columna del kit que contiene la banda purificada se colocó en un EPPENDORF nuevo agregando 100 µl de agua libre de nucleasas previamente calentada a 55° C y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14, 000 rpm durante 1 minuto. La muestra purificada se guardó a -20° C hasta su posterior uso.

- **5.20 Clonación del ORF h mediante PCR.**

Para facilitar la clonación del gen *h*, se realizó una subclonación del ORF *h* utilizando el vector de pJET1.2/blunt del kit CloneJET PCR Cloning de ThermoScientific. Como plantilla para la reacción de PCR se utilizó el ADN bacteriano de la lisógena PA14/H70 (dentro de su genoma bacteriano se encuentra el genoma fágico del bacteriófago H70),

se emplearon los cebadores diseñados flanqueando el ORF *h*; para el primer *forward*: 5'-gaattcATGACTGCCCTGACCACCG (con el sitio de corte *EcoRI* en minúsculas), para el primer *reverse*: 5'- aagcttTTAgtgtttgtgacggtggttgtgTTCCACCCACACGCCG (con el sitio de corte *HindIII* en minúsculas y etiqueta de 4 histidinas intercaladas en subrayado). La reacción de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones:

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad</u>
Buffer High Fidelity 5x	<u>2µl</u>
dNTPs 10 µM	<u>0.25 µl</u>
ORF_h_Forward	<u>0.25 µl</u>
ORF_h_Reverse_4His	<u>0.25 µl</u>
ADN PA14/H70_h	<u>1 µl</u>
Enzima Phusion High Fidelity DNA Polymerase (2 U/µl)	<u>0.2 µl</u>
Agua libre de nucleasas	<u>Para 10 µl</u>

Para el programa utilizado en el termociclador se ocuparon los siguientes parámetros: Desnaturalización inicial a 96° C por 10 minutos, Desnaturalización a 96° C por 30 segundos, Alineamiento a 60° C por 30 segundos, Extensión a 72° C por 1 minuto, Extensión final a 72° C por 10 minutos, Holding a 4° C por tiempo indefinido ∞.

- **5.21 Ligación en pJET1.2/Blunt – pUCP24 L-3**

Tomando en cuenta las instrucciones del kit pJET1.2/Blunt, se prosiguió a continuar con la reacción de ligación usando los amplicones obtenidos de la reacción de PCR. La ligación se realizó bajo las siguientes condiciones:

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad</u>
2x Buffer	<u>5µl</u>
Producto de PCR No Purificado	<u>0.5 µl</u>
Plásmido vector pJET1.2/Blunt (50 ng/µl)	<u>0.5 µl</u>
Ligasa T4	<u>0.5 µl</u>
Agua libre de nucleasas	<u>Para 10 µl</u>

Se mezcló la reacción y la ligación se incubó en un ThermoStat a 22° C por 5 minutos para su posterior transformación en células de E.coli DH5α usando los siguientes volúmenes: A una alícuota de células quimiocompetentes DH5α de 100 µl se añadió 20 µl de la reacción de ligación obtenida. Posterior a la transformación, se plaquearon las células en cajas de LB con Ampicilina (el plásmido pJET confiere resistencia al antibiótico Ampicilina) a una concentración de 100 µg/ml. Al día siguiente a las colonias candidatas, producto de la transformación, se les realizó un pase de siembra a una nueva caja con Ampicilina (100 µg/ml) para asegurar la propagación de células transformantes que si contienen al plásmido y no se seleccionen colonias falsamente resistentes al antibiótico (colonias satélites).

Para la reacción de ligación en pUCP24 L-3 se usaron las concentraciones recomendadas de vector:inserto siendo éstas de una proporción molar 1:3 respectivamente aplicando la sig. Fórmula

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{kb tamaño de inserto}}{\text{kb tamaño del vector}} \times \text{proporción molar} = \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} = \text{ng de inserto}$$

Para determinar la concentración necesaria de inserto (previamente digerido con EcoR1/HindIII) para una proporción 1:3 de 100 ng de pUCP24 L-3 (restringido con EcoR1/HindIII):

$$\frac{100 \text{ ng de pUCP24 L-3} \times 0.43 \text{ kb de inserto}}{4 \text{ kb tamaño pUCP24 L-3}} \times \text{proporción molar} \frac{3 \text{ inserto}}{1 \text{ vector}} = 32.2 \text{ ng de inserto}$$

La ligación se realizó con la enzima T4 Ligasa de Thermo Scientific bajo las siguientes condiciones:

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad</u>
Buffer 10 x	<u>2 µl</u>
Vector	<u>100 ng</u>
Inserto	<u>32.2 ng</u>
Ligasa T4	<u>1 µl</u>
Agua libre de nucleasas	<u>Para 20 µl</u>

Se incubó la reacción en ThermoStat a 16° C durante 16 horas.

Posteriormente se inactivo la ligasa mediante incubación a 65° C por 10 minutos, se utilizaron 5 µl del producto de ligación (20 µl de producto en caso de ligación en pJET) para transformar químicamente a *E.coli* DH5α. Las células recuperadas se plaquearon en cajas de LB con el antibiótico de selección (ampicilina [15 µg/ml] para el caso de pJET1.2/Blunt y gentamicina [50 µg/ml] para el caso de pUCP24 L-3). Se realizó un tamizaje de candidatas mediante PCR y se extrajo el plásmido a la colonia que tuviera el inserto.

- **5.22 PCR de colonia – Tamizaje de candidatos**

Se tomó una colonia candidata aislada usando un asa bacteriológica, el contenido se depositó en un microtubo EPPENDORF con 20 µl de agua estéril, posteriormente el tubo se sometió a un choque térmico a una temperatura de 95° C por 5 minutos para lisar a las células y liberar su DNA, se les dio un spin en una microcentrifuga para precipitar el

debris y el sobrenadante se ocupó para la reacción de PCR bajo las siguientes condiciones

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad</u>
GoTaq Green Master Mix	<u>5 μl</u>
ORF_h_Forward	<u>0.25 μl</u>
ORF_h_Reverse_4His	<u>0.25 μl</u>
ADN de colonia candidata	<u>3 μl</u>
Agua libre de nucleasas	<u>Para 10 μl</u>

Para el programa utilizado en el termociclador se ocuparon los siguientes parámetros: Desnaturalización inicial a 96° C por 10 minutos, Desnaturalización a 96° C por 30 segundos, Alineamiento a 60° C por 30 segundos, Extensión a 72° C por 1 minuto, Extensión final a 72° C por 10 minutos, Holding a 4° C por tiempo indefinido ∞ .

- 5.23 Ensayos de restricción

Se necesitaba verificar la integridad de los sitios de restricción de la secuencia clonada en pJET para su posterior clonación en pUCP24 L-3 por lo tanto se realizaron ensayos de restricción utilizando 500 ng de ADN y 2 unidades de enzima *EcoRI* y *HindIII* de la marca TaKaRa en un volumen final de 20 μ l.

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad (Vector)</u>	<u>Cantidad (producto PCR)</u>
Buffer M 1X TaKaRa	<u>2 μl</u>	<u>2 μl</u>
EcoR1 TaKaRa HF	<u>1 μl</u>	<u>1 μl</u>
HindIII TaKaRa HF	<u>1 μl</u>	<u>1 μl</u>
ADN	<u>2.5 μg</u>	<u>2.5 μg</u>
Agua libre de nucleasas	<u>Para 20 μl</u>	<u>Para 20 μl</u>

Se incubó la reacción durante toda la noche a 37° C y se analizaron las muestras en un gel de agarosa al 1%

5.24 Secuenciación de ADN.

Las candidatas que dieron positivo en el screening de PCR y que se comprobó que eran restringibles con *EcoRI* y *HindIII* se eligieron para secuenciación. Se extrajo el

plásmido de 1 candidata positiva y se elaboró la reacción de PCR usando el kit BygDye Terminator v3.1 Sequencing de Thermo Fisher Scientific bajo las siguientes condiciones:

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad</u>
ADN diana	<u>1 µg</u>
Oligo SMC pUCP24 Forward	<u>2 µl (20 pmoles)</u>
Oligo SMC pUCP24 Reverse	<u>2 µl (20 pmoles)</u>
Ready Reaction Mix	<u>4 µl</u>
Sequencing Buffer 5X	<u>4 µl</u>
Agua libre de nucleasas	<u>Para 20 µl</u>

Para el programa utilizado en el termociclador se ocuparon los siguientes parámetros:

Desnaturalización inicial a 94° C por 5 minutos, Desnaturalización a 94° C por 30 segundos, Alieamiento a 55° C por 20 segundos, Extensión a 60° C por 4 minutos, Extensión Final a 60° C por 7 minutos, Holding a 4° C por tiempo indefinido ∞.

La muestra resultante se precipitó y se deshidrato para su usó en el secuenciador. En un nuevo EPPENDORF se agregó 60 µl de Etanol Absoluto, 20 µl de agua libre de nucleasas y se adicionaron 20 µl de la reacción de secuenciación, se mezcló con pipeta de manera uniforme. Con el tubo cerrado, se dejó incubando a temperatura ambiente por 20 minutos. La muestra se centrifugó a 10, 000 rpm por 20 minutos, se retiró el sobrenadante, se añadieron 400 µl de etanol al 70%, se centrifugó a 14, 000 rpm por 8 minutos. Se dejó el tubo destapado a 50° C por 1 minuto y se cubrió con papel aluminio para protegerlo de la luz. El tubo se colocó en hielo para transportarlo al Área de Ácidos Nucleicos en el Dpto. De Genética Y Biología Molecular del Cinvestav Zacatenco para su secuenciación.

- 5.25 Electroforésis en geles de poliacrilamida Tris-Glicina (SDS-PAGE)

Se colocaron vidrios para hacer geles (Mini-PROTEAN® Short Plates de Bio-rad) de 1.0 mm de grosor y se colocaron en un marco (Mini-PROTEAN® Casting Frame de Bio-rad) sobre una goma (Mini-PROTEAN® Casting Stand Gasket de Bio-rad) en el soporte para colocar los vidrios (Mini-PROTEAN® Casting Stand de Bio-rad). Al preparar los geles de poliacrilamida, el tamaño del poro se ajustó a una concentración al 15% para el gel separador mientras que para el gel concentrador se preparó al 5%. Los reactivos se fueron añadiendo y mezclando en el orden en que aparecen a continuación:

- Preparación del gel separador al 15% - 10.1 ml

15%	
H2O	2.5 ml
Solucion Monómeros	5.0 ml
Buffer (ph 8.8)	2.5 ml
10% APS	100 µl
TEMED	5 µl

Se mezcló en un matraz los componentes en el orden que indica la tabla. Agregando hasta el último el persulfato y el TEMED. Al llenar el espacio correspondiente del gel en las placas, se prosiguió a cubrir la superficie del gel separador con isopropanol para que quedara uniforme la superficie del gel. Se decantó el molde de las placas para retirar el agua sobrante y se secó usando papel filtro.

2.- Preparación del gel concentrador - 3 ml

5%	
H2O	1.75 ml
Solución Monómeros	0.50 ml
Buffer (ph 6.8)	0.75 ml
10% APS	40 µl
TEMED	2 µl

Se insertó el sándwich de las placas con los geles polimerizados en la unidad de electroforesis para proteínas Mini-PROTEAN® Tetra 39 Handcast Systems de Bio-rad, se retiró el peine cuidadosamente y se enjuagaron los carriles con agua destilada y una jeringa. Se vertió el buffer de electroforesis de Tris-Glycine-SDS (Tris base, Glicina y SDS, diluida 10 veces para trabajar al 1X a pH 8.3) en los reservorios interior y exterior de la cámara. Las muestras fueron mezcladas con 10 µl de buffer de lisis para proteínas, excepto el marcador; se cargaron en el gel y se corrieron a 90 V durante 3 horas a 4°C.

- **5.26 Tinción con Coomassie**

Un gel fue teñido con azul de Coomassie durante toda la noche en agitación. Se utilizó la solución de tinción Coomassie Blue R-250, se mezcló la solución con etanol previo a su uso durante 5 min. Para eliminar el exceso de solución de tinción y poder visualizar las bandas se realizaron lavados al gel con solución desteñidora (ver Anexo para soluciones).

- **5.27 Western Blot**

- **5.28 Transferencia.**

El segundo gel se transfirió a una membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno) previamente hidratada en metanol junto con cuatro placas de papel filtro (Whatman™ 3MM ChrChromatographyPaper de Fisher Scientific) y una de membrana de PVDF de igual dimensión del gel fueron equilibradas en el buffer de transferencia durante 10 minutos. Se apilaron en el siguiente orden: esponja, dos papel filtro Whatman, gel de proteínas, membrana de PVDF, dos papeles Whatman y otra esponja, esto con el fin de formar un *sándwich*, el cual fue dispuesto en la cámara de transferencia (Mini Trans-Blot® Cell de Biorad) cuidando de que el paso de corriente fuera del gel hacia la membrana, para así permitir que las proteínas se desplazaran hacia el polo positivo y quedaran atrapadas en la membrana. Se dejó toda la noche a 20 V a 4°C

- **5.29 Inmunodetección.**

Posterior a la transferencia de proteínas a la membrana de PVDF, se lavó dos veces con 20 ml de TBS-Tween 1X y se bloqueó en 15 ml de leche descremada al 5% en 1X TBS-Tween-0.05% en agitación a temperatura ambiente durante 2 hrs.

A continuación se realizaron lavados con TBS-T 0.05% (5 lavados con duración de 15 min. en agitación). Una vez terminada la primera serie de lavados, se procedió a incubar la membrana con el anticuerpo primario (2 μ l anti-MAT-tag de Sigma) en 10 ml de leche descremada al 5% en 1X TBS-Tween 0.05%, se dejó durante dos horas a temperatura ambiente en agitación suave. Una vez concluido el tiempo de incubación de la membrana con el anticuerpo primario, se lavó la membrana 5 veces con 1X TBS-Tween 0.05% con agitación. Al término de los lavados se resuspendió el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa (Rabbit anti-Mouse IgG de Invitrogen) en 15 ml de leche descremada al 5% en 1X TBS-Tween 0.05% incubando con el anticuerpo secundario por 2 horas. Una vez concluido el tiempo de incubación del anticuerpo secundario, se realizó otra serie de lavados (5) con 1X TBS-Tween 0.05% a temperatura ambiente.

Una vez terminada la serie de lavados, las membranas se revelaron utilizando el substrato quimioluminiscente SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate de Thermo Fisher Scientific. Se diluyeron 50 μ l de *Luminol/Enhancer* en un volumen de agua inyectable, así mismo se hizo con el *StablePeroxide Buffer*. Se mezclaron las soluciones siendo el total de 200 μ l, los cuales se agregaron a la membrana sobre una base de vidrio. Enseguida se colocó la membrana en el escáner C-DiGit® Blot de LI-COR con la cara que recibió la solución hacia abajo. Se cerró el escáner y se eligió la sensibilidad Alta y de 12 min, la cantidad de luz colectada y el tiempo de escaneo (Acquire→Sensitivity→High, 12 min).

6. RESULTADOS

- 6.1 Propagación de bacteriófagos en la cepa hospedera PA14

Se propagaron los fagos PaMx73 y H70 en la cepa PA14 obteniendo un título de fagos de 2.6×10^9 ufp/ml para PaMx73 y 3.8×10^9 ufp/ml para H70 (Tabla 3). Ambos fagos temperados presentaron una morfología de placas turbias, lo cual es característico para los fagos de naturaleza temperada o lisogénica (Fig 9). Sin embargo, el título obtenido está por debajo del título mínimo requerido (1×10^{11} ufp/ml) para poder extraer su ADN. Por lo tanto, se optó por incrementar la población de fagos mediante la técnica de lisados fágicos por placa confluyente.

Título de fagos obtenidos		
PA14		
Fagos	N° de placas	Título
PaMx73	25 placas/0.005 ml(10^6)	5×10^9 ufp/ml
H70	33 placas/0.005 ml(10^6)	6.6×10^9 ufp/ml

Tabla 3. Título de fagos propagados en PA14. El título de fagos se calculó empleando la fórmula previamente descrita (ver Materiales y Métodos - 5.6 Obtención del título de fagos).

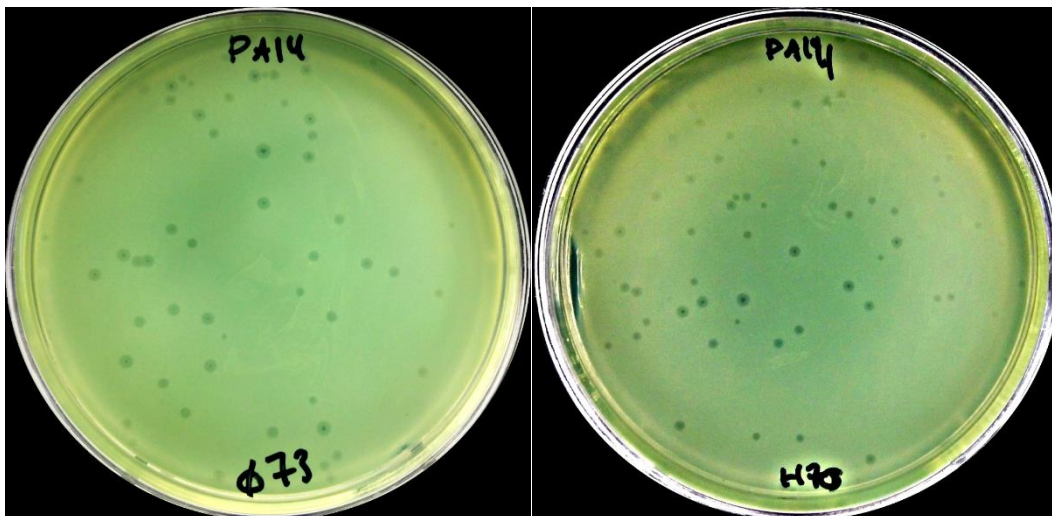


Fig. 9 Propagación de bacteriófagos PaMx73 y H70 en *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Las placas líticas formadas presentan una morfología de placas turbias con un halo en el centro formado por el crecimiento bacteriano para ambos fagos. El título obtenido fue bajo por lo que fue necesario preparar lisados fágicos por placa confluyente.

- 6.2 Lisados fágicos por placa confluyente/Precipitación con polietilenglicol PEG-8000

Se optó la técnica de lisado por placa confluyente para incrementar la población de fagos PaMx73 y H70. Una vez realizado la técnica de placa confluyente (ver sección Materiales y Métodos – 5.9 Concentración de fagos por polietilenglicol) se procedió a precipitar los fagos usando PEG-8000 y se concentraron los viriones obteniendo un título mayor al obtenido anteriormente como se puede ver en la tabla 6.

FAGOS	Título post-precipitación	Título anterior
PaMx73	8×10^{10} ufp/ml	5×10^9 ufp/ml
H70	4×10^{10} ufp/ml	6.6×10^9 ufp/ml

Tabla 4. Título de fagos obtenidos por la técnica de placa confluyente. El nuevo título obtenido permitió obtener una población de fagos lo suficientemente alta como para poder purificar los viriones mediante una ultra-centrifugación de gradientes discontinuos de Cloruro de Cesio.

- 6.3 Purificación de fagos por gradientes discontinuos de Cloruro de Cesio

Para poder obtener bacteriófagos libres de probables residuos de polietilenglicol o algún otro tipo de contaminante y al mismo tiempo incrementar el título de los fagos, se procedió a purificar los viriones utilizando gradientes discontinuos de Cloruro de Cesio.

Título de fagos obtenidos		
PA14		
Fagos	Título	
PaMx73	30 placas/0.010 ml(10^8)	3×10^{11} ufp/ml
H70	80 placas/0.010 ml(10^8)	8×10^{11} ufp/ml

Tabla 5. Título de fagos obtenidos después de purificar por Cloruro de cesio. El nuevo título fue lo suficientemente alto para extraer el DNA de los fagos

- 6.4 Tipificación de ADN fágico

Se extrajo el ADN de los viriones purificados verificando la integridad y la pureza del material genético. Los valores obtenidos mediante espectrofotometría determinaron una concentración de ADN de 491.4 ng/mL para PaMx73 y 537.3 ng/mL para H70 (Figura 10). Ambos genomas presentaron valores entre 1.8 por espectrofotometría de la relación de pureza de DNA 260/280.

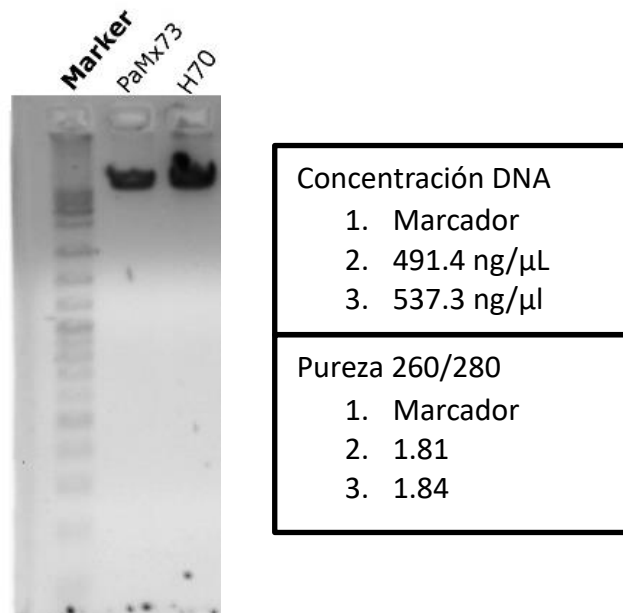


Fig. 10 DNA extraído de los fagos purificados por Cesio. Electroforesis del material genético extraído de los fagos PaMx73 y H70. La imagen muestra que el DNA extraído se encuentra en buena concentración (ng/mL) y es lo suficientemente puro (260/280) para poder clonar el ORF *h* a partir de estos genomas.

Para tipificar el genoma de los fagos, se utilizaron unos sets de primers internos y externos a las regiones de plasticidad genómica RGPs B y H. En base a las RGPs presentes en los genomas de los fagos PaMx73 y H70, se realizaron reacciones de PCR que permitieron confirmar que el ADN extraído de los viriones purificados pertenecía a los fagos *Mu-like* ya mencionados (Figura 11). Se ocupó el set de primers RGP-B para identificar la región de plasticidad genómica B presente en PaMx73 y ausente en H70,

para la RGP-H se ocuparon los primers internos al ORF *h* presente en ambos fagos. El uso simultáneo de estos oligos permite discernir entre un tipo de fago y otro.

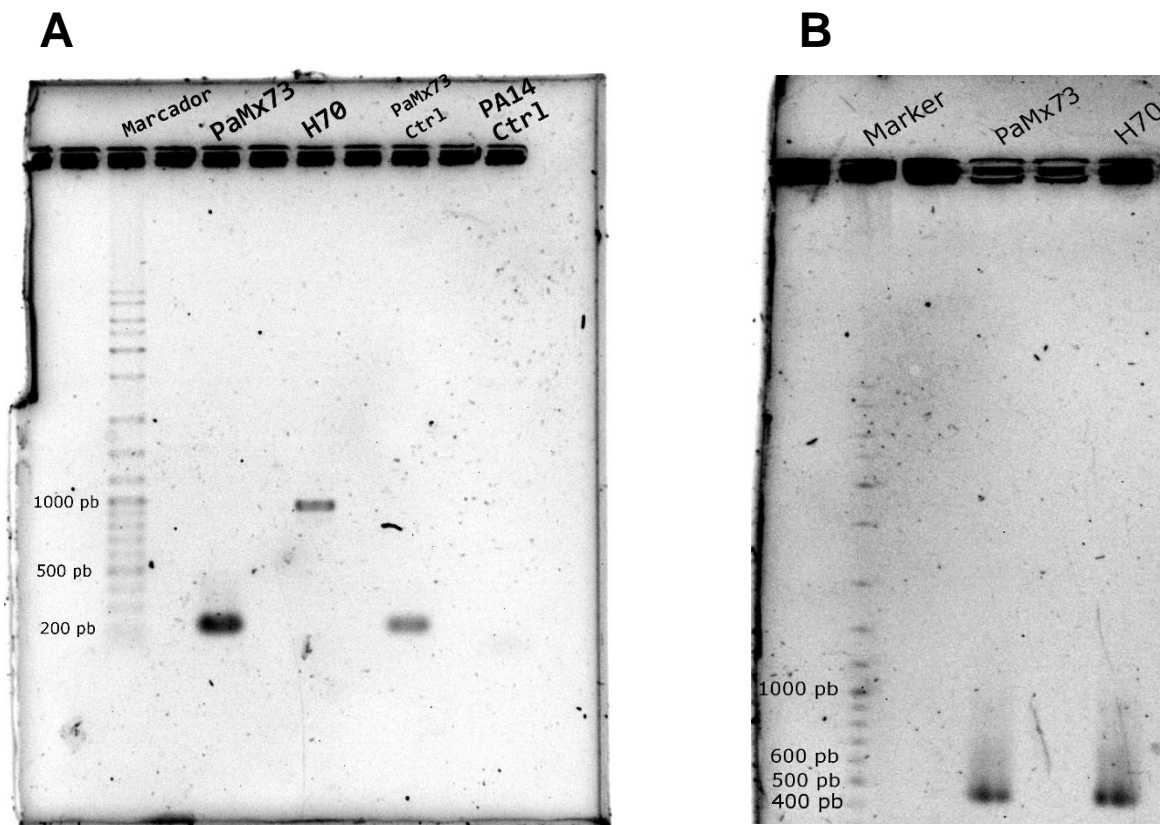


Fig 11. Tipificación de los fagos PaMx73 y H70. Reacción de PCR utilizando primers cuya secuencia diana son las regiones de plasticidad genómica RGP B **A.** Los oligos externos empleados en esta PCR resultaron generar un amplicon de 224 pb para el genoma de PaMx73 y 920 para H70 (ver Materiales y métodos - Tabla 2). **B.** Los primers hibridan dentro de la región H por lo tanto el amplicon esperado es de 387 pb

6.5 Clonación del ORF *h* en un vector de expresión

Con base en la evidencia obtenida mediante el análisis de los genes accesorios de fagos temperados PaMx73 y H70 [63], se designó como función putativa de proteína de decoración al ORF *h* encontrado dentro de las regiones de plasticidad genómica (RGP siglas en inglés) en fagos Mu-like analizados por espectrometría de masas. Sin embargo, para validar esta propuesta es necesario clonar el ORF *h* en un vector de expresión para la obtención *in vitro* de la proteína y poder realizar los estudios experimentales pertinentes

para la caracterización y asignación de la función de la proteína putativa de decoración de cápside

- 6.6 Subclonación del ORF *h* en pJET1.2

Usando ARTEMIS se pudo visualizar la secuencia nucleotídica de los bacteriófagos H70 y PaMx73, se localizó el ORF *h* dentro de la región de plasticidad genómica (RGP) para visualizar su secuencia a nivel de nucleótidos y a nivel de aminoácidos. Con base en esto se construyeron los primers para obtener el producto de PCR del ORF *h* los cuales presentan en su diseño la secuencia de los sitios de restricción *EcoR1* y *HindIII*, se seleccionaron estos sitios de corte debido a que estos se encuentran presentes en el poli-linker de los vectores pJET1.2 y pUCP24 L-3, lo cual permite la inserción y liberación del fragmento deseado. También se colocó una etiqueta de 4 Histidinas intercaladas en la construcción del primer Reverso para poder facilitar la purificación de la proteína por columnas de Níquel y su posterior inmunodetección por Western Blot (ver Materiales y Métodos – Tabla 2).

La amplificación del ORF *h* se realizó mediante PCR una vez estandarizada la T_m de los primers siendo de 60° C la más eficiente que no mostró bandeo de productos inespecíficos. Se utilizó la enzima Phusion de Alta Fidelidad para disminuir la tasa de errores en la secuencia diana. El molde que se ocupó para la reacción de PCR fue el DNA extraído de H70 y PaMx73. El amplicón fue ligado al vector de transición pJET1.2/Blunt (Fig. 14A) en una reacción de ligación de 5 minutos de acuerdo a las instrucciones del kit. La reacción de ligación se usó para la transformación de células de *E.coli* DH5 α . En este punto no habían candidatas falso-positivas, es decir, candidatas que llevaran el vector vacío, siendo esta la virtud del plásmido pJET1.2/Blunt que permite la selección de recombinantes debido a que cualquier gen que se clone en el sitio de clonación múltiple de pJET interrumpe un gen letal (*eco47IR*); por lo tanto solo candidatas que tuvieran el ORF *h* clonado sobrevivieron (Fig. 12).

Las colonias obtenidas se traspararon a nueva caja de LB con Ampicilina (15 μ g/ml) para poder realizar un tamizaje más preciso. Diez candidatas se analizaron por PCR de

colonia (Fig. 13) con los primers que se usaron para clonar obteniendo un producto del tamaño esperado.

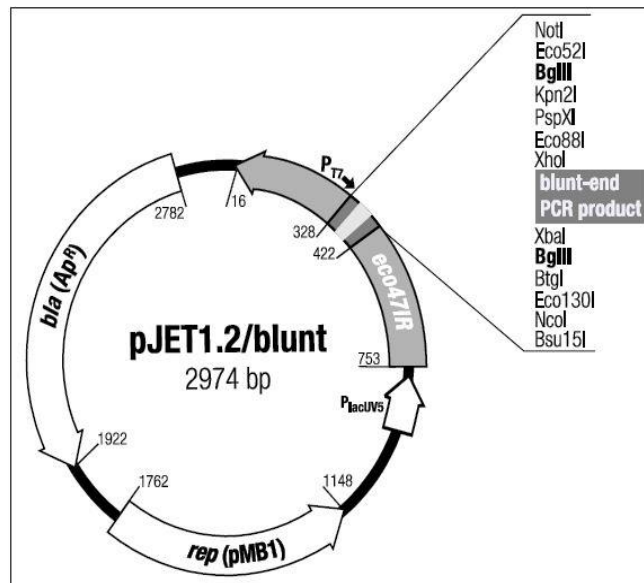


Figura 12. Vector de transición pJET1.2. A. Mapa de pJET1.2/Blunt utilizado como vector de transición.

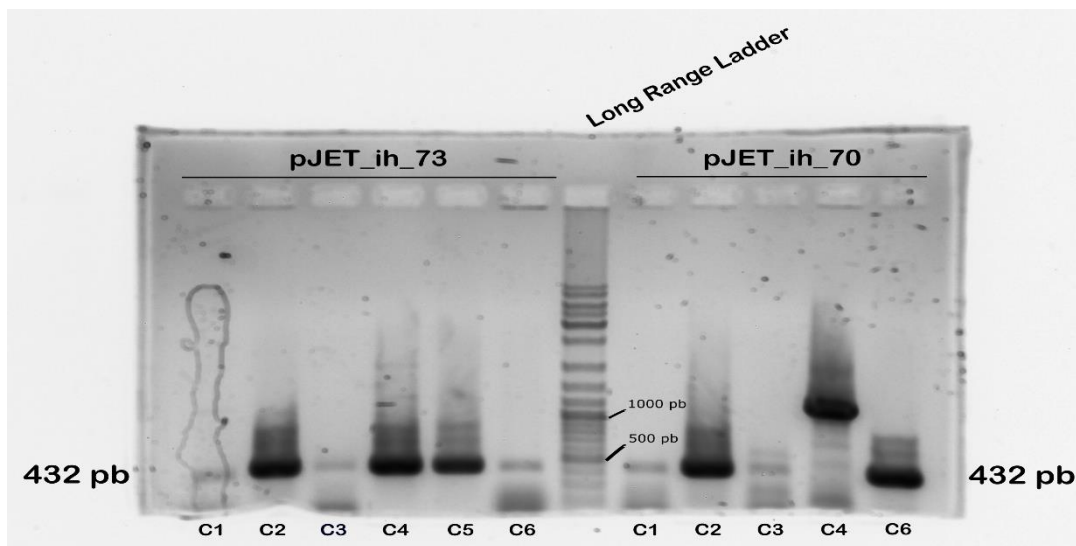
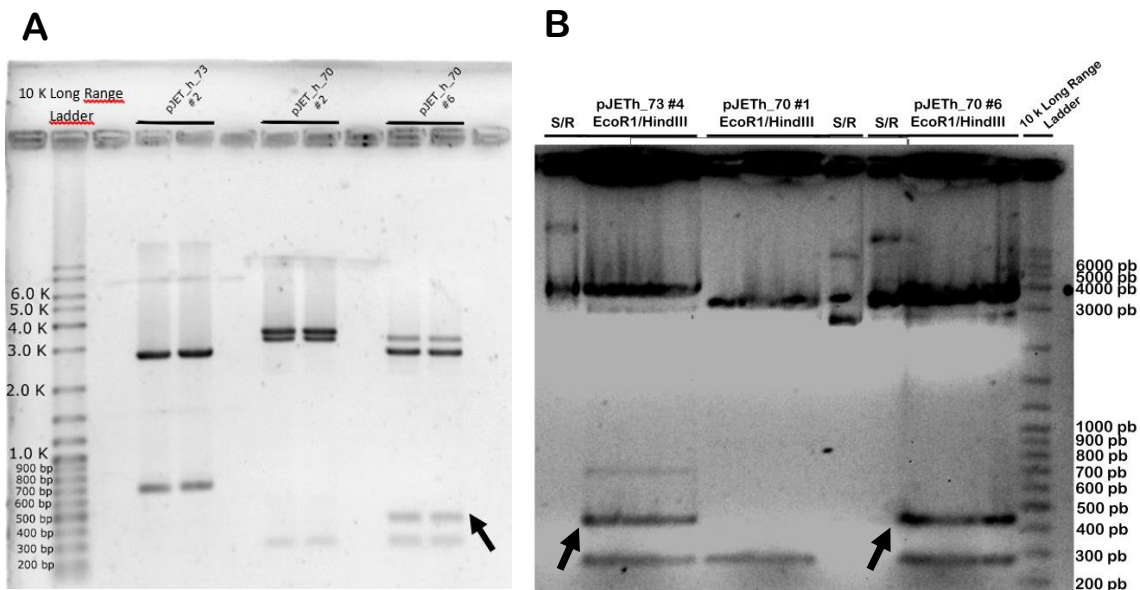


Figura 13. Clonación del ORF *h* en pJET1.2. Tamizaje de candidatas mediante PCR de colonia obteniendo amplicones del tamaño esperado de 432 pares de bases (399 pares de bases más los sitios de restricción y 4x etiqueta de Histidinas).

- 6.7 Clonación en pUCP24 L-3

Para la clonación del inserto en un vector de expresión apropiado, se optó por elegir al plásmido pUCP24 L-3 modificado [88]. Éste es un plásmido de expresión que permitió obtener replicones del ORF *h* con alto número de copias en cepas de *E.coli* (DH5 α) y bajo número de copias en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (PA14) sin obtener una proteína de fusión. El vector es un plásmido de expresión constitutiva por lo que no requiere inducción y posee un gen *aacC1* que confiere resistencia a Gentamicina como marcador de selección.

El plásmido fue propagado en *E.coli* DH5 α para obtener mayor cantidad en volumen y concentración, se extrajo por medio de un kit comercial de Promega, se cuantificó y verificó su integridad mediante electroforesis y posteriormente se realizó una doble restricción en el plásmido pUCP24 L-3 y en la construcción que viene de DH5 α pJET_ih_73 y pJET_ih_70 para liberar al ORF *h* (Fig. 14A Y B). Ambos productos restringidos previamente purificados y cuantificados fueron empleados para la reacción de ligación y su subsecuente transformación en *E.coli* DH5 α (Fig. 14D Y E).



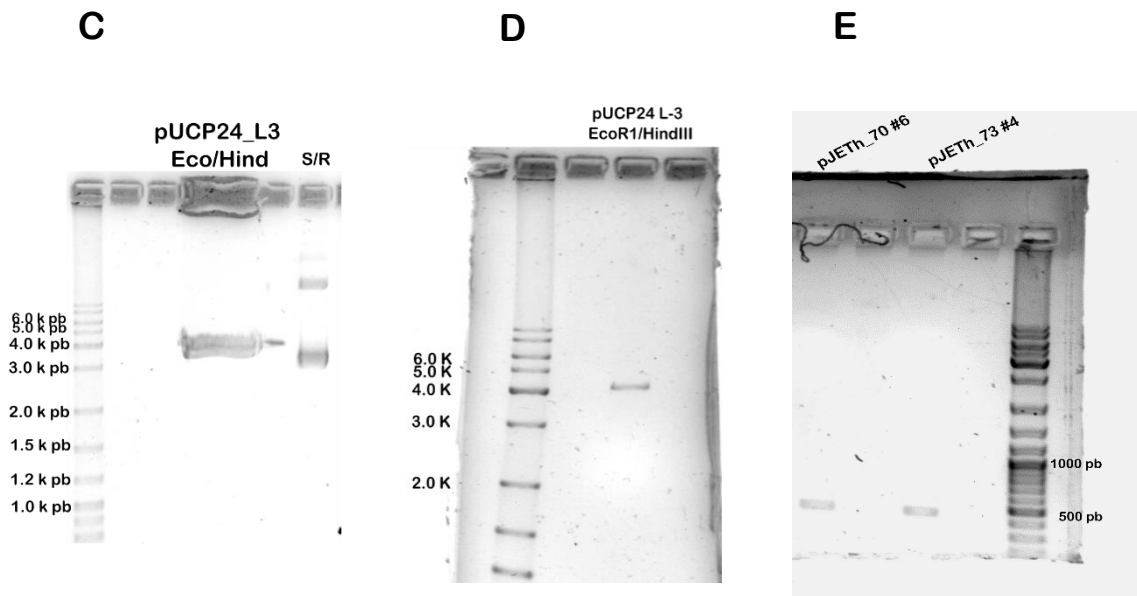


Figura 14. Doble restricción del inserto *h* y el vector de expresión pUCP24 L-3 para la reacción de ligación. A y B. Doble restricción de las candidatas en pJET para la liberación del ORF *h*. Se muestran los tamaños correctos de 432 pb (correspondientes al inserto *h*) y uno de 250 pb aprox. (fragmento liberado de pJET producto de una doble digestión *EcoR1/HindIII*). Las flechas negras indican el amplicón del orf *h* con el tamaño esperado. **C.** Doble restricción del plásmido de expresión pUCP24 L-3 con *EcoR1* y *HindIII*, la reacción genera dos fragmentos uno grande de 3968 pb y uno pequeño de 68 pb (no mostrado en la figura). **D y E.** Electroforesis de los fragmentos purificados correspondientes al vector pUCP24 L-3 (**D**) y candidatas pJET_70 #6, pJET_73 #4 (**E**) restringidos con *EcoR1* y *HindIII*

Las colonias obtenidas producto de la reacción de ligación se re-sembraron en nuevas cajas de LB con Gentamicina 15 µg/ml para su posterior selección mediante PCR de colonia. Se tomaron 7 colonias y se les realizó la reacción de PCR utilizando los oligos que flanquean al sitio de clonación múltiple del plásmido pUCP24 L-3 los cuales generan un amplicón de 212 pares de bases si el vector se encuentra vacío y 644 pares de bases si llevan clonado el inserto del ORF *h* (Fig. 13A). Una candidata mostró el amplicón de tamaño esperado y ésta fue restringida con *EcoR1* y *HindIII* para verificar la liberación del fragmento y corroborar la correcta construcción del plásmido (Fig. 15B).

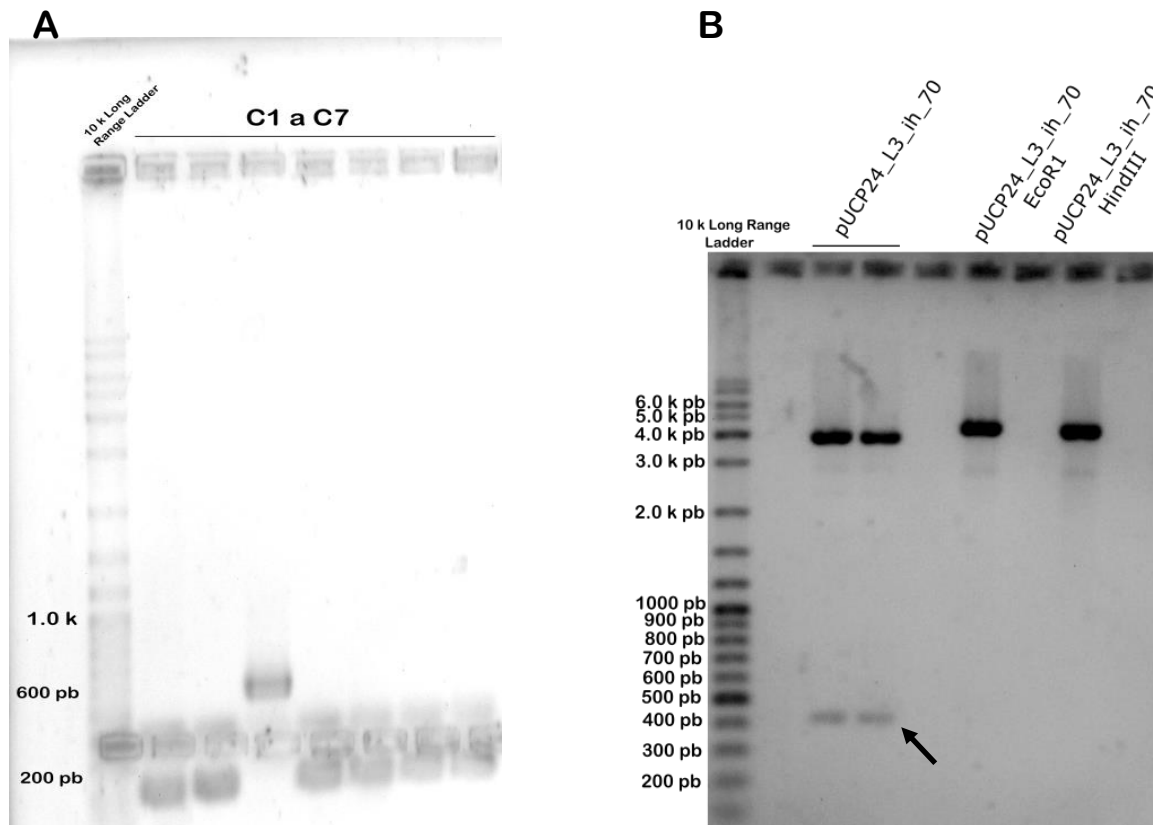


Figura 15. Ligación del ORF *h* en pUCP24L-3. **A.** PCR de colonia de candidata que alberga al plásmido con inserto. Se obtuvo un amplicón del tamaño esperado de 644 pb. **B.** Doble restricción de la construcción pUCP24_L3_ih_70 producto de la ligación en DH5 α , al realizar una doble digestión con *EcoRI* y *HindIII* se observa la liberación del fragmento *h* del tamaño esperado de 432 pb.

La candidata C3 muestra un tamaño de 644 pb, indicando que el vector no está vacío (Fig. 16A), al extraer el plásmido de C3 y realizar una doble restricción (*EcoRI/HindIII*) se libera un fragmento de 432 pb, tamaño correspondiente al ORF *h* (Fig, 16B); por lo tanto, ésta construcción se mandó a secuenciar para verificar la correcta inserción del fragmento y corroborar que la secuencia del ORF *h* se encuentre íntegra para evaluar su posible expresión a nivel de proteína y que ésta fuese funcional.

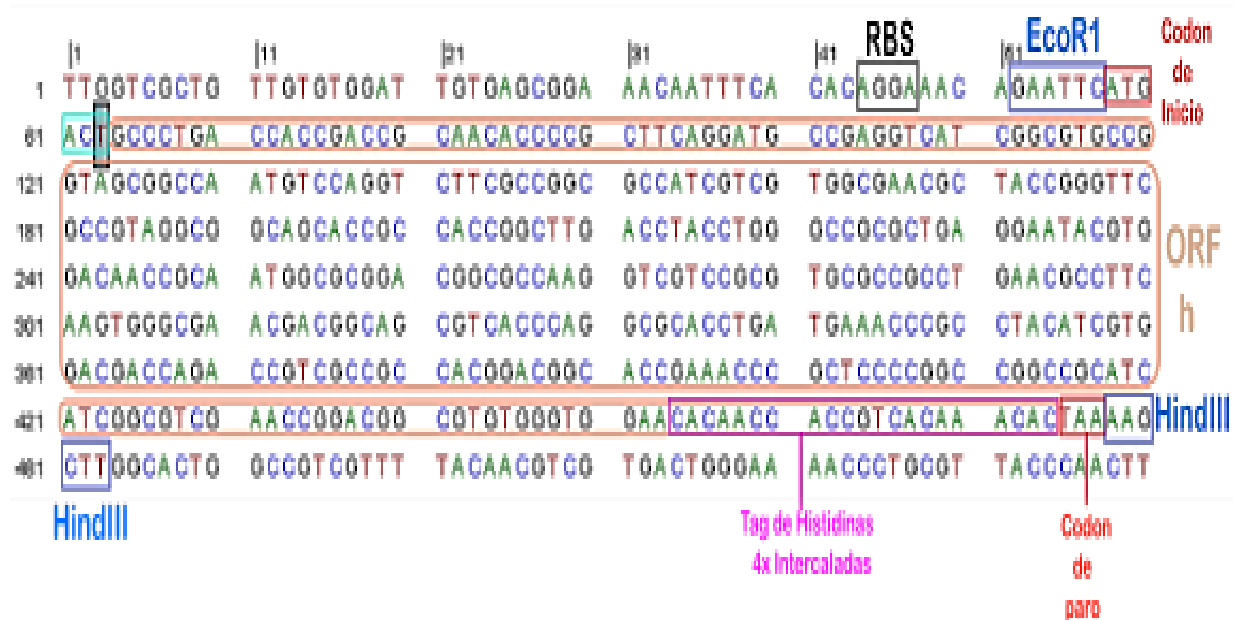


Figura 16. Secuencia de la construcción pUCP24_L3_ih_70. En negro se resalta el sitio de unión a ribosoma (RBS), los sitios de restricción *EcoRI* y *HindIII* en azul, los codones de inicio y de terminación en rojo, la etiqueta de 4 Histidinas intercaladas en rosa y se señala un cambio de base en el triplete marcado con color aguamarina, en la posición 3 del triplete hay un cambio de base C por T (recuadro negro) haciendo el cambio del codón ACC por un codón sinónimo ACT que ambos codifican para el aminoácido Treonina.

Al analizar la secuencia del plásmido pUCP24_L3_ih_70, se encontró que hubo un cambio de base en el codón precedido del codón de inicio en la posición 63 en la secuencia (Fig. 17), ésta sustitución de base de Citosina por Timina pertenece al mismo grupo de codones que codifican para el aminoácido Ácido aspártico o Aspartato. En base al uso relativo de codones sinónimos presente en *Pseudomonas aeruginosa* PA14 [89] se llegó a la conclusión de que éste cambio no comprometería la expresividad de la proteína en PA14 y se procedió a transformar la cepa PA14 con la construcción pUCP24_L3_ih_70 por medio de electroporación.

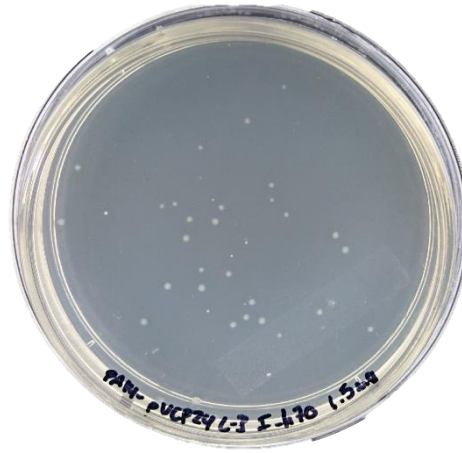
- 6.8 Transformación en *Pseudomonas aeruginosa* de la construcción pUCP24_L3_ih_70

La electroporación en PA14 se realizó de acuerdo con lo reportado para esta cepa [90], las colonias obtenidas se re-sembraron en una nueva caja de LB con Gentamicina (50 µg/ml) (Fig. 17) y se les realizó un tamizaje por PCR para verificar la presencia del plásmido en la bacteria. Las candidatas positivas liberaron un fragmento correspondiente al tamaño esperado de 644 pb. Por lo tanto la nueva construcción

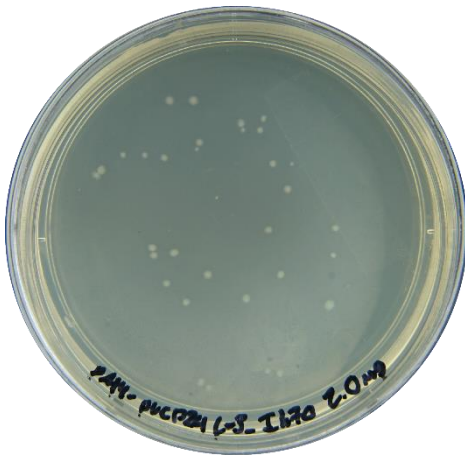
PA14/pUCP24_L3_ih_70 se realizó correctamente lo cual permitiría inferir *a priori* la posible expresión del gen *h* tomando en cuenta que la bacteria alberga un vector de expresión con el inserto. (Fig. 18)



A



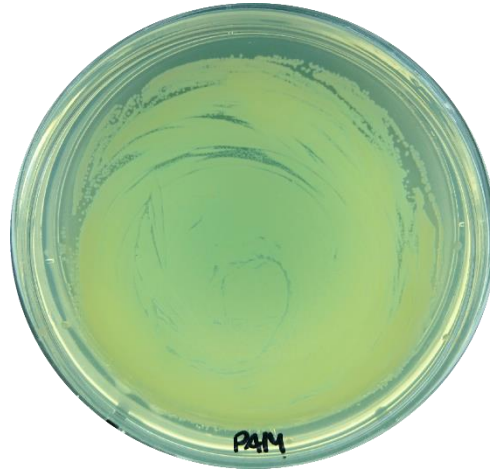
B



C



D



E

Figura 17. Electroporación en *Pseudomonas aeruginosa* cepa PA14 con la construcción pUCP24_L3_ih_70. A, B y C. Candidatas obtenidas de la transformación en PA14 usando 1, 1.5 y 2 μ g de DNA plasmídico respectivamente. D. Transformación de la cepa PA14 con el vector vacío pUCP24_L3 E. PA14 silvestre sometida a electroporación sin adición de DNA exógeno.

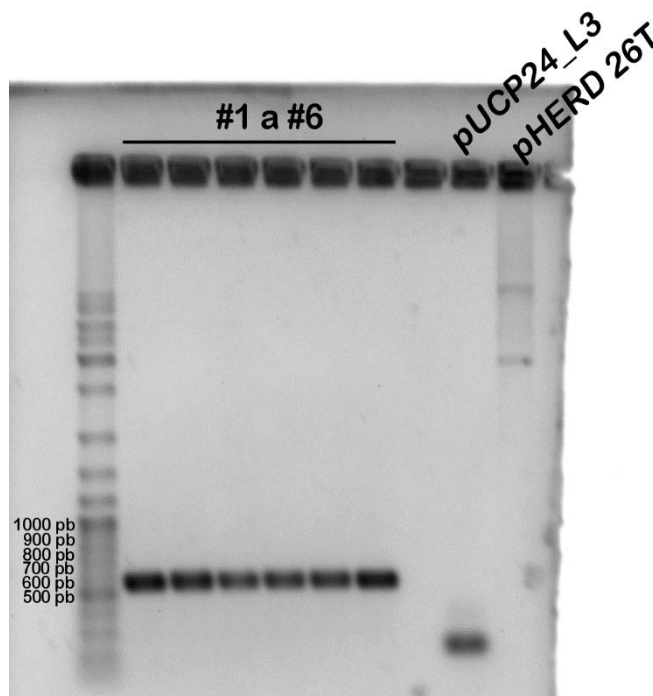


Figura 18. Tamizaje de candidatas producto de la transformación en PA14. Electroforésis de amplicones de PCR de colonia, se ocupó el par de primers del MCS de pUCP24 los cuales amplifican un producto de 212 pb. si el vector se encuentra vacío (carril #8) y un producto de 644 pb. si el vector lleva clonado un fragmento en su sitio de clonación múltiple (carriles #1 hasta #6). En el carril #9 se muestra el control negativo que es un plásmido pHERD26T con un MCS totalmente distinto a pUCP24

- **6.9 Construcción de lisógenas**

Con el fin de poder determinar la función *in vivo* de la proteína putativa de decoración, se construyó una lisógena de la cepa PA14 transformada anteriormente con el plásmido que alberga al ORF *h*. Esto con la finalidad de obtener una cepa que no solo sea lisógena y libere fago, sino también que los fagos liberados por inducción espontánea sean “decorados” por la unión de la proteína a las cápsides de los viriones gracias a la expresión constitutiva del plásmido pUCP24_L3_ih_70.

La lisógena construida fue capaz de liberar fago y presentó inmunidad a la infección por el mismo tipo de fago (homo-inmunidad). Sin embargo, para cerciorarse de que la lisógena pertenecía al fago 39016 y que contenía al plásmido con el gen, se hizo una PCR de colonia para verificar la correcta construcción de la lisógena utilizando los oligos que flanquean el sitio de clonación múltiple del plásmido pUCP24 y oligos externos al ORF *h* que nos permiten discernir con cual grupo de fagos se está trabajando. Como se puede ver en la figura 19, la construcción de la lisógena se realizó de manera correcta pudiendo corroborar la presencia del plásmido con el inserto en la cepa. Cabe mencionar que para sondear al fago 39016 se ocupó un set de oligos externos al ORF *h* que permiten identificar si estamos trabajando con el fago 39016 debido a que este fago no presenta el ORF *h* en su genoma, al realizar la PCR de la cepa lisógena usando los oligos externos del ORF *h* se obtiene un producto de 700 pb, como es de esperarse para el fago 39016.

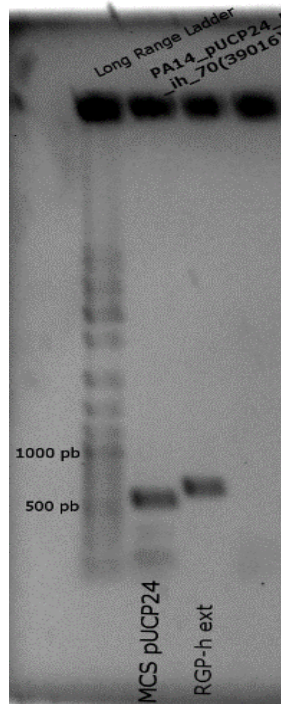


Figura 19. PCR de colonia de la lisógena construida de la cepa PA14/pUCP24_L3_ih_70 con el fago 39016. PCR de colonia utilizando el set de primers del sitio de clonación múltiple de pUCP24 generando un producto de 644 pb (carril 2) y un set de oligos externos al ORF *h* los cuales dan lugar a un amplicon de 700 pb (carril 3).

7. Discusión

En el presente trabajo se notifica la clonación del gen *h* del fago *Mu-like* H70 de *Pseudomonas aeruginosa*. El gen *h* codifica para una proteína de aprox. 13.8 kDa cuya función y caracterización no está completamente dilucidada.

Inicialmente al comparar la secuencia genómica de un grupo de fagos *Mu-like* de *Pseudomonas aeruginosa*, se encontró evidencia que indica que la proteína H presenta una similitud en masa molecular con otras proteínas de decoración (gpD para fago λ , Dec para fago L)[68, 78] con un tamaño aproximado de 11-15 kDa., y éstos genes presentan una marcada sintenia al estar localizados entre genes de andamiaje involucrados en el ensamble del fago y genes estructurales de proteínas mayoritarias de la cápside [63].

La clonación del ORF *h* se realizó obteniendo un producto de PCR de 432 pb utilizando oligos diseñados en PrimerBlast de NCBI para su hibridación en los primeros 16 aminoácidos del gen en la parte N-terminal y 16 aminoácidos en la parte C-terminal. Par la construcción de los oligonucleótidos se consideró añadir una etiqueta de afinidad de polihistidinas intercaladas (4 residuos intercalados) para identificar a la proteína H mediante un anticuerpo comercial específico para esta etiqueta.[91] La etiqueta se ubicó en el primer reverso inmediatamente después del codón de paro, se incorporó ésta etiqueta mediante PCR en la secuencia del ORF *h* de manera que las 4 histidinas intercaladas quedaron ubicadas en la parte C-terminal del gen. Las evidencias reportadas para proteínas decorativas en el fago λ [77] resaltan la importancia de los primeros 14 residuos del sitio N-terminal indispensables para establecer una íntima asociación con la proteína de decoración y la proteína mayoritaria de la cápside gpE. Sin embargo, se tiene reportado que pequeñas fusiones de péptidos en ambos extremos de la proteína gpD, amino terminal y carboxilo terminal, no comprometen su función de unirse a la cápside [76, 92-94]. Debido a que el extremo carboxilo terminal es el sitio más tolerante a fusión con proteínas o etiquetas de histidinas y el extremo amino terminal confiere a la proteína de decoración su habilidad de unirse a la cápside [77], se optó por colocar la etiqueta de 4 Histidinas en el extremo carboxilo.

Mediante el programa Ridom® TraceEdit y Seaview se analizaron las secuencias *Forward* y *Reverse* obtenidas del plásmido secuenciado pUCP24_L3_ih_70, al alinear

las secuencias con respecto al genoma del fago silvestre H70 se descubrió que hubo una mutación introducida en la secuencia, un cambio en un triplete en la posición 63, una sustitución de base de una Timina T por una Citosina C cambiando el triplete ACC por ACT, *a priori* este cambio de base no tendría impacto alguno a nivel de expresión del gen *h* ya que esta mutación “silenciosa” cambió codones sinónimos que codifican para el mismo aminoácido treonina (Thr). Al evaluar un posible escenario en donde esta mutación silenciosa afectaría la expresividad del plásmido, se verificó una variable intrínseca de la cepa PA14 de *Pseudomonas aeruginosa* que es el uso de codones, nos percatamos que el codon ACC presenta una marcada “preferencia” por parte de *Pseudomonas* para llevar a cabo interacciones codón-anticodón con mayor frecuencia que los codones sinónimos pertenecientes al mismo grupo que codifican para Thr, a lo que [95] denominó como Uso de Codones Sinónimos Relativo (RSCU siglas en inglés).

El triplete ACT presente en la secuencia de pUCP24_L3_ih70 es usado con más frecuencia que ACC, *a priori* esto nos indicaría que podría haber inconvenientes a nivel traduccional debido a la poca preferencia de la bacteria hospedera por este tipo de codón que de acuerdo con previos reportes [96] el codón ACT es clasificado como codon “raro” y representa menos del 10% de los codones elegidos de un grupo específico de codones sinónimos (Thr en este caso). Sin embargo, éstos reportes sobre uso de codones en *Pseudomonas* fueron realizados dentro del contexto del cromosoma de la bacteria y como señalaron ciertos autores [89] para ciertas cepas de *Pseudomonas* existe otra variable que impacta en el uso de codones y ésta tendencia se atribuye a aquellos genes que se denominaron como genes “foráneos” (genes localizados dentro de profagos crípticos y genes que presentan un bajo contenido de G+C atípico y que son probablemente recién importados al genoma de la bacteria por medio de transferencia horizontal [14, 89]. Éste mosaicismo de la bacteria con genes recién adquiridos modifican su patrón de uso de codones y para el caso de nuestro orf *h*, un gen que forma parte del genoma de un fago lisógeno, la bacteria emplea una distribución diferente de tRNA disponibles para el reconocimiento de este conjunto de secuencias [89].

No obstante, al revisar la secuencia del otro fago Mu-like PaMx73 para el ORF *h*, nos percatamos de otro suceso que nos arrojó más evidencia respecto a la mutación

silenciosa presente en nuestra construcción pUCP24_L3_ih70 y que pudiera no tener efecto alguno en la expresión de la proteína putativa de decoración. El codón ACT, se encuentra presente de forma nativa en la secuencia del ORF *h* dentro del genoma de PaMx73 [63] y este tipo de codón se encuentra presente en menor proporción que ACC y no hay preferencia por este triplete por parte de la bacteria [89], sin embargo, a pesar de estas limitantes, el fago PaMx73 codifica para una proteína putativa de decoración totalmente funcional y este argumento ya lo hemos comprobado mediante pruebas de estabilidad de EDTA que realizamos en nuestro laboratorio con fagos que portan el gen *h* en su genoma como es el caso de PaMx73 y H70 (datos no mostrados), por lo tanto si PaMx73 logra estabilizar sus cápsides utilizando un set de codones sinónimos heterogéneos, nos da pauta para inferir que la mutación en estos tripletes de Treonina no afectarían la expresión de la proteína en nuestra bacteria *Pseudomonas* PA14 con el plásmido pUCP24_L3_ih_70.

La clonación del gen *h* se realizó de manera exitosa en una cepa de *E.coli* DH5 α , sin embargo, fue necesario el contar con esta construcción en *Pseudomonas* en particular la cepa PA14 que es la cepa hospedera del fago cuyo genoma fue clonado, esto con la finalidad de poder verificar la función de la proteína putativa de decoración mediante construcción de lisógenas de la bacteria transformada que alberga el plásmido pUCP24_L3_ih_70. La electroporación en PA14 generó colonias candidatas en ambos casos, en el vector con el inserto y en el vector vacío, a pesar de obtener un número de colonias por debajo de lo esperado (30-40 colonias en 2.0 μ g y 1.5 μ g de ADN plasmídico respectivamente) como en el caso reportado [90] para esta cepa PA14 con el plásmido pUCP24 (eficiencia de 1.7×10^9), todas las candidatas re-sembradas analizadas por PCR de colonia resultaron positivas.

Al analizar la expresión de la proteína mediante SDS-PAGE utilizando nuestra construcción PA14_ pUCP24_L3_ih_70, no pudimos determinar la presencia de la proteína en el gel de poliacrilamida (datos no mostrados), esto probablemente se debe a las características del plásmido pUCP24_L3 el cuál presenta un numero bajo de copias en *Pseudomonas* ocasionando una muy baja producción de la proteína fagica por parte del plásmido, existe evidencia de este posible escenario debido a que genes fágicos que

han sido clonados en este vector muestran una baja producción de la proteína en *E. coli* y requieren de la concentración de la proteína y su posterior purificación [88], también está la posibilidad de que la proteína H se encuentre enmascarada por una de las proteínas propias de la bacteria siendo esto factible debido al enorme proteoma que posee *Pseudomonas* [64] y que la bacteria pueda tener proteínas de un tamaño parecido a la de una proteína decorativa [68, 70, 78]. Por lo tanto, para poder visualizar la proteína de decoración es necesario enriquecer la proteína mediante columnas de Ni-NTA agarosa haciendo uso de la etiqueta de histidinas.

A pesar que la proteína H no se pudo visualizar en un gel, pudimos evidenciar un fenotipo en particular al realizar una cinética de crecimiento de las bacterias transformadas con nuestro plásmido construido. La curva de crecimiento que se realizó de las cepas construidas (PA14/pUCP24_L3_ih_70 y PA14/pUCP24_L3) fue con la finalidad de poder determinar si la expresión de la proteína *per se* impacta de alguna forma en el crecimiento de la bacteria. Como se puede ver en la Fig. 20 (ir a Anexos) la cepa PA14/pUCP24_L3_ih_70 muestra un comportamiento diferente a la cepa control que es PA14 transformada con un vector vacío PA14/pUCP24_L3, la cepa que porta el gen presentan un decremento en su población bacteriana lo cual se ve reflejado en un crecimiento celular más lento que la cepa que solo lleva el vector vacío. Esto concuerda con lo que se tiene reportado para clonaciones realizadas en vectores de expresión en *E. coli* y *Pseudomonas* en donde el decremento en la población bacteriana puede deberse principalmente a una carga metabólica producida por la expresión del plásmido con un inserto [88, 97, 98]. Si bien esto no es un indicio concluyente respecto a la expresión de la proteína ya que no se cuenta con la evidencia molecular de un gel de proteínas en *Pseudomonas*, si nos permite inferir que la expresión del plásmido que porta el gen *h* de alguna forma impacta a las cepas que fueron transformadas con este vector construido.

La bacteria lisógena PA14/pUCP24_L3_ih_70 (39016) se construyó de manera exitosa. Éste hecho fue corroborado mediante la reacción de PCR utilizando oligos específicos al MCS del plásmido pUCP24 y al fago 39016. Al contar con esta bacteria mutante podemos realizar experimentos para buscar el fenotipo de estabilidad de cápside usando como referencia el diseño experimental reportado para el fago L y P22 con la

proteína de decoración Dec [68]. Estos autores reportan la unión de la proteína de decoración entre fagos cercanamente emparentados y con una alta similitud de morfología de cápside entre ellos. En base a estos antecedentes, ésta bacteria lisógena que alberga nuestro plásmido construido pretende servir como herramienta para poder evaluar un fenotipo de estabilidad en viriones al estar en presencia de la proteína decorativa H.

8. CONCLUSIONES

- La clonación del ORF *h* se realizó de manera exitosa en la cepa DH5 α de *Escherichia coli* y en la cepa PA14 de *Pseudomonas aeruginosa*.
- El plásmido pUCP24_L3 posee un bajo número de copias en *Pseudomonas* y su característica de plásmido constitutivo podría comprometer la visualización de la proteína *h* en un gel de proteínas.
- La sustitución de un codón sinónimo de Treonina en la secuencia del ORF *h* podría no tener efecto alguno en el uso de codones en *Pseudomonas*.
- La expresión del plásmido está ocurriendo y tiene un efecto reproducible en una cepa de *Pseudomonas* transformada con el vector vacío y el vector construido con el gen *h*.
- Se construyó una bacteria lisógena de *Pseudomonas aeruginosa* PA14/pUCP24_L3_ih_70(39016)

- 9. PERSPECTIVAS

- Para continuar con la caracterización funcional de la proteína es necesario determinar la expresión del plásmido construido pUCP24_L3_ih_70 en *E.coli* y *Pseudomonas aeruginosa* mediante el enriquecimiento y la purificación de la proteína para su visualización en geles de poliacrilamida o espectrometría de masas así como su inmunodetección por Western Blot.
- Realizar un ensayo de estabilidad de cápside con la lisógena construida PA14/pUCP24_L3_ih_70(39016) para poder visualizar un fenotipo en los viriones en presencia de la proteína putativa de decoración
- A largo plazo, esta investigación podría aportar herramientas para diversas aplicaciones siendo las proteínas de decoración una plataforma idónea para phage display lo cual permitiría estudiar las diversas interacciones que presentan las proteínas con otras moléculas.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Pace, N.R., *A molecular view of microbial diversity and the biosphere*. Science, 1997. **276**(5313): p. 734-40.
2. Woese, C.R., *Bacterial evolution*. Microbiol Rev, 1987. **51**(2): p. 221-71.
3. Baron, S., *Medical microbiology*. 4th ed. 1996, Galveston, Tex.: University of Texas Medical Branch at Galveston. xvii, 1273 p.
4. Gilligan, P.H., et al., *Isolation medium for the recovery of Pseudomonas cepacia from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis*. J Clin Microbiol, 1985. **22**(1): p. 5-8.
5. Ramos, G.P., J.L. Rocha, and F.F. Tuon, *Seasonal humidity may influence Pseudomonas aeruginosa hospital-acquired infection rates*. Int J Infect Dis, 2013. **17**(9): p. e757-61.
6. Koch, C. and N. Hoiby, *Diagnosis and treatment of cystic fibrosis*. Respiration, 2000. **67**(3): p. 239-47.
7. Pierce, G.E., *Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans, and device-related nosocomial infections: implications, trends, and potential approaches for control*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2005. **32**(7): p. 309-18.
8. Yoshimura, F. and H. Nikaido, *Permeability of Pseudomonas aeruginosa outer membrane to hydrophilic solutes*. J Bacteriol, 1982. **152**(2): p. 636-42.
9. Govan, J.R. and V. Deretic, *Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia*. Microbiol Rev, 1996. **60**(3): p. 539-74.
10. Hancock, R.E. and W.A. Woodruff, *Roles of porin and beta-lactamase in beta-lactam resistance of Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis, 1988. **10**(4): p. 770-5.
11. Nikaido, H., *Multiple antibiotic resistance and efflux*. Curr Opin Microbiol, 1998. **1**(5): p. 516-23.
12. Srikumar, R., E. Tsang, and K. Poole, *Contribution of the MexAB-OprM multidrug efflux system to the beta-lactam resistance of penicillin-binding protein and beta-lactamase-derepressed mutants of Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother, 1999. **44**(4): p. 537-40.
13. Ozer, E.A., J.P. Allen, and A.R. Hauser, *Characterization of the core and accessory genomes of Pseudomonas aeruginosa using bioinformatic tools Spine and AGEnt*. BMC Genomics, 2014. **15**: p. 737.
14. Stover, C.K., et al., *Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen*. Nature, 2000. **406**(6799): p. 959-64.
15. Kiewitz, C. and B. Tummler, *Sequence diversity of Pseudomonas aeruginosa: impact on population structure and genome evolution*. J Bacteriol, 2000. **182**(11): p. 3125-35.
16. Mathee, K., et al., *Dynamics of Pseudomonas aeruginosa genome evolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 3100-5.
17. Kung, V.L., E.A. Ozer, and A.R. Hauser, *The accessory genome of Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Mol Biol Rev, 2010. **74**(4): p. 621-41.
18. Kutter, E. and A. Sulakvelidze, *Bacteriophages : biology and applications*. 2005, Boca Raton, FL: CRC Press. 510 p.
19. Poranen, M.M., R. Daugelavicius, and D.H. Bamford, *Common principles in viral entry*. Annu Rev Microbiol, 2002. **56**: p. 521-38.
20. Weitz, J.S., et al., *Phage-bacteria infection networks*. Trends Microbiol, 2013. **21**(2): p. 82-91.
21. Breitbart, M., et al., *Genomic analysis of uncultured marine viral communities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(22): p. 14250-5.
22. Chibani-Chennoufi, S., et al., *Phage-host interaction: an ecological perspective*. J Bacteriol, 2004. **186**(12): p. 3677-86.
23. Hendrix, R.W., *Bacteriophage HK97: assembly of the capsid and evolutionary connections*. Adv Virus Res, 2005. **64**: p. 1-14.

24. Weinbauer, M.G. and F. Rassoulzadegan, *Are viruses driving microbial diversification and diversity?* Environ Microbiol, 2004. **6**(1): p. 1-11.
25. Tiwari, A., et al., *Survival of two avian respiratory viruses on porous and nonporous surfaces.* Avian Dis, 2006. **50**(2): p. 284-7.
26. Abedon, S.T., *Phage evolution and ecology.* Adv Appl Microbiol, 2009. **67**: p. 1-45.
27. Ionel, A., et al., *Molecular rearrangements involved in the capsid shell maturation of bacteriophage T7.* J Biol Chem, 2011. **286**(1): p. 234-42.
28. Ackermann, H.W., *Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review.* Arch Virol, 2001. **146**(5): p. 843-57.
29. Maniloff, J. and H.W. Ackermann, *Taxonomy of bacterial viruses: establishment of tailed virus genera and the order Caudovirales.* Arch Virol, 1998. **143**(10): p. 2051-63.
30. Duckworth, D.H. and P.A. Gulig, *Bacteriophages: potential treatment for bacterial infections.* BioDrugs, 2002. **16**(1): p. 57-62.
31. Campbell, A., *The future of bacteriophage biology.* Nat Rev Genet, 2003. **4**(6): p. 471-7.
32. Hendrix, R.W., et al., *Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2192-7.
33. Calendar, R., *The bacteriophages.* 2nd ed. 2006, Oxford ; New York: Oxford University Press. xiii, 746 p.
34. Lavigne, R., et al., *Unifying classical and molecular taxonomic classification: analysis of the Podoviridae using BLASTP-based tools.* Res Microbiol, 2008. **159**(5): p. 406-14.
35. Tortora, G.J., B.R. Funke, and C.L. Case, *Microbiology : an introduction.* 11th ed. 2013, Boston: Pearson. xviii, 818, 121 p.
36. Lwoff, A., *Lysogeny.* Bacteriol Rev, 1953. **17**(4): p. 269-337.
37. Das, B., J. Bischerour, and F.X. Barre, *Molecular mechanism of acquisition of the cholera toxin genes.* Indian J Med Res, 2011. **133**: p. 195-200.
38. Milo, R.a. and R.a. Phillips, *Cell biology by the numbers.*
39. Aksyuk, A.A. and M.G. Rossmann, *Bacteriophage assembly.* Viruses, 2011. **3**(3): p. 172-203.
40. Veesler, D. and J.E. Johnson, *Virus maturation.* Annu Rev Biophys, 2012. **41**: p. 473-96.
41. Pedulla, M.L., et al., *Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes.* Cell, 2003. **113**(2): p. 171-82.
42. Suttle, C.A., *Marine viruses--major players in the global ecosystem.* Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(10): p. 801-12.
43. Forterre, P., *The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions.* Virus Res, 2006. **117**(1): p. 5-16.
44. McGrath, S., G.F. Fitzgerald, and D. van Sinderen, *The impact of bacteriophage genomics.* Curr Opin Biotechnol, 2004. **15**(2): p. 94-9.
45. Levin, B.R. and J.J. Bull, *Population and evolutionary dynamics of phage therapy.* Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(2): p. 166-73.
46. Thiel, K., *Old dogma, new tricks--21st Century phage therapy.* Nat Biotechnol, 2004. **22**(1): p. 31-6.
47. Zhang, S., *Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly.* Nat Biotechnol, 2003. **21**(10): p. 1171-8.
48. Landy, A. and W. Ross, *Viral integration and excision: structure of the lambda att sites.* Science, 1977. **197**(4309): p. 1147-60.
49. Harshey, R.M., *Transposable Phage Mu.* Microbiol Spectr, 2014. **2**(5).
50. Ravin, N.V., *Replication and Maintenance of Linear Phage-Plasmid N15.* Microbiol Spectr, 2015. **3**(1): p. PLAS-0032-2014.

51. Boram, W. and J. Abelson, *Bacteriophage Mu integration: on the mechanism of Mu-induced mutations*. J Mol Biol, 1971. **62**(1): p. 171-8.
52. Judson, N. and J.J. Mekalanos, *Transposon-based approaches to identify essential bacterial genes*. Trends Microbiol, 2000. **8**(11): p. 521-6.
53. Hamer, L., et al., *Recent advances in large-scale transposon mutagenesis*. Curr Opin Chem Biol, 2001. **5**(1): p. 67-73.
54. Grundy, F.J. and M.M. Howe, *Morphogenetic structures present in lysates of amber mutants of bacteriophage Mu*. Virology, 1985. **143**(2): p. 485-504.
55. Fitts, R.A. and A.L. Taylor, *Integration of bacteriophage Mu at host chromosomal replication forks during lytic development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(5): p. 2801-5.
56. Daniell, E., R. Roberts, and J. Abelson, *Mutations in the lactose operon caused by bacteriophage Mu*. J Mol Biol, 1972. **69**(1): p. 1-8.
57. Waggoner, B.T., et al., *Identification of the bacteriophage Mu kil gene*. Virology, 1989. **173**(2): p. 378-89.
58. Coelho, A., et al., *Transposition studies using a ColE1 derivative carrying bacteriophage Mu*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1981. **45 Pt 1**: p. 323-8.
59. Mizuuchi, K. and R. Craigie, *Mechanism of bacteriophage mu transposition*. Annu Rev Genet, 1986. **20**: p. 385-429.
60. Madigan, M.T., *Brock biology of microorganisms*. 13th ed. 2012, San Francisco: Benjamin Cummings. xxviii, 1043, 77 p.
61. Shapiro, J.A., *Molecular model for the transposition and replication of bacteriophage Mu and other transposable elements*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(4): p. 1933-7.
62. Sepulveda-Robles, O., L. Kameyama, and G. Guarneros, *High diversity and novel species of Pseudomonas aeruginosa bacteriophages*. Appl Environ Microbiol, 2012. **78**(12): p. 4510-5.
63. Cazares, A., G. Mendoza-Hernandez, and G. Guarneros, *Core and accessory genome architecture in a group of Pseudomonas aeruginosa Mu-like phages*. BMC Genomics, 2014. **15**: p. 1146.
64. Lee, D.G., et al., *Genomic analysis reveals that Pseudomonas aeruginosa virulence is combinatorial*. Genome Biol, 2006. **7**(10): p. R90.
65. Hendrix, R.W., et al., *The origins and ongoing evolution of viruses*. Trends Microbiol, 2000. **8**(11): p. 504-8.
66. Comeau, A.M., et al., *Modular architecture of the T4 phage superfamily: a conserved core genome and a plastic periphery*. Virology, 2007. **362**(2): p. 384-96.
67. Juhala, R.J., et al., *Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: pervasive genetic mosaicism in the lambdaoid bacteriophages*. J Mol Biol, 2000. **299**(1): p. 27-51.
68. Gilcrease, E.B., et al., *Nucleotide sequence of the head assembly gene cluster of bacteriophage L and decoration protein characterization*. J Bacteriol, 2005. **187**(6): p. 2050-7.
69. Qin, L., et al., *Structure of the small outer capsid protein, Soc: a clamp for stabilizing capsids of T4-like phages*. J Mol Biol, 2010. **395**(4): p. 728-41.
70. Ishii, T. and M. Yanagida, *The two dispensable structural proteins (soc and hoc) of the T4 phage capsid; their purification and properties, isolation and characterization of the defective mutants, and their binding with the defective heads in vitro*. J Mol Biol, 1977. **109**(4): p. 487-514.
71. Fokine, A., et al., *Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 6003-8.
72. Iwasaki, K., et al., *Molecular architecture of bacteriophage T4 capsid: vertex structure and bimodal binding of the stabilizing accessory protein, Soc*. Virology, 2000. **271**(2): p. 321-33.
73. Steven, A.C., et al., *Conformational changes of a viral capsid protein. Thermodynamic rationale for proteolytic regulation of bacteriophage T4 capsid expansion, co-operativity, and super-stabilization by soc binding*. J Mol Biol, 1992. **228**(3): p. 870-84.

74. Hayden, M., M.B. Adams, and S. Casjens, *Bacteriophage L: chromosome physical map and structural proteins*. *Virology*, 1985. **147**(2): p. 431-40.
75. Earnshaw, W.C. and S.R. Casjens, *DNA packaging by the double-stranded DNA bacteriophages*. *Cell*, 1980. **21**(2): p. 319-31.
76. Dokland, T. and H. Murialdo, *Structural transitions during maturation of bacteriophage lambda capsids*. *J Mol Biol*, 1993. **233**(4): p. 682-94.
77. Yang, F., et al., *Novel fold and capsid-binding properties of the lambda-phage display platform protein gpD*. *Nat Struct Biol*, 2000. **7**(3): p. 230-7.
78. Yang, Q., N.K. Maluf, and C.E. Catalano, *Packaging of a unit-length viral genome: the role of nucleotides and the gpD decoration protein in stable nucleocapsid assembly in bacteriophage lambda*. *J Mol Biol*, 2008. **383**(5): p. 1037-48.
79. Lander, G.C., et al., *Bacteriophage lambda stabilization by auxiliary protein gpD: timing, location, and mechanism of attachment determined by cryo-EM*. *Structure*, 2008. **16**(9): p. 1399-406.
80. Sternberg, N. and R. Weisberg, *Packaging of coliphage lambda DNA. II. The role of the gene D protein*. *J Mol Biol*, 1977. **117**(3): p. 733-59.
81. Wendt, J.L. and M. Feiss, *A fragile lattice: replacing bacteriophage lambda's head stability gene D with the shp gene of phage 21 generates the Mg²⁺-dependent virus, lambda shp*. *Virology*, 2004. **326**(1): p. 41-6.
82. Galisteo, M.L. and J. King, *Conformational transformations in the protein lattice of phage P22 procapsids*. *Biophys J*, 1993. **65**(1): p. 227-35.
83. Duda, R.L., et al., *Structural transitions during bacteriophage HK97 head assembly*. *J Mol Biol*, 1995. **247**(4): p. 618-35.
84. Heymann, J.B., et al., *Dynamics of herpes simplex virus capsid maturation visualized by time-lapse cryo-electron microscopy*. *Nat Struct Biol*, 2003. **10**(5): p. 334-41.
85. Morgan, G.J., et al., *Bacteriophage Mu genome sequence: analysis and comparison with Mu-like prophages in Haemophilus, Neisseria and Deinococcus*. *J Mol Biol*, 2002. **317**(3): p. 337-59.
86. Hanahan, D., J. Jessee, and F.R. Bloom, *Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria*. *Methods Enzymol*, 1991. **204**: p. 63-113.
87. Green, M.R., J. Sambrook, and J. Sambrook, *Molecular cloning : a laboratory manual*. 4th ed. 2012, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
88. De La Cruz, A., *Caracterización del gen g2 del fago H70 de Pseudomonas aeruginosa como anti-CRISPR*, in *Departamento de Genética y Biología Molecular 2016*, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional: México. p. 95.
89. Grocock, R.J. and P.M. Sharp, *Synonymous codon usage in Pseudomonas aeruginosa PA01*. *Gene*, 2002. **289**(1-2): p. 131-9.
90. Choi, K.H., A. Kumar, and H.P. Schweizer, *A 10-min method for preparation of highly electrocompetent Pseudomonas aeruginosa cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation*. *J Microbiol Methods*, 2006. **64**(3): p. 391-7.
91. Bornhorst, J.A. and J.J. Falke, *Purification of proteins using polyhistidine affinity tags*. *Methods Enzymol*, 2000. **326**: p. 245-54.
92. Santini, C., et al., *Efficient display of an HCV cDNA expression library as C-terminal fusion to the capsid protein D of bacteriophage lambda*. *J Mol Biol*, 1998. **282**(1): p. 125-35.
93. Mikawa, Y.G., I.N. Maruyama, and S. Brenner, *Surface display of proteins on bacteriophage lambda heads*. *J Mol Biol*, 1996. **262**(1): p. 21-30.
94. Sternberg, N. and R.H. Hoess, *Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(5): p. 1609-13.
95. Sharp, P.M. and W.H. Li, *Codon usage in regulatory genes in Escherichia coli does not reflect selection for 'rare' codons*. *Nucleic Acids Res*, 1986. **14**(19): p. 7737-49.

96. West, S.E. and B.H. Iglewski, *Codon usage in Pseudomonas aeruginosa*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(19): p. 9323-35.
97. Bentley, W.E., et al., *Plasmid-encoded protein: the principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria*. Biotechnology Bioengineering, 1990. Biotechnol Bioeng, 2009. **102**(5): p. 1284-97; discussion 1283.
98. Wang, Z., et al., *Effects of the presence of ColE1 plasmid DNA in Escherichia coli on the host cell metabolism*. Microb Cell Fact, 2006. **5**: p. 34.

ANEXOS.

1. Medios y Soluciones

Medio LB: 10 g bacto-triptona, 5 g extracto de levadura, 5 g NaCl. Agregar 20 g agar cuando se preparan cajas. Llevar a 1 litro con agua destilada. Esterilizar con autoclave.

TMG: 11.7 g NaCl, 1 g gelatina, 1 ml tris HCl 1 M a pH 8.0, 0.5 ml MgSO₄ 1 M. Ajustar el pH a 7.4 con KOH. Esterilizar con autoclave.

TØ suave: 10 g bacto-triptona, 10 g agar, 2.5 g NaCl, 2 ml NaOH 2 M. Agregar 1 ml MgSO₄ 1 M cuando se preparen cajas. Llevar a un litro con agua destilada. Esterilizar con autoclave.

Preparación de células quimiocompetentes

A partir de una solución stock 1M de CaCl₂ (147.01 g en 1000 mL), se prepararon 200 ml de 100 mM de CaCl₂ (20 mL de la solución stock 1M y 180 mL de agua destilada) y se guardaron en refrigeración a 4° C. (La solución se debe esterilizar por autoclave para la preparación de las células)

Preparación de células electrocompetetes – Pseudomonas aeruginosa

A partir de una solución stock 1M de Sacarosa (342.3 g en 1000 mL) se prepararon 100 mL de 300 mM de sacarosa (30 mL de la solución stock 1M y 70 mL de agua destilada) y se guardó en refrigeración a 4° C. (La solución se debe filtrar)

Electroforesis

Buffer *stock* TAE 50X: 242 g tris, 57.1 ml ácido acético, 100 ml EDTA 0.5 M pH 8.0. Llevar a un litro con agua destilada. Para corrimientos electroforéticos se disuelven 20 ml en 980 ml de agua destilada.

Buffer de carga 6X

Azul de bromofenol al 1% 250 μ l

Glicerol estéril 400 μ l

TAE 1X 350 μ l

Mezclar y guardar a temperatura ambiente. Para el corrimiento de muestras, el buffer debe de estar a una concentración 1X.

Preparación del gel de Agarosa al 1%

Disolver la solución 50X de TAE a una concentración final de 1X. Disolver por calentamiento 1 g de agarosa (Sigma) en 100 ml de TAE 1X. Vaciar en el molde y una vez gelificado, retirar el peine y los sellos. Para el corrimiento procurar cubrir el gel con suficiente solución de TAE 1X.

Geles de proteínas SDS-PAGE

Acriamida/Bis (30% T, 2.67 % C)

Acrilamida (29.2 g/100 ml) 87.60 g

N'N'-metilenbisacrilamida 2.40 g

Agua destilada hasta 300 ml

Filtrar y almacenar a 4°C en frasco ambar (máximo 30 días).

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (150 ml)

Tris base (18.15 g/100 ml) 27.23 g

Agua destilada 80 ml

Ajustar pH 8.8 con 6 N HCl

Agua destilada hasta 150 ml

Almacenar a 4° C

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Tris base 6.00 g

Agua destilada 60 ml

Ajustar pH 6.87 con 6 N HCl

Glicina	144.10 g
SDS	10.00 g
Agua destilada	hasta 1L

Solución de tinción – 500 ml

Coomassie Blue R-250	0.125 g
Metanol	200 ml
Ácido acético	3.5 ml

Mezclar antes el Coomassie con el metanol durante 5 min. Llevar a 500 ml con agua destilada

Solución para desteñir – 500 ml

Metanol	50 ml
Ácido acético	35 ml
Agua destilada	hasta 500 ml

Western Blot

Buffer de transferencia: 100 ml *tank* buffer, 200 ml metanol. Llevar a un litro con agua destilada.

Tank buffer: 12 g tris, 57.6 g glicina, 40 ml de SDS al 10%. Llevar a un litro con agua destilada. No es necesario medir el pH.

Stock TBS 10X: 80 g NaCl, 24.2 g Trizma base, ajustar pH a 7.6 con ácido clorhídrico.

TBS-Tween al 0.05% 1X: 50 ml stock PBS 10X, se adicionan 250 µl de Tween 20, llevar a 500 mL de agua bidestilada o mili Q

Soluciones de cloruro de cesio con densidades de 1.7, 1.5, 1.3 y 1.08
 Datos de Concentración, Índice refractivo y Densidad del Cloruro de Cesio a 25°C.

Density (g/cm3)*	Refractive Index, n_D	% by Weight	mg/ml of Solution**	Molarity	Density (g/cm3)*	Refractive Index, n_D	% by Weight	mg/ml of Solution**	Molarity
1.0047	1.3333	1	10.0	0.056	1.336	1.3657	34	454.2	2.698
1.0125	1.3340	2	20.2	0.119	1.3496	1.3670	35	472.4	2.806
1.0204	1.3348	3	30.6	0.182	1.363	1.3683	36	490.7	2.914
1.0284	1.3356	4	41.1	0.244	1.377	1.3696	37	509.5	3.026
1.0365	1.3364	5	51.8	0.308	1.391	1.3709	38	528.6	3.140
1.0447	1.3372	6	62.8	0.373	1.406	1.3722	39	548.3	3.257
1.0531	1.3380	7	73.7	0.438	1.4196	1.3735	40	567.8	3.372
1.0615	1.3388	8	84.9	0.504	1.435	1.3750	41	588.4	3.495
1.0700	1.3397	9	96.3	0.572	1.450	1.3764	42	609.0	3.617
1.0788	1.3405	10	107.9	0.641	1.465	1.3778	43	630.0	3.742
1.0877	1.3414	11	119.6	0.710	1.481	1.3792	44	651.6	3.870
1.0967	1.3423	12	131.6	0.782	1.4969	1.3807	45	673.6	4.001
1.1059	1.3432	13	143.8	0.854	1.513	1.3822	46	696.0	4.134
1.1151	1.3441	14	156.1	0.927	1.529	1.3837	47	718.6	4.268
1.1245	1.3450	15	168.7	1.002	1.546	1.3852	48	742.1	4.408
1.1340	1.3459	16	181.4	1.077	1.564	1.3868	49	766.4	4.552
1.1437	1.3468	17	194.4	1.155	1.5825	1.3885	50	791.3	4.700
1.1536	1.3478	18	207.6	1.233	1.601	1.3903	51	816.5	4.849
1.1637	1.3488	19	221.1	1.313	1.619	1.3920	52	841.9	5.000
1.1739	1.3498	20	234.8	1.395	1.638	1.3937	53	868.1	5.156
1.1843	1.3508	21	248.7	1.477	1.658	1.3955	54	895.3	5.317
1.1948	1.3518	22	262.9	1.561	1.6778	1.3973	55	922.8	5.481
1.2055	1.3529	23	277.3	1.647	1.699	1.3992	56	951.4	5.651
1.2164	1.3539	24	291.9	1.734	1.720	1.4012	57	980.4	5.823
1.2275	1.3550	25	306.9	1.823	1.741	1.4032	58	1009.8	5.998
1.2387	1.3561	26	322.1	1.913	1.763	1.4052	59	1040.2	6.178
1.2502	1.3572	27	337.6	2.005	1.7846	1.4072	60	1070.8	6.360
1.2619	1.3584	28	353.3	2.098	1.808	1.4093	61	1102.9	6.550
1.2738	1.3596	29	369.4	2.194	1.831	1.4115	62	1135.8	6.746
1.2858	1.3607	30	385.7	2.291	1.856	1.4137	63	1167.3	6.945
1.298	1.3619	31	402.4	2.390	1.880	1.4160	64	1203.2	7.146
1.311	1.3631	32	419.5	2.492	1.9052	1.4183	65	1238.4	7.355
1.324	1.3644	33	436.9	2.595					

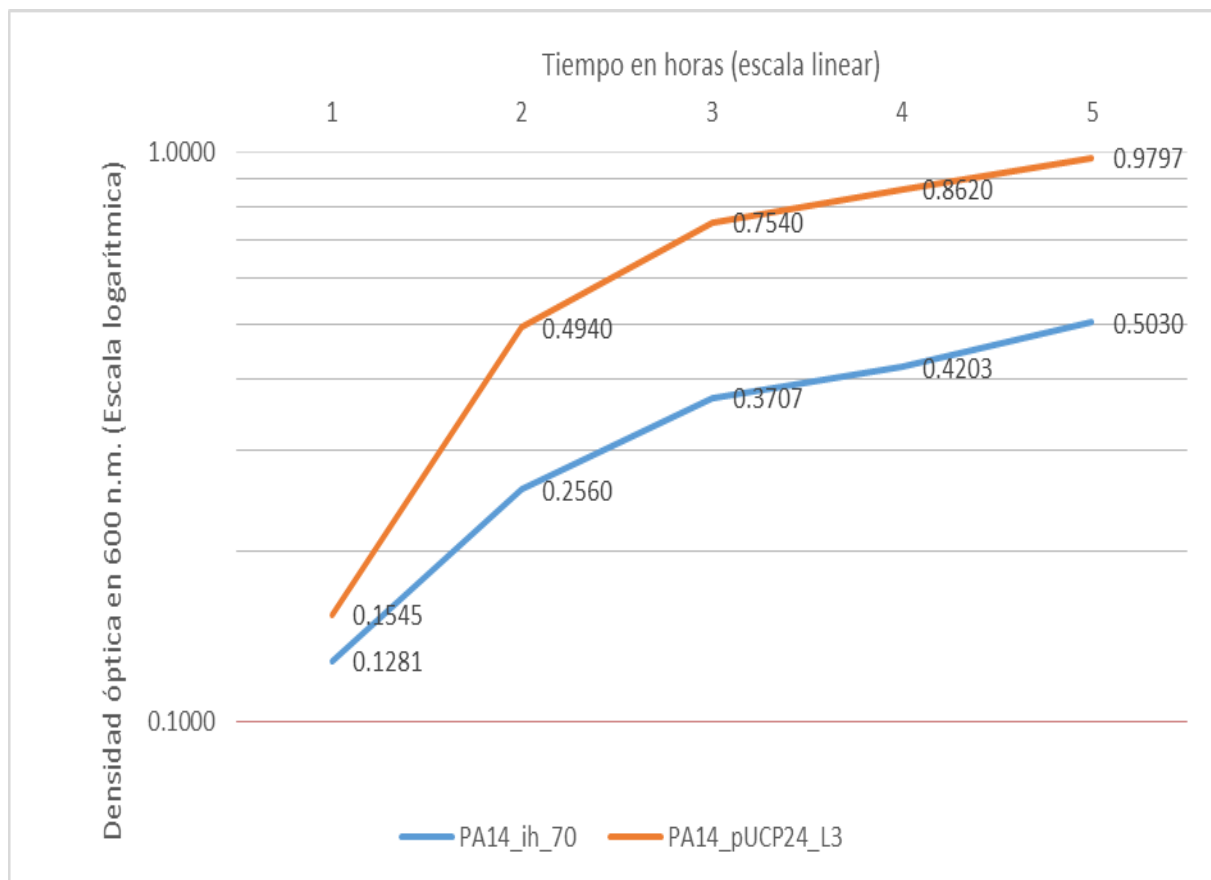


Fig. 20 Cinética de crecimiento de PA14 transformada con el plásmido construido. Los cultivos overnight de las cepas correspondientes se diluyeron en 1:100 en 50 ml de LB con Gentamicina [50µg/ml] y se pusieron en agitación hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0.1 el cual se determinó como tiempo cero y se realizaron 4 mediciones más cada 60 min.