



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

Tesis profesional

“Construcción parcial de un plásmido para deletar el operón *pqq* de  
*Azospirillum brasilense* Sp7”

Para obtener el grado de

Licenciada en Biomedicina

Presenta:

Lizbeth Barrios Cortés

Director:

D.C. Ricardo Carreño López

Asesor metodológico:

D.C. Julia María Alatorre Cruz

Puebla, Pue. 2025

## **Agradecimientos**

Agradezco a la SECIHTI por los recursos otorgados para la realización de esta tesis en base al proyecto CF-2023-I-669 El metabolito bacteriano Pirroloquinolina Quinona en las enfermedades crónicas no transmisibles.

De igual manera agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por la beca que me fue otorgada en base al proyecto VIEP 2024 ID 00093 Microorganismos benéficos para el ambiente y agricultura.

A mis compañeros de laboratorio quienes me ayudaron a solucionar problemas técnicos, darme nuevas opciones para sacar este proyecto adelante y motivarme a seguir trabajando y disfrutando mi estancia en el laboratorio. A mi familia quien en todo momento me apoyan a seguir adelante y me brindan todo su cariño.

A mis asesores de tesis, el D.C. Ricardo y la D.C. Julia María quienes me guiaron durante los últimos años de mi carrera y me enseñaron muchas cosas en el laboratorio, nunca me dejaron sola y siempre estuvieron ahí para resolver mis dudas y para apoyarme en lo que necesitara.

# Índice

Agradecimientos.....	2
Índice .....	3
Abreviaturas.....	5
Resumen .....	9
Introducción.....	10
Antecedentes generales.....	11
Interacción Bacteria-Planta.....	11
<i>Azospirillum brasilense</i> .....	11
Asociación de <i>Azospirillum</i> a plantas .....	12
Solubilización de fosfatos.....	13
Mecanismo de solubilización de fosfatos.....	14
PQQ .....	15
Operón pqq .....	15
Biosíntesis de PQQ.....	16
Antecedentes específicos.....	17
Planteamiento del problema .....	21
Objetivos.....	22
General.....	22
Específicos.....	22
Material y métodos .....	23
Análisis bioinformático .....	23
Material biológico .....	25
Diseño de oligonucleótidos .....	26
Extracción de ADN genómico con sílica.....	27
Amplificación del brazo derecho por PCR.....	27
Precipitación de ADN con alcoholes .....	29
Obtención de pGBD por ligación de PCR Brazo derecho en pGEM-T Easy .....	29
Transformación genética de <i>E. coli</i> con construcción plasmídica.....	30
Preparación de células competentes .....	31

Comprobación de clona del brazo derecho.....	31
Extracción de ADN plasmídico modificado (miniprep + sílica) .....	31
Restricción enzimática de clonas del brazo derecho ( pGBD).....	32
Secuenciación de la clona del brazo derecho (pGBD) .....	33
Obtención del gen de resistencia a antibiótico .....	33
Extracción de ADN de gel de agarosa con sílica.....	34
Clonación del gen $\Omega$ -Gm en pGBD.....	35
Inactivación de enzimas de restricción con Fenol:Cloroformo .....	35
Ligación de $\Omega$ -Gm y pGBD .....	36
Comprobación de clonas pGBDGm.....	36
Amplificación del brazo izquierdo .....	37
Esquema de trabajo.....	39
Resultados.....	40
Análisis bioinformático .....	40
Diseño de oligonucleótidos .....	42
Obtención del amplicón del Brazo derecho.....	46
Análisis de secuenciación.....	51
Obtención del gen de resistencia a gentamicina.....	54
Clonación $\Omega$ -Gm en pGBD .....	56
PCR Brazo izquierdo .....	58
Discusión .....	59
Conclusiones.....	64
Perspectivas .....	64
Bibliografía.....	65
Anexos .....	70
Preparación de soluciones .....	71

## Abreviaturas

°C: Grados centígrados

μl: Microlitros

μm: Micrómetro

μM: Micromolar

*A. brasilense*: *Azospirillum brasilense*

A: Adenina

ADN o DNA: Ácido desoxirribonucleico

Amp: Ampicilina

ARN o RNA: Ácido ribonucleico

bp: Pares de bases

C: Citosina

CaCl<sub>2</sub>: Cloruro de calcio

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O: Cloruro de calcio dihidratado

CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: Sulfato de cobalto(II) heptahidratado

CTAB: Bromuro de Cetiltrimetilamonio

CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O: Sulfato de cobre(II) pentahidratado

ddNTP: Didesoxinucleótido trifosfato

DMSO: Dimetilsulfóxido

dNTP: Desoxinucleótidos trifosfato

DO: Densidad óptica

*E. coli*: *Escherichia coli*

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : Sulfato ferroso heptahidratado

g: Gramo

G: Guanina

Gm: Gentamicina

$\text{H}_2\text{O}$ : Agua

$\text{H}_3\text{BO}_3$ : Ácido bórico

HCl: Ácido clorhídrico

IPTG: Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

$\text{K}_2\text{HPO}_4$ : Fosfato dipotásico

kb: Kilobase

KCl: Cloruro de potasio

KOH: Hidróxido de potasio

L: Litro

lb: Libra

LB: Luria-Bertani

M: Molar

MCS: Sitio de clonación múltiple

mg: Miligramo

$\text{MgCl}_2$ : Cloruro de magnesio

$\text{MgSO}_4$ : Sulfato de magnesio

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : Sulfato de magnesio heptahidratado

ml: Mililitro

mM: Milimolar

MMAB: Medio mínimo para *Azospirillum brasilense*

MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O: Sulfato de manganeso(II) monohidratado

Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O: Sal disódica dihidrato del ácido etilendiaminotetraacético

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O: Dihidrato de molibdato de sodio

NaCl: Cloruro de sodio

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Fosfato de sodio monobásico

NaI: Yoduro de sodio

NaOH: Hidróxido de sodio

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ng: Nanogramo

NH<sub>4</sub>Cl: Cloruro de amonio

nm: Nanómetro

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PQQ: Pirroloquinolina quinona

rpm: Revoluciones por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SOC: Super Óptimo con Represión Catabólica

T: Timina

TBE: Tris-Borato-EDTA

TE: Tris EDTA

T<sub>m</sub>: Temperatura de fusión

U: Unidad

V: Voltios

v: volumen

X: Concentración

X-GAL: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: Sulfato de zinc heptahidratado

$\Delta$ G: Energía libre de Gibbs

$\Omega$ -Gm: Elemento omega gentamicina

## Resumen

*Azospirillum brasilense* Sp7 es una bacteria ocasional de intestino humano y una de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal más estudiadas, conocida por ser fijadora de nitrógeno, productora de biopelícula, fitoreguladores, ácido indol-3-acético y sideróforos con función biocontroladora. En su genoma se encuentran los genes para la biosíntesis de PQQ (*pqqABCDE*), un cofactor de enzimas deshidrogenasas como la glucosa deshidrogenasa, la cual se ha reportado que participa en la solubilización de fosfatos. Con este proyecto se pretende obtener una mutante por delección de operón *pqq* de *Azospirillum brasilense* Sp7 mediante una doble recombinación homóloga, intercambiando el operón *pqq* por un gen de resistencia a antibiótico. Se delimitaron las regiones río arriba y río abajo del operón *pqq* y se diseñaron oligonucleótidos para ambas regiones. Se amplificó la región río abajo, denominado brazo derecho, y se clonó en el vector plasmídico pGEM-T Easy. El gen de resistencia a gentamicina se obtuvo mediante restricción enzimática a partir del plásmido pBSL142, el cual se clonó junto al brazo derecho. Con esto se obtuvo una construcción parcial para posteriormente clonar el brazo izquierdo y continuar con la estrategia de trabajo para obtener la mutante por delección del operón *pqq* de *A. brasilense* Sp7.

## Introducción

Bastante se ha documentado que el suelo es un componente fundamental para el crecimiento y desarrollo de las plantas, particularmente la rizosfera, la fracción de suelo que rodea las raíces de las plantas. La rizosfera contiene una gran diversidad microbiana que comprende desde invertebrados hasta hongos, bacterias y arqueas. Dentro de estos microorganismos, los más estudiados con las bacterias conocidas como Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) debido a la relación mutualista que tienen con las plantas a través de diversos mecanismos como la fijación de nitrógeno, control biológico de patógenos, inducir resistencia sistémica, estimular el crecimiento radicular, mayor eficiencia de absorción de nutrientes, producción de fitohormonas, sideróforos y metabolitos antimicrobianos, solubilización de minerales, activación de mecanismos de resistencia al estrés abiótico y descomposición orgánica (1–6)

Por otra parte, la composición del suelo juega un papel fundamental en el establecimiento de comunidades de microorganismos a través de factores como el pH, la humedad y el contenido nutrimental influenciado por el tipo y composición de exudados radiculares secretados por las plantas (1).

Dentro de las PGPR se encuentran diversos géneros como *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Allorhizobium*, *Agrobacterium*, *Azoarcus*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *Caulobacter*, *Burkholderia*, *Delftia*, *Chromobacterium*, *Frankia*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Mesorhizobium*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Micrococcus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus*, *Streptomyces* y *Serratia* (3).

Es por ello que se ha propuesto el uso de las PGPR como biofertilizantes, por su capacidad de mejorar la absorción de nutrientes de las plantas y protegerlas de agentes patógenos, enfermedades y diferentes factores de estrés. Actualmente ya se usan algunas cepas bacterianas y se continúan las investigaciones para descubrir e incrementar nuevas PGPR que permitan mejorar el rendimiento de los cultivos de una forma sostenible (7).

## Antecedentes generales

### Interacción Bacteria-Planta

Ha sido bien descrito que el suelo contiene una gran diversidad microbiana que incluye hongos, arqueas, bacterias e invertebrados que interactúan con diferentes plantas sobre todo a nivel de rizosfera, promoviendo su crecimiento. La rizosfera comprende una red integrada de raíces de plantas, suelo y microorganismos, principalmente bacterias PGPR. Las PGPR promueven el crecimiento vegetal a través de uno o más mecanismos, como la fijación de nitrógeno, mejora en la adquisición de nutrientes, producción de fitorreguladores, modificación en la composición del exudado radicular, control de patógenos, reducción de estrés biótico y abiótico, supresión de enfermedades de las plantas e incluso induciendo resistencia sistémica a patógenos. Por otra parte, las plantas también influyen en la composición de la microbiota rizosférica a través de los exudados radiculares que sirven como atrayentes o repelentes químicos y fuente de energía para los microorganismos (1–3,8,9).

### *Azospirillum brasilense*

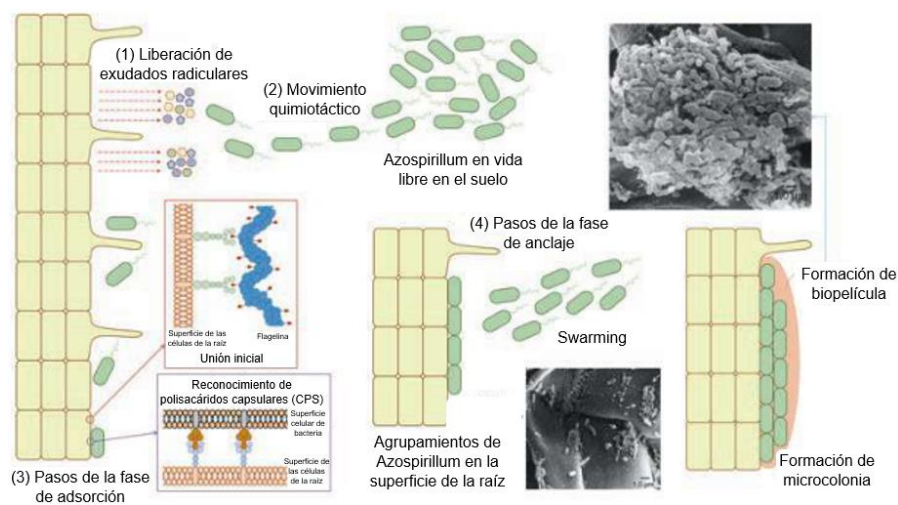
El género *Azospirillum* pertenece a la clase  $\alpha$ -proteobacterias, Gram-negativas de vida libre que no forman esporas, pueden crecer en ambientes microaerófilos, esporádicamente se le encuentra en la microbiota intestinal humana y se considera un eficiente colonizador de la rizosfera de varias plantas (10). Varias especies de este género, incluido *A. brasilense* Sp7, han mostrado la capacidad de fijar nitrógeno de forma directa, solubilizar fosfatos, aliviar el estrés por sequía y salinidad, promover el cambio en la morfología radicular (elongación, aumento de raíz lateral y adventicia, alargamiento y ramificación de pelos radiculares), secretar fitorreguladores, producir sideróforos, inducir cambios en la elasticidad de la pared celular y ajustes osmóticos, además reduce el óxido nitroso, un gas de efecto invernadero que interviene en el cambio climático (3,5,8,10,11).

*Azospirillum brasilense* es la especie más estudiada del género *Azospirillum* (10). Es una PGPR conocida por ser fijadora de nitrógeno, productora de biopelícula, ácido indol-3-

acético (AIA) y sideróforos con función biocontroladora. Se ha reportado que cambia la fisiología de las raíces de las plantas al producir fitorreguladores como auxinas, citocinas, giberelinas y etileno (8). *A. brasilense* es una bacteria microaerófila, cuando no se encuentra en una zona óptima, tiende a adherirse entre sí para reducir la relación superficie-volumen y la difusión de oxígeno a la célula, es decir recurre a la agregación y floculación como respuesta de defensa ante el estrés por oxígeno (12). Posee un solo flagelo polar, para movilidad tipo "swimming" y múltiples flagelos laterales, para movilidad tipo "swarming", implicados en la adhesión en la superficie de las raíces de las plantas (9,13).

### Asociación de *Azospirillum* a plantas

*Azospirillum* comúnmente se asocia a pasto, arroz, trigo y caña de azúcar (14). *Azospirillum* es un género bacteriano muy móvil, lo que le permite moverse hacia condiciones nutricionales favorables (14). Presenta quimiotaxis hacia exudados radiculares como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, compuestos aromáticos, oxígeno y moléculas redox. Malato, succinato y D-fructosa son los atrayentes más efectivos para *A. brasilense* (8,9,13). La adhesión de *Azospirillum* sp. a las raíces de las plantas comienza con su respuesta quimiotáctica hacia los exudados radiculares liberados por la planta, seguido de la adhesión que se lleva a cabo en dos fases como se muestra en la Figura 1:



**Figura 1.** La adhesión de *Azospirillum* a las raíces de las plantas se realiza en dos fases, una de adsorción y otra de anclaje. Se muestran micrografías electrónicas de barrido de raíces colonizadas por *A. brasilense*. Tomado de: (8).

1. Fase de adsorción: La bacteria se une débilmente a las células de la raíz a través de su flagelo polar (flagelina). *Azospirillum* secreta polisacáridos capsulares (CPS) y lectinas que median su adhesión a la superficie de las raíces de la planta. En *A. brasilense* Sp7 se ha identificado una lectina glicosilada con especificidad para L-fucosa y D-galactosa (8).
2. Fase de anclaje: Esta unión es más fuerte y da lugar a la formación de biopelícula. En *A. brasilense* Sp7 el anclaje con la raíz y con otras bacterias está mediado por exopolisacáridos (EPS), principalmente L-arabinosa, formando un clúster con uniones irreversibles (8).

Se ha descrito un total de 21 especies de *Azospirillum*, siendo *A. brasilense* y *A. lipoferum* las más estudiadas y mejor descritas, utilizadas como inóculo para cultivos en varios países (8–10).

### **Solubilización de fosfatos**

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para el correcto desarrollo de las plantas, se utiliza en diversos procesos como fotosíntesis, respiración, señales de transducción, conversión de energía, reproducción, replicación de material genético, síntesis de proteínas, entre otros. En el suelo se encuentra de forma omnipresente, sin embargo, las fuentes de obtención disponibles directamente para las plantas son mínimos debido a que forma compuestos con otros elementos como aluminio (Al), hierro (Fe), o calcio (Ca) a través de sus grupos hidroxilo y carboxilo. El fósforo se puede encontrar en suelos alcalinos principalmente en forma de fosfato de calcio, fosfato de magnesio y fosfato octacálcico, mientras que en suelos ácidos los óxidos de hierro y aluminio absorben fuertemente el P para formar complejos insolubles Fe-P y Al-P, es por ello que el fósforo resulta difícil de asimilar por las plantas (15–20).

Usualmente, se utilizan fertilizantes fosfatados en grandes cantidades para aumentar el rendimiento de los cultivos, aunque la cantidad que logran absorber las plantas es mínima. Además, su uso puede causar daños ambientales como acidificación del suelo y eutrofización de los recursos hídricos (16).

A principios del siglo XX se aislaron bacterias del suelo y algunas mostraron la capacidad de liberar fosfatos a partir de harina de huesos y roca fosfórica. Desde entonces se ha aislado un gran número de bacterias solubilizadoras de fosfatos (PSB por sus siglas en inglés) capaces de convertir el fósforo insoluble en formas solubles, principalmente en fosfatos, que pueden ser asimilados por las plantas (16).

### **Mecanismo de solubilización de fosfatos**

Se han descrito diferentes mecanismos por los cuales las PSB pueden solubilizar los fosfatos del suelo y de esta forma aumentar la cantidad de fósforo disponible como la secreción de enzimas (fosfatasas), ácidos orgánicos y quelación (sideróforos y polisacáridos extracelulares) (21).

El principal mecanismo de solubilización del fósforo por las PSB consiste en la secreción de ácidos orgánicos como ácido glucónico, málico, succínico, fumárico, acético, cítrico, tartárico, malónico, glutámico, propiónico, butírico, láctico, 2-cetoglucónico, sacarínico y ácido oxálico, los cuales hacen un intercambio directo o quelación en condiciones de pH bajo a través de grupos hidroxilo y carboxilo con iones metálicos en el suelo ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ). Además, la extrusión de protones acidifica el suelo incrementando la solubilidad de sales inorgánicas de fósforo. Muchas PGPR liberan ácidos orgánicos que forman quelatos con cationes divalentes en formas minerales poco solubles, lo que aumenta la disponibilidad del fosfato para ser asimilado por las plantas. Se cree que la oxidación directa de la glucosa a ácido glucónico es la principal forma de solubilización de P en bacterias Gram-negativas (5,15–17,21–24).

En el caso de las PSB que secretan enzimas, se ha reportado que la fosfatasa alcalina (ALP) cataliza la hidrólisis de fosfolípidos y libera fósforo inorgánico en suelos con valores de pH superiores a 7, aunque también existen fosfatasas ácidas (ACP) y neutras que actúan a otros valores de pH. Por otra parte, el mecanismo de quelación a través de sideróforos producidos por PSB, polisacáridos extracelulares y la descomposición de residuos vegetales y animales, se basa en el principio de la unión del grupo funcional a los cationes metálicos en el suelo ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), liberando iones fosfato para la disolución de fosfato (21).

En *P. asiatica* se ha reportado que la solubilización de fosfatos se realiza por la oxidación directa de glucosa a ácido glucónico (GA) en el espacio periplásmico, catalizado por la glucosa deshidrogenasa usando como cofactor a la pirroloquinolina quinona (PQQ) y también por la oxidación del GA a ácido 2-ceto glucónico (2KGA) por la gluconato deshidrogenasa, y por la producción de fosfatasa alcalina (ALP) que actúa sobre los ésteres de fosfato para generar fosfato inorgánico o transferir el grupo fosforilo a otros alcoholes (16,25).

## **PQQ**

PQQ es un cofactor (tipo o-quinona) de quinoproteínas como la glucosa deshidrogenasa, metanol deshidrogenasa, sorbitol deshidrogenasa y glicerol deshidrogenasa, sintetizado principalmente por bacterias Gram-negativas durante la fase estacionaria (18,26–33). La glucosa deshidrogenasa (GDH), ubicada en el espacio periplásmico, requiere tres iones calcio para la unión de PQQ (34,35). PQQ participa en la antioxidación y la eliminación de radicales libres, siendo un componente esencial de alimentos, medicamentos y productos para la salud (36–38). Funciona como cofactor redox debido a que puede aceptar dos electrones y dos protones del sustrato, además al unirse a la GDH, el sustrato se oxida en el exterior de la célula donde podría estar acoplado a la cadena respiratoria y por lo tanto a la producción de ATP (26,30). Se ha reportado que interviene en mecanismos para la promoción del crecimiento vegetal como la solubilización de fosfatos, además de actuar como un antioxidante en plantas eliminando especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) (27,30,39).

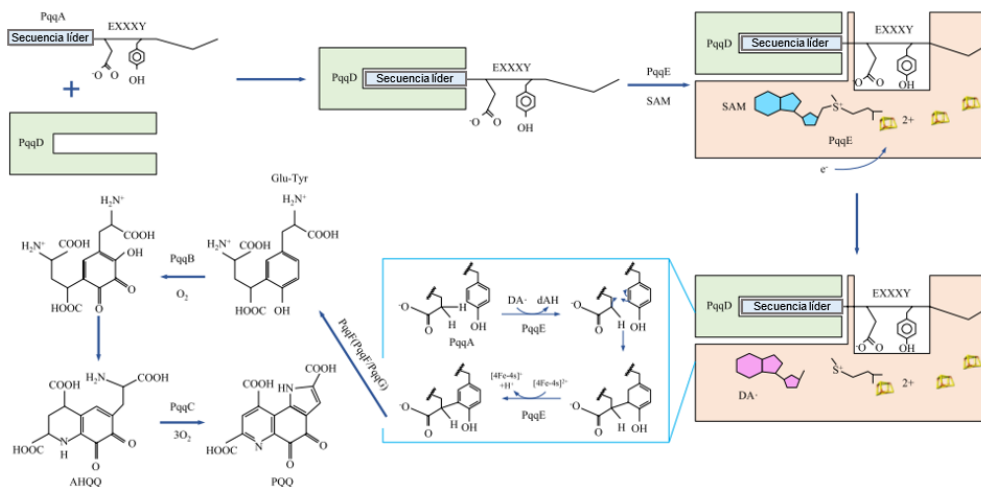
## **Operón *pqq***

Varias especies de bacterias son productoras de PQQ, se estima bioinformáticamente que al menos 126 especies contienen los genes para su biosíntesis, en sus genomas presentan un operón de *pqq* altamente conservado. Este operón consiste en aproximadamente cuatro a seis genes: *pqqA*, *pqqB*, *pqqC*, *pqqD*, *pqqE* y *pqqFG* (26,27,40). Su número y posición depende de la especie en cuestión, algunas contienen *pqqFG* ubicado algunas kilobases río arriba o río abajo del operón y se cree que en algunas especies puede ser reemplazado por isoenzimas

similares (18). En *P. fluorescens* B16 se identificó el gen *pqqH* como regulador transcripcional que actúa sobre los genes *pqq*, mientras que en *Methylobacterium* sp. CLZ se encontró el gen, relativamente único, *pqqL* (18,26). En *Methylobacterium* se encontraron dos grupos de genes para la biosíntesis de PQQ: *pqqABCDE* y *pqqFG* (36). En *Klebsiella pneumoniae* DSM301014 se encontró el operón *pqqABCDEF* y en *Gluconobacter oxydans* el operón *pqqABCDE* (26,29). Por otra parte, *pqqC* se ha propuesto como marcador filogenético para el género *Pseudomonas*, debido a que está altamente conservado (18).

## Biosíntesis de PQQ

La síntesis de PQQ comienza con su precursor PqqA, al cual se le une PqqD que funciona como chaperona para transportar PqqA a PqqE, una enzima radical S-adenosilmetionina (SAM) (Figura 2). PqqE cataliza la formación de un enlace C-C entre el carbón- $\gamma$  del residuo de glutamato y el tercer carbón del anillo del residuo de tirosina de PqqA. PqqF/G hidroliza y separa este producto (Glu-Tyr) del resto del complejo PqqA/D/E. Se agregan dos grupos hidroxilo al anillo de tirosina, luego se condensa el 4-OH de la tirosina y la amina de la cadena principal del glutamato para formar un anillo heterocíclico. Algunos investigadores creen que PqqB cataliza el sustrato Glu-Tyr en ácido 3a-(2-amino-2-carboxietil)-4,5-dioxo-4,5,6,7,8,9-hexahidroquinolina-7,9-dicarboxílico (AHQQ). Finalmente, PqqC cataliza una oxidación de 8 electrones para completar una ciclización estructural convirtiendo AHQQ en PQQ (26–28,36,40).



**Figura 2.** Representación gráfica de la biosíntesis de PQQ realizada por PqqA,B,C,D,E,F/G. Tomado de: (26).

## Antecedentes específicos

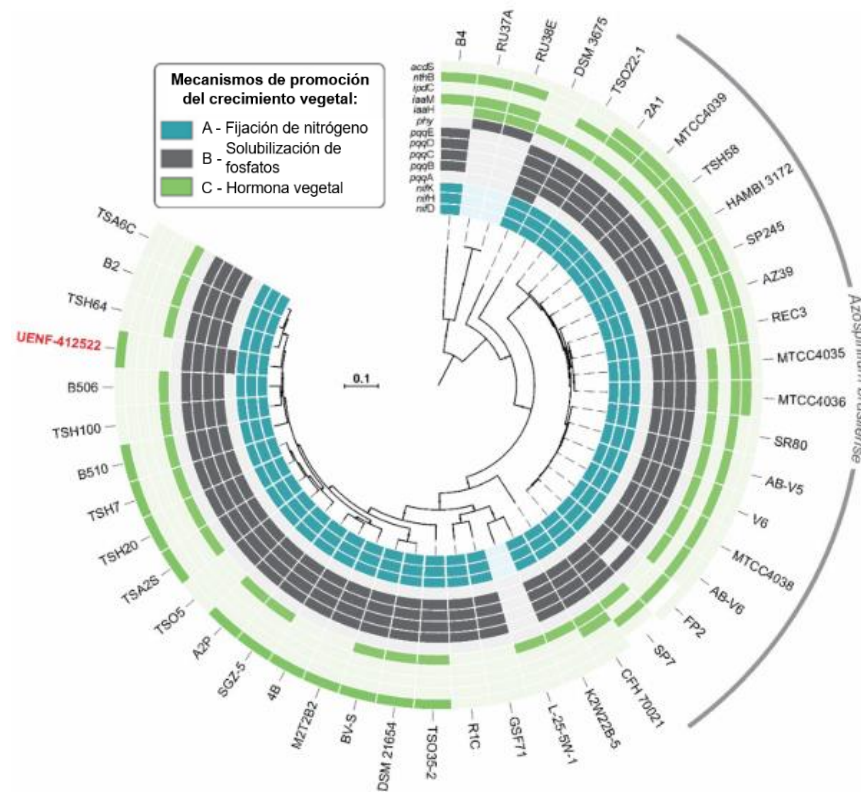
Algunos estudios han identificado genes asociados a la promoción del crecimiento vegetal como *nifHDKWXZ*, *draGT*, *vnfDGK*, deaminasa ACC (*acds*) y genes para la biosíntesis de ácido indol acético (*iaaH*, *iaaM* y *ipdC*) y *pqq* (5).

En 2019, Rasul y colaboradores analizaron 11 PSB aisladas de zonas productoras de arroz basmati en Pakistán, para determinar la base genética de la producción de ácido glucónico para la solubilización de fosfatos. Diseñaron oligonucleótidos para amplificar los genes codificantes de GDH (*gcd*) y PQQ (*pqqC* y *pqqE*). Las cepas solubilizadoras de fosfatos más eficientes fueron *P. putida* y *Acinetobacter soli*, presentaron una gran producción de ácido acético y ácido glucónico, y amplificaron los genes *gcd*, *pqqC* y *pqqE*. Inocularon estas cepas en semillas de arroz y observaron una máxima tasa de germinación de semillas, raíces primarias más cortas y un aumento en el diámetro de las raíces en comparación con el control no inoculado. Con todo esto, concluyeron que una alta actividad de solubilización de fosfato puede inducir cambios en el sistema radicular del arroz y que *Acinetobacter soli* y *P. putida* mejoran la asimilación de fósforo por las plantas posiblemente por la presencia de los genes *gcd*, *pqqC* y *pqqE* codificantes para GDH y PQQ, respectivamente (17).

En 2020, Tahir y colaboradores hicieron un estudio para examinar el papel del gen *pqqE* de las rizobacterias en la producción de ácido orgánico y su relación con la solubilización de fosfato en bacterias *in vitro* e *in vivo*. Aislaron las cepas *Pantoea* sp. WP-5 y *Pseudomonas* sp. NN-4 de la rizovaina del trigo, diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gen *pqqE* de ambas cepas y las analizaron bioinformáticamente confirmando la presencia de *pqqE* en sus genomas. Detectaron y cuantificaron la solubilización de fosfatos y la producción de ácidos orgánicos, el ácido acético fue el significativamente predominante en ambas cepas seguido por el ácido cítrico y el ácido glucónico. Se observó una disminución del pH (de 7 a 4.2-4.9) y un incremento significativo en la solubilización de fosfatos. Ambas cepas se usaron como bioinoculantes para trigo por dos años consecutivos, observaron un aumento en la población de PSB en la rizosfera de las plantas inoculadas, mayor rendimiento de granos de trigo, mayor solubilización de fosfatos, mayor cantidad de nitrógeno y fosfato en el campo, así como una alta concentración de ácido acético y glucónico en los exudados radiculares. Finalmente, concluyeron que *pqqE* tiene un papel indirecto en la solubilización de fosfatos

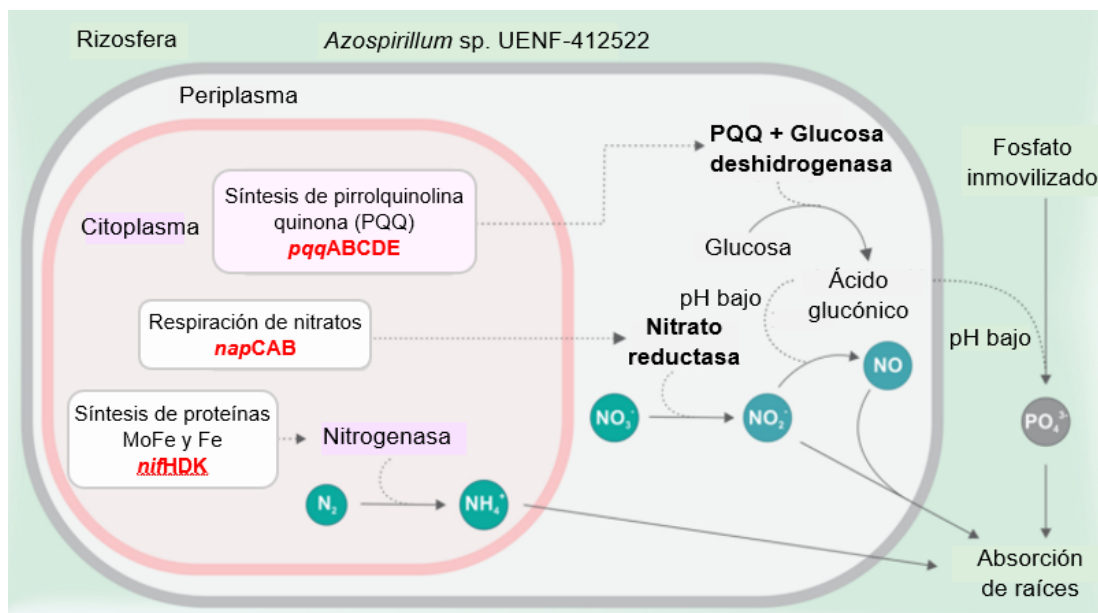
confirmado por una disminución en el pH del medio y por la actividad metabólica funcional como la producción de ácido glucónico, acético y cítrico en *Pantoea* sp. WP-5 y *Pseudomonas* sp. NN-4 en trigo (41).

Rodrigues y colaboradores en 2022 estudiaron los genes codificantes de PQQ para entender la solubilización de fosfatos por medio de la glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ, la GDH-PQQ en *Azospirillum* sp. Evaluaron la presencia de genes que probablemente estuvieran directamente involucrados en la promoción del crecimiento vegetal (fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos y síntesis de hormonas vegetales) en diferentes cepas de *Azospirillum*, realizando un árbol filogenético de máxima verosimilitud construido con las secuencias de proteínas codificadas por su genoma (Figura 3). De las especies que analizaron *Azospirillum* UENF-412522 y *A. halopraeferens* DSM3675 tenían el operón completo (*pqqABCDE*); *Azospirillum* sp. RU37A, *Azospirillum* sp. RU38E y *Azospirillum* sp. L-25-5w-1 carecían del operón *pqq*; *A. brasilense* FP2 carecía de *pqqA* y *pqqD*; la mayoría carecía de *pqqA*, incluyendo *Azospirillum brasilense* Sp7 (5).



**Figura 3.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud de genes promotores del crecimiento vegetal del género *Azospirillum*. Tomado de: (5).

Con base en su análisis genético, investigaron la cepa *Azospirillum* sp. UENF-412522 he hipotetizaron que la solubilización de fosfatos, la fijación de nitrógeno y el crecimiento de las raíces son procesos interconectados en el sistema suelo-raíz. El mecanismo que hipotetizaron es el siguiente. Ante una baja disponibilidad de oxígeno, el nitrato puede utilizarse como aceptor final de electrones en la respiración anaeróbica, produciendo nitrito que se reduce a óxido nítrico a bajo pH en el periplasma. Este ambiente ácido puede ser aprovechado por el ácido glucónico generado por la glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ. El óxido nítrico o nitrito se exportaría entonces a la rizosfera, estimulando el crecimiento radicular. Finalmente, el ácido glucónico también se exporta a la rizosfera, solubilizando el fosfato para su absorción por las células radiculares (Figura 4.). Esta hipótesis relaciona la presencia de genes para la biosíntesis de PQQ con la solubilización de fosfatos a través de la glucosa deshidrogenasa en *Azospirillum* sp. UENF-412522 (5).



**Figura 4.** Representación esquemática de la fijación de nitrógeno (citoplasma), la solubilización de fosfato y la emisión de nitrito/óxido nítrico (periplasma) por *Azospirillum* sp. UENF-412522. Tomado de: (5).

Estas investigaciones nos dan un indicio de la importancia de la solubilización de fosfatos para la promoción del crecimiento vegetal, así como el papel de PQQ en diferentes cepas bacterianas. El estudio de Rodrigues y colaboradores en 2022 reveló la presencia de algunos genes para la biosíntesis de PQQ en diferentes cepas del género *Azospirillum*, sin embargo, aún no se reporta si el operón *pqq* interviene directamente en la solubilización de fosfatos en *A. brasilense* Sp7. En este proyecto se pretende realizar una construcción plasmídica para posteriormente obtener la mutante por delección del operón *pqq* en *A. brasilense* Sp7 y con ello continuar con las investigaciones sobre el papel de los genes para la biosíntesis de PQQ en la promoción del crecimiento vegetal por medio de la solubilización de fosfatos.

## Planteamiento del problema

El fósforo es uno de los elementos más esenciales para el correcto desarrollo de las plantas, se utiliza en diversos procesos como fotosíntesis, respiración, señalización, replicación de material genético, síntesis de proteínas, entre otros. Sin embargo, se encuentra mayoritariamente de forma insoluble en el suelo formando compuestos con otros elementos como Al, Fe, o Ca, de esta forma el fósforo resulta difícil de asimilar para las plantas. Usualmente, se utilizan fertilizantes fosfatados en grandes cantidades para aumentar el rendimiento de los cultivos, aunque la cantidad que logran absorber las plantas es mínima. Por otra parte, existen diversos microorganismos, como las rizobacterias, que tienen la capacidad de solubilizar esos fosfatos del suelo mediante la síntesis de ácidos orgánicos. *Azospirillum brasilense* Sp7 es una de las rizobacterias más estudiadas debido a sus beneficios en la promoción del crecimiento vegetal, además contiene los genes para la síntesis de PQQ, un cofactor que podría jugar un papel esencial en la solubilización de fosfatos. Haciendo una exhaustiva búsqueda, hasta el momento no se cuenta con estudios enfocados en explicar la relación entre los genes para la biosíntesis de PQQ y la solubilización de fosfatos en esta cepa.

En este proyecto se pretende analizar si los genes para la biosíntesis de PQQ de *Azospirillum brasilense* Sp7 intervienen en la promoción del crecimiento vegetal por medio de la solubilización de fosfatos y posiblemente ser un modelo de estudio de regulación de la expresión de los genes *pqq*, a través de una construcción plasmídica que incluya un marcador de selección para posteriormente realizar una mutante por delección del operón *pqq*. Esto permitirá comprender y ampliar el conocimiento actual de la interacción bacteria-planta, biosíntesis de PQQ, así como contribuir en el conocimiento y con el desarrollo de inoculantes bacterianos como una opción sustentable para la agricultura, y de esta forma disminuir el uso de fertilizantes químicos que dañen al suelo, medio ambiente y la salud humana.

## **Objetivos**

### **General**

Realizar la construcción plasmídica parcial para la mutación por delección de los genes *pqqA*, *pqqB*, *pqqC*, *pqqD* y *pqqE* de *Azospirillum brasilense* Sp7.

### **Específicos**

1. Clonar el fragmento río abajo del operón *pqq* de *Azospirillum brasilense* Sp7 en un vector plasmídico.
2. Clonar un marcador de selección, en el vector anterior, adyacente al fragmento río abajo del operón *pqq* de *Azospirillum brasilense* Sp7.

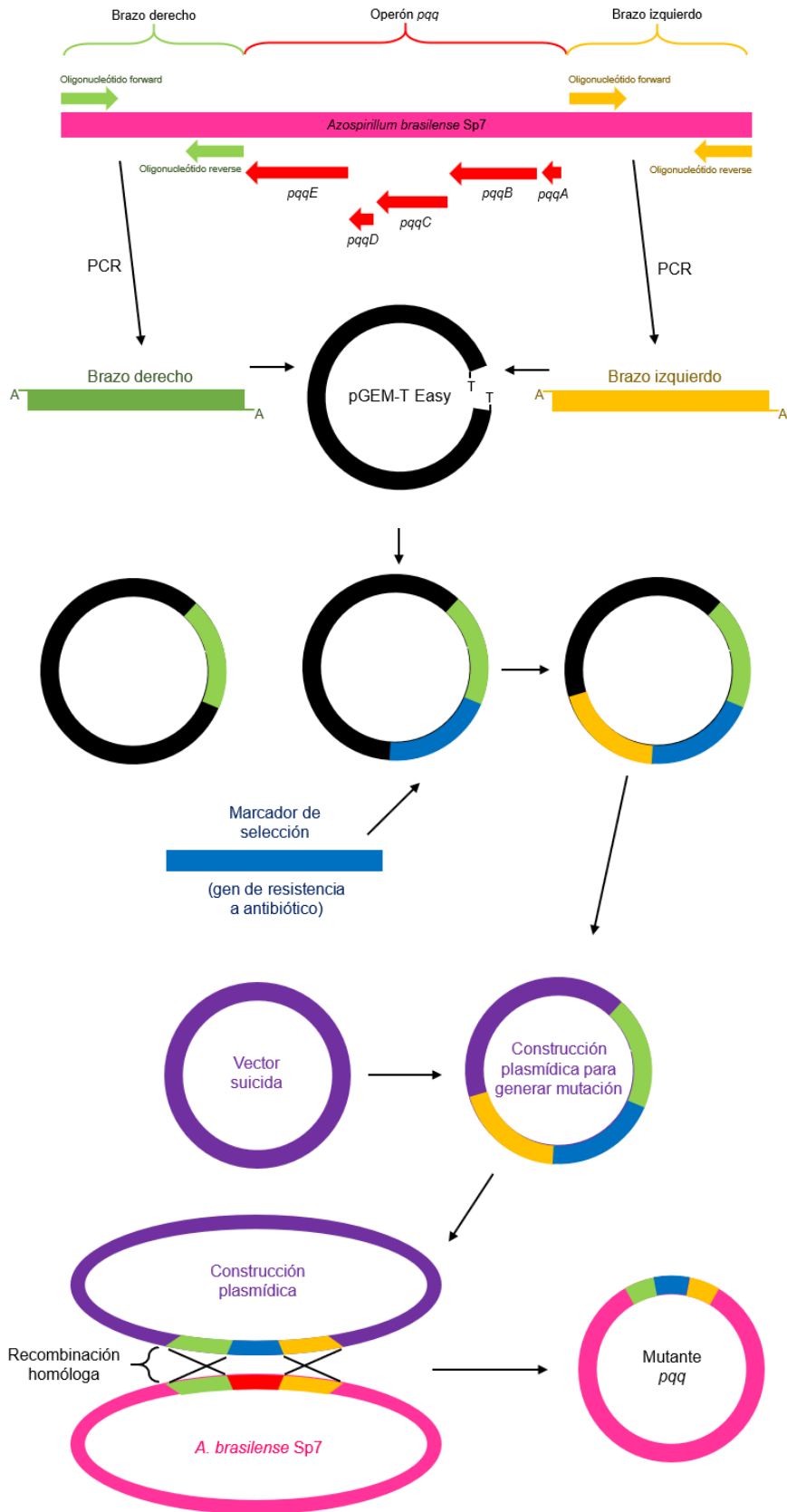
## Material y métodos

### Análisis bioinformático

El análisis de la secuencia del operón *pqq* de *A. brasilense* Sp7 y de la región río abajo del mismo, se realizó mediante los servidores National Center for Biotechnology Information (NCBI), GeneBank y SnapGene. Se analizó la composición del operón, su región promotora y la posición de los genes adyacentes. Con esa información se diseñó la estrategia experimental para obtener la mutante.

Se decidió hacer recombinación homóloga para obtener la mutante por delección del operón *pqq*. Para ello se determinó clonar las regiones río arriba y río abajo del operón *pqq* en un vector plasmídico, y en lugar del operón clonar un marcador de selección como un gen de resistencia a antibiótico. Posteriormente clonar esa construcción en un vector suicida e insertarlo en *A. brasilense* Sp7 para obligar a la bacteria a realizar recombinación homóloga y de esta forma intercambiar el operón *pqq* por el marcador de elección (Figura 5).

Bioinformáticamente, se delimitó la región río abajo del operón *pqq* que se denominó “brazo derecho” y la región río arriba denominada “brazo izquierdo”. Para el análisis de los plásmidos se utilizó Addgene, SnapGene y GeneBank, Así mismo, se utilizaron los servidores NEBcutter v3.0.20 y SnapGene donde se identificaron los sitios de restricción más viables del operón *pqq*, del brazo derecho e izquierdo, el gen de resistencia a antibiótico y los plásmidos utilizados.



**Figura 5.** Estrategia de trabajo diseñada para obtener la mutación por delección del operón *pqq* de *Azospirillum brasilense* Sp7 mediante recombinación homóloga.

## Material biológico

Las cepas bacterianas y los plásmidos empleados en este proyecto se encuentran listados en la Tabla 1. La cepa *A. brasilense* Sp7 fue recuperada a partir de un vial de cultivo puro conservado en ultracongelación a -80°C en glicerol (50% v/v). Se tomaron 50 µl del cultivo y se inocularon en 5 ml de medio mínimo para *Azospirillum brasilense* Sp7 (MMAB) (ver Anexos) sin antibiótico en un tubo Falcon de 50 ml que se dejó incubando en agitación durante 16-18 horas a 32°C. Posteriormente, se analizó el cultivo en un microscopio óptico. Luego se tomaron 10 µl de ese cultivo y se inocularon en una placa Petri con 20 ml de agar MMAB estéril. Para la cepa *Escherichia coli* DH5α, se realizó lo mismo, con la diferencia de que se utilizó medio Luria-Bertani (LB) (ver Anexos) en lugar de medio MMAB y se dejó incubando a 37°C.

El plásmido pGEM-T Easy fue adquirido de manera comercial con la empresa biotecnológica Promega, mientras que los demás plásmidos fueron obtenidos en este proyecto.

**Tabla 1.** Material biológico empleado en este proyecto.

Cepa bacteriana	Características	Referencia
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	Cepa silvestre.	Döbereiner, 1970 Tarrand, <i>et al.</i> 1978
<i>Escherichia coli</i> DH5α	$\Delta lacU169$ $hsdR17$ $recA1$ $endA1$ $gyrA96$ $thiL$ $relA1$ $lacZ\Delta M15$ .	Hanahan, 1983
Plásmido		
pGEM-T Easy	Vector de clonación. $ori$ $lacZ$ promotor T7 y SP6.	Promega
pGBD	Región río abajo del operón $pqq$ de <i>A. brasilense</i> Sp7 clonado en pGEM-T Easy. $Amp^r$ .	Este estudio

pGBDGm	Gen $\Omega$ -Gm clonado en pGBD. Amp <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> .	Este estudio
--------	--	--------------

### Diseño de oligonucleótidos

Se diseñó un par de oligonucleótidos para el brazo derecho y otro par para el brazo izquierdo con ayuda de los servidores OligoAnalyzer Tool, Primer-BLAST y SnapGene. Se tomaron en cuenta varios factores como longitud entre 20-25 pb, contenido de GC entre 40-60%, Tm entre 50°C-70°C, diferencia de Tm entre oligonucleótidos no mayor a 5°C, evitar la formación de estructuras secundarias (hairpins, self-dimers, hetero-dimers) y terminación G, C, CG o GC en el extremo 3' (Tabla 2).

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar el brazo derecho.

Brazo Derecho		
Dirección	Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
<b>Forward</b>	PQQHIND3F25	AGATAGCCGCAGAGGACG
<b>Reverse</b>	PQQSPH1R26	TCTGGGAAGGAAGGAGCAGC

Para el diseño de oligonucleótidos del brazo izquierdo, se hizo el cambio de dos bases para generar sitios de restricción debido a que la región río arriba no contaba con sitios de restricción únicos necesarios para la clonación en el vector plasmídico pGEM-T Easy.

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar el brazo izquierdo. Las letras en color rojo representan la base cambiada para generar los sitios de restricción dentro de los oligonucleótidos. Los sitios de restricción obtenidos se muestran subrayados en color amarillo.

Brazo Izquierdo		
Dirección	Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
<b>Forward</b>	PQQECOR12F30	CGGGGAATTCGTCGTGGGAG
<b>Reverse</b>	PQQSPE12R31	TCCCCACTAGTGAACGTTAGAACG

### **Extracción de ADN genómico con sílica**

En un tubo Falcon de 50 ml se inoculó, en 5 ml de medio MMAB (ver Anexos), una colonia aislada de un cultivo fresco en placa de *A. brasilense* Sp7 y se dejó incubando en agitación durante 16-18 horas a 32°C. Se tomó 1 ml de cultivo y se pasó a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se centrifugó durante 2 minutos a 13000 rpm en la microcentrífuga LabNet Spectrafuge 24D y se decantó el sobrenadante. El pellet bacteriano obtenido se resuspendió en 500 µl de buffer  $TE_{50/20}$  (ver Anexos), se centrifugó durante 2 minutos a 13000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se resuspendió en 450 µl de buffer  $TE_{50/20}$  y se agregaron 10 µl de proteinasa k (10 mg/ml), se homogeneizó invirtiendo el tubo varias veces y se incubó 1 hora a 37°C. Se agregaron 50 µl de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%, se homogeneizó por inversión y se dejó incubando 15 minutos a 37°C. Se agregaron 100 µl de NaCl 5M (ver Anexos), se homogeneizó por inversión y se incubó 10 minutos a 65°C. Se agregaron 100 µl de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), se homogeneizó por inversión y se incubó 15 minutos a 65°C. Se agregaron 200 µl de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 (ver Anexos), se homogeneizó por inversión y se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm. Se repitió el mismo paso hasta que ya no fue visible la interfase blanca. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 500 µl de NaI 6M (ver Anexos) y se homogeneizó por inversión. Se agregaron 20 µl de sílica (ver Anexos), se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 1 minuto a 13000 rpm, se decantó sobrenadante. Se agregaron 500 µl de solución New Wash 1X (ver Anexos) y se resuspendió la sílica por agitación. Se centrifugó 1 minuto a 13000 rpm y se decantó el sobrenadante. Se repitió el mismo paso 2 veces más. Se dejó secando el pellet resultante a 37°C. Se resuspendió en 50 µl de buffer  $TE_{10/1}$  (ver Anexos). Se incubó 5 minutos a 37°C y se centrifugó 2 minutos a 13000 rpm. Finalmente se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml y se almacenó a -20°C.

### **Amplificación del brazo derecho por PCR**

La construcción plasmídica para obtener de la mutación comenzó con la clonación del brazo derecho, posteriormente el marcador de selección y finalmente el brazo izquierdo. Para amplificar el brazo derecho, se realizó PCR en un tubo de microcentrífuga de 0.2 ml a un

volumen final de 25  $\mu$ l. La mezcla de la reacción se muestra en la Tabla 4, se realizaron 3 reacciones de PCR.

**Tabla 4.** Reactivos y cantidades empleados para realizar PCR del brazo derecho.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
H <sub>2</sub> O PISA	14.6	-
Buffer DreamTaq 10X	2.5	1X
ADN de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 (28 ng/ $\mu$ l)	1	1.12 ng
2 mM dNTPs	2.5	0.2 mM
10 $\mu$ M Oligonucleótido forward	2	0.8 $\mu$ M
10 $\mu$ M Oligonucleótido reverse	2	0.8 $\mu$ M
DreamTaq ADN polimerasa (5 U/ $\mu$ l)	0.4	2 U
Volumen final	25	-

Los tubos se colocaron dentro del termociclador LabNet MultiGene Mini donde fue configurado a 30 ciclos, las temperaturas se establecieron con base a las características de los oligonucleótidos empleados (Tabla 5). Se tomaron 5  $\mu$ l del producto de PCR de cada reacción para analizarlos en un gel de agarosa al 0.7% corrido en buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5X a (ver Anexos) a 75 V, el resto (60  $\mu$ l) se usó para clonación.

**Tabla 5.** Condiciones de amplificación para PCR del brazo derecho.

Ciclo	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Tiempo (minutos)
Desnaturalización inicial	95	3:00
Desnaturalización	95	0:45
Alineamiento	59	0:45
Extensión	72	2:00
Extensión final	72	10:00

Atemperamiento	20	$\infty$
Número de ciclos: 30		

### Precipitación de ADN con alcoholes

Un volumen de 60  $\mu$ l del amplicón del brazo derecho se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se agregó una décima de volumen (6  $\mu$ l) de acetato de sodio 3M pH 5.2 (ver Anexos). Luego se agregó 0.7 volúmenes (46.2  $\mu$ l) de isopropanol a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 15 minutos a 13000 rpm en la microcentrífuga LabNet Spectrafuge 24D. Se decantó el sobrenadante con mucho cuidado. Se hizo un lavado con 100  $\mu$ l de etanol al 70% frío. Se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm y se decantó el sobrenadante. Se dejó secando la muestra a 37°C. Se resuspendió en 5  $\mu$ l de agua destilada PISA.

### Obtención de pGBD por ligación de PCR Brazo derecho en pGEM-T Easy

A partir de las PCR precipitadas del brazo derecho, se hizo una reacción de ligación en un tubo de microcentrífuga de 0.2 ml. La mezcla de la reacción se muestra en la Tabla 6. Se homogeneizó con micropipeta y se dejó incubando 1 hora a temperatura ambiente. Se decidió utilizar el vector plasmídico pGEM-T Easy (Promega) para la clonación.

**Tabla 6.** Reacción de ligación para el plásmido pGEM-T Easy.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
2X Rapid ligation buffer T4 DNA ligase	5
pGEM-T Easy (50 ng)	1
Producto de PCR precipitado	3
T4 DNA ligase (3 U/ $\mu$ l)	1
Volumen final	10

### Transformación genética de *E. coli* con construcción plasmídica

En un baño de hielo se colocó la reacción de ligación y 2 viales de células competentes *E. coli* DH5a previamente preparadas en el laboratorio y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En un tubo de microcentrífuga de 0.2 ml se colocaron 90  $\mu\text{l}$  de células competentes + 10  $\mu\text{l}$  de la reacción de ligación. En otro tubo de microcentrífuga de 0.2 ml se colocaron 90  $\mu\text{l}$  de células competentes + 10  $\mu\text{l}$  de agua destilada PISA, este último sirvió control de transformación (sensibilidad y viabilidad). Se homogeneizaron cuidadosamente con una micropipeta y se dejaron incubando por 30 minutos en hielo. Ambos tubos se colocaron en el baño seco digital AccuBlock LabNet a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos, inmediatamente se regresaron al baño de hielo por 2 minutos. En 2 tubos Eppendorf de 1.5 ml se agregó 1 ml de medio SOC (ver Anexos), a uno de los tubos se agregó la transformación y en otro el control de transformación. Ambos tubos se incubaron en agitación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora y 30 minutos. Se prepararon placas de agar LB (ver Anexos) con reactivos de selección (Tabla 7), en ellas se inocularon 200  $\mu\text{l}$  de transformación y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 18 horas. Se seleccionaron al azar 20 colonias blancas y se sembraron en placas con agar LB al 1.5% + Ampicilina (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

**Tabla 7.** Composición de las placas utilizadas para la transformación bacteriana. Se preparó una placa para transformación, una para el control de sensibilidad y otra para el control de viabilidad.

Transformación		Control de sensibilidad		Control de viabilidad	
Agar LB al 1.5%	20 ml	Agar LB al 1.5%	20 ml	Agar LB al 1.5%	20 ml
Ampicilina (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	20 $\mu\text{l}$				
X-GAL (20 $\text{mg}/\text{ml}$ )	20 $\mu\text{l}$	Ampicilina (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	20 $\mu\text{l}$		
IPTG (20 $\text{mg}/100 \mu\text{l}$ )	2.5 $\mu\text{l}$				

### **Preparación de células competentes**

En un tubo Falcon de 50 ml se inoculó, en 5 ml de medio LB (ver Anexos), una colonia aislada de un cultivo fresco en placa de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se dejó incubando en agitación durante 16-18 horas a 37°C. Se tomó 1 ml de cultivo y se inoculó en 100 ml de medio LB en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. Se dejó incubando en agitación a 37°C durante 2-3 horas hasta que alcanzó una DO<sub>600nm</sub> 0.3-0.4. Se tomaron 20 ml cultivo y se pasaron a un tubo de fondo redondo de 50 ml para centrifuga. Se centrifugó durante 10 minutos a 6000 rpm a 4°C en la centrífuga Allegra 64R Beckman Coulter. Se decantó el medio de cultivo y el pellet bacteriano resultante se resuspendió, con movimientos circulares en un baño de hielo, en 20 ml de solución de competencia CaCl<sub>2</sub> 150 mM (ver Anexos) frío. El tubo se dejó reposando sumergido totalmente en hielo durante 30 minutos. Se centrifugó por 10 minutos a 6000 rpm a 4°C y se decantó el sobrenadante. Se hicieron dos lavados más con solución de competencia repitiendo los pasos anteriores. El pellet bacteriano resultante se resuspendió en 0.8 ml de solución de competencia + 0.2 ml de glicerol estéril. Se hicieron alícuotas de 100  $\mu$ l en tubos de microcentrífuga de 0.2 ml y se almacenaron a -80°C.

### **Comprobación de clona del brazo derecho**

Fueron seleccionadas 20 colonias de *E. coli* transformadas con la construcción plasmídica del brazo derecho por su coloración blanca y sembradas en placas de agar LB con ampicilina, se tomaron 5 para comprobar que se haya clonado con éxito el brazo derecho en el vector plasmídico pGEM-T Easy. Dicha comprobación se realizó mediante PCR y restricción enzimática a partir de ADN plasmídico purificado de las clonas seleccionadas al azar. La PCR se realizó siguiendo las mismas condiciones explicadas anteriormente. Las condiciones de la restricción se explican más adelante.

### **Extracción de ADN plasmídico modificado (miniprep + sílica)**

En un tubo Falcon de 50 ml se inoculó, en 5 ml de medio LB (ver Anexos), una colonia aislada de un cultivo fresco en placa de la transformación y se dejó incubando en agitación durante 16-18 horas a 37°C. Se tomó 1 ml de cultivo y se pasó a un tubo Eppendorf de 1.5

ml, se centrifugó durante 2 minutos a 13000 rpm en la microcentrífuga LabNet Spectrafuge 24D y se decantó el sobrenadante. El pellet bacteriano obtenido se resuspendió en 300  $\mu$ l de solución 1 miniprep (ver Anexos). Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 400  $\mu$ l de solución 2 miniprep (ver Anexos), se homogeneizó por inversión y se incubó 5 minutos en un baño de hielo. Se agregó 300  $\mu$ l de solución 3 miniprep (ver Anexos), se homogeneizó por inversión y se incubó 10 minutos en un baño de hielo. Se centrifugó por 10 minutos a 13000 rpm. Se recuperaron 500  $\mu$ l de sobrenadante que se pasaron a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se agregaron dos volúmenes (1 ml) de NaI 6M (ver Anexos), se homogeneizó por inversión. Se agregó 20  $\mu$ l de sílica (ver Anexos), se homogeneizó por inversión y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 1 minuto a 13000 rpm y se decantó el sobrenadante. Se agregaron 800  $\mu$ l de New Wash 1X (ver Anexos), se homogeneizó por inversión hasta resuspender la sílica, se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm y se decantó la solución. Se hicieron 3 lavados más con New Wash 1X repitiendo los pasos anteriores. Se centrifugó durante dos minutos a 13000 rpm y se retiraron las trazas de New Wash 1X con una micropipeta. El tubo se incubó a 37°C hasta que se secase la sílica. Una vez seca, se resuspendió en 30  $\mu$ l de buffer  $TE_{10/1}$  (ver Anexos). Se incubó 5 minutos a 37°C. Se centrifugó durante 3 minutos a 13000 rpm. Finalmente se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml y se almacenó a -20°C.

### Restricción enzimática de clonas del brazo derecho ( pGBD)

Después de realizar PCR a las 5 clonas seleccionadas al azar, se eligió una para hacer restricción enzimática y así comprobar que se hayan clonado con éxito utilizando las enzimas *EcoRI*, *HindIII*, *Sall* y *SpeI* (Tabla 8). El análisis se realizó corriendo las restricciones en un gel de agarosa al 1.2% en buffer TBE 0.5X a 90 V.

**Tabla 8.** Reactivos y cantidades empleados para una simple restricción enzimática.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O PISA	25.3
Buffer enzima de restricción 10X	3

ADN plasmídico pGBD clona 1 (93 ng/ $\mu$ l)	1
Enzima de restricci3n (10 U/ $\mu$ l)	0.2 (2 U)
RNAsa	0.5
Volumen final	30

### **Secuenciaci3n de la clona del brazo derecho (pGBD)**

Una vez que se confirm3 que se haya clonado con 3xito el brazo derecho, mediante PCR y restricci3n enzimática, se mand3 a secuenciar dicha clona para asegurar que la secuencia corresponda a la esperada y para ver el sentido en el que se clon3 en el vector plasmídico, ya que de eso dependi3 el orden y la direcci3n en que se clon3 el gen de resistencia a antibi3tico. Para ello se realiz3 la extracci3n de ADN plasmídico de la clona del brazo derecho seleccionada mediante el kit comercial Zyppy<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep de Zymo Research siguiendo el protocolo del fabricante (ver Anexos). El ADN plasmídico obtenido se mand3 a secuenciar a la Unidad de S3ntesis y Secuenciaci3n de DNA del Instituto de Biotecnolog3a de la UNAM (m3todo de Sanger) con los oligonucle3tidos m13/pUC -40 Fw y m13/pUC Rv. Los resultados se analizaron con el programa BioEdit v7.2.5 y en la base de datos Nucleotide BLAST de NCBI.

### **Obtenci3n del gen de resistencia a antibi3tico**

Luego de analizar los resultados de la secuenciaci3n, se decidi3 clonar el gen de resistencia a antibi3tico. Se escogi3 el gen de resistencia a gentamicina ( $\Omega$ -Gm) del plásmido pBSL142 (42) y se realiz3 la extracci3n de ADN plasmídico con el m3todo modificado miniprep + s3lica descrito anteriormente. Posteriormente se hizo una doble restricci3n enzimática con las enzimas *Hind*III y *Spe*I (Tabla 9) en un tubo de microcentrífuga de 0.2 ml, se homogeneiz3 con micropipeta y se incub3 toda la noche a 37°C.

**Tabla 9.** Reactivos y cantidades empleados para una doble restricción enzimática.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O PISA	20.1
Buffer Tango 10X	3
ADN plasmídico pBSL142 (0.08 $\mu$ g/ $\mu$ l)	6 (0.48 $\mu$ g)
<i>Hind</i> III (10 U/ $\mu$ l)	0.2 (2 U)
<i>Spe</i> I (10 U/ $\mu$ l)	0.2 (2 U)
RNAsa	0.5
Volumen final	30

### **Extracción de ADN de gel de agarosa con sílica**

Se analizó la restricción enzimática del plásmido pBSL142 en un gel de agarosa al 1.2% en buffer TBE 0.5X corriéndola a 90 V durante 30 minutos. Se tiñó 10 minutos en bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml) y después se dejó reposando en agua destilada por otros 10 minutos. El gel se reveló en el transiluminador Cole Parmer 97500-series por unos pocos segundos para ver dónde realizar los cortes y recuperar la banda de interés. Se pesó la banda en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se agregaron dos volúmenes de NaI 6M (ver Anexos) a un volumen de gel (100 mg gel ~ 100  $\mu$ l). Se incubó en el baño seco digital AccuBlock LabNet a 55°C durante 5-10 minutos vortexeando ocasionalmente hasta que la agarosa se disuelva por completo. Se agregó 10  $\mu$ l de sílica (ver Anexos), se homogeneizó por inversión y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 1 minuto a 13000 rpm en la microcentrífuga LabNet Spectrafuge 24D y se decantó el sobrenadante. Se agregaron 500  $\mu$ l de New Wash 1X (ver Anexos), se homogeneizó por inversión hasta resuspender la sílica, se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm y se decantó la solución. Se hicieron dos lavados más con New Wash 1X repitiendo los pasos anteriores. Se centrifugó durante dos minutos a 13000 rpm y se retiraron las trazas de New Wash 1X con una micropipeta. El tubo se incubó a 37°C hasta que se secase la sílica. Una vez seca, se resuspendió en 10  $\mu$ l de buffer *TE*<sub>10/1</sub> (ver Anexos). Se incubó 5 minutos a 37°C. Se centrifugó durante 3 minutos a 13000 rpm. Finalmente se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml.

### Clonación del gen $\Omega$ -Gm en pGBD

Para clonar el gen  $\Omega$ -Gm, primero se abrió el plásmido pGBD mediante restricción enzimática con las enzimas *Hind*III y *Spe*I (Tabla 10) en un tubo de microcentrífuga de 0.2 ml, la reacción se homogeneizó con micropipeta y se incubó toda la noche a 37°C. Posteriormente se inactivaron las enzimas de restricción.

**Tabla 10.** Reactivos y cantidades empleados para abrir el plásmido pGBD mediante doble restricción enzimática.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O PISA	20.1
Buffer Tango 10X	3
ADN plasmídico pGBD (0.092 $\mu$ g/ $\mu$ l)	6 (0.552 $\mu$ g)
<i>Hind</i> III (10 U/ $\mu$ l)	0.2 (2 U)
<i>Spe</i> I (10 U/ $\mu$ l)	0.2 (2 U)
RNAse	0.5
Volumen final	30

### Inactivación de enzimas de restricción con Fenol:Cloroformo

A una reacción de restricción de 30  $\mu$ l en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 120  $\mu$ l de agua destilada PISA. Se agregaron 100  $\mu$ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1 (ver Anexos), se homogeneizó por inversión y se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm en la microcentrífuga LabNet Spectrafuge 24D. Se recuperó el sobrenadante con una micropipeta sin tocar la fase densa y se pasó a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se hicieron 3 lavados con 150  $\mu$ l de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 (ver Anexos) y se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm. Se recuperaron 100  $\mu$ l de sobrenadante sin tocar la fase densa y se pasó a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se agregó 0.7 volúmenes (70  $\mu$ l) de isopropanol a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 15 minutos a 13000 rpm. Se decantó el sobrenadante con mucho cuidado. Se hicieron 2 lavados con 500  $\mu$ l de etanol al 70% frío. Se

centrifugó 10 minutos a 13000 rpm y se decantó el sobrenadante. Se dejó secando la muestra a 37°C. Se resuspendió en 10 µl de agua destilada PISA.

### Ligación de Ω-Gm y pGBD

A partir de las restricciones de pGBD y Ω-Gm con *Hind*III y *Spe*I, se hizo una reacción de ligación (Tabla 11) en un tubo de microcentrífuga de 0.2 ml. Se homogeneizó con micropipeta y se dejó incubando una hora a temperatura ambiente. Después se transformó en células competentes *E. coli* DH5α siguiendo la misma metodología descrita anteriormente. Las colonias blancas obtenidas se sembraron en placas de agar LB al 1.5% + Ampicilina (200 µg/ml) + Gentamicina (8 µg/ml).

**Tabla 11.** Reacción de ligación para la clonación de Ω-Gm en pGBD.

Reactivo	Volumen (µl)
2X Rapid ligation buffer T4 DNA ligase	5
pGBD abierto	1
Gen Ω-Gm	3
T4 DNA ligase (3 U/µl)	1
Volumen final	10

### Comprobación de clonas pGBDGm

Para comprobar que se haya clonado con éxito el gen Ω-Gm en el plásmido pGBD, además de ver el crecimiento de las clonas en placas de agar LB con los antibióticos de selección (ampicilina y gentamicina), se hizo restricción enzimática en la enzima *Eco*RI. La reacción de ligación (Tabla 12) se hizo en un tubo de microcentrífuga de 0.2 ml. Se homogeneizó con micropipeta y se dejó incubando 1 hora a 37°C. Posteriormente se corrió la restricción en un gel de agarosa al 1.2% en buffer TBE 0.5X a 90 V.

**Tabla 12.** Reactivos y cantidades empleados para una doble restricción enzimática.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O PISA	25.8
Buffer <i>Eco</i> RI 10X	3
ADN plasmídico pGBDGm (131.5 ng/ $\mu$ l)	1
<i>Eco</i> RI (10 U/ $\mu$ l)	0.2 (2 U)
Volumen final	30

### Amplificación del brazo izquierdo

Para amplificar el brazo izquierdo, se realizó PCR en un tubo de microcentrífuga de 0.2 ml a un volumen final de 25  $\mu$ l (Tabla 13). Se hicieron 9 reacciones de PCR iguales.

**Tabla 13.** Reactivos y cantidades empleados para realizar PCR del brazo izquierdo.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
H <sub>2</sub> O PISA	16.25	-
Buffer DreamTaq 10X	2.5	1X
ADN de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 (28 ng/ $\mu$ l)	1	1.12 ng
2 mM dNTPs	1	0.2 mM
10 $\mu$ M Oligonucleótido forward	1.5	0.8 $\mu$ M
10 $\mu$ M Oligonucleótido reverse	1.5	0.8 $\mu$ M
DreamTaq ADN polimerasa (5 U/ $\mu$ l)	0.5	2 U
DMSO	0.75	3%
Volumen final	25	-

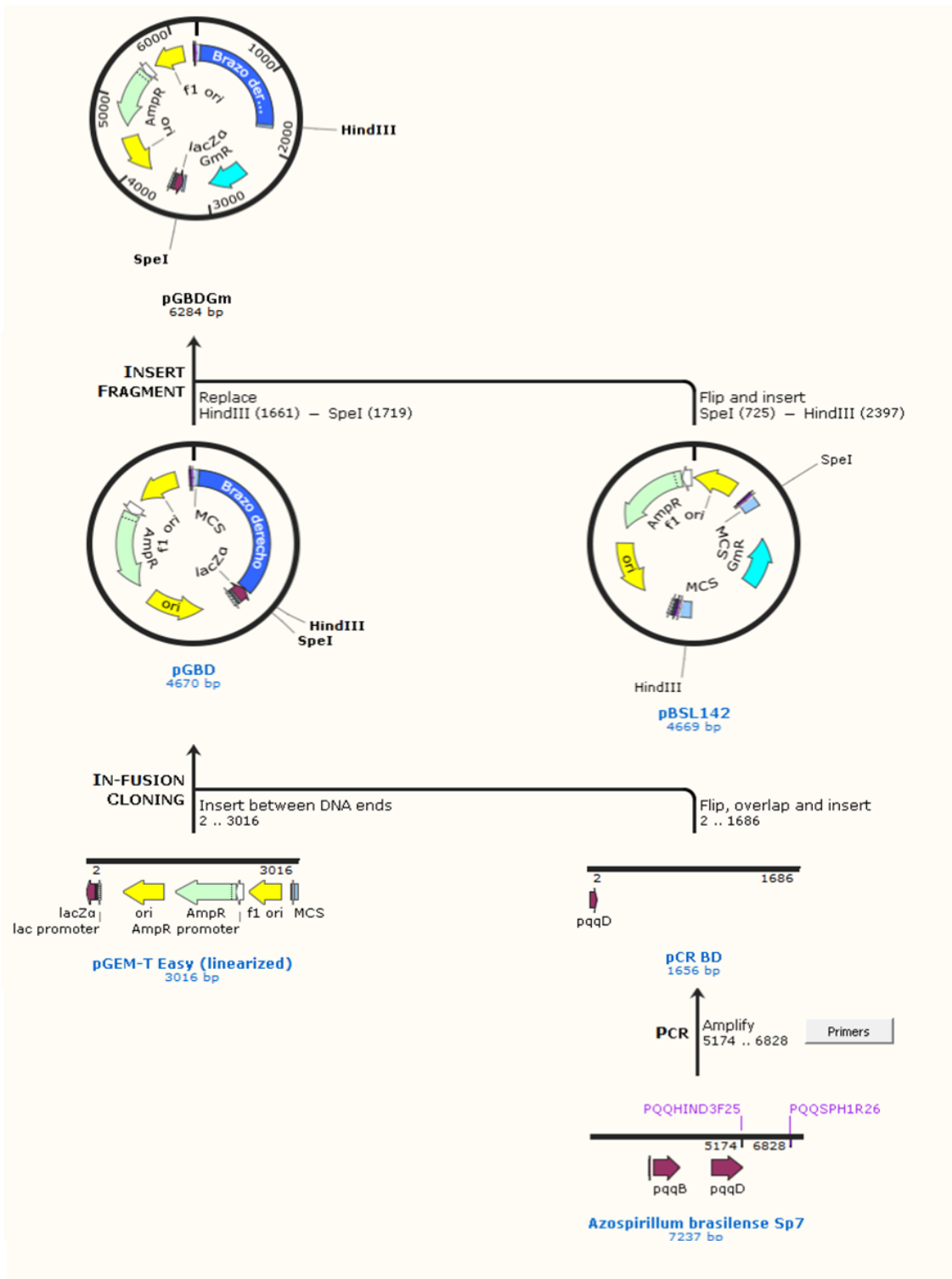
Los tubos se colocaron dentro del termociclador LabNet MultiGene Mini donde fue configurado a 30 ciclos con gradiente en la temperatura de alineamiento, las demás temperaturas y tiempos se establecieron con base al fragmento a amplificar (Tabla 14). Se

tomaron 10  $\mu$ l del producto de PCR de cada reacción para analizarlos en un gel de agarosa al 1.2% corrido en buffer TBE 0.5X (ver Anexos) a 90V.

**Tabla 14.** Condiciones de amplificación para PCR del brazo izquierdo.

Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Desnaturalización inicial	98	5:00
Desnaturalización	98	0:45
Alineamiento	57 – 66	0:45
Extensión	72	2:00
Extensión final	72	5:00
Atemperamiento	23	$\infty$
Número de ciclos: 30		

## Esquema de trabajo



**Figura 25.** Esquema de trabajo general sobre las clonaciones realizadas para obtener la construcción plasmídica pGBDGm con resistencia a ampicilina y gentamicina. El esquema se lee de abajo hacia arriba. Creado en SnapGene.

# Resultados

## Análisis bioinformático

La secuencia del operón *pqq* de *Azospirillum brasilense* Sp7 se encontró en la base datos NCBI bajo la referencia CP033312.1. El operón está compuesto por los genes *pqqA*, *pqqB*, *pqqC*, *pqqD* y *pqqE* (Figura 6).

### Azospirillum brasilense strain Sp 7 chromosome 1, complete sequence

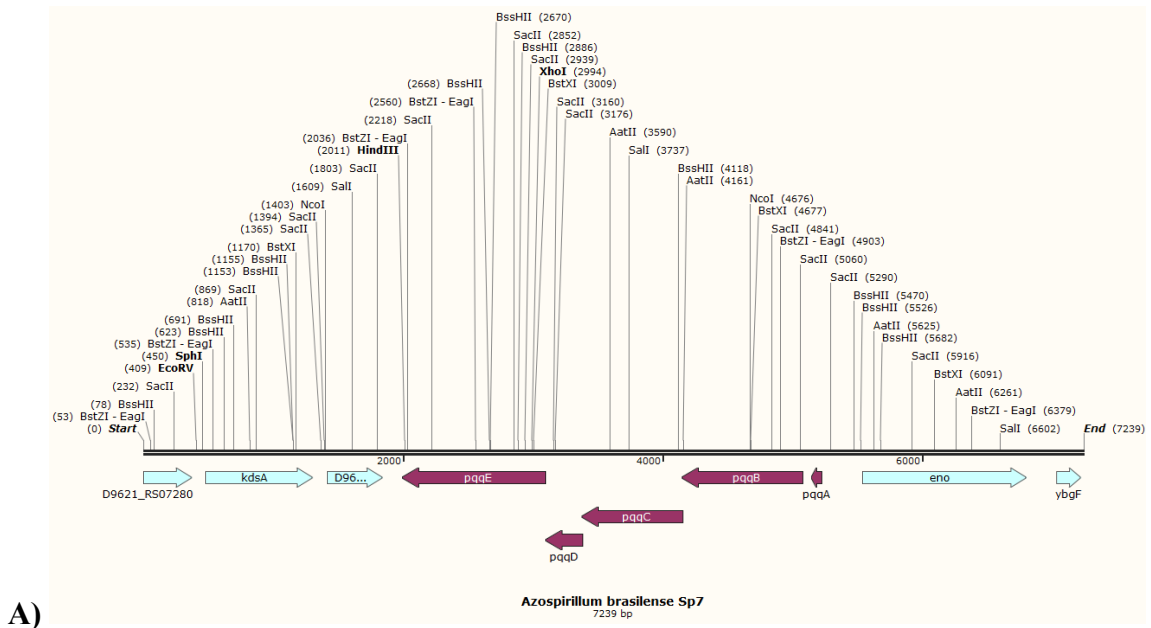
GenBank: CP033312.1

[GenBank](#) [FASTA](#)



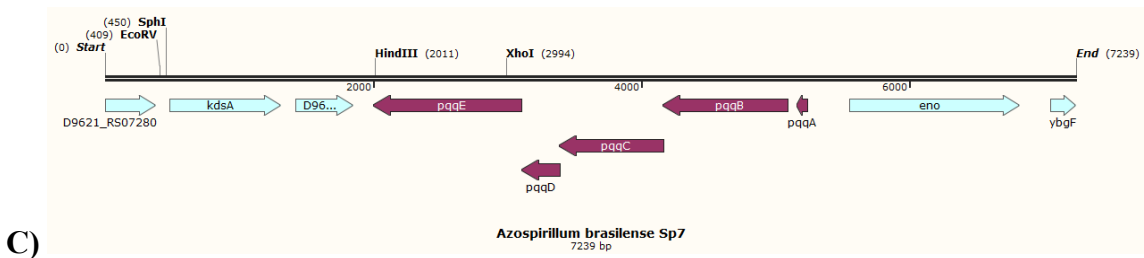
**Figura 6.** Contexto genético del operón *pqq* de *Azospirillum brasilense* Sp7 y sus regiones adyacentes delimitados por el marcador 1 y 2. Obtenido de National Center for Biotechnology Information.

Se analizaron las regiones río arriba y río abajo del operón *pqq* tomando un rango de 2000 pares de bases (1551277-1553277 y 1556515-1558515). Se buscaron los sitios de restricción de ambas regiones que coincidieran con los sitios de restricción del vector plasmídico pGEM T-Easy y pBSL142 (Figura 7A). De todas las enzimas analizadas, solamente 4 presentaron sitios de restricción únicos: *Xho*I, *Hind*III, *Sph*I y *Eco*RV (Figura 7B y C).



**B)**

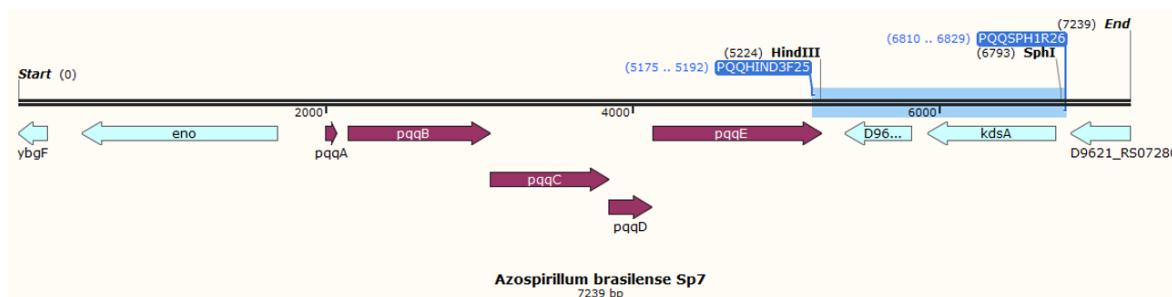
Enzyme	Cuts	Recognition Sequence	Methylation Sensitivity?
<b>AatII</b>	5	G <sub>1</sub> ACGT <sup>*</sup> C	CpG
<b>BssHII</b>	12	G <sup>*</sup> CGCG <sub>1</sub> C	CpG
<b>BstXI</b>	4	CCAN <sub>1</sub> NNNN <sup>*</sup> NTGG	
<b>EagI</b>	6	C <sup>*</sup> GGCC <sub>1</sub> G	CpG
<b>EcoRV</b>	1	GAT <sub>1</sub> ATC	CpG
<b>HindIII</b>	1	A <sup>*</sup> AGCT <sub>1</sub> T	
<b>NcoI</b>	2	C <sup>*</sup> CATG <sub>1</sub> G	
<b>SacII</b>	14	CC <sub>1</sub> GC <sup>*</sup> GG	CpG
<b>Sall</b>	3	G <sup>*</sup> TCGA <sub>1</sub> C	CpG
<b>SphI</b>	1	G <sub>1</sub> CATG <sup>*</sup> C	
<b>XhoI</b>	1	C <sup>*</sup> TCGA <sub>1</sub> G	CpG



**Figura 7.** Sitios de restricción del operón *pqq* y sus regiones río arriba y río abajo analizados en NEBcutter. **A)** Sitios de restricción analizados en SnapGene, las enzimas con cortes únicos se muestran en negritas. **B)** Lista de enzimas y número de cortes que realizan en la secuencia, obtenido de NEBcutter. **C)** Representación de los sitios de restricción de las enzimas *XhoI*, *HindIII*, *SphI* y *EcoRV* con cortes únicos analizado en SnapGene.

## Diseño de oligonucleótidos

Se decidió trabajar primero con la región río abajo, denominado brazo derecho, por lo que el diseño de oligonucleótidos se realizó contemplando los sitios de restricción para *Sph*I y *Hind*III dentro del amplificado (Figura 8).

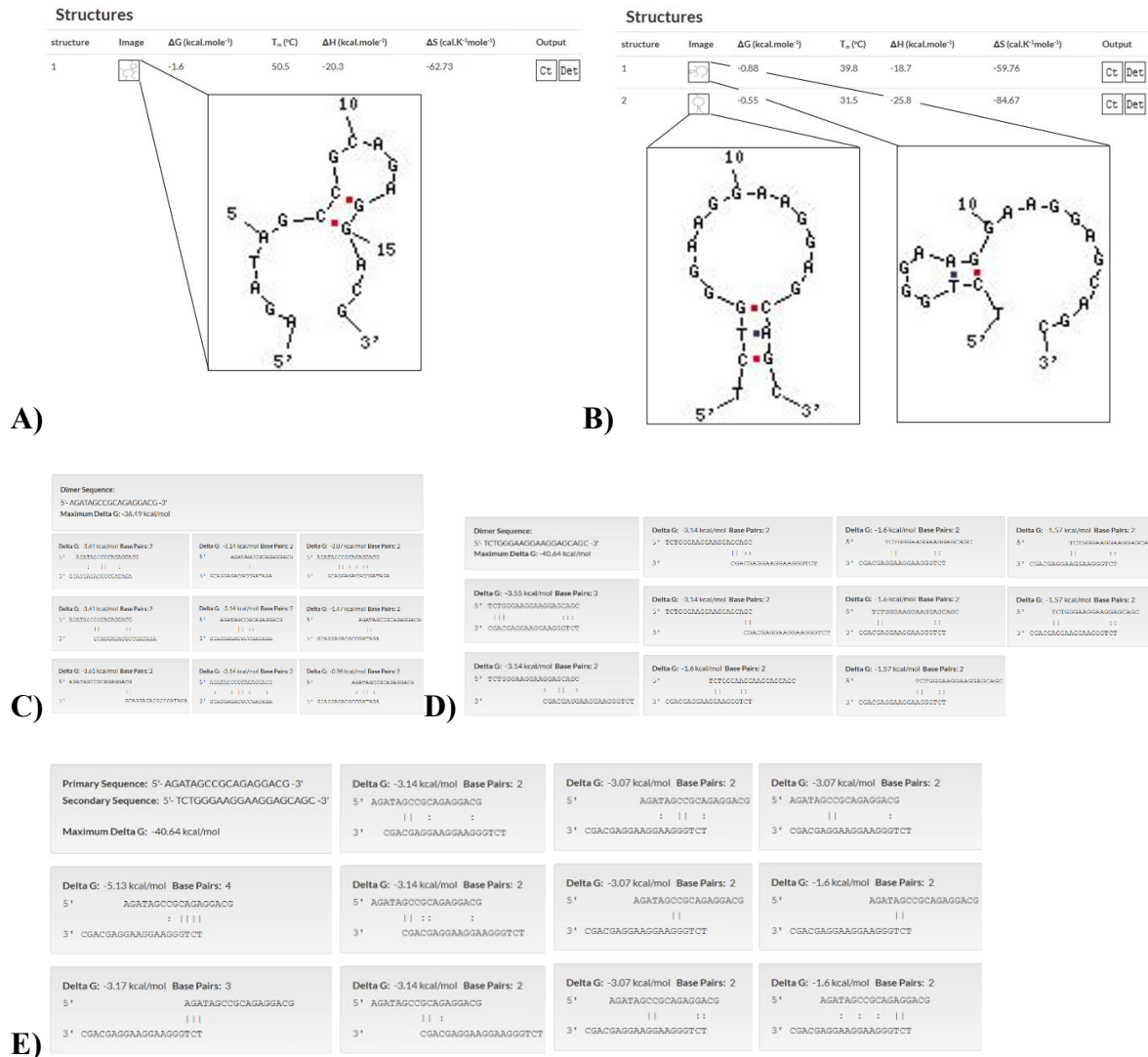


**Figura 8.** Representación gráfica del amplificado del brazo derecho marcado con color azul. Realizado en SnapGene. Se invirtió la secuencia para visualizar mejor la dirección del brazo derecho.

Las características principales de los oligonucleótidos para amplificar el brazo derecho se muestran en la Tabla 15, se diseñaron siguiendo los rangos mencionados en la sección de material y métodos. Se utilizó OligoAnalyzer Tool para analizar la presencia de estructuras secundarias, los resultados se muestran en la Figura 9. En el oligonucleótido forward se encontró un solo hairpin a 50.5°C (Figura 9A) y 9 homodímeros con  $\Delta G$  entre -3.61 y -0.96 kcal/mol (Figura 9B). En el oligonucleótido reverse se detectaron dos hairpins a 39.8 y 31.5°C (Figura 9C) y 10 homodímeros con  $\Delta G$  entre -3.55 y -1.57 kcal/mol (Figura 9D). En cuanto a los heterodímeros se detectaron 11 con  $\Delta G$  entre -5.13 y -1.6 kcal/mol (Figura 9E). Si bien, lo deseable es que los valores  $\Delta G$  sean positivos, los valores obtenidos son tolerables para las reacciones de PCR, además, las otras características se encuentran dentro de los rangos óptimos.

**Tabla 15.** Principales características de los oligonucleótidos para amplificar el brazo derecho.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Tamaño	%G/C	Tm	Amplificado
PQQHIND3F25	AGATAGCCGCAGAGGACG	18 bp	61.1%	56.7°C	1655 bp
PQQSPH1R26	TCTGGGAAGGAAGGAGCAGC	20 bp	60.0%	59.5°C	



**Figura 9.** Estructuras secundarias de los oligonucleótidos del brazo derecho. **A)** Hairpin (1) oligonucleótido forward. **B)** Hairpins (11) oligonucleótido reverse. **C)** Homodímeros (9) oligonucleótido forward. **D)** Homodímeros (10) oligonucleótido reverse. **E)** Heterodímeros (11) oligonucleótidos brazo derecho. Obtenido de OligoAnalyzer Tool, se tomaron capturas de los resultados y se agruparon por cuestión de espacio.

El análisis bioinformático reveló que la región río arriba no cuenta con sitios de restricción únicos que coincidieran con los vectores plasmídicos a utilizar, por lo que se decidió generarlos mediante el diseño de los oligonucleótidos para esta región. Se encontraron únicamente dos opciones viables: un cambio de base para generar el sitio de restricción para *SpeI* y otro para *EcoRI* (Figura 10). Para generar el sitio de restricción para *SpeI* se cambió una C por T, mientras que para la generación de *EcoRI* se cambió una G por T.

Con este cambio se pudo realizar el diseño de los oligonucleótidos para amplificar el brazo izquierdo (Tabla 16).



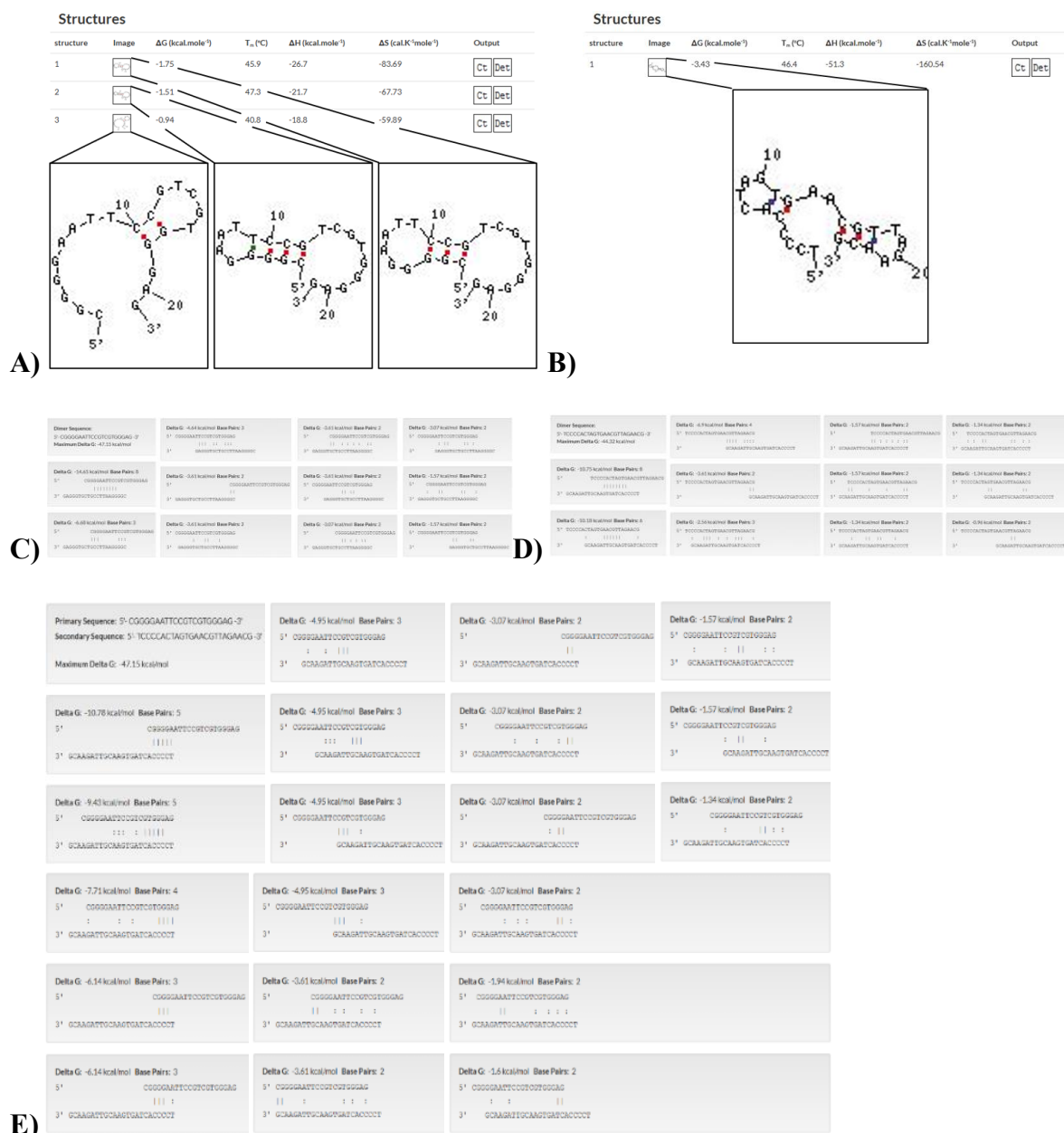
**Figura 10.** Representación gráfica de los cambios de base para la generación de sitios de restricción en la región río arriba del operón *pqq* de *A. brasilense* Sp7. Los recuadros rojos muestran la ubicación de los sitios de restricción generados. En azul se muestra la secuencia elegida para hacer el cambio de base en los oligonucleótidos mostrados en morado.

**Tabla 16.** Principales características de los oligonucleótidos para amplificar el brazo izquierdo. Se muestra el sitio de restricción subrayado en amarillo y la base cambiada en color rojo.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Tamaño	%G/C	Tm	Amplificado
<b>PQQECOR12F30</b>	CGGGGAATTCGTCGTGGGAG	18 bp	61.1%	56.7°C	1655 bp
<b>PQQSPE12R31</b>	TCCCCACTAGTGAACGTTAGAACG	20 bp	60.0%	59.5°C	

De igual forma se realizó el análisis de estructuras secundarias en OligoAnalyzer Tool. En el oligonucleótido forward se encontraron 3 hairpins a 45.9, 47.3 y 40.8°C (Figura 11A) y 11 homodímeros con  $\Delta G$  entre -14.65 y -1.57 kcal/mol (Figura 11B). En el oligonucleótido reverse se identificó un solo hairpin a 46.4°C (Figura 11C) y 11 homodímeros con  $\Delta G$  entre -10.75 y -0.96 kcal/mol (Figura 11D). En cuanto a los heterodímeros se detectaron 20 posibles formaciones con  $\Delta G$  entre -10.78 y -1.34 kcal/mol (Figura 11E). La razón de los valores considerablemente negativos se debe a los sitios de restricción de ambos

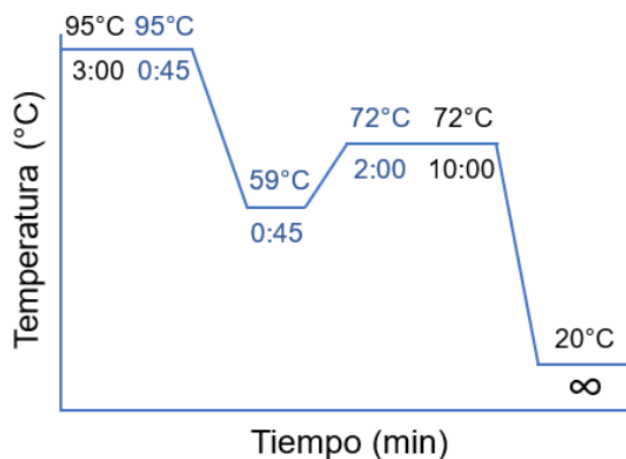
oligonucleótidos que favorece su unión. Se diseñaron varios oligonucleótidos y se probó con otros sitios de restricción, pero los finalmente presentados son los más viables. Para evitar la formación de estructuras secundarias se optó por añadir DMSO a la mezcla de reacción de PCR.



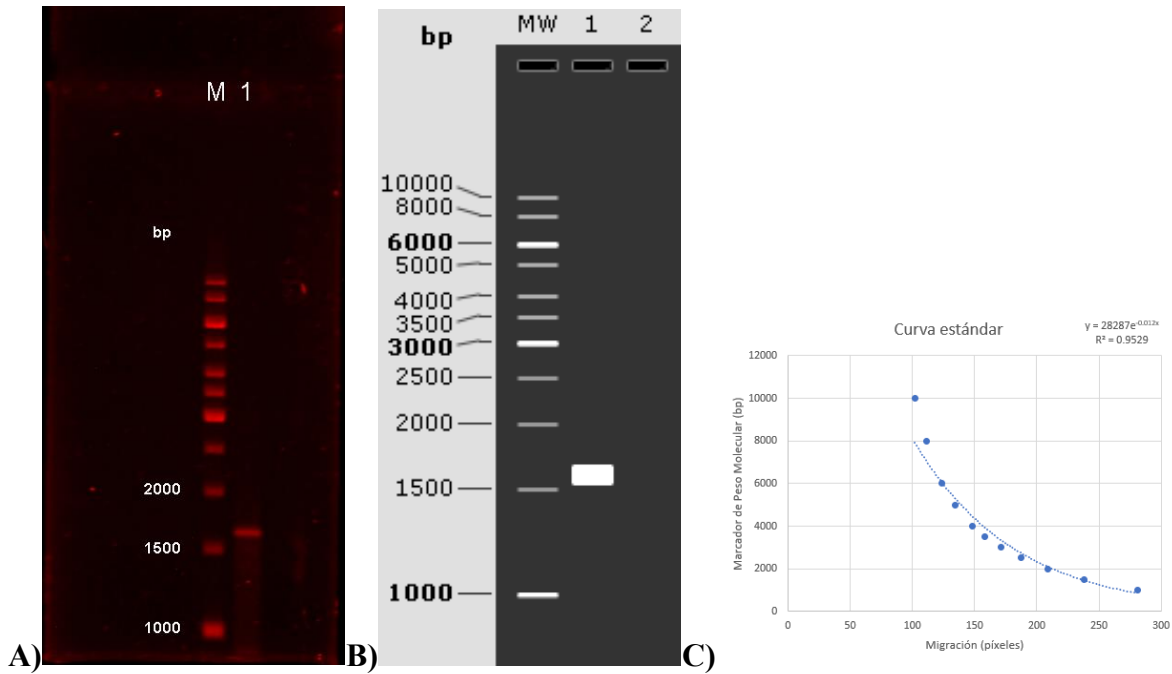
**Figura 11.** Estructuras secundarias de los oligonucleótidos del brazo izquierdo. **A)** Hairpins (3) oligonucleótido forward. **B)** Hairpin (1) oligonucleótido reverse. **C)** Homodímeros (11) oligonucleótido forward. **D)** Homodímeros (11) oligonucleótido reverse. **E)** Heterodímeros (20) oligonucleótidos brazo izquierdo. Obtenido de OligoAnalyzer Tool.

### Obtención del amplicón del Brazo derecho

Con la finalidad de obtener el amplicón del brazo derecho se probaron diferentes temperaturas de alineamiento para la PCR, comenzando por 53°C (promedio de ambas T<sub>m</sub> menos 5°C), subiendo 1°C hasta obtener el amplificado esperado de 1655 bp. La temperatura de alineamiento final fue 59°C (Figura 12). El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 0.7% en buffer TBE 0.5X a 75 V junto al marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb (Figura 13A). Para determinar el tamaño de la banda del producto de PCR (carril 1) en el gel de agarosa se hizo una curva estándar en Excel (Figura 13C) dando un tamaño aproximado de 1660 bp, muy cercano al esperado de 1655 bp.



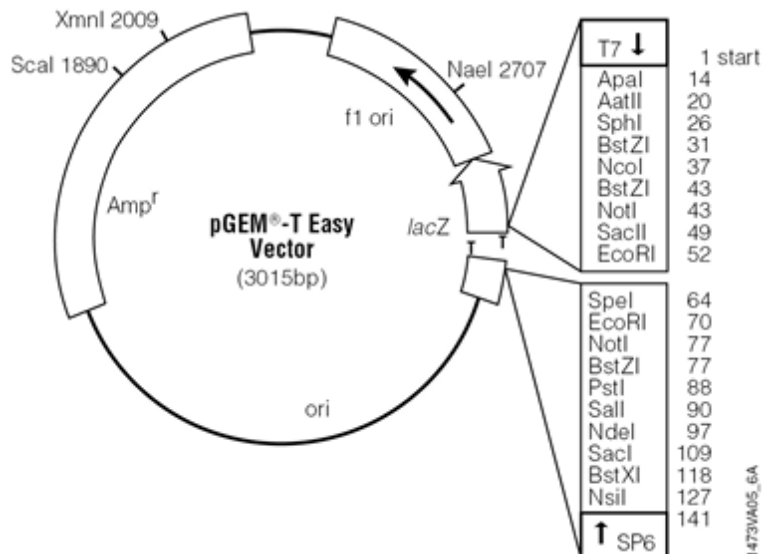
**Figura 12.** Gráfica de las condiciones de amplificación del brazo derecho.



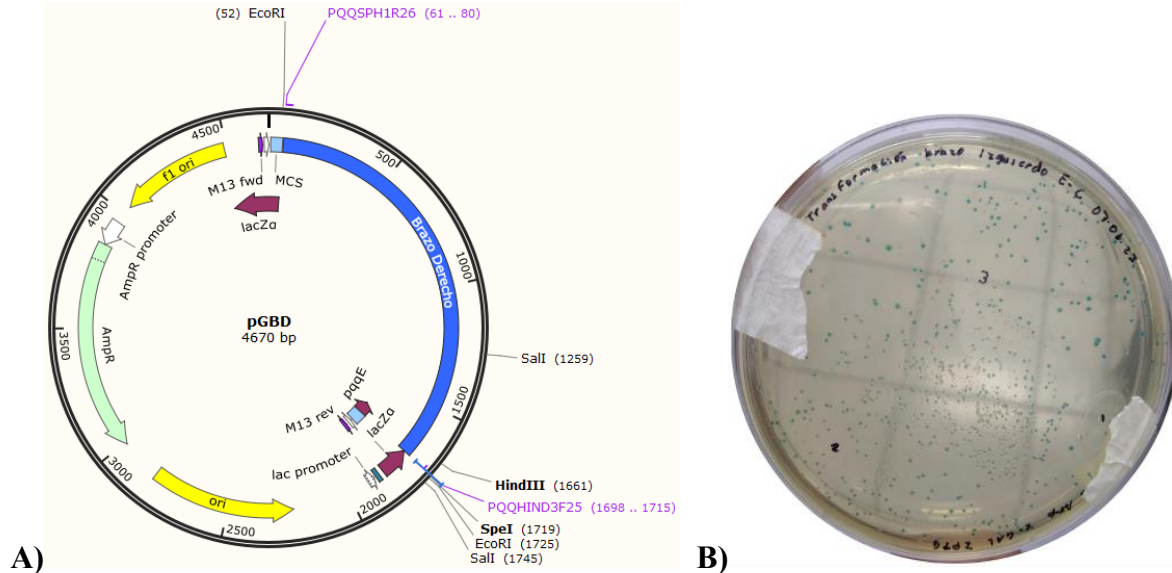
**Figura 13.** Amplificación del brazo derecho. **A)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder. Carril 1: Producto de PCR del brazo derecho. **B)** Predicción de la amplificación del brazo derecho de 1655 bp en SnapGene. **C)** Curva estándar en Excel para determinar el tamaño de la banda del carril 1 en el gel de agarosa, el tamaño obtenido fue de 1660 bp.

### Clonación del brazo derecho en pGEM-T Easy (pGBD)

La amplificación del brazo derecho se precipitó y se ligó al vector plasmídico pGEM-T Easy (Figura 14), como resultado se obtuvo la clona pGBD (Figura 15) con un tamaño de 4670 bp.



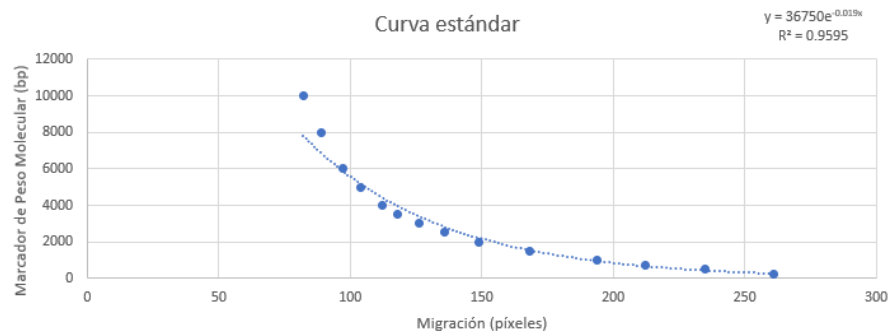
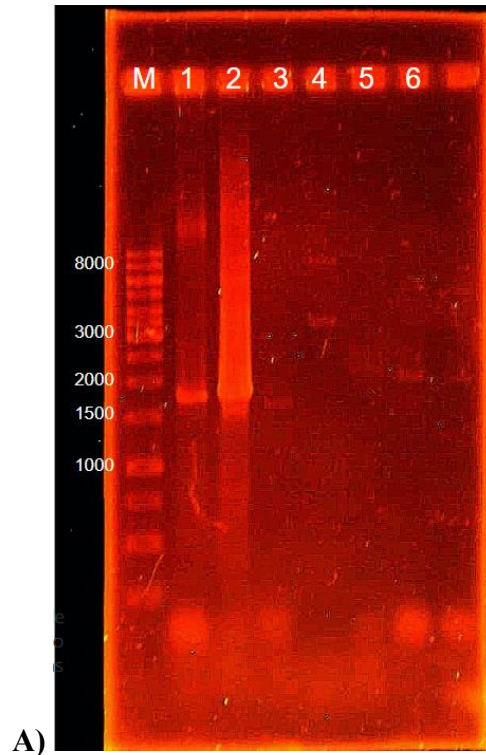
**Figura 14.** Representación gráfica del plásmido pGEM-T Easy.



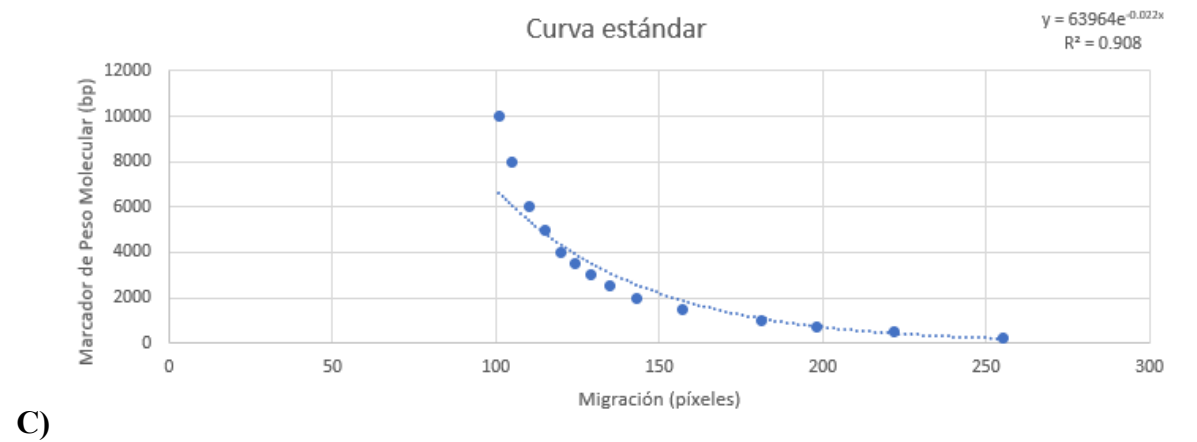
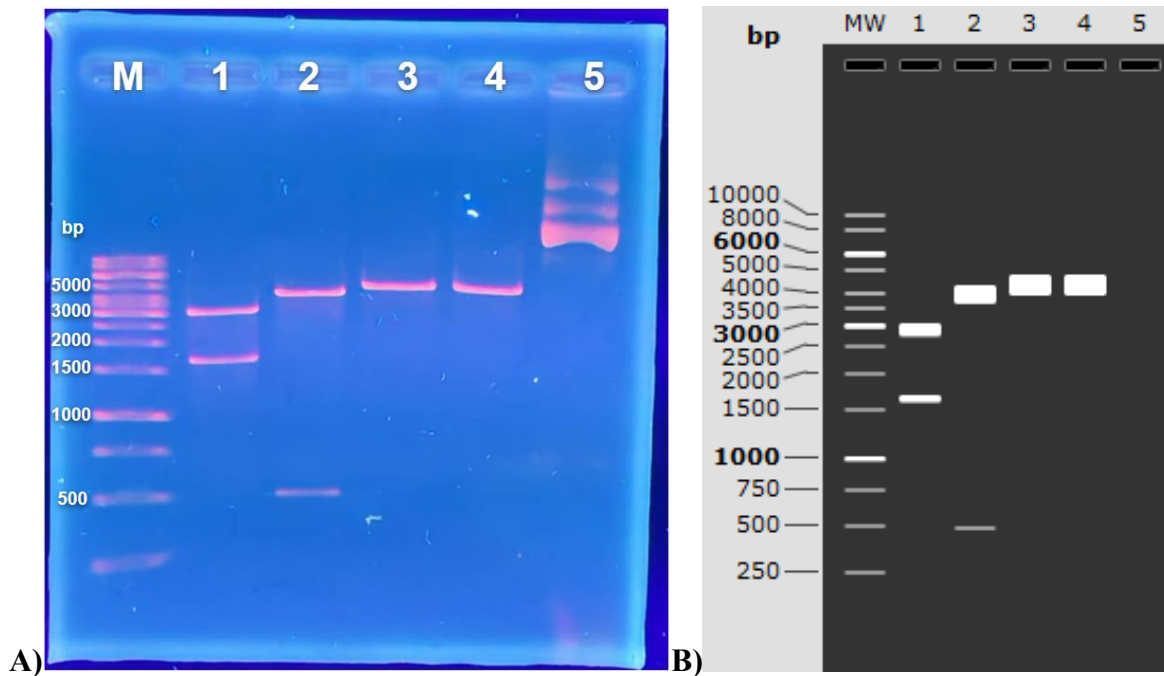
**Figura 15. A)** Representación gráfica del plásmido pGBD, los oligonucleótidos se muestran en color morado. Creado con SnapGene. **B)** Transformación pGBD en células competentes *E. coli* DH5α sembradas en agar LB + Amp + IPTG + X-GAL.

Para comprobar la clonación del brazo derecho, se hizo PCR a partir de ADN plasmídico pGDB de 5 clonas blancas seleccionadas al azar. De las 5 clonas, solo 1 amplificó una banda muy similar al control de 1655 bp (PCR con ADN cromosómico de *A. brasilense* Sp7) (Figura 16A). Se hizo una curva de calibración para determinar el tamaño de las bandas de los productos de PCR de las clonas obtenidas del brazo derecho (Figura 16B). En el gel se observa que, de acuerdo con la curva, el control (carril 1) amplificó una banda de 1660 bp; la clona 1 (carril 2) amplificó una banda de aproximadamente 1692 bp; la clona 2 (carril 3) amplificó una banda de 1568 bp; la clona 3 (carril 4) amplificó dos bandas, una de 7592 bp y otra de 3418 bp; la clona 4 (carril 5) amplificó una banda de 2166 bp; y la clona 5 (carril 6) amplificó una banda de 2046 bp aproximadamente. Se seleccionó la clona 1 para hacer restricción enzimática con 4 enzimas diferentes, liberando fragmentos de diversos tamaños, esto con la finalidad de comprobar que se haya clonado correctamente el brazo derecho y no se haya clonado algún otro fragmento no deseado. Haciendo las comparaciones entre las bandas del gel de agarosa (Figura 17A) y las predicciones en SnapGene (Figura 17B), la

enzima *EcoRI* liberó una banda de 2997 bp y otra de 1673 bp; *SalI* 4184 bp y 486 bp; *HindIII* 4670 bp y *SpeI* 4670 bp, obteniendo los resultados esperados. También se realizó la curva estándar (Figura 17C) cuyos tamaños se aproximan a los esperados.



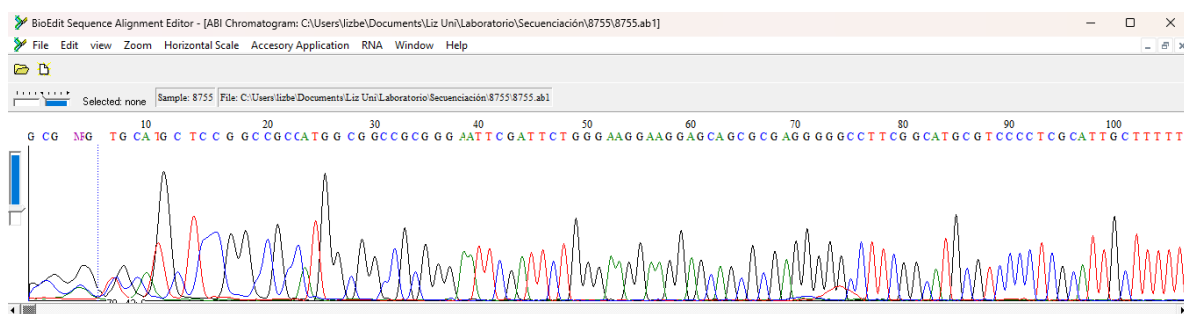
**Figura 16.** Productos de PCR de las clonas obtenidas del brazo derecho. **A)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. PCR de 5 clonas seleccionadas al azar del brazo derecho. M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder. Carril 1: PCR control *A. brasilense* Sp7. Carril 2: PCR clona 1. Carril 3: PCR clona 2. Carril 4: PCR clona 3. Carril 5: PCR clona 4. Carril 6: PCR clona 5. **B)** Curva estándar en Excel para determinar el tamaño de las bandas de los productos de PCR de las clonas del brazo derecho en el gel de agarosa.



**Figura 17.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. **A)** Restricción enzimática de la clona 1. M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder. Carril 1: Restricción con *EcoRI*. Carril 2: Restricción con *SalI*. Carril 3: Restricción con *HindIII*. Carril 4: Restricción con *SpeI*. Carril 5: ADN plasmídico clona 1 sin cortar. **B)** Predicción de los patrones de restricción de la clona 1 en SnapGene. **C)** Curva estándar de las restricciones de la clona 1 del brazo derecho.

## Análisis de secuenciación

Luego de realizar PCR y restricción enzimática, se mandó a secuenciar la clona 1 para corroborar que el gen clonado corresponde a la región río abajo del operón *pqq* de *A. brasilense* Sp7 y para visualizar el sentido en que está clonado, debido a que de eso depende las enzimas a utilizar para clonar el marcador de selección. Los resultados de la secuenciación se analizaron en el programa BioEdit v7.2.5, el electroferograma obtenido se muestra en la Figura 18.



**Figura 18.** Electroferograma del fragmento inicial la de secuenciación de la clona 1 pGBD visualizado en BioEdit v7.2.5.

Después de analizar el electroferograma, en el mismo programa (BioEdit v7.2.5) se obtuvo la secuencia FASTA del fragmento clonado presentado a continuación.

>Secuencia pGDB

```
GCGMRGTGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTCTGGGAA
GGAAGGAGCAGCGCGAGGGGGCCTTCGGCATGCGTCCCCTCGCATTGCTTTTTG
GAGAGCACGGGATGACCACCGCCAAGACCGTCCAGATCGGCACCCTGAYKRTC
GCCAACGACCGGCCGTTCACTTTGATCGCCGGACCGTGCCAGATGGAGAGCCG
CGACCACGCGCTGGAGACGGCGGGCGGCGCTGGTGGAGATGACCGGCGCGCTGG
GCATCGGGCMGATCTACAAGTCGTCCTTCGACAAGGCCAACCGCACCTCCATCA
SCACGGCGCGCGGCCCGGCATGGACRAGGCGCTGCCGATCTTCGCCGAGATCA
AGGAGCGGTTTCGGCTGCCCGGTGATCACCGACGTGCACGAGGCCGACCAGTGC
GCCGTCGTGGCCGAGGTGATGGACGTCCTCCAGATTCCCGCCTTCTGTGCCGC
CAGACCGACCTGTTGATCGCCGCGGCGAAGACGGGCCGGGCGGGTCAACGTCA
AGAAGGGCCAGTTCCTCGCCCCCTGGGGACATGAAGAACGTTGCGGCGAAGC
TGGTGGCGTCGGGCAACGACAAAGGTGCTGCTGTGCGAGCGCGGTGCCAGCTT
```

CGGCTACAACACGCTGGTGTCTGGACATGCGCTCCCTGCCGATCATGGCGGAGAC  
CGGCTTCCCGGTGGTCTTCGACGCCACCCATTCCGTTTCAGCAGCCGGGCGGGCA  
GGGCACCACCTCCGGCGGGCAGCGCGAGTTCG**WK**CCGGTGCTGGCGCGCGCC  
GCCATCGCCGTGGGCGTCCCGCCGTTTTCATGGAGACCCATGAGAATCCGGAC  
TGCGCCCCCAGCGGCGGTCCGAACATGGTCCCGCTGAAGGAGATGCCGGTCCT  
GCTGGCGCGGCTCCAGGCTTCGATCGGCTCGCAAAGGCTGACGAAAGGACAGT  
TCGGGAACGYGCGTGCCGGTCCCGGCGTTGG**M**STTGG**M**CG**S**GGCGCC**S**GCT  
TATGGTGGAG**S**GCC**S**GAATGGAGCCATGGAGCACGCATGAGCGATCCGCCT**GK**  
**G****S**GCCATCTAGCCATCGGCA**K**GTGG**CSS**GATGATCGCTGT**CGG****W**CTCGGGC**ATC**  
GACGGTCGTCCGCAAGCTCAC**M**GCGATGCGAAGGCAGCGCATGCGCGGC**AMA**  
GGCGGTAC**MM**CC**M**CGCGGGTC

En la secuencia FASTA obtenida, se indicó con color rojo aquellas bases diferentes a A, T, G o C para visualizar el grado de pureza de la secuencia.

Posteriormente, se hizo un “curado” de la secuencia obtenida donde se eliminaron las bases que no fueran A, T, G o C, es decir, las marcadas con rojo en la secuencia anterior. Esto se hizo con la finalidad obtener una secuencia con únicamente bases que pueda reconocer la base de datos empleada. La secuencia se ingresó en la base de datos Nucleotide BLAST de NCBI para buscar si el fragmento clonado corresponde a la secuencia del brazo derecho. Los primeros 29 resultados obtenidos, corresponden al género *Azospirillum*, dentro de los cuales se encuentra *Azospirillum brasilense* Sp7 con un 96.23% de identidad con la secuencia ingresada y cuyo GenBank (CP033312.1) es el mismo que se utilizó para el diseño de oligonucleótidos de las regiones aledañas al operón *pqq*. En la Figura 19A solo se presentan los primeros 12 resultados en donde se visualiza el nombre de la especie bacteriana, el score, el valor E y el número de acceso de la secuencia. En la Figura 19B se muestra el alineamiento de la secuencia ingresada (producto de la secuenciación) con la región río abajo del operón *pqq* de *A. brasilense* Sp7 correspondiente al brazo derecho. Finalmente, en la Figura 19C se muestra una representación gráfica del contexto genético de *A. brasilense* Sp7 en la cual se indica dónde se alineó la secuencia FASTA ingresada (producto de la secuenciación), la cual sí corresponde al brazo derecho.

[< Edit Search](#)   Save Search   Search Summary   [How to read this report?](#)   [BLAST Help Videos](#)   [Back to Traditional Results Page](#)

**Job Title**   **Secuencia clona 1**

**RID**   **9WX3Z2AZ013**   Search expires on 08-16 07:42 am   [Download All](#)

**Program**   BLASTN   [Citation](#)

**Database**   core\_nt   [See details](#)

**Query ID**   IclQuery\_616973

**Description**   Secuencia clona 1

**Molecule type**   dna

**Query Length**   1165

**Other reports**   [Distance tree of results](#)   [MSA viewer](#)

**Filter Results**

**Organism**   only top 20 will appear    exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

**Percent Identity**    to   
 **E value**    to   
 **Query Coverage**    to

[Descriptions](#)   [Graphic Summary](#)   [Alignments](#)   [Taxonomy](#)

**Sequences producing significant alignments**   Download   Select columns   Show 100

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Azospirillum brasilense strain MTCC4038 chromosome complete genome	Azospirillum bra...	1705	1705	88%	0.0	96.23%	3007857	CP033339.1
<input checked="" type="checkbox"/> Azospirillum brasilense strain Sp 7 chromosome 1 complete sequence	Azospirillum bra...	1705	1705	88%	0.0	96.23%	2983263	CP033312.1
<input checked="" type="checkbox"/> Azospirillum brasilense strain Sp 7 chromosome complete sequence	Azospirillum bra...	1705	1705	88%	0.0	96.23%	3005726	CP012914.1
<input checked="" type="checkbox"/> Azospirillum brasilense strain Crl chromosome 1 complete sequence	Azospirillum bra...	1705	1705	88%	0.0	96.23%	3035856	CP033318.1
<input checked="" type="checkbox"/> Azospirillum argentinense strain MTCC4036 chromosome	Azospirillum arg...	1522	1522	88%	0.0	93.11%	3065527	CP032330.1
<input checked="" type="checkbox"/> Azospirillum argentinense strain MTCC4035 chromosome complete genome	Azospirillum arg...	1511	1511	88%	0.0	92.92%	3007928	CP032321.1
<input checked="" type="checkbox"/> Azospirillum brasilense strain Az39 complete genome	Azospirillum arg...	1511	1511	92%	0.0	91.83%	3064393	CP007793.1
<input checked="" type="checkbox"/> Azospirillum brasilense strain MTCC4039 chromosome complete genome	Azospirillum bra...	1478	1478	88%	0.0	92.36%	2941886	CP032345.1
<input checked="" type="checkbox"/> Azospirillum brasilense strain 2020WEIHUA_K chromosome complete genome	Azospirillum bra...	1472	1472	88%	0.0	92.26%	2810413	CP059449.1
<input checked="" type="checkbox"/> Azospirillum brasilense Sp245 main chromosome complete genome	Azospirillum bal...	1413	1413	88%	0.0	91.37%	3023440	HE577327.1
<input checked="" type="checkbox"/> Azospirillum balidaniorum strain Sp245 chromosome	Azospirillum bal...	1413	1413	92%	0.0	90.34%	3049901	CP022253.1
<input checked="" type="checkbox"/> Azospirillum formosense strain UWAZO-1 chromosome complete genome	Azospirillum for...	1380	1380	92%	0.0	89.63%	2760395	CP159402.1

A)

[Download](#)   [GenBank](#)   [Graphics](#)   [Next](#)   [Previous](#)   [Descriptions](#)

**Azospirillum brasilense strain Sp 7 chromosome 1, complete sequence**

Sequence ID: CP033312.1   Length: 2983263   Number of Matches: 1

Range 1: 1551682 to 1552736   [GenBank](#)   [Graphics](#)   [Next Match](#)   [Previous Match](#)

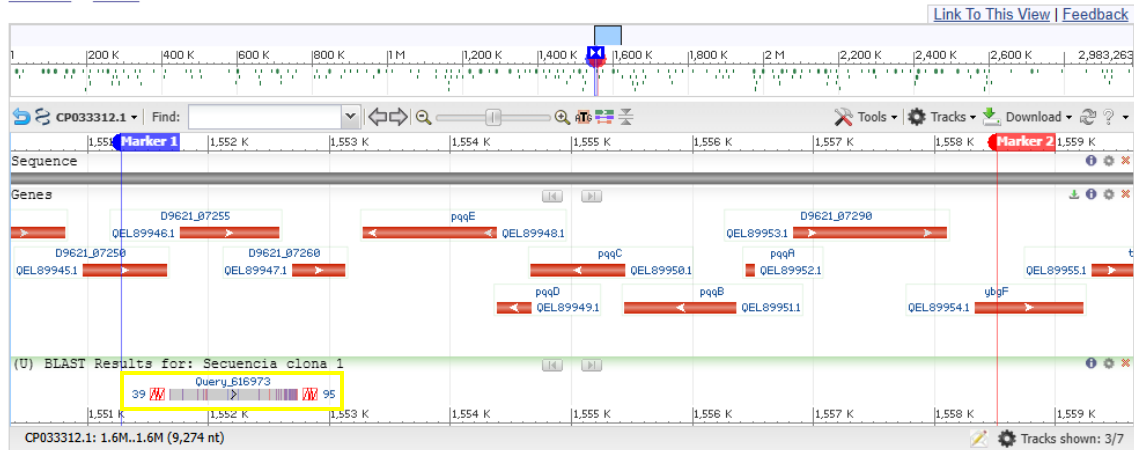
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1705 bits (923)	0.0	1020/1060(96%)	34/1060(3%)	Plus/Plus
Query 40	CGAT	TCTGGGAGGAAGGACAGCGCGAGGGGGCTTCGGCATCGCTCCCTCGCATTG		98
Sbjct 1551682	CGATATCTGGGAGGAAGGACAGCGCGAGGGGGCTTCGGCATCGCTCCCTCGCATTG			1551741
Query 99	CTTTTTGGAGAGCAGGGGATGACCAACCGCAAGACCGTCCAGATCGGACCCCTG		---ATC	155
Sbjct 1551742	CTTTTTGGAGAGCAGGGGATGACCAACCGCAAGACCGTCCAGATCGGACCCCTGACATC			1551881
Query 156	GCCAAACGACCGCCGTTCACTTTGATCGCCGACCGTCCAGATGGAGAGCCGCGACAC			215
Sbjct 1551882	GCCAAACGACCGCCGTTCACTTTGATCGCCGACCGTCCAGATGGAGAGCCGCGACAC			1551861
Query 216	GCGCTGGAAGCAGCGCGCGCGCTGGTGGAGATGACCGCGCGCTGGGATCGGGCTGATC			274
Sbjct 1551862	GCGCTGGAAGCAGCGCGCGCGCTGGTGGAGATGACCGCGCGCTGGGATCGGGCTGATC			1551921
Query 275	TACAAGTCTGCTTCGACAAGGCCAACCGACCTCCATCA-CACGGCGCGCGCCCGGG			333
Sbjct 1551922	TACAAGTCTGCTTCGACAAGGCCAACCGACCTCCATCAGCAGCGCGCGCGCGCTCGGG			1551981
Query 334	ATGGAC-AGGCGCTGCGCATCTTCGCGAGATCAAGGAGCGGTTCCGGCTGCCGGTGATC			392
Sbjct 1551982	ATGGACAAGGCGCTGCGCATCTTCGCGAGATCAAGGAGCGGTTCCGGCTGCCGGTGATC			1552041
Query 393	ACCAGCTGACAGAGCGCGACAGTGGCGGCTGCTGGCCGAGGTGATGGACGCTCTCCAG			452
Sbjct 1552042	ACCAGCTGACAGAGCGCGACAGTGGCGGCTGCTGGCCGAGGTGATGGACGCTCTCCAG			1552101
Query 453	ATCCCGGCTTCTGTGCGCCAGACCGACCTGTTGATCGCCCGCGCGAAGACGGGCGG			512
Sbjct 1552102	ATCCCGGCTTCTGTGCGCCAGACCGACCTGTTGATCGCCCGCGCGAAGACGGGCGG			1552161
Query 513	GCGGTCACCGTCAAGAGGGCCAGTTCCTCGCCCTTGGGGACATGAAGAACGTTGCG			572
Sbjct 1552162	GC-GGTCAACGTC AAGAGGGCCAGTTCCTCGCCCTTGGGGACATGAAGAACGTTGCG			1552218
Query 573	GCGAAGCTGGTGGCTCGGGCAACGACAAGGTGCTGCTGTGCGAGCGCGGTGCAAGCTT			632
Sbjct 1552219	GCGAAGCTGGTGGCTCGGGCAACGACAAGGTGCTGCTGTGCGAGCGCGGTGCAAGCTT			1552277
Query 633	CGGCTACAAACGCTGGTGTGCGACATGCGCTCCCTGCGATCATGGCGGAGACGGGCTT			692
Sbjct 1552278	CGGCTACAAACGCTGGTGTGCGACATGCGCTCCCTGCGATCATGGCGGAGACGGGCTT			1552337
Query 693	CCCGGTGGTCTTCGACGCCACCCATTCCGTTAGCAGCGCGGGCGGGCAGGGCACCACTC			752
Sbjct 1552338	CCCGGTGGTCTTCGACGCCACCCATTCCGTTAGCAGCGCGGGCGGGCAGGGCACCACTC			1552397
Query 753	CGGCGGCGAGCGCGAGTTTCG--CCGGTCTGGCGCGCGCCCATGCCGTGGGGCTGCG			810
Sbjct 1552398	CGGCGGCGAGCGCGAGTTTCG--CCGGTCTGGCGCGCGCCCATGCCGTGGGGCTGCG			1552457
Query 811	GCCGCTTTTCATGGAGACCAATGAGAAATCCGGACGCGCCCGCCAGCGGGCTCGAAGAT			870
Sbjct 1552458	GCCGCTTTTCATGGAGACCAATGAGAAATCCGGACGCGCCCGCCAGCGGGCTCGAAGAT			1552517
Query 871	GGTCCCGCTGAAGGAGATCCGGCTCTGCTGGCGCGGCTCCAGG-CTTCGATCGGCTCGC			929
Sbjct 1552518	GGTCCCGCTGAAGGAGATCCGGCTCTGCTGGCGCGGCTCCAGG-CTTCGATCGGCTCGC			1552577
Query 930	-AAAGCTGACGAAAGGACA-GTTCGGGAACGGCGTCCGGTCCCGCGTTGG-TTGGC-			985
Sbjct 1552578	AAAGGCTGACGAAAGGACAGTTCGGGAACGGCGTCCGGTCCCGCGTTGGCTTGCA			1552637
Query 986	C-G-GG-CECCG-GCTATGGTGGAG-GCC-G-G-AATGGACCATGGAGCA-CG-ATG			1035
Sbjct 1552638	CCGCGGGCGCCGCGCTTATGGTGGAGGCCCGCGGAAT-GAGCCATGGAGCAACCGCATG			1552696
Query 1036	A-GC-GATCCCGCTG-G-GCCATCTA-GCCATCGGCACTG 1070			
Sbjct 1552697	AAGCCGATCCCGCTGCGCCATCGGCACTCGGCACTG 1552736			

B)

## Azospirillum brasilense strain Sp 7 chromosome 1, complete sequence

GenBank: CP033312.1

[GenBank](#) [FASTA](#)



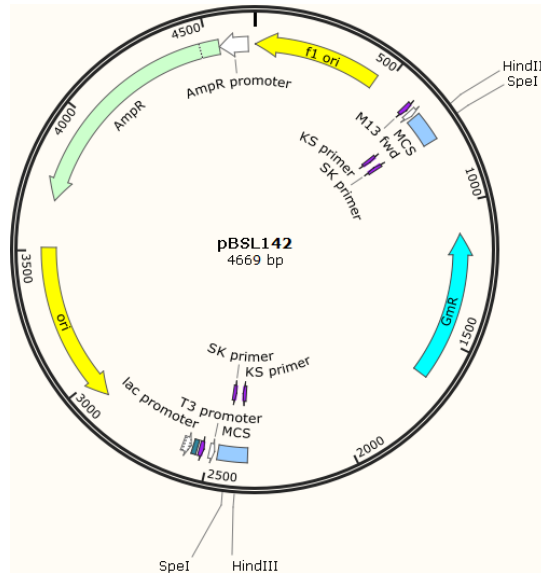
C)

**Figura 19.** Resultados del Nucleotide BLAST que se realizó con el resultado de la secuenciación de la clona 1. **A)** Descripción detallada del alineamiento donde se muestra el porcentaje de identidad y la referencia de la cepa alineada. El recuadro rojo marca la presencia de la secuencia esperada. **B)** Alineamiento de la secuencia de la clona 1 (Query) con la secuencia de *Azospirillum brasilense* Sp7 (Sbjct). **C)** Contexto genético del alineamiento. El fragmento clonado se muestra en el recuadro amarillo. Obtenido de NCBI Nucleotide BLAST.

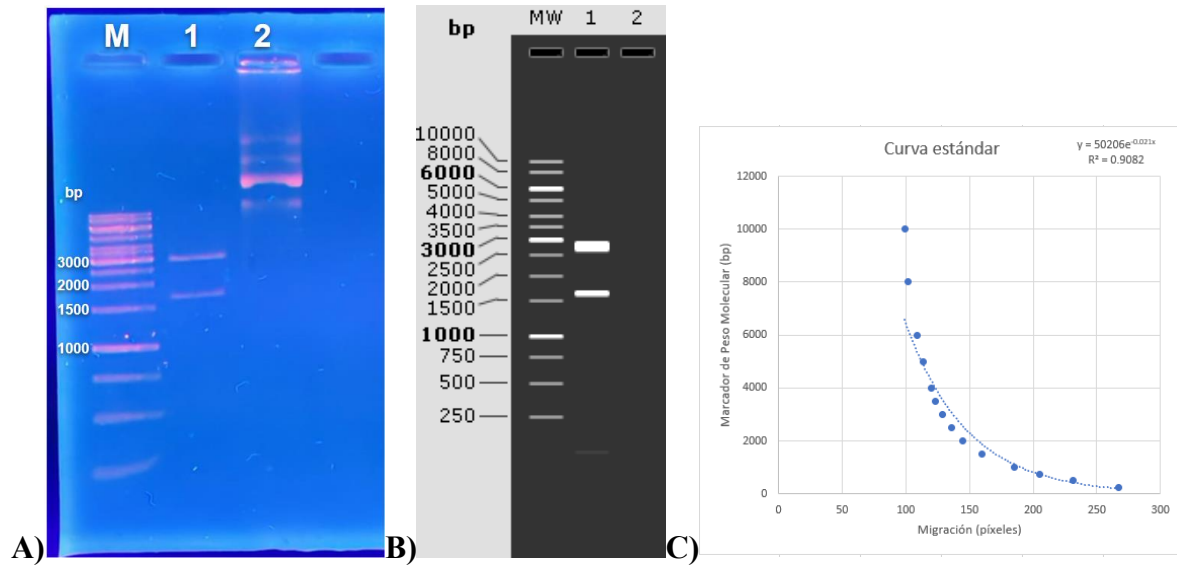
Con los resultados obtenidos, se llegó a la conclusión de que el fragmento clonado en el vector pGEM-T Easy corresponde a la región río abajo del operón *pqq* de *A. brasilense* Sp7 tal y como se esperaba, además se determinó el sentido en que se clonó y con esto se decidió qué enzimas de restricción usar para clonar el gen de resistencia a antibiótico.

### Obtención del gen de resistencia a gentamicina

Como marcador de selección para la mutante por delección del operón *pqq* de *A. brasilense* Sp7, se eligió el gen  $\Omega$  gentamicina del plásmido pBSL142 (Figura 20) porque *A. brasilense* Sp7 no presenta resistencia a este antibiótico. De acuerdo con la orientación, obtenida a partir del análisis de la secuenciación de pGBD, en que se clonó el brazo derecho, se decidió liberar el  $\Omega$ -Gm de 1672 bp mediante una restricción enzimática doble con las enzimas *Hind*III y *Spe*I (Figura 21A). Se corrió la restricción en un gel de electroforesis al 1.2% en TBE 0.5X a 90 V, posteriormente se cortó y purificó la banda correspondiente al gen  $\Omega$ -Gm (1672 bp) siguiendo el protocolo indicado en la sección de materiales y métodos. La curva estándar señaló tamaños cercanos a la predicción hecha con SnapGene (Figura 21B y C).



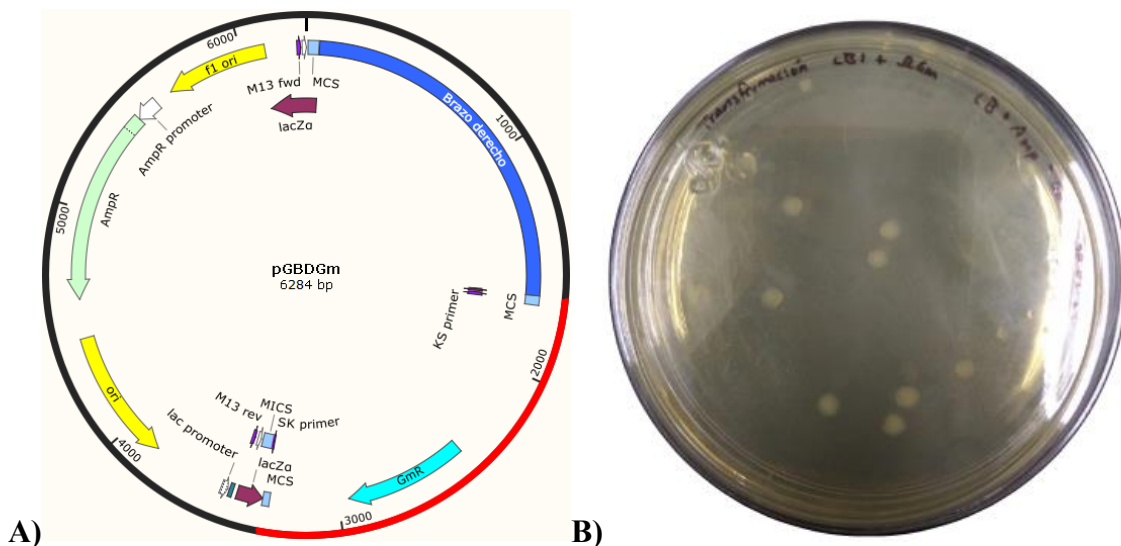
**Figura 20.** Representación gráfica del plásmido pBSL142. Se muestran las enzimas de restricción *Hind*III y *Spe*I usadas para la obtención del gen de resistencia a gentamicina.



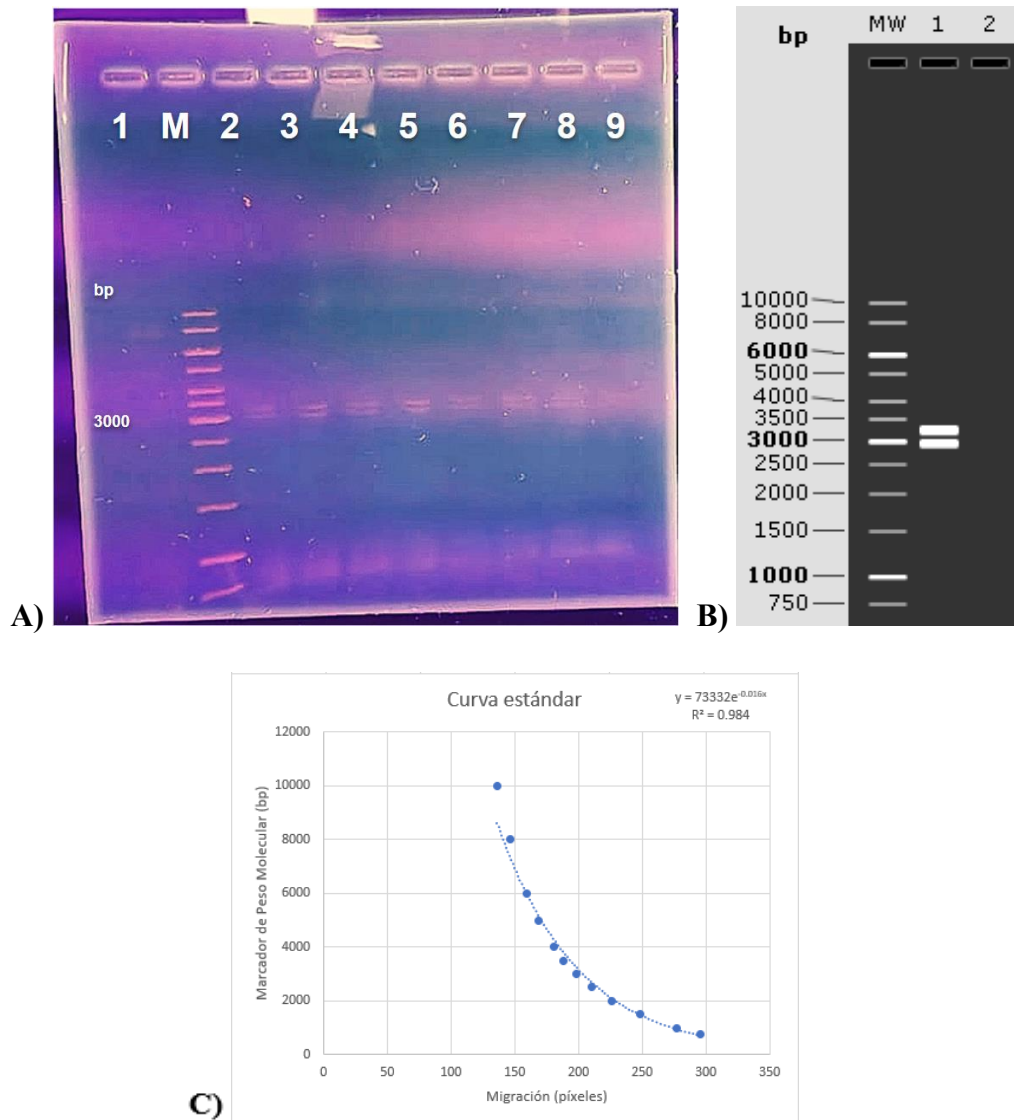
**Figura 21.** A) Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Restricción enzimática del plásmido pBSL142 con *Hind*III y *Spe*I. Se cortó la banda de 1672 bp correspondiente al  $\Omega$ -Gm. M: GeneRuler 1 kb. Carril 1: Restricción enzimática pBSL142. Carril 2: ADN plasmídico pBSL142 sin cortar. B) Predicción del patrón de restricción de pBSL142 en SnapGene. C) Curva estándar de la restricción de pBSL142 elaborada en Excel.

## Clonación $\Omega$ -Gm en pGBD

Se abrió el plásmido pGBD con las enzimas de restricción *Hind*III y *Spe*I y fue ligado con el gen  $\Omega$ -Gm cortado con las mismas enzimas. Como resultado se obtuvo la construcción plasmídica pGBDGm con un tamaño de 6284 bp (Figura 22A) y con resistencia a ampicilina (200  $\mu$ g/ml) y gentamicina (8  $\mu$ g/ml) (Figura 22B). Para comprobarlo se hizo extracción plasmídica y posteriormente restricción enzimática con *Eco*RI, donde se visualizaron en un gel de agarosa al 1.2%, una banda de 3287 bp y otra de 2997 bp (Figura 23A). Se hizo una curva estándar para determinar los tamaños aproximados de las bandas visualizadas en el gel de agarosa (Figura 23C).



**Figura 22.** A) Representación gráfica del plásmido pGBDGm, la línea roja representa el gen  $\Omega$ -Gm insertado. Creado con SnapGene. B) Transformación pGBDGm en células competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  sembradas en agar LB + Amp + Gm.

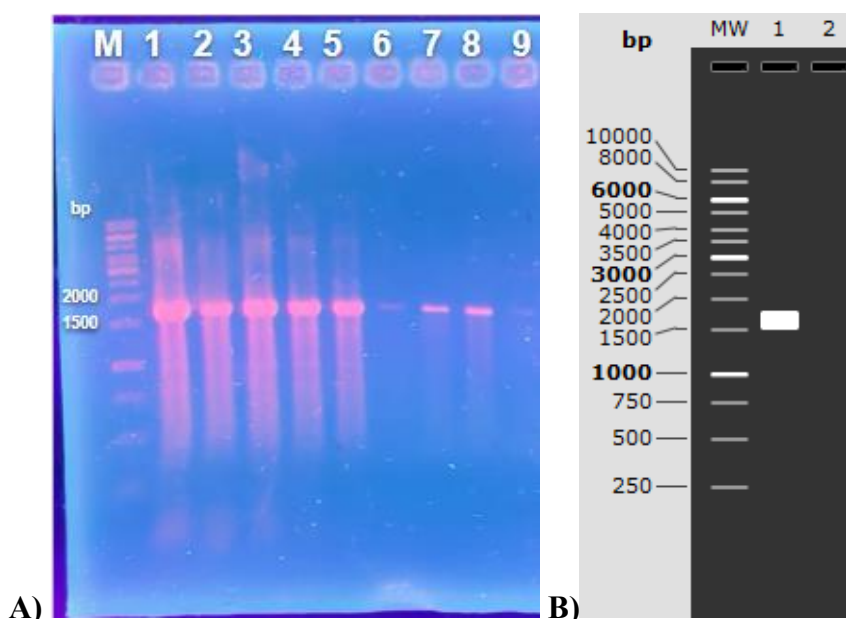


**Figura 23. A)** Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. M: GeneRuler 1 kb. Carril 1: ADN plasmídico pGBDGm sin cortar. Carril 2-9: Restricción enzimática pGBSGm con *EcoRI*. **B)** Predicción del patrón de restricción de pGBDGm en SnapGene. **C)** Curva estándar de la restricción de pGBDGm, los tamaños obtenidos son aproximados a los predichos por SnapGene.

Con estos resultados, se llegó a la conclusión de que clonó con éxito el brazo derecho y el gen de resistencia a antibiótico, por lo tanto, se decidió iniciar la clonación de la última parte que corresponde al brazo derecho para obtener la construcción plasmídica que se usará para obtener la mutante del operón *pqq* de *A. brasilense Sp7*.

## PCR Brazo izquierdo

Se hicieron reacciones de PCR con cantidades y condiciones similares a las del brazo derecho, pero no se obtuvo ningún amplificado, por lo que se decidió añadir DMSO a la reacción de PCR para disminuir la formación de secuencias secundarias entre los oligonucleótidos y que éstos se puedan unir adecuadamente a la secuencia de ADN. Se hizo un gradiente de 57 – 66°C, los 9 productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.2% en buffer TBE 0.5X a 90 V junto al marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb. En la mayoría de las reacciones de PCR se obtuvo el amplificado esperado de 1736 bp (Figura 24). La banda deseada se vio mejor definida y sin barridos a 63.6 y 65°C por lo que se sugiere que la temperatura de alineamiento podría ser de 64°C.



**Figura 24.** Amplificación del brazo izquierdo usando gradiente de 57 a 66°C. Del carril 1-9 se ve una banda correspondiente a la esperada de 1736 bp. **A)** Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. M: GeneRuler 1 kb. Carril 1: 57°C. Carril 2: 57.7°C. Carril 3: 58.2°C. Carril 4: 59.7°C. Carril 5: 61.3°C. Carril 6: 62.9°C. Carril 7: 63.6°C. Carril 8: 65°C. Carril 9: 66°C. **B)** Predicción de la amplificación del brazo izquierdo de 1736 bp en SnapGene.

Aún falta hacer más pruebas de PCR para confirmar la temperatura de alineamiento a 64°C y para obtener el brazo izquierdo y clonarlo en la construcción pGBDGm para continuar con la obtención de la mutante por delección del operón *pqq* de *Azospirillum brasilense* Sp7.

## Discusión

La interacción bacteria-planta es una de las asociaciones más estudiadas debido a los beneficios de diversos microorganismos en la promoción del crecimiento vegetal (1). Una de las bacterias más estudiadas es *A. brasilense* Sp7, una rizobacteria Gram-negativa fijadora de nitrógeno, descrita en muchos estudios por proveer nutrientes, inducir resistencia a agentes patógenos y producir fitohormonas (43). El análisis bioinformático reveló que *A. brasilense* Sp7 contiene 5 genes para la biosíntesis de PQQ dispuestos en un operón (*pqqA*, *pqqB*, *pqqC*, *pqqD* y *pqqE*). PQQ es un cofactor de quinoproteínas deshidrogenasas como la glucosa deshidrogenasa, la cual es responsable de tomar la glucosa del medio y convertirla en ácido glucónico. El ácido glucónico es el responsable de solubilizar los fosfatos al liberar fósforo de minerales de fosfato y otros fosfatos inorgánicos, el cual se vuelve biodisponible para la planta (17,18,44,45).

El objetivo general de este trabajo fue realizar una construcción plasmídica para obtener la mutante por delección del operón *pqq*. Para obtener la construcción plasmídica, se analizaron bioinformáticamente las regiones río arriba y río abajo del operón *pqq* en un margen de 2000 bp con la finalidad de elegir la región óptima a clonar mediante PCR. Dicha región debía tener sitios de restricción únicos que coincidieran con los de los vectores plasmídicos pGEM-T Easy y pBSL142 para poder hacer las clonaciones. La región río abajo del operón *pqq* fue la que cumplió con este criterio, dentro de esta región se encontraron los sitios de restricción para las enzimas *XhoI*, *HindIII*, *SphI* y *EcoRV* (Figura 7). Se decidió trabajar con las enzimas *SphI* y *HindIII* porque son las más próximas al operón y porque son enzimas disponibles en el laboratorio. A partir de ahí se diseñaron los oligonucleótidos PQQHIND3F25 y PQQSPH1R26.

Para clonar la región río abajo, denominada “brazo derecho”, se decidió trabajar con el plásmido pGEM-T Easy debido a que es un sistema muy conveniente para clonar productos de PCR generados por la polimerasa que se maneja en el laboratorio, la ADN polimerasa Dream Taq. Esta polimerasa tiene la característica de añadir una base adenina (A) al extremo 3' de los productos de PCR, mientras que pGEM-T Easy contiene una base timina (T), lo cual resultó muy útil para la clonación TA. De esta forma se obtuvo la clona denominada pGBD,

la cual se comprobó con el crecimiento de colonias blancas resistentes a Ampicilina y con técnicas de biología molecular como PCR y restricción enzimática. La PCR es una de las técnicas básicas de biología molecular para el análisis de secuencias de ADN que genera múltiples copias de un segmento específico de ADN (46,47). A partir de la extracción de ADN de la clona 1 se hizo PCR con los oligonucleótidos PQQHIND3F25 y PQQSPH1R26 para determinar la presencia del brazo derecho en la clona seleccionada. Se obtuvo un amplificado positivo de 1655 bp (Figura 16A) confirmando la presencia de este fragmento.

Así mismo se hizo una restricción enzimática con las enzimas *EcoRI*, *SalI*, *HindIII*, y *SpeI*. Se usó *EcoRI* porque es una de las enzimas que permite remover el inserto con una digestión simple, en caso de que no se haya clonado nada, en el gel se observaría una banda de 3 kb, en caso de que sí, se observarían dos bandas, una de 3 kb y otra del tamaño del inserto. En el carril 1 de la Figura 17A se observaron dos bandas, una de 2997 bp y otra de 1673 bp correspondiente al brazo derecho. Se usó *SalI* porque esta enzima tiene dos sitios de restricción en pGBD, uno de esos sitios proviene de pGEM-T Easy, mientras que el otro sitio se encuentra dentro del inserto, al hacer la restricción se observaron dos bandas, una de 4184 bp y otra de 486 bp. También se hizo restricción con *HindIII* porque presenta un sitio único de restricción ubicado en el inserto, esta enzima no tiene sitio de restricción en pGEM-T Easy por lo tanto si corta es por la clonación del brazo derecho. Finalmente se hizo restricción con *SpeI* que presenta sitio de restricción único proveniente de pGEM-T Easy, por lo tanto, si el brazo derecho está clonado se obtendría una banda de casi 4.7 kb, de lo contrario se observaría una banda de 3 kb. En el carril 4 de la Figura 17A se observó una banda única de 4670 bp.

Otra técnica de biología molecular que se utilizó para confirmar la clonación del brazo derecho fue la secuenciación. Se mandó a secuenciar solo la clona analizada mediante PCR y restricción enzimática a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM donde se empleó el método de Sanger, uno de los más utilizados en los últimos años. La secuenciación de Sanger se basa en la amplificación de una cadena de ADN usando didesoxinucleótidos (ddNTPs), los cuales interrumpen la amplificación generando fragmentos con longitudes variables que son separados por electroforesis capilar y posteriormente se detecta la fluorescencia de los ddNTPs para determinar la secuencia

nucleotídica. La ventaja de clonar en pGEM-T Easy es que contiene el sitio de unión para los oligonucleótidos de secuenciación universales pUC/M13. Una vez obtenidos los resultados, se analizaron con el programa BioEdit v7.2.5 donde se visualizó un electroferograma y se obtuvo la secuencia en formato FASTA. Una de las limitaciones de la secuenciación de Sanger es que presenta secuencias de baja calidad en los primeros y últimos 15-40 bp debido a la pobre resolución de pequeños fragmentos y grandes fragmentos en la electroforesis. Los nucleótidos no determinados fueron eliminados manualmente de la secuencia, se eliminaron aquellas pares de bases sobrepuestas y no bien definidas. La secuencia obtenida se ingresó en la base de datos Nucleotide BLAST de NCBI, una herramienta bioinformática que detecta regiones de similitud entre secuencias biológicas comparando secuencias de nucleótidos con bases de datos de secuencias y calcula la significancia estadística de esas comparaciones (48), para determinar si el fragmento clonado corresponde al brazo derecho. El análisis reveló que efectivamente el inserto corresponde al esperado con un 96.23% de identidad, un valor E de 0.0 y un score de 1705 el cual fue significativo (Figura 19). El propósito de mandar a secuenciar también fue para conocer la dirección en que se clonó el brazo derecho y con eso establecer las enzimas a utilizar para clonar el marcador de selección.

Se seleccionó el plásmido pBSL142 por sus característicos sitios de clonación múltiple (MCS) y por poseer un gen de resistencia a gentamicina o  $\Omega$ -Gm. Su diseño provee varias opciones de sitios de restricción a elegir para realizar construcciones plasmídicas y mutagénesis (42). Se utilizó el gen  $\Omega$ -Gm para concederle la resistencia a gentamicina y que sirviera como marcador de selección para obtener la construcción plasmídica pGBDGm. La elección del gen  $\Omega$ -Gm se debe a que *A. brasilense* Sp7 es resistente a ampicilina, pero sensible gentamicina, de esta forma se aseguró que las colonias crecidas en placas de agar LB + Apm + Gm sea por la clonación del marcador y no por resistencia natural (11).

La clonación del gen  $\Omega$ -Gm en pGBD se realizó mediante restricción enzimática. Se hizo una restricción doble con *Hind*III y *Spe*I porque son enzimas que tienen sitios de restricción en pGBD y pBSL142 y porque, de acuerdo con la dirección en que se clonó el brazo derecho, el marcador de selección se debe clonar del lado donde está el sitio de restricción para *Hind*III para que tome el lugar del operón *pqq* cuando se realice la mutación. Dando lugar a la construcción plasmídica pGBDGm.

Se seleccionaron las colonias blancas que crecieron en medio LB + Amp + Gm, a las cuales se les hizo restricción enzimática con *EcoRI* para confirmar la clonación del marcador de selección, dando como resultado dos bandas de tamaños similares, 3287 y 2997 bp.

Se realizó una primera prueba de PCR para amplificar el brazo izquierdo usando un gradiente de temperatura de 57-66°C para determinar la temperatura de alineamiento, la cual con los resultados obtenidos (Figura 24) se sugiere sea de 64°C debido a que en el gradiente las bandas más definidas se presentaron a 63.6°C y 65°C. Hace falta realizar más pruebas de PCR para determinar la temperatura de alineamiento óptima, sin embargo, ya se obtuvo una primera prueba positiva de que los oligonucleótidos diseñados son específicos para amplificar la región río arriba del operón *pqq*, correspondiente al brazo izquierdo.

El brazo derecho se clonó en el vector plasmídico pGEM-T Easy ya que es muy útil para clonaciones TA y posteriormente se transformó en *E. coli* DH5α donde se agregó un gen de resistencia a gentamicina como marcador de selección proveniente del plásmido pBSL142, en otros trabajos se han reportado con éxito las mismas estrategias con la diferencia de que emplearon el vector pCR2.1, el cual también resulta útil para clonaciones TA (49).

Como se propuso en la estrategia de trabajo (Figura 5), una vez obtenida la construcción plasmídica final, se pretende clonarlo en un vector suicida para inducir a la bacteria a realizar una doble recombinación homóloga y de esta forma obtener la mutante, tal y como se ha reportado en otros trabajos como el de Carreño-López *et al.*, en 2009, en donde obtuvieron las mutantes Sp74031 (*chsA*-Tn5) y Sp74088 (*purK*-Tn5) por recombinación homóloga donde utilizaron como vector suicida a pSUP202 (13).

Se ha reportado que los vectores suicidas son útiles para la mutagénesis debido a que permiten la movilización de ADN en *Azospirillum* sin la integración estable de todo el vector, lo cual resulta favorable para las recombinaciones homólogas donde se reemplaza el ADN del huésped con el ADN transmitido por el vector (50).

La finalidad de una mutación por delección del operón *pqq* de *A. brasilense* Sp7 es para analizar su relación directa con la solubilización de fosfatos en esta cepa, en el estudio de Vikram y colaboradores utilizaron la construcción pMCG898 que contiene los genes para la biosíntesis de PQQ para movilizarlo dentro de una cepa de *Azospirillum* incapaz de

solubilizar fosfatos por medio de conjugación bilateral, el resultado obtenido fue que dicha cepa adquirió la capacidad de solubilizar fosfato dicálcico (44). En el estudio de Sharma y colaboradores analizaron la cepa *Priestia megaterium* AIOASP1 como promotor del crecimiento del tomate y encontraron que los genes *gcd* y *pqq* fueron los responsables de aumentar la absorción de fósforo de las plantas a través de la producción de ácido orgánico (51). Los resultados obtenidos en este trabajo nos acercan más a obtener la mutante esperada de *A. brasilense* Sp7 para continuar con los estudios sobre el operón *pqq* y la solubilización de fosfatos en esta cepa.

## Conclusiones

*A. brasilense* es una de la rizobacterias más estudiadas debido a los diversos mecanismos que tiene para promover el crecimiento de las plantas. El más estudiado es la fijación de nitrógeno, sin embargo, también cuenta con otros mecanismos como la solubilización de fosfatos. Si bien es un mecanismo ya reportado en otras rizobacterias, en *A. brasilense* Sp7 no se ha descrito el proceso de forma completa y detallada. En este proyecto se realizó la construcción plasmídica pGBDGm la cual contiene la región río abajo del operón *pqq* de *A. brasilense* Sp7 y el gen  $\Omega$ -Gm como marcador de selección, para en un futuro clonar la región río arriba y con ello obtener la mutante por delección del operón PQQ en esta cepa. De esta forma proponer a *A. brasilense* Sp7 como modelo de estudio para la regulación de la expresión de los genes *pqq* y continuar con las investigaciones del cofactor PQQ y su papel en la promoción del crecimiento vegetal.

## Perspectivas

Posteriormente se pretende clonar la región río arriba del operón *pqq* de *A. brasilense* Sp7 correspondiente al brazo izquierdo, en la construcción plasmídica obtenida en este proyecto para clonarlo en un vector suicida, como el pSUP202. La razón de utilizar dicho plásmido es porque carece de un origen de replicación compatible para *A. brasilense* Sp7, por lo que al insertarlo en *A. brasilense*, la bacteria solo tendrá la opción de degradar el plásmido o integrarlo a su genoma, además de que contiene genes de movilidad y genes de resistencia a ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina como marcadores (52). Para eliminar el operón *pqq* se decidió hacerlo mediante una doble recombinación homóloga, por ello se delimitaron sus regiones río arriba y río abajo y se clonó un marcador de selección que es un gen de resistencia a gentamicina. Lo que se espera es que se recombinen las regiones homólogas y se intercambie el operón *pqq* por el gen de resistencia a gentamicina como se ilustra en la figura 5. De esta forma se obtendría la mutante por delección del operón *pqq* de *Azospirillum brasilense* Sp7 y así continuar con las investigaciones sobre el papel de PQQ en la solubilización de fosfatos como mecanismo para promover el crecimiento vegetal.

## Bibliografía

1. Verbon EH, Liberman LM. Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends Plant Sci.* 2016;21(3):218–229.
2. Domínguez-Castillo C, Alatorre-Cruz JM, Castañeda-Antonio D, Munive JA, Guo X, López-Olguín JF, *et al.* Potential seed germination-enhancing plant growth-promoting rhizobacteria for restoration of *Pinus chiapensis* ecosystems. *J For Res (Harbin).* 2021;32(5):2143–2153.
3. Sun W, Shahrajabian MH, Wang N. A study of the different strains of the genus *Azospirillum* spp. on increasing productivity and stress resilience in plants. *Plants.* 2025;14(2):267-290.
4. Singh HB, Keswani C, Reddy MS, Sansinenea E, García-Estrada C. Secondary metabolites of plant growth promoting rhizomicroorganisms: Discovery and applications. Singapore: Springer; 2019.
5. Rodrigues GL, Matteoli FP, Gazara RK, Rodrigues PSL, dos Santos ST, Alves AF, *et al.* Characterization of cellular, biochemical and genomic features of the diazotrophic plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* sp. UENF-412522, a novel member of the *Azospirillum* genus. *Microbiol Res.* 2022;254:12.
6. Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2009;63:541–556.
7. Timofeeva AM, Galyamova MR, Sedykh SE. How do plant growth-promoting bacteria use plant hormones to regulate stress reactions? *Plants.* 2024;13(17):2371-2394.
8. Rodrigues AC, Bonifacio A, de Araujo FF, Junior MAL, do Vale Barreto Figueiredo M. *Azospirillum* sp. as a challenge for agriculture. En: Maheshwari DK, editor. *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem.* Switzerland: Springer;2015. 29–51.
9. Singh VS, Dubey BK, Rai S, Singh SP, Tripathi AK. Engineering D-glucose utilization in *Azospirillum brasilense* Sp7 promotes rice root colonization. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2022;106(23):7891–903.
10. Ferreira NDS, Sant’ Anna FH, Reis VM, Ambrosini A, Volpiano CG, Rothballer M, *et al.* Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* SP245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2020;70(12):6203–12.

11. Holguin G, Patten CL, Glick BR. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. Biol Fertil Soils. 1999;29:10-23.
12. Dubey AP, Pandey P, Mishra S, Gupta P, Tripathi AK. Role of a fasciclin domain protein in photooxidative stress and flocculation in *Azospirillum brasilense* Sp7. Microbiol Res. 2021;172(6):10.
13. Carreño-López R, Sánchez A, Camargo N, Elmerich C, Baca BE. Characterization of *chsA*, a new gene controlling the chemotactic response in *Azospirillum brasilense* Sp7. Arch Microbiol. 2009;191(6):501–507.
14. Steenhoudt O, Vanderleyden J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol Rev. 2000;24(4):487–506.
15. Ewel JJ, Schreeg LA, Sinclair TR. Resources for crop production: Accessing the unavailable. Trends Plant Sci. 2019;24(2):121-129.
16. Wang L, Zhou F, Zhou J, Harvey PR, Yu H, Zhang G, *et al.* Genomic analysis of *Pseudomonas asiatica* JP233: An efficient phosphate-solubilizing bacterium. Genes. 2022;13(12):19.
17. Rasul M, Yasmin S, Suleman M, Zaheer A, Reitz T, Tarkka MT, *et al.* Glucose dehydrogenase gene containing phosphobacteria for biofortification of phosphorus with growth promotion of rice. Microbiol Res. 2019;223–225:1-12.
18. Vera-Cardoso BC, Muñoz-Rojas J, Munive JA, Marín-Cevada V, Flores-Encarnación M, Carreño-López R. Pirroloquinolinaquinona (PQQ) y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). De la biosíntesis a los fenotipos. Alianzas y Tendencias BUAP. 2017;2(1):22–29.
19. Beltrán Pineda ME. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. Rev. Cienc. Tecnol. Agropecu. 2015;15(1):101–13.
20. Li XL, Zhao XQ, Dong XY, Ma JF, Shen RF. Secretion of gluconic acid from *Nguyenibacter* sp. L1 is responsible for solubilization of aluminum phosphate. Front Microbiol. 2021;12:1–9.
21. Pan L, Cai B. Phosphate-Solubilizing Bacteria: Advances in their physiology, molecular mechanisms and microbial community effects. Microorganisms. 2023;11(12):2904.
22. Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus. 2013;2(1):587.

23. Ding Y, Yi Z, Fang Y, He S, Li Y, He K, *et al.* Multi-omics reveal the efficient phosphate-solubilizing mechanism of bacteria on rocky soil. *Front Microbiol.* 2021;12:13.
24. Paredes-Mendoza M, Espinosa-Victoria D. organic acids produced by phosphate solubilizing rhizobacteria : A critical review. *Terra Latinoamericana.* 2009;28:61–70.
25. Bagewadi ZK, Yaraguppi DA, Mulla SI, Deshpande SH. response surface methodology based optimization, partial purification and characterization of alkaline phosphatase isolated from *Pseudomonas asiatica* strain ZKB1 and its application in plant growth promotion. *Mol Biotechnol.* 2022;64(9):984–1002.
26. Gao H, Wang Y, Yang J, Qiu M, Lei Z, Zhang W, *et al.* Microbial synthesis of pyrroloquinoline quinone. *World J Microbiol Biotechnol.* 2024;40(1):1–7.
27. Carreño-López R, Alatorre-Cruz JM, Marín-Cevada V. Pyrroloquinoline quinone (PQQ): Role in plant-microbe interactions. En: Singh HB *et al.* editor. *Secondary metabolites of plant growth promoting rhizomicroorganisms: Discovery and applications.* Singapore: Springer; 2019. 169–84.
28. Latham JA, Iavarone AT, Barr I, Juthani P V., Klinman JP. PqqD is a novel peptide chaperone that forms a ternary complex with the radical S-adenosylmethionine protein PqqE in the pyrroloquinoline quinone biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* 2015;290(20):12908–12918.
29. Fang T, Lo SC, Yu YN, Sou NL, Hung SHW, Peng JH, *et al.* Development of an engineered bacterial endophyte: promoting plant growth through pyrroloquinoline quinone (PQQ) synthesis. *Microorganisms.* 2025;13(2):17.
30. Flores-Encarnación M, Sánchez-Cuevas M, Ortiz-Gutiérrez F. Las PQQ-deshidrogenasas. Un novedoso ejemplo de quinoproteínas bacterianas. *Rev Latinoam Microbiol.* 2004;46(1–2):47–59.
31. Goodwin PM, Anthony C. The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. *Adv Microb Physiol.* 1998;40:1-80.
32. Ikemoto K, Mori S, Mukai K. Synthesis and crystal structure of pyrroloquinoline quinol (PQQH<sub>2</sub>) and pyrroloquinoline quinone (PQQ). *Acta Crystallogr B Struct Sci Cryst Eng Mater.* 2017;73(3):489–97.
33. Munder F, Voutsinos M, Hantke K, Venugopal H, Grinter R. High-affinity PQQ import is widespread in Gram-negative bacteria. *Sci. Adv.* 2025;11(22):13.
34. Oubrie A, Rozeboom HJ, Dijkstra BW. Active-site structure of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase complexed with methylhydrazine: A covalent cofactor-inhibitor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(21):11787–11791.

35. Duine JA, Van Der Meer RA, Groen BW. The cofactor pyrroloquinoline quinone. *Annu Rev Nutr.* 1990;10(1):297–318.
36. Zhao C, Wan Y, Cao X, Zhang H, Bao X. Comparative genomics and analysis of the mechanism of PQQ overproduction in *Methylobacterium*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2021;37(6):100.
37. Li X, Zhang M, Zhang Q, Tan F, Gong Z, Xie Y, *et al.* Insights into pyrroloquinoline quinone (PQQ) effects on soil nutrients and pathogens from pepper monocropping soil under anaerobic and aerobic conditions. *Microbiol Spectr.* 2022;10(4):15.
38. Cordell GA, Daley SK. Pyrroloquinoline quinone chemistry, biology, and biosynthesis. *Chem Res Toxicol.* 2022;35(3):355-377.
39. Lo SC, Tsai SY, Chang WH, Wu IC, Sou NL, Hung SHW, *et al.* Characterization of the pyrroloquinoline quinone producing *Rhodopseudomonas palustris* as a plant growth-promoting bacterium under photoautotrophic and photoheterotrophic culture conditions. *Int J Mol Sci.* 2023;24(18):17.
40. Barr I, Latham JA, Iavarone AT, Chantarojsiri T, Hwang JD, Klinman JP. Demonstration that the radical s-adenosylmethionine (SAM) enzyme PqqE catalyzes de novo carbon-carbon cross-linking within a peptide substrate PqqA in the presence of the peptide chaperone PqqD. *J. Biol. Chem.* 2016;291(17):8877–8884.
41. Tahir M, Naeem MA, Shahid M, Khalid U, Farooq ABU, Ahmad N, *et al.* Inoculation of pqqE gene inhabiting *Pantoea* and *Pseudomonas* strains improves the growth and grain yield of wheat with a reduced amount of chemical fertilizer. *J Appl Microbiol.* 2020;129(3):575–589.
42. Alexeyev MF, Shokolenko IN, Croughan TP. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for Escherichia coli vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene.* 1995;160(1):63-67.
43. Parra Y. Revisión bibliográfica potencialidades de *Azospirillum* como inoculante. *Cultivos Tropicales.* 2001;23(3):31–41.
44. Vikram A, Alagawadi AR, Krishnaraj PU, Mahesh Kumar KS. Transconjugation studies in *Azospirillum* sp. negative to mineral phosphate solubilization. *World J Microbiol Biotechnol.* 2007;23(9):1333–1337.
45. Magnusson OT, Toyama H, Saeki M, Rojas A, Reed JC, Liddington RC, *et al.* Quinone biogenesis: Structure and mechanism of PqqC, the final catalyst in the production of pyrroloquinoline quinone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(21):7913–7918.
46. Karunanathie H, Kee PS, Ng SF, Kennedy MA, Chua EW. PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR. *Biochimie.* 2022;197:130-143.

47. Basu C. PCR primer design. 2<sup>da</sup> ed. New York, NY: Springer; 2015.
48. Crossley BM, Bai J, Glaser A, Maes R, Porter E, Killian ML, *et al.* Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2020;32(6):767–775.
49. Jijón-Moreno S, Baca BE, Castro-Fernández DC, Ramírez-Mata A. TyrR is involved in the transcriptional regulation of biofilm formation and D-alanine catabolism in *Azospirillum brasilense* Sp7. *PLoS One.* 2019;14(2):1–22.
50. Pereg L, McMillan M. Molecular tools to study *Azospirillum* sp. and other related plant growth promoting rhizobacteria. En: Cassán F, Okon Y, Creus C, editores. *Handbook for Azospirillum.* Switzerland: Springer; 2015. 65-82.
51. Sharma H, Gupta S, Chauhan R, Tripathi DK, Pandey S. Phosphorus solubilizing *Priestia Megaterium* AIOASP1 enhances tomato growth and wilt resistance through antioxidant gene regulation. *Plant Sci.* 2025;359:20.
52. Simon R, Priefer U, Pühler A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Nat Biotechnol.* 1983;1(9):784–791.

## Anexos

### Zyppy™ Plasmid Miniprep de Zymo Research

1. Agregar 600 µl de cultivo bacteriano en medio LB a un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
  - Si es muy poco pellet bacteriano, se puede centrifugar y agregar más cultivo (hasta 3 ml).
  - Se recomienda usar medio LB, si proviene de otro medio de cultivo se deben centrifugar 600 µl – 3 ml, 30 segundos a máxima velocidad y resuspender en 600 µl de H<sub>2</sub>O PISA o Buffer TE.
2. Agregar 100 µl de 7X Lysis Buffer y mezclar invirtiendo el tubo 4-6 veces. Dejar reposar 2 minutos.
  - Debe pasar de color azul fuerte a azul claro para asegurar la lisis.
  - Si el 7X Lysis Buffer tiene algún precipitado se debe incubar a 30-37°C por 30 minutos, luego mezclar por inversión para resuspender el buffer. No usar microondas.
3. Agregar 350 µl de Neutralization Buffer frío y mezclar bien por inversión. La solución del tubo se volverá amarilla cuando termine de neutralizar y se comenzará a ver una masa visible.
  - Adicionalmente invertir 2-3 veces para asegurar la neutralización.
4. Centrifugar 3 minutos a 12000 rpm.
5. Transferir sobrenadante a la columna Zymo-Spin IIN sin tocar el pellet.
6. Centrifugar 15 segundos a 12000 rpm.
7. Desechar flujo continuo y volver a colocar la misma columna a la camisa.
8. Agregar 200 µl de Endo-Wash Buffer a la columna y centrifugar por 30 segundos.
  - Se puede o no desechar el flujo.
9. Agregar 400 µl de Zyppy Wash Buffer a la columna y centrifugar por 1 minuto. Desechar flujo continuo.
10. Transferir columna a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y agregar 30 µl de Zyppy Elution Buffer directamente al filtro blanco de la columna y dejar reposar 1 minuto a temperatura ambiente.
  - Dejar reposar 5-10 minutos para plásmidos >10 kb.
11. Centrifugar por 30 segundos para eluir el ADN plasmídico.

## Preparación de soluciones

### Acetato de sodio 3M pH 5.2

	g/L
Acetato de sodio	246.09 (3M)
Agua destilada	Aforar a 1L

Ajustar pH a 5.2 con ácido acético glacial. Esterilizar a 15 lb durante 15 minutos.

### Agar LB

	g/L
NaCl	10
Triptona	10
Extracto de levadura	5
Agar	15 (1.5%)
Agua destilada	Aforar a 1L

Esterilizar a 10 lb durante 15 minutos.

### Agarosa al 0.7%

	g/L
Agarosa	7
Buffer TBE 0.5X	Aforar a 1L

Calentar en microondas hasta que se funda la agarosa por completo.

### **Agarosa al 1.2%**

	g/L
Agarosa	12
Buffer TBE 0.5X	Aforar a 1L

Calentar en microondas hasta que se funda la agarosa por completo.

### **Buffer TBE 0.5X**

	g/100 ml
Buffer TBE 10X	
Tris base	10.8
Ácido bórico	5.5
EDTA	0.744 (0.5M)
Agua destilada	50 ml

Disolver con agitador magnético y luego ajustar pH a 8.2-8.4 con HCl. Aforar a 100 ml con agua destilada. Esterilizar a 15 lb durante 15 minutos.

Disolver 20 veces con agua destilada para llegar a una concentración final de 0.5X.

### **Buffer TE<sub>10/1</sub>**

	g/L
Tris base	1.2114 (10 mM)
EDTA	3.7224 (1 mM)
Agua destilada	Aforar a 1L

Esterilizar a 15 lb durante 15 minutos.

**Buffer TE<sub>50/20</sub>**

	g/L
Tris base	6.057 (50 mM)
EDTA	7.4448 (20 mM)
Agua destilada	Aforar a 1L

Esterilizar a 15 lb durante 15 minutos.

**Cloroformo: alcohol isoamílico 24:1**

	ml/50 ml
Cloroformo	48
Alcohol isoamílico	2

**Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1**

	ml/50 ml
Fenol	25
Cloroformo	24
Alcohol isoamílico	1

**Medio líquido LB**

	g/L
NaCl	10
Triptona	10
Extracto de levadura	5
Agua destilada	Aforar a 1L

Esterilizar a 10 lb durante 15 minutos.

## Medio SOC

	L
NaCl	10 mM
Triptona	2%
Extracto de levadura	0.5%
KCl	2.5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glucosa	20 mM
Agua destilada	Aforar a 1L

Esterilizar a 10 lb durante 15 minutos.

## MMAB

	g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
NH <sub>4</sub> Cl	1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3
KCl	0.15
*CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01
*FeSO <sub>4</sub>	0.0025
Ácido málico	34 mM
*Microelementos 100X	10 ml
Agua destilada	Aforar a 1L
Microelementos 100X	g/L
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.25
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.07

CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.014
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0125
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.003
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.05
Agua destilada	Aforar a 1L

Ajustar pH a 7.0 con KOH. Esterilizar a 10 lb durante 10 minutos.

\*CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub> y microelementos 100X se agregan al final después de esterilizar el resto del medio.

### NaCl 5M

	g/L
NaCl	292.2 (5M)
Agua destilada	Aforar a 1L

Esterilizar a 15 lb durante 15 minutos.

### NaI 6M

	g/L
NaI	899.34 (6M)
Agua destilada	Aforar a 1L

Esterilizar a 15 lb durante 15 minutos.

## **New Wash 1X**

	ml/L
New Wash 10X	50
H <sub>2</sub> O PISA	450
Etanol 96%	500

	g/50 ml
New Wash 10X	
Tris base	1.21
NaCl	2.92
Agua destilada	Aforar a 50 ml

Esterilizar a 15 lb durante 15 minutos.

## **Sílica**

1. Pesar 0.5 g de sílica en una balanza analítica.
2. Disolver por agitación en 14 ml de H<sub>2</sub>O PISA pH 2.0 en un tubo Falcon de 14 ml.
3. Dejar reposar toda la noche.
4. Centrifugar durante 1 min a 6000 rpm.
5. Desechar sobrenadante.
6. Hacer 3 lavados más con 14 ml de H<sub>2</sub>O PISA pH 2.0.
7. Desechar sobrenadante.
8. Resuspender sílica en 2 ml de H<sub>2</sub>O PISA pH 2.0.
9. Pasar a un tubo Eppendorf de 1.5 ml con ayuda de una micropipeta.
10. Almacenar a temperatura ambiente.

### **Solución 1 miniprep**

	g/50 ml
Tris base	0.303
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	0.186
Agua destilada	30 ml

Ajustar pH a 8.0 con HCl. Aforar a 50 ml con agua destilada. Esterilizar a 15 lb durante 15 minutos.

### **Solución 2 miniprep**

	g/50 ml
NaOH	0.4
SDS	0.5
Agua destilada	Aforar a 50 ml

Esterilizar a 15 lb durante 15 minutos.

### **Solución 3 miniprep**

	g/50 ml
Acetato de potasio	14.725
Agua destilada	30 ml

Ajustar pH a 5.5 con ácido acético glacial. Aforar a 50 ml con agua destilada. Esterilizar a 15 lb durante 15 minutos.

### **Solución de competencia CaCl<sub>2</sub> 150 mM**

	g/100 ml
CaCl <sub>2</sub>	2.205 (150 mM)
Agua destilada	Aforar a 100 ml

Esterilizar usando un filtro de jeringa con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ .