

Resumen

Azotobacter vinelandii es una bacteria gram negativa, que pertenece a las γ -proteobacterias. La bacteria produce dos metabolitos secundarios de interés biotecnológico: el poliéster intracelular, poli- β -hidroxibutirato y el polisacárido extracelular alginato, ambos de uso industrial.

La producción del polisacárido extracelular alginato está regulada por un sistema de regulación de la familia de doble componente llamado GacS/A. De manera general, éste es un regulador global que a su vez controla a otros sistemas de regulación como al sistema de control post-transcripcional Csr (Rsm). Su elemento principal es una pequeña proteína de unión a RNA referida como CsrA en *E. coli* o RsmA en especies de *Erwinia* y *Pseudomonas*. CsrA se une a una región cercana al sitio de unión a ribosoma (RBS) de los ARN mensajeros que son sus blancos de regulación, impidiendo así su traducción y promoviendo su degradación. Originalmente, en *E. coli*, se logró identificar el gen *csrA* mediante mutagénesis al azar mediada por transposones. La inserción del transposón se localizó en el codón 51 del gen (Timmermans y Melderer, 2009). CsrA controla el flujo de carbono intracelular por una regulación positiva de la glucólisis, pero al mismo tiempo regula negativamente la gluconeogénesis y la síntesis de glucógeno. Por lo tanto, en ausencia de CsrA la síntesis de glucógeno es fuertemente favorecida, lo cual genera un estrés metabólico en la bacteria que la hace perder viabilidad; mutantes incapaces de sintetizar glucógeno soportan sin mayor problema la mutación en *csrA*. En este trabajo generamos evidencias que sugieren fuertemente que la mutación en el gen *rsmA* promueve la sobreproducción de alginato lo cual probablemente impide la obtención de mutantes de este gen. Generamos mutaciones con alteraciones en el extremo C-terminal de RsmA similares a la reportadas en *E. coli*, las que se recombinaron en el cromosoma de las cepas silvestre E (productora de alginato) y *EalgD* (no productora de alginato), obteniéndose en la cepa silvestre mutantes merodipliodes y una mutante nula (sin silvestres del gen) en la cepa no productora de alginato JGDE; lo que nos permitió probar que es posible obtener mutantes nulas de *rsmA* en fondos genéticos no productores de alginato.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii es una bacteria que ha generado desde hace varias décadas interés en su estudio, entre otras cosas por su producción de metabolitos secundarios; en particular por la síntesis de alginatos y de poli- β -hidroxibutirato. Estos metabolitos son polímeros que se usan respectivamente en la industria alimenticia/farmacéutica y en la fabricación de plásticos biodegradables.

A. vinelandii es una bacteria gram negativa, vive en suelos y en agua, son células ovoides y grandes que miden de 1.5 a 2 μm . Su movilidad se da gracias a que posee flagelos peritricos, son aerobios pero pueden crecer en condiciones bajas de oxígeno. Son bacterias pleomórficas, variando su morfología desde bacilos hasta células en forma de cocos (Nagpal *et al.* 1989).

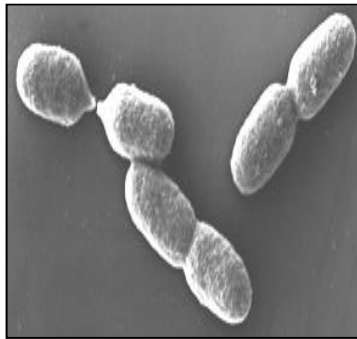


Figura 1
Azotobacter vinelandii en forma bacilar
(Nagpal *et al.* 1989)

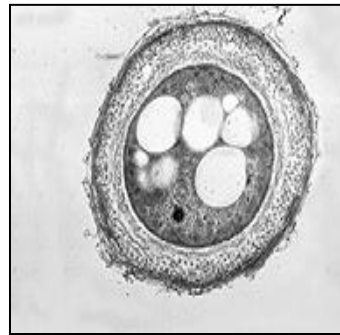


Figura 2
Azotobacter vinelandii en forma de quiste
(Brock *et al.* 1999)

Algunas de las características que hacen a *A. vinelandii* un interesante modelo de estudio son:

- ❑ Produce metabolitos secundarios que la a contender cambios ambientales; como lo es el poliéster intracelular, poli- β hidroxibutirato y el polisacárido extracelular, alginato, como se mencionó ambos polímeros con aplicaciones industriales (Espín 2003).
- ❑ Fija nitrógeno de manera biológica en condiciones aerobias, ya que posee el complejo enzimático de la nitrogenasa y una alta capacidad respiratoria.

- ❑ Posee una alta capacidad respiratoria.
- ❑ Sufre procesos de diferenciación morfológica para formar quistes resistentes a la desecación.

1.2 Ciclo de vida de *A. vinelandii*

Azotobacter vinelandii presenta dos fases en su ciclo de vida (Fig. 3) una fase de crecimiento y una fase de vida latente, por el momento no se conocen las condiciones ambientales que determinen el fin de la fase vegetativa para dar inicio a la etapa de diferenciación (Sadoff, 1975; 2001).

Al inicio del proceso de diferenciación, las células pierden sus flagelos y presentan una última división celular donde se generan dos células esféricas formadas por dos capas; una interna, la intina y otra externa llamada exina, constituidas por alginato en un 13% y 32% respectivamente y lipoproteínas (Lin y Sadoff, 1969). Una vez que se formaron estas capas prosigue la formación del quiste maduro constituido por un cuerpo central basal que en el interior contiene en su interior gránulos de poli- β -hidroxibutirato (PHB) como fuente de carbono de reserva. En condiciones favorables el quiste inicia un proceso de germinación con el hinchamiento del cuerpo central que provoca la ruptura de la exina emergiendo dos células que adquieren nuevamente movilidad (Sadoff, 1975; 2001).

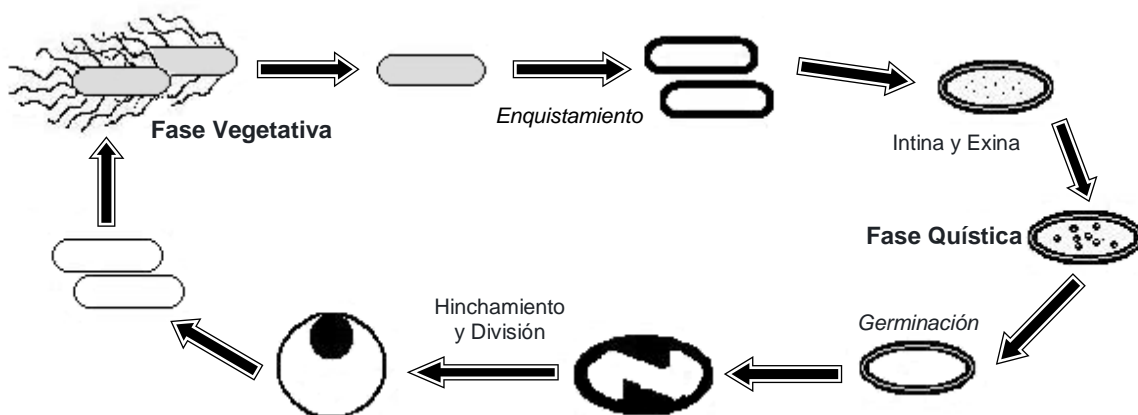


Figura 3
Ciclo de vida de *A. vinelandii*

1.3 Alginato

1.3.1 Aplicación

El alginato es utilizado como agente gelificante y viscosificante en la industria farmacéutica y alimenticia, se le ha encontrado utilidad en el recubrimiento y protección de heridas y en la inmovilización de células y enzimas.

Una de las opciones para la producción de alginato son las algas marinas, como: *Ascophyllum*, *Laminaria*, *Lessonia*, *Ecklonia*, *Durillaea* y *Macrocystis* (Phaeophyceae), sin embargo su calidad es variable por depender de las condiciones del medio ambiente y la edad de los tejidos de donde se extrae, por lo que una opción potencial para la obtención de este producto es, *A vinelandii*.

Azotobacter es un buen candidato para la producción de alginato ya que contiene una distribución de los bloques de residuos de M (ácido manurónico) y G (ácido gulurónico) muy similar a la producida por las algas (Gacesa, 2010).

1.3.2 Composición y función biológica

Los alginatos son una familia de heteropolímeros compuestos por monómeros de ácido gulurónico (G) y ácido manurónico (M), unidos por enlaces β (1-4), cuyo contenido y distribución es variable encontrándose cadenas con secuencias alternas (-M-G-M-G-M), o bloques de monómeros alternados (-M-M-M-G-G-G-M-M-M) donde el número de monómeros en los bloques es irregular (Fig 4) (Haug *et al*, 1971).

Las zonas ricas en ácido gulurónico son zonas de unión entre cadenas, mientras que las ricas en ácido manurónico son las de interacción preferente con el agua. Consecuentemente, la variabilidad en la composición y distribución de ácido manurónico y gulurónico del alginato le confiere variabilidad en la capacidad de gelificación: alginato con alto contenido de ácido gulurónico genera geles rígidos y resistentes, y uno de bajo contenido produce geles suaves y elásticos;

además, los bloques de guluronato interaccionan con iones divalentes, como los de Ca^{++} , haciendo más fuerte la unión entre los residuos del ácido gulurónico y formando geles termorresistentes (Clementi, 1998).

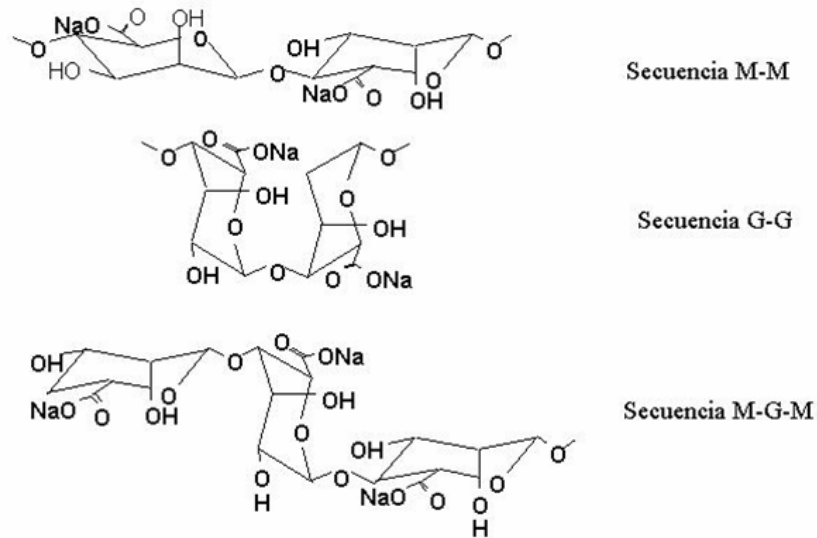


Figura 4
Estructura del exopolisacárido alginato (Haug
et al. 1971)

El alginato es esencial para el enquistamiento ya que es el principal componente de las dos capas que cubren al quiste: la exina y la intina (Lin y Sadoff, 1989).

En condiciones de crecimiento vegetativo esta capa de alginato extracelular actúa como una barrera contra la difusión de oxígeno y metales pesados o de protección contra condiciones adversas (Clementi, 1998).

1.3.3 Síntesis del alginato

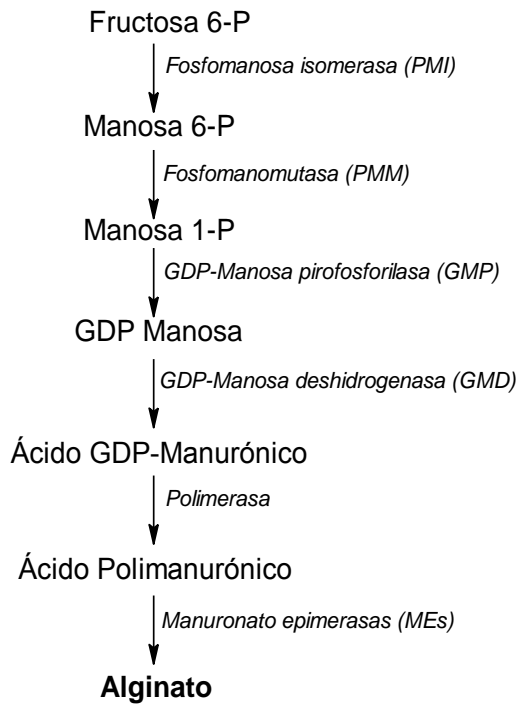


Figura 5
Ruta biosintética del alginato en *A. vinelandii*

En *A. vinelandii* el alginato se sintetiza a partir de fructosa-6-P (Beale y Foster, 1996) la cual es convertida por la fosfo-manosa-isomerasa (PMI), a manosa-6-P, ésta a su vez se convierte en manosa-1-P por la fosfo-mano-mutasa (PMM). El siguiente paso consiste en la activación de la manosa-1-P por la GDP-manosa-pirofosforilasa (GPMP) dando como resultado la formación de GDP-manosa, la cual es oxidada a ácido GDP-manurónico por la GDP-manosa-deshidrogenasa (GMD). El ácido GDP-manurónico es el sustrato que se polimeriza a nivel de la membrana interna para formar ácido polimanurónico. En el periplasma algunos de los residuos manurónicos del ácido polimanurónico son acetilados por una acetilasa. El polímero es exportado fuera de la célula donde algunos residuos manurónicos no acetilados son epimerizados a residuos gulurónicos por múltiples epimerasas extracelulares dando así el producto final, el alginato (Franklin, 2011).

1.3.4 El gen *algD* y la síntesis de alginatos

En *A. vinelandii*, los genes que codifican las enzimas involucrados en la síntesis de alginato han sido caracterizados en su totalidad. En *A. vinelandii* los genes biosintéticos se encuentran agrupados en cuatro unidades transcripcionales. El gen *algD*, que codifica la GDP-manosa deshidrogenasa es transcrito a partir de tres posibles promotores, uno de ellos (P1) es σ^E dependiente, mientras que el segundo promotor (P2) presenta secuencia consenso típica de promotores σ^{70} (Campos *et al.*, 1996).

Los genes *alg8*, *alg44*, *algK* y *algJ* se encuentran agrupados en un operon localizado inmediatamente debajo de *algD*, sus productos participan en la polimerización y secreción del alginato. Inmediatamente después se encuentra el operón *algGXLVIFA*; *algG* codifica para una epimerasa; *algL* para una alginasa; los productos de *algX*, *algV* *algI* y *algF* son los responsables de la acetilación de los residuos manurónicos y *algA* codifica para la enzima que cataliza la conversión de fructosa 6-fosfato a manosa 6-fosfato y para la conversión de manosa 1-fosfato a GDP-manosa (Fig. 6).

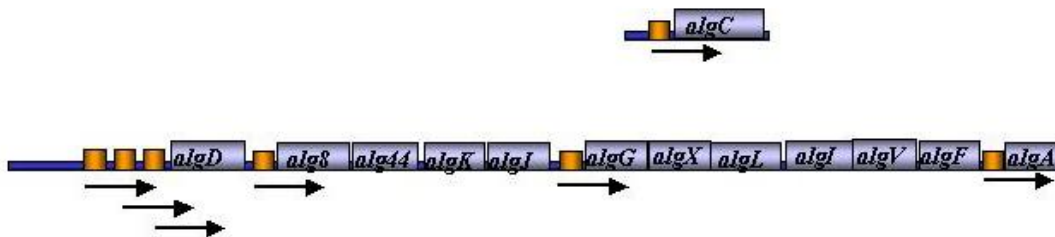


Figura 6
Genes involucrados en la síntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii*

1.4 Sistemas Reguladores de la familia de doble componente

Las bacterias responden a señales o a variedades que ocurren en su medio ambiente a través de sistemas de transducción de señales.

Este sistema de doble componente está formado por dos proteínas:

- Detector de señales del medio ambiente
- Regulador transcripcional

Primer componente

Es una proteína con actividad de cinasa histidínica, con algunas excepciones, la parte amino terminal de esta proteína tiene dos dominios transmembranales, las cuales detectan una porción de la proteína que está en el periplasma, esta región se le ha involucrado en la detección de señales del medio ambiente y se le conoce como dominio de entrada.

La región citoplásmica de estas cinasas, contienen motivos conservados que tienen un papel en la actividad de fosforilación, entre éstos se localiza un motivo que tiene una histidina (H), que es el residuo que se fosforila. Este motivo se le conoce como Modulo de Transmisión (Gao y Stock, 2009).

Segundo componente

Éste es una proteína que se le conoce como regulador de respuesta y que está constituido por dos dominios: el dominio de fosforilación, que se encuentra en el extremo amino terminal y el segundo que es un regulador transcripcional, que es de unión a ADN y se le conoce como Dominio de Salida (Gao y Stock, 2010).

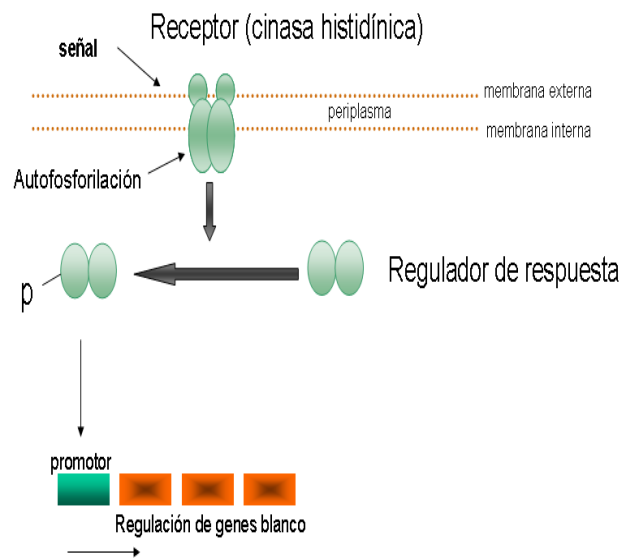


Figura 7

Esquema general de los sistemas de transducción de señales de dos componentes

1.5 El sistema de transducción de señales de dos componentes GacS/GacA

Los genes *gacS/gacA* son reguladores de la síntesis de alginato, los productos de estos corresponden a una cinasa histidinica transmembranal y a su regulador de respuesta que pertenece a la familia de los sistemas de transducción de señales de doble componente.

El par regulador GacS/A ha sido reportado en varias especies bacterianas del subgrupo y del phylum Proteobacteria (Goodier y Ahmer, 2001). De manera general, éste es un regulador global que a su vez controla a otros sistemas de regulación como el sistema de señalización conocido como *Quorum sensing*, al factor sigma de fase estacionaria σ^S y al sistema de control post-transcripcional Csr (Rsm).

1.6 GacS/GacA en *A. vinelandii*

En *A. vinelandii* están presentes homólogos del sistema GacS/GacA y la activación de esta vía de transducción de señales da como resultado la activación de la transcripción del gen *algD* (Castañeda *et al.* 2001). La producción de alginato aumenta al incrementar la transcripción del gen *algD* a partir de sus tres promotores, los cuales son controlados de manera positiva por GacS/A. De manera interesante mutantes *gacS/A* son incapaces de enquistarse (Castañeda *et al.* 2000).

1.7 Sistema de Regulación Post-transcripcional CrsA/CrsB (RsmA/RsmB)

Csr (Carbon Storage Regulator) es un sistema regulador global que controla la expresión de los genes bacterianos post-transcripcionalmente. Su efector es una pequeña proteína de unión a RNA referida como CsrA en *E. coli* o RsmA en especies de *Erwinia* y *Pseudomonas*.

En *E. coli*, CsrA ejerce un control negativo en la expresión de genes que codifican para las enzimas involucradas en la biosíntesis y catabolismo de glucógeno, gluconeogénesis, glucólisis, movilidad, propiedades de la superficie celular y adherencia.

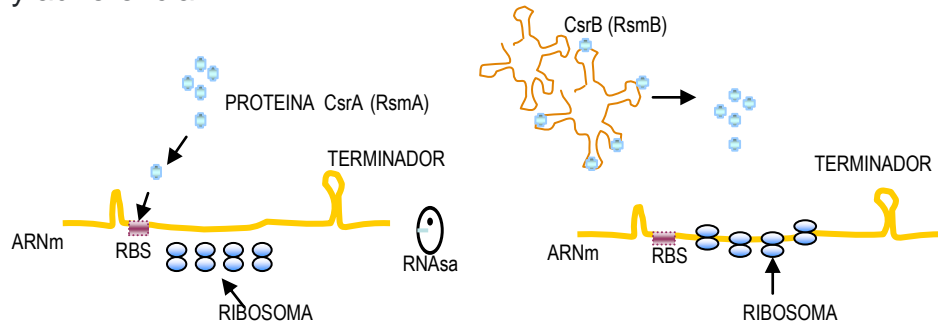


Figura 8

Modelo de regulación post-transcripcional llevado a cabo por el sistema CsrA/B (RsmA/B).
(Modificado de Romeo, 1998)

CsrA es una proteína de unión a RNA de 61 aa, este sistema de regulación post-transcripcional actúa de la manera siguiente: el elemento proteico CsrA (RsmA) se une a una región cercana al sitio de unión a ribosoma (RBS) de los ARN mensajeros que son sus blancos de regulación, impidiendo así su traducción y promueve su degradación.

En *E. coli*, CsrA ejerce un control negativo en la expresión de genes que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de glucógeno y gluconeogénesis. Por otra parte, CsrA controla positivamente la glucólisis regulando la expresión de genes que codifican para la isomerasa-6-fosfato, la triosa fosfato isomerasa y la enolasa (Sabnis *et al.*, 1995).

El segundo componente CsrB (RsmB) es un ARN regulador no codificante de 360 nucleótidos aproximadamente formando un complejo ribonucleoprotéico globular uniéndose a 18 subunidades de CsrA, su función es antagonizar los efectos de CsrA (RsmA). La molécula de ARN presenta una estructura secundaria característica formando varias estructuras de tallo y asa, encontrándose en las asas secuencias similares a las que se une CsrA (RsmA) en los ARNm regulados por el sistema (Fig. 9). En presencia de CsrB (RsmB) las moléculas de CsrA

(RsmA) se unen a las asas del ARN regulador dejando libre al ARN mensajero, posibilitando así su traducción (Romeo, 1998)

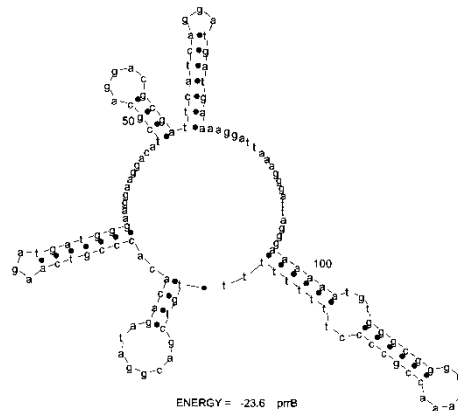


Figura 9

Predicción por el programa MFOLD de la estructura secundaria del RNA codificado por *prpB(rsmZ)* de *P. fluorescens* y *rsmB* de *A. vinelandii*

La estructura secundaria de este sRNA presenta varias estructuras de tallo y asa, encontrándose en éstas últimas secuencias repetidas una similitud con secuencias de unión a las que reconoce RsmA en sus mensajeros blanco de regulación (Liu *et al.*, 1997; Romeo, 1998).

CsrB es un regulador positivo de genes cuya expresión es reprimida por CsrA. Los RNAs pequeños se unen a proteínas RsmA / CsrA que son producidas bajo el control positivo del sistema de doble componente, GacS / GacA.

El sistema CsrA/CsrB ha proporcionado un modelo para la elucidación de varios sistemas homólogos en otras bacterias gramnegativas, referidos como RsmA/RsmB (regulator of secondary metabolism) en *Erwinia* o RsmA/RsmZ(PrrB) en *Pseudomonas*.

Al estudiar la cascada de señalización en *A. vinelandii* encabezada por el sistema de doble componente GacS/GacA se identificaron varios genes que codifican a componentes del sistema Rsm. Un homólogo para la proteína RsmA, siete homólogos a los pequeños RNAs reguladores RsmZ y dos homólogos a RsmY (Manzo *et al.*, 2011).

Estudios genómicos recientes, han revelado que existen homólogos de *rsmA/csrA* fuera de las γ -Proteobacterias, por ejemplo en: δ -Proteobacteria (*Desulfovibrio*, *Geobacter*), ϵ -Proteobacteria (*Helicobacter*, *Campylobacter*), espiroquetas (*Borrelia*, *Treponema*), en bacterias Gram-positivas bajas en GC (*Bacillus*, *Clostridium*) y en *Thermotoga* (Rife *et al.*, 2005; Kulkarni *et al.*, 2006).

En muchas especies bacterianas, es muy difícil generar mutantes de *rsmA* (*csrA*), ya que presentan fuertes agregaciones de célula–célula y/o un crecimiento muy lento (Romeo *et al.*, 1993; Lawhon *et al.*, 2003; Molofsky and Swanson, 2003). En *P. aeruginosa* la mutación de *rsmA* resulta en un fenotipo de colonias pequeñas (Heurlier *et al.*, 2005).

2. ANTECEDENTES

En un estudio previo, Cocotl Yáñez (2006) reportó la dificultad de obtener mutantes nulas del gen *rsmA* en la cepa E de *A. vinelandii*. *A. vinelandii* es una bacteria poliploide lo que complica en general la obtención de mutantes nulas. En el estudio antes citado, solo se obtuvieron mutantes merodiploides y no se pudo segregar la mutación a todos los cromosomas de la cepa. Sin embargo la sobreexpresión constitutiva de *rsmA* en la cepa E abatió la producción de alginatos (Cocotl Yáñez, 2006). Para recuperar las mutantes *rsmA* se usó como medio de selección, medio mínimo (Burk) adicionado con Sacarosa y el marcador de selección. En *E. coli* se ha reportado que mutaciones nulas en *csrA* son letales cuando las mutantes se crecen en hexosas como fuente de carbono. Para recuperar las mutantes *csrA*, se necesitó de fuentes de carbono que entran directamente al ciclo de Krebs (Timmermans y Melderén 2009). Lo anterior es explicado por el control negativo que CsrA ejerce sobre la síntesis de glucógeno, en ausencia de CsrA la síntesis de glucógeno es fuertemente favorecida, lo cual genera un estrés metabólico en la bacteria que la hace perder viabilidad. De manera interesante mutantes incapaces de sintetizar glucógeno soportan sin mayor problema la mutación nula en *csrA* en cualquier fuente de carbono (Timmermans y Melderén 2009).

Originalmente, en *E. coli*, se logró identificar el gen *csrA* mediante mutagénesis al azar mediada por transposones. La inserción del transposón se localizó en el codón 51 del gen (Timmermans y Melderén, 2009). Esta mutante es viable en cualquier fuente de carbono, dejando ver la posibilidad de que los primeros 50 aminoácidos podrían mantener una actividad parcial. Para comprobar esta hipótesis Timmermans y Melderén (2009) construyeron un péptido CsrA₁₋₅₀ que mostró ser parcialmente activo siendo capaz de restaurar el crecimiento de mutantes *csrA* nulas en fuentes de carbono glucolíticas. De acuerdo con lo anterior mutantes con remociones del extremo C-terminal (a partir del aminoácido 50) son viables en cualquier fuente de carbono. En *A. vinelandii* se podría estar

presentando un fenómeno similar en el que la síntesis de alginato tomaría el papel de la síntesis de glucógeno en *E. coli*.

La imposibilidad de generar mutantes *rsmA* no ha permitido estudiar detalladamente el efecto regulado de RsmA sobre la producción de alginato, biopelículas y enquistamiento. *A. vinelandii* posee nueve pequeños RNAs reguladores (sRNAs) de la familia Rsm, dos de los cuales han sido ampliamente estudiados y se ha establecido que GacS/A a través de estos controla la expresión de *algD* y la síntesis de alginatos (Manzo et al., 2012). La reiteración génica de estos sRNAs hace difícil estudiar esta familia, ya que probablemente la ausencia de alguno podría ser compensada por otro.

3. HIPÓTESIS

En *A. vinelandii*, la sobreproducción de alginato en mutantes con remociones completas del gen *rsmA* provoca pérdida de viabilidad; sin embargo, mutantes con remociones parciales (a partir del aminoácido 50 hasta el carboxilo terminal) son viables en condiciones de crecimiento que favorecen la producción de alginatos.

4. JUSTIFICACIÓN

La cascada de regulación GacS/A–RsmA/B parece ser una vía de regulación común al menos en bacterias de la subdivisión γ Proteobacterias. El conocimiento generado contribuirá a mejorar la comprensión de la cascada de regulación, de manera general, en esta subdivisión bacteriana y de forma particular, en *A. vinelandii*.

Por otra parte el conocimiento generado dará nuevos elementos que permitirán entender de mejor manera la regulación de la producción de alginato *A. vinelandii*.

5. OBJETIVOS

Objetivo General:

Estudiar la función del regulador post-transcripcional RsmA en *A. vinelandii*

Objetivos particulares:

1. Demostrar que es posible recuperar mutantes nulas del gen *rsmA* en cepas no productoras de alginato
2. Generar una mutante parcial del gen *rsmA* removiendo el extremo carboxilo terminal del gen en el fondo de la cepa silvestre.
3. Caracterizar la mutante en relación a su producción de alginato

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas Bacterianas y Plásmidos. Las cepas y los vectores de clonación utilizados en este trabajo se describen en las tablas siguientes:

		Características	Referencias	Cultivo
<i>E. coli</i>	DH5α	EndA1 hsdR17 supE44 thi-1λ- recA1 gyrA96 relAΔlacU169φ80 (ΔlacZ ΔM15)	Woodcock <i>et. al.</i> , 1989	Medio Lb/37°C
<i>A. vinelandii</i>	E	Fondo silvestre; Nal r	Larsen <i>et. al.</i> , 1971	Medio BS/30°C/Ac. Nalidixico 15 mg/mL
	EΔ <i>rsmA</i> ::Km	Mutante derivada de la cepa E, con remoción en el extremo carboxilo terminal del gen <i>rsmA</i> interrumpido con un casete de resistencia a Kanamicina	Este trabajo	Medio BS/30°C/ Ac. Nalidixico 15 mg/mL/ Kanamicina 4mg/mL
	E <i>rsmA</i> ::Km	Mutante derivada de la cepa E, con inserción en el extremo carboxilo terminal del gen <i>rsmA</i> interrumpido con un casete de resistencia a Kanamicina	Este trabajo	Medio BS/30°C/ Ac. Nalidixico 15 mg/mL/ Kanamicina 4mg/mL
	JGDE	Mutante derivada de la cepa E donde el gen <i>algD</i> se interrumpió con un casete de resistencia a Kanamicina	IBT/UNAM	Medio BS/30°C/Ac. Nalidixico 15 mg/mL/ Kanamicina 4mg/mL
	JGDEΔ <i>rsmA</i> ::Sm	Mutante derivada de la JGDE, con mutación generada por remoción en el gen <i>rsmA</i> , el cual se sustituyó por un casete de resistencia a Estreptomicina	Este trabajo	Medio BS/30°C/Ac. Nalidixico 15 mg/mL/ Kanamicina 4mg/mL/Estreptomycin a 2mg/mL
	JGDE <i>rsmA</i> ::Gm	Mutante derivada de la JGDE, con mutación generada por inserción en el extremo carboxilo terminal gen <i>rsmA</i> , el cual se sustituyó por un casete de resistencia a Gentamicina	Este trabajo	Medio BS/30°C/Ac. Nalidixico 15 mg/mL/ Kanamicina 4mg/mL/Gentamicina 1.5mg/mL
	EΔ <i>algD</i>	Mutante derivada de la cepa E a la que se le removió la región que codifica para el sitio catalítico de la enzima, colocando en su lugar un casete de resistencia a Kanamicina	Este trabajo	Medio BS/30°C/Ac. Nalidixico 15 mg/mL/ Kanamicina 4mg/mL
	EΔ <i>algD</i> r <i>rsmA</i> ::Gm	Mutante derivada de la EΔ <i>algD</i> , con inserción en el extremo carboxilo terminal del gen <i>rsmA</i> interrumpido con un casete de resistencia a Gentamicina	Este trabajo	Medio BS/30°C/Ac. Nalidixico 15 mg/mL/ Kanamicina 4mg/mL/Gentamicina 1.5mg/mL
	EΔ <i>algD</i> Δ <i>rsmA</i> ::Gm	Mutante derivada de la EΔ <i>algD</i> , con remoción en el extremo carboxilo terminal del gen <i>rsmA</i> interrumpido con un casete de resistencia a Gentamicina	Este trabajo	Medio BS/30°C/Ac. Nalidixico 15 mg/mL/ Kanamicina 4mg/mL/Gentamicina 1.5mg/mL

Plásmidos utilizados y realizados en este trabajo:

Nombre	Característica	Referencia
pBSL141	Vector con un cartucho de resistencia a Gm.	Alexeyev, 1995
pGEM-T Easy	Vector de clonación para productos de PCR; <i>lacZ</i> , Amp ^r	Promega
pUC19 <i>rsmArev</i> ::Sm	Derivado del pUC19 que contiene un fragmento de 2 Kb en el que se removió el gen <i>rsmA</i> y se insertó en un su lugar el interposón Ω Sm	Cocotl-Yañez (2006)
pGEM <i>rsmA</i> ::Gm pGEM <i>rsmA</i> ::Km	Derivado del pGEMTEasyVector; porta un fragmento de 1.1 Kb que contiene la inserción de un casete de resistencia a Kanamicina/Gentamicina en el gen <i>rsmA</i>	Este trabajo
pGEM Δ <i>rsmA</i> Gm pGEM Δ <i>rsmA</i> Km	Derivado del pGEMTEasyVector; porta un fragmento de 1 Kb que contiene la remoción del gen <i>rsmA</i> interrumpido con un casete de resistencia a Kanamicina/Gentamicina	Este trabajo
pGEM Δ <i>algD</i>	Derivado del pGEMTEasyVector; porta un fragmento de 2.4 Kb que contiene la remoción del gen <i>algD</i> interrumpido con un casete de resistencia a Kanamicina	Este trabajo

Extracción de DNA plasmídico (Método de extracción por perclorato). Se centrifugan 3 ml de cultivo, se resuspenden en 175 μ l de TES, se agregan 25 μ l de lisozima (10mg/mL), se dejan 20 min en hielo, se agregan 400 μ l de agua tridestilada fría y se incuban a 73°C por 15 min, se centrifugan 15 min a 12000 rpm, se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo y se le agregan 600 μ l de isopropanol y 60 μ l de NaClO₄ 5M, se centrifugan 15 min a 12000 rpm y se lava la pastilla 2 veces con etanol al 70%, se deja secar la pastilla y se resuspende en 30 μ l de agua tridestilada o RNasa (10mg/mL).

Solución de TES

Sacarosa al 15%

TRIS 50mM a pH 8.5

EDTA 50mM a pH 8.0

Manipulación de ácidos nucleicos. El DNA cromosomal fue extraído siguiendo un protocolo modificado de Li et al. (Plant Methods, 2010), en el cual se lisan las células con CTAB y se purifica el ADN en una matriz de sílica. Mientras que la purificación de productos de PCR se llevó a cabo con glucógeno; las



purificaciones de banda se realizaron con un protocolo modificado del kit GeneClean de MP Biomedical. Para las reacciones de PCR se utilizaron las enzimas Taq DNA polimerasa y Vent Polimerasa (New England BioLabs).

Preparación de células competentes de *A. vinelandii*. Para inducir el estado de competencia en *A. vinelandii* se realizaron dos cultivos consecutivos en medio CM sólido (libre de fierro y molibdeno), incubando 48 horas a 30°C cada cultivo (Page, 1982); posteriormente, se recolectaron todas las células para inocular 50 ml de medio CM líquido y se incubaron por 48 horas a 30°C y 250 rpm. Se recuperaron las células por centrifugación (6000 rpm/10'), se lavaron con sulfato de magnesio 10 mM y se resuspendieron en 1 ml de medio CM 16 mM de MgSO₄.

Transformación de *A. vinelandii* con DNA plasmídico. Después proseguimos tomando 200 µl de células competentes de *A. vinelandii* y se mezclaron con 5 µg del plásmido (tabla: plásmidos utilizados) en un tubo Eppendorf estéril. La mezcla de cada una de las transformaciones con los plásmidos se extendió en medio de competencia sólido (CM) y se incubó a 30°C durante 48 horas. Se recuperó el tapete celular y se lavo con MgSO₄ 10mM. Posteriormente se sembraron 200 µl de células en medio mínimo Burk Sacarosa sólido (BS) adicionado con los antibióticos que le confieren resistencia al plásmido respectivo seleccionando las células recombinantes y se incubó a 30°C durante 48-60 horas.

Electroforesis

Soluciones y Reactivos

-  Amortiguador Tris-acetatos- EDTA: (TAE1X; Tris pH 8, 90 mM; ácido acético, 90 mM; EDTA, 2 mM).
-  Agarosa al 1%.

Protocolo

1. Para la determinación de la concentración de DNA purificado, se analiza la muestra de DNA en un gel de agarosa.

2. Una vez cargado el DNA en los pozos de agarosa, se compara visualmente contra un estándar de DNA de concentración conocida.
3. Teñir el gel en bromuro de etidio.
4. Visualizar en un transiluminador de rayos UV (Sambrook *et al.*, 2001).

Preparación de Células Electrocompetentes de *E. coli* DH5 α

1. Inocular 500 ml de YT2X con 5 ml de un cultivo overnight y crecer hasta una DO 600 nm a 0.6, enfriar el cultivo en hielo.
2. Centrifugar 10 min a 10000 rpm a 4 °C.
3. Resuspender en 500 ml de H₂O fría
4. Centrifugar 10 min a 10000 rpm a 4 °C.
5. Resuspender en 250 ml de H₂O fría
6. Centrifugar 10 min a 10000 rpm a 4 °C.
7. Repetir los pasos 5 y 6.
8. Resuspender en 30 ml de glicerol 10% frío y pasar todo a un tubo de centrifugación chico.
9. Centrifugar 10 min a 10000 rpm a 4 °C.
10. Vaciar el sobrenadante y resuspender el pellet con el líquido que se quedó en las paredes del tubo (se obtiene una pasta de células)
11. Alícuotar y guardar a -70 °C.

Ligación. La T4 DNA ligasa une poli-nucleótidos que tienen extremos 5'-fosfato a extremos 3'-hidroxilo usando ATP. Es usada para:

1. Ligación de fragmentos de DNA con extremos romos o cohesivos.
2. Ligación de un vector con el DNA del inserto.
3. Sellar huecos en un dsDNA.

Se realiza la mezcla de reacción, que contiene el DNA del vector y del inserto, el buffer de la enzima y H₂O para aforar al volumen adecuado. Es muy importante tomar en cuenta que debe mantenerse el orden de relación molar inserto-vector en una proporción 5:1 y se incuba en función de los extremos generados (romos o cohesivos), preferentemente a 16°C durante toda la noche.

Precipitación con glucógeno. Para concentrar el DNA y eliminar sales que interfieran con tratamientos posteriores, utilizamos esta técnica. Se agrega un volumen de 500 μ l de isopropanol más 1 μ l de glucógeno, mezclar por inversión y reposar durante 15 min a -70°C . Centrifugar por 10 min a 13200 rpm, y decantar el sobrenadante. Posteriormente lavar la pastilla dos veces con etanol al 70%, dejar secar la pastilla y disolver en 10 μ l de agua tridestilada.

Transformación (Electroporación). Las células deben estar previamente esterilizadas y enfriadas. Se mezclan las células electrocompetentes y la ligación, posteriormente someterlas a un pulso eléctrico (programa Ec2 del electroporador). Inmediatamente se le agrega 1 mililitro de medio Sock a la celda, y después de mezclar se vierte en un mililitro de medio LB. Después de 1 hora de incubación se inoculan de 50-100 μ l en medio de selección.

Los cultivos de *E. coli* crecen a 37°C , por 24 h, en medio LB (Luria Bertani).

PCR. Las condiciones para la PCR fueron: 5 minutos de desnaturalización inicial a 95°C ; ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineamiento (temperatura especificada en la tabla de oligonucleótidos) por 1 minuto, extensión a 72°C durante 1 minuto por cada 1000pb que se deseen amplificar, todo lo anterior por 30 ciclos, con un ciclo final de extensión a 72°C por 10 minutos. Para llevar a cabo las reacciones de PCR se utilizaron las enzimas *Taq* DNA Polimerasa (Biotherm®) y High Fidelity DNA Polimerasa (Biotherm®) (Sambrook *et al.*, 2001).

Cuantificación de proteína: Método de Lowry. A partir de un cultivo de 48 horas de *A. vinelandii* se separaron las células del sobrenadante. Las células fueron lavadas con MgSO_4 (10mM) y se resuspendió el paquete celular en 1 ml de MgSO_4 del cual se tomaron 20 μ l. Se añadió 1ml de solución reactivo y 100 μ l de reactivo de Folin, tal reacción se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se leyó la absorbancia a 625nm. Simultáneamente se realizó una curva de calibración utilizando un estándar de albumina. Solución

reactivo: 1% del volumen de solución C (CuSO_4 1%), 1% de solución B (Tartrato de Na y K 2%) y 98% de solución A (Na_2CO_3 2% y NaOH 0.1 N). Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado (Lowry *et al.*, 1951).

Cuantificación de Alginato (Método del Carbazol) Para cuantificar la producción de alginato se usó medio Burk líquido y sólido (Ver medios y condiciones de cultivo), se cosecharon las células y se resuspendieron en NaCl 0.89% y posteriormente se centrifugó para separar el paquete celular del sobrenadante, el cual contiene el alginato. Del paquete celular se cuantificó proteína, mientras el sobrenadante se mezcló con cuatro volúmenes de isopropanol para precipitar el polímero y separarlo posteriormente por centrifugación. Una vez obtenido el alginato (precipitado blanco) se lavó con etanol, se dejó secar por 24 horas y se resuspendió en un volumen adecuado de agua tetraQ. Posteriormente se tomó una cantidad adecuada de muestra (dependiendo de la mucoidia de cada cepa) y se aforó a 350 μl , ésta se colocó sobre una solución de ácido sulfúrico-boratos, previamente enfriada en baño de hielo, se adicionaron 100 μl de carbazol y se dejó reposar en un baño de agua a 55°C por 30 minutos. La cuantificación espectrofotométrica a 530 nm se basa en la reacción del carbazol con los ácidos urónicos producidos por la hidrólisis del polímero con ácido sulfúrico, la cual desarrolla un color rosa-violeta.

Simultáneamente se realizó la curva de calibración con concentraciones de alginato de 25, 50, 100, 200, 300, 400 $\mu\text{g/ml}$. Las soluciones utilizadas fueron: 1) 10.09 g de KOH y 24.7 g de HBO_3 en 100 ml de agua; 2) 25 ml de solución de boratos - 975 ml de ácido sulfúrico; 3) Carbazol al 0.1% en etanol. La reproducibilidad del procedimiento fue determinada realizando los experimentos por triplicado de cada cepa en cada una de las condiciones de cultivo. Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado (Blumenkrantz *et al.*, 1973).

7. RESULTADOS

Generación de las construcciones por remoción del extremo carboxilo terminal de RsmA e inserción de un casete de resistencia en el locus removido.

Para alcanzar el primer objetivo se planteó crear dos mutaciones: una en la que se cambiarían dos bases generando un sitio de restricción *Hind*III en codón 51 dejando intacta la región 3' y otra en la que se removería desde el codón 51 hasta el codón de paro del gen generándose a su vez un sitio único restricción *Hind*III. En los sitios *Hind*III se ligarían los casetes de resistencia a Gm y Km generando una mutación por inserción en el primer caso y una por remoción-inserción en el segundo (Fig. 9).

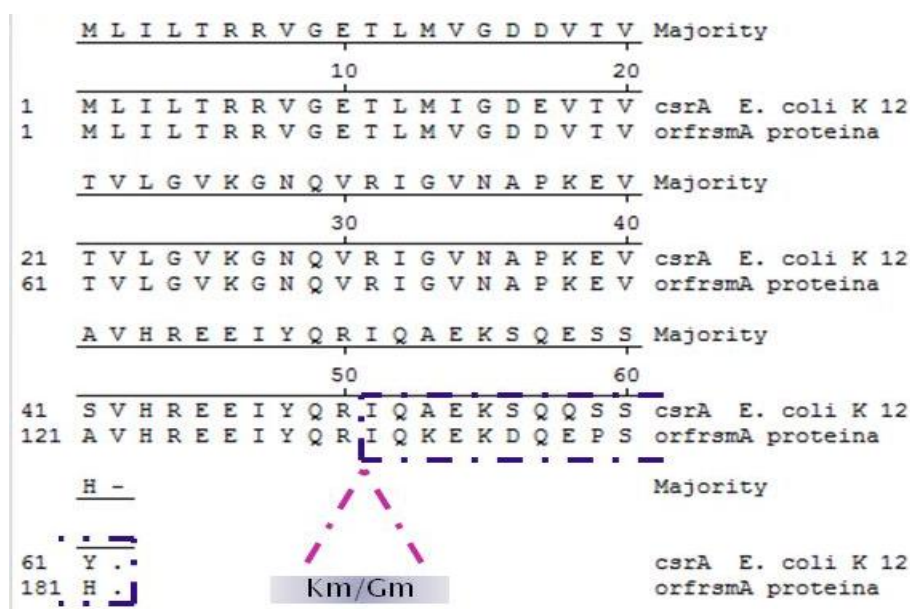




Figura 9. Esquema de la generación de mutaciones por inserción y remoción en el extremo carboxilo terminal de RsmA

 Remoción a partir del aminoácido 51 del extremo carboxilo terminal de *rsmA* (construcción por remoción; H3)

 Inserción del casete de resistencia en el aminoácido 51 del extremo carboxilo terminal de *rsmA* (construcción por inserción; H1)

La Fig. 10 esquematiza la estrategia seguida para generar las construcciones antes descritas. La Tabla 2 presenta las secuencias de oligonucleótidos que se utilizaron.

Tabla 2

Oligonucleótidos utilizados para la generación de los plásmidos

	Secuencia	Tm
H1	5´ ACC GCG AAG AA GCT TCC AGC GCA 3´	65.5°C
H2	5´ TGC GCT GA AGC TTT CTT CGC GGT 3´	65.5°C
H3	5´ GGG GCA AAG CTT GGT ATG ATT C 3´	56.5 °C
RsmA1Kb F	5´ CGG CGC ACG CGA AGT CAT T 3´	61.6 °C
Δ6	5´ ACG GCC GAA CCA GTT ACC AT 3´	59.1 °C

*En **rojo** - Sitio de restricción generado para la enzima *HindIII*

Tabla 3

Oligonucleótidos utilizados para generar los amplicones

Par de oligonucleótidos usados	Amplificado	Amplicon generado	T° óptima
H1 / Δ6	624 pb	H1	57°C
RsmA 1Kb / H2	570 pb	H2	57°C
H3 / Δ6	572 pb	H3	57°C

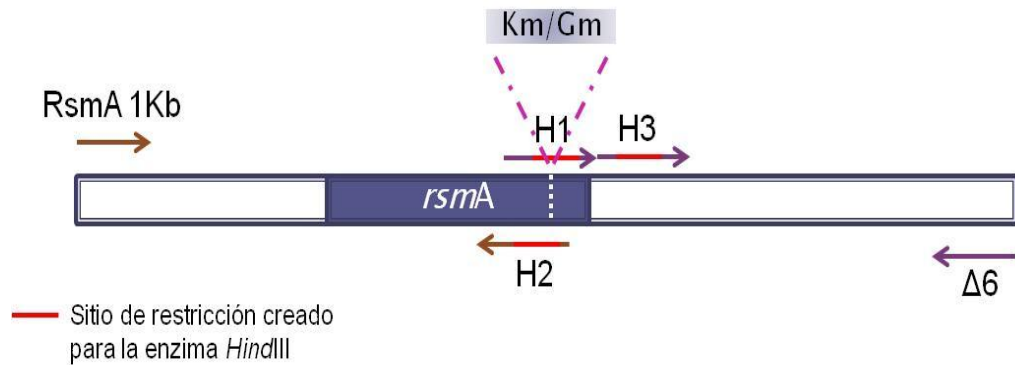


Figura 10

Esquema de los amplicones y oligonucleótidos usados para generar las mutaciones por inserción e inserción-remoción del extremo carboxilo terminal de *rsmA*

Par RsmA 1Kb /H2 (amplicón H2), par H1 / Δ6 (amplicón H1)
par H3 / Δ6 (amplicón H3)

El amplicón H2 se clonaría para posteriormente ligarle el amplicón H1, generando así la construcción útil para mutar al gen insertando en el sitio *Hind*III el gen de resistencia. De manera similar, al amplicón H2 se le ligaría el amplicón H3 generando la construcción con la remoción del extremo C terminal. En el sitio *Hind*III se le insertaría el gen de resistencia (Fig. 11).

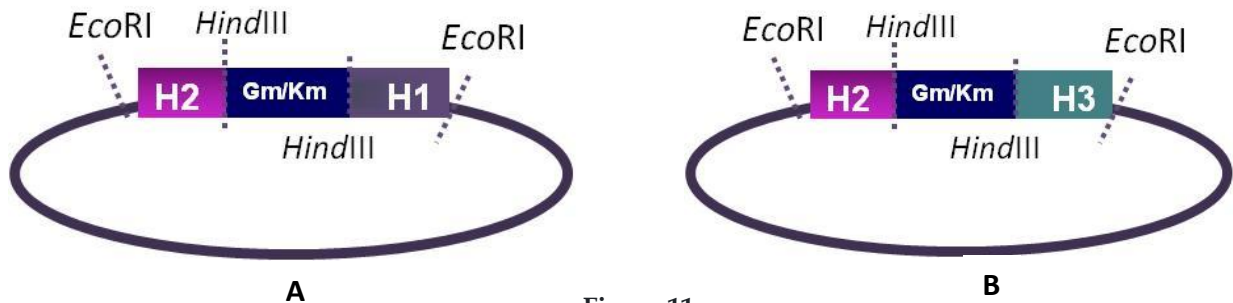


Figura 11

A. Esquema de la construcción para generar la mutación por inserción (H2/H1) en el extremo carboxilo terminal de *rsmA*

B. Esquema de la construcción para generar la mutación por remoción (H2/H3) en el extremo carboxilo terminal de *rsmA*

Para generar la primera construcción se amplificó un fragmento de 570 pb usando los oligonucleótidos RsmA 1 Kb F y el H2. El producto de PCR se ligó al vector pGEM-T Easy obteniendo un plásmido de 3.5 Kb llamado pGEMH2. Para checar la orientación del inserto se realizó una restricción doble con las enzimas

HindIII y *Sall* (sitio ubicado en el vector) obteniendo un fragmento de 3.5 Kb (Fig. 12). Posteriormente el pGEMH2, se usó como vector para ligarle los amplicones H1 y H3.

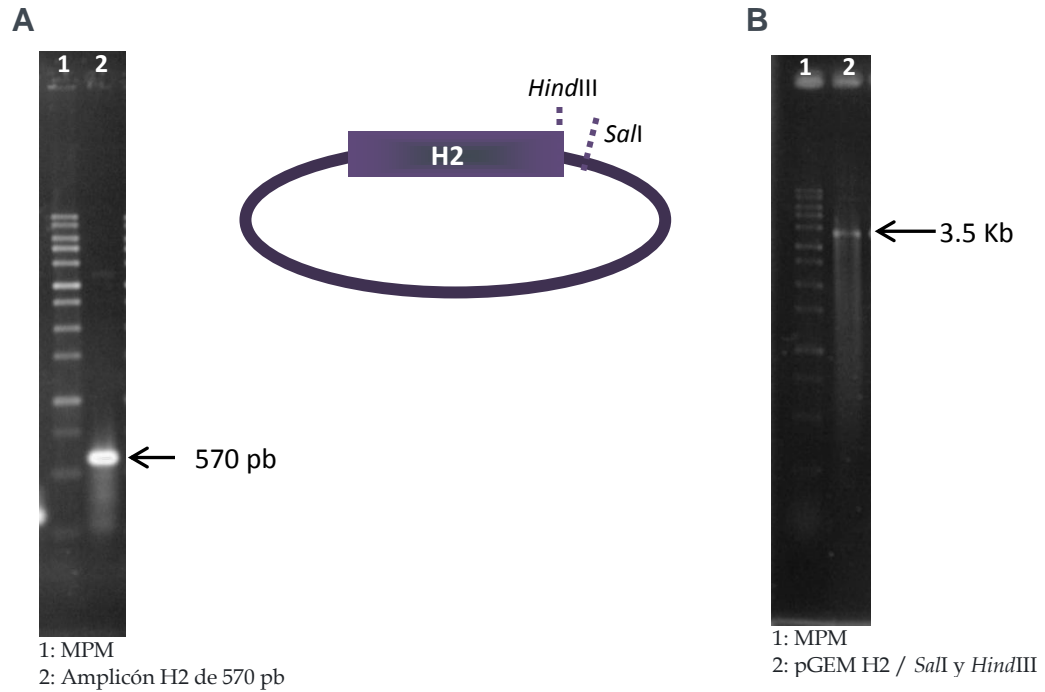


Figura 12

A- Producto de PCR amplificado con los oligonucleótidos rsmA 1KbF y H2 (570 pb)
B- Digestión (linearización) del plásmido pGEMH2 con las enzimas *HindIII* y *Sall*

Para clonar el fragmento H3 también se utilizó al vector pGEM-T Easy. En este caso el producto de PCR se amplificó usando los oligonucleótidos H3 y RsmA1KbR. El amplicón presentó un peso de 572 pb. Una vez obtenida la clona, a la cual llamamos pGEMH3 (en la que se mutó por remoción el extremo carboxilo terminal), se verificó su orientación con una doble restricción con las enzimas *HindIII* y *Sall* (sitio ubicado en el vector), obteniendo una banda de 3 Kb correspondiente al pGEM-T Easy y un fragmento de 572 pb del inserto (Fig. 13).

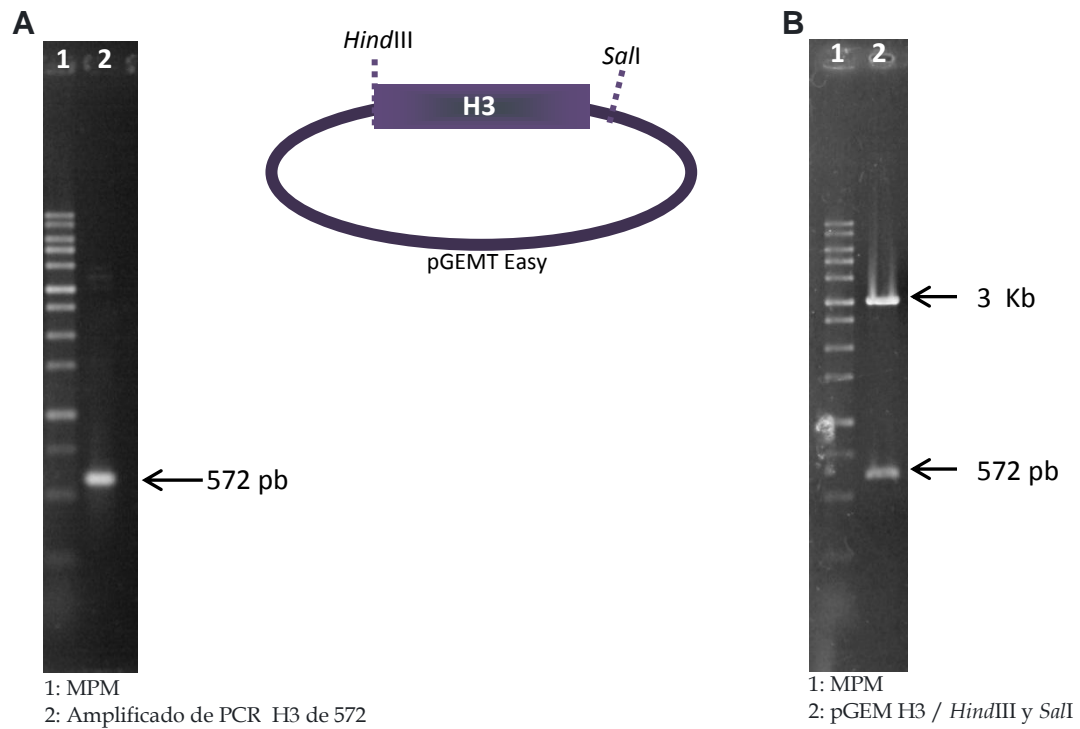


Figura 13

A- Electroforesis del producto de PCR H3 de 572 pb

B-Digestión del plásmido pGEMH3 con las enzimas *HindIII* y *SalI*

Ya que obtuvimos los plásmidos pGEMH3 y pGEMH2 proseguimos a realizar el ensamblaje utilizando como vector al pGEMH2 cortado con *HindIII* y *SalI* y como inserto al fragmento clonado en el pGEMH3 liberado con las mismas enzimas. Una vez ligado y transformado en el plásmido, realizamos un mapeo de restricción en las transformantes obtenidas para verificar su naturaleza. Se verificó con la enzima *EcoRI* (para la cual el vector pGEMT Easy presenta un sitio de corte en los extremos) observando la liberación del fragmento de 1.1 kb mas el fragmento de 3 Kb del pGEMT Easy (Fig. 14). Al plásmido se le llamó pGEMH2/H3.

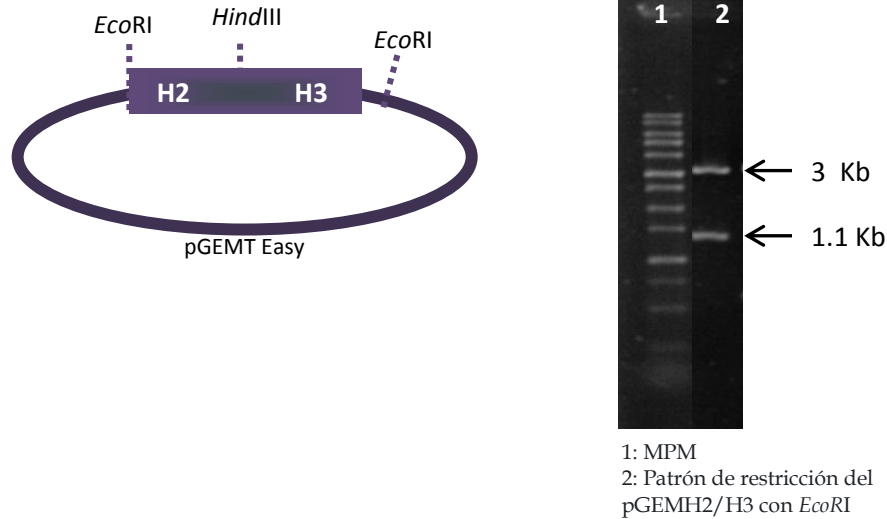


Figura 14

Patrón de restricción del plásmido pGEMH2/H3 con la enzima *EcoRI*

Una vez que verificamos el plásmido pGEMH2/H3, se cortó con *HindIII* para ligarle en este sitio los casetes de resistencia a Gentamicina y Kanamicina. Los plásmidos obtenidos se verificaron cortando de nuevo con *HindIII* probando que se liberaran los casetes de resistencia (Fig. 15), obteniendo así los plásmidos pGEM Δ rsmA::Km y pGEM Δ rsmA::Gm.

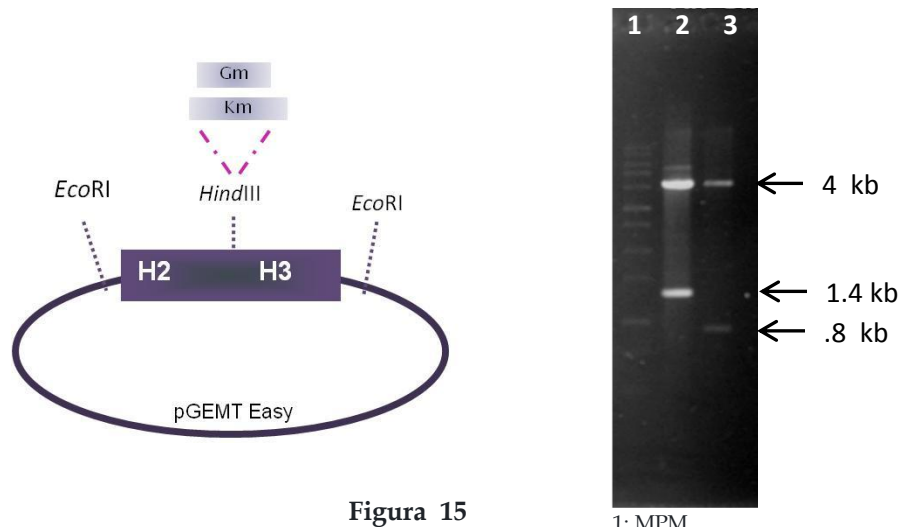


Figura 15

Patrón de restricción con *HindIII* de los plásmidos pGEM Δ rsmA que se observa la liberación de los casetes de resistencia (4 kb)/Gentamicina (0.8 kb)

Para generar la construcción con la mutación del gen *rsmA* por inserción en el extremo 3' amplificamos con un oligonucleótido reverso complementario al oligonucleótido H2 llamado H1, usando como molde DNA cromosomal. El fragmento amplificado fue de 624 pb y de igual forma se clonó en el vector pGEMT Easy, generando el plásmido pGEMH1. Verificamos el pGEMH1 mediante restricciones con las enzimas *HindIII* y *SalI* (Fig. 16).

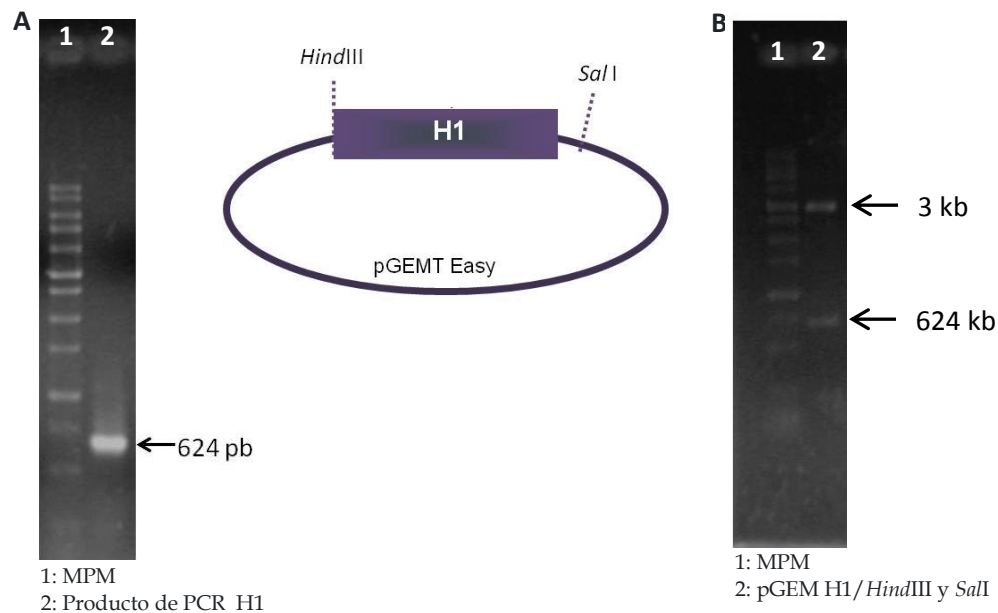


Figura 16
 A. Producto de PCR H1
 B. Verificación por patrón de restricción del pGEMH1 cortado con las enzimas *HindIII/SalI*

Una vez que se obtuvo el pGEMH1 se cortó con una doble restricción con las enzimas *HindIII* y *SalI* y se le ligó el inserto del pGEMH2 liberado con las enzimas *HindIII* y *SalI*. De esta manera construimos el plásmido pGEMH2/H1. A este plásmido posteriormente se le ligaron en el sitio *HindIII* los casetes de resistencia a Gentamicina y Kanamicina, generando así la mutación por inserción en el extremo 3' del gen *rsmA*. A los plásmidos se les llamaron pGEM*rsmA*::Km y pGEM*rsmA*::Gm. En la Fig. 17 se muestra la liberación del casete al digerir los plásmidos con la enzima *HindIII*.

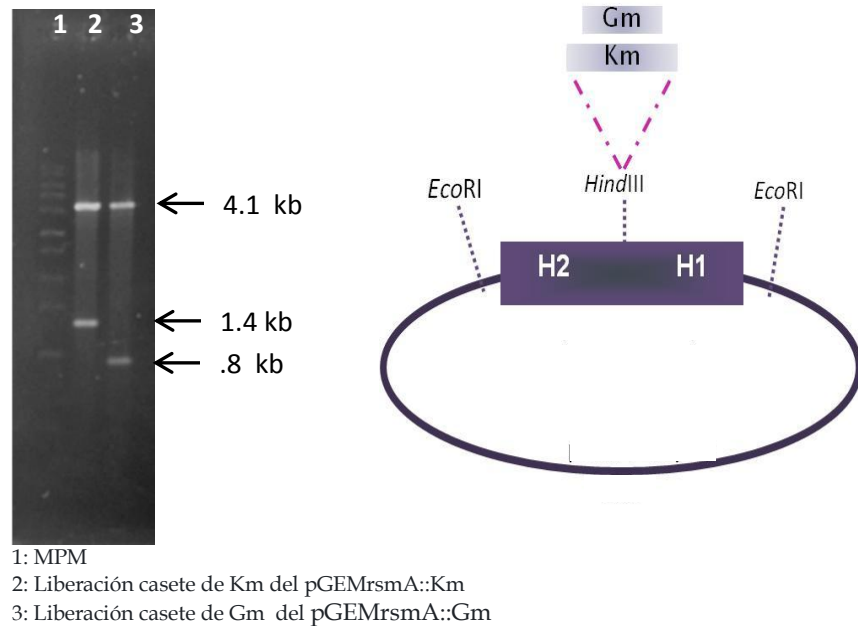


Figura 17
 Patrón de restricción *HindIII* de los plásmidos pGEMrsmA::Km y pGEMrsmA::Gm liberando los casetes de resistencia a Kanamicina (1.4 kb)/Gentamicina (0.8 kb)

Obtención de mutantes JGDErsmA

Para obtener las primeras mutantes se extrajo el plásmido pUC19rsmA::ΩSm previamente construido por Cocotl (2007). El plásmido se transformó en la cepa JGDE según lo descrito en material y métodos. Como el plásmido transformado no puede replicarse en *A. vinelandii* la única forma que tiene la bacteria para mantener la resistencia conferida por éste es recombinar el gen de resistencia en el cromosoma mediante intercambio alélico. La doble recombinación homóloga se probó mediante PCR utilizando un oligonucleótido que se une al gen de resistencia a Sm y el oligonucleótido RsmAD, que reconoce una región río arriba del gen *rsmA*. El producto del amplificado con estos primeros tendría que tener un peso de 950 pb como se muestra en las transformantes probadas (Fig. 18).

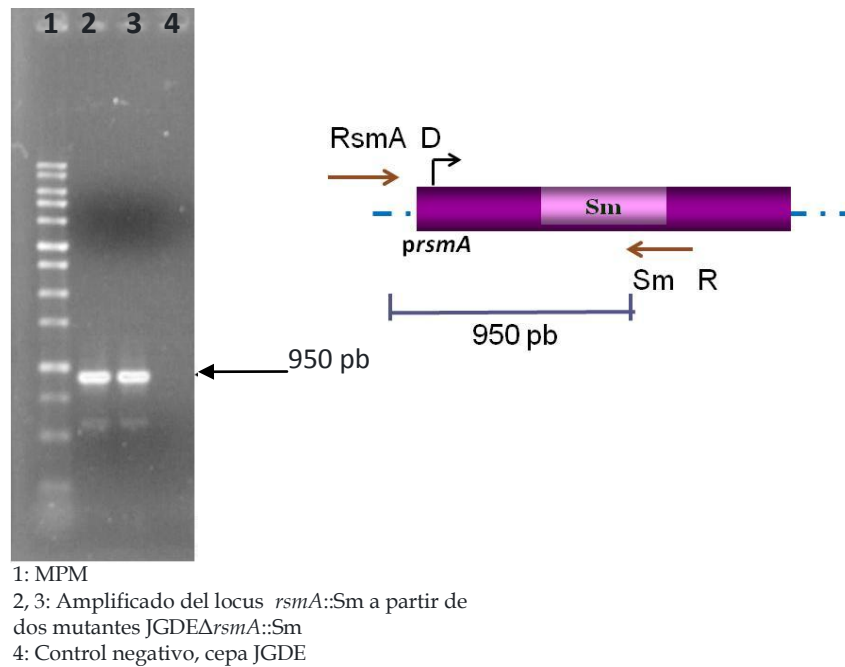


Figura 18
 Amplificación del locus mutante *rsmA* en la cepa JGDE Δ *rsmA*::Sm y en la JGDE con los oligonucleótidos SmR y RsmAD

Una vez que se comprobó la mutación del gen *rsmA*, proseguimos a establecer la presencia del alelo silvestre. Para esto hicimos otro PCR con los oligonucleótidos RsmAD y RsmAR que amplifican 900 pb del locus de *rsmA*. Se hace evidente la presencia del locus silvestre y la merodiploidia de la cepa (Fig. 19).

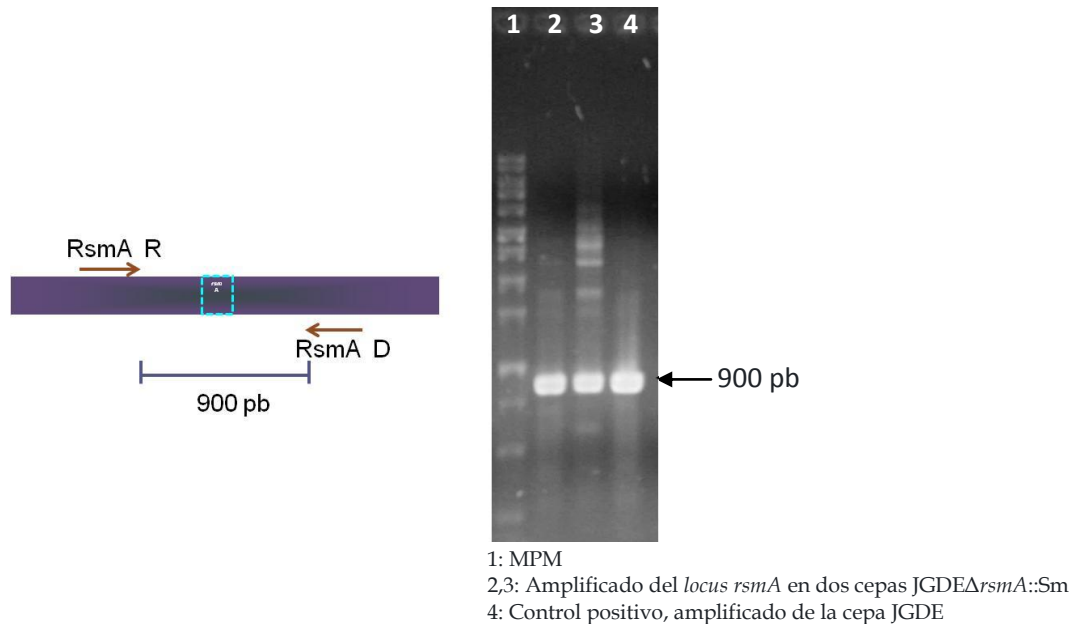


Figura 19
 Amplificación del locus silvestre *rsmA* en la cepa JGDE y en la JGDE Δ *rsmA*::Sm con los oligonucleótidos RsmAR y RsmAD

Pudimos observar algo inesperado: el fenotipo de esta mutante, presenta un aspecto mucoide a diferencia su cepa madre no mucoide (Fig. 20).

Posteriormente se realizó una segunda transformación con uno de los plásmidos que se describieron anteriormente el pGEM*rsmA*::Gm; (construcción con la mutación por inserción en el extremo carboxilo terminal con resistencia a Gentamicina). Se utilizó la construcción con resistencia a Gentamicina ya que la mutante JGDE es resistente a Kanamicina.

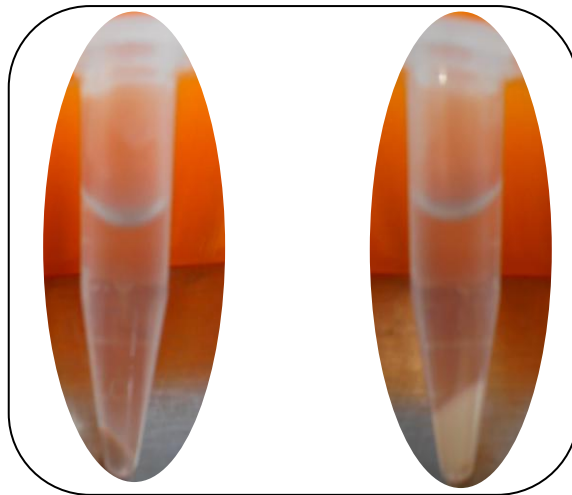


Figura 20. Fenotipo mucoide de la cepa JGDE y JGDE Δ *rsmA*
Izquierda -JGDE , Derecha - JGDE Δ *rsmA*

Una vez realizada la transformación verificamos por PCR a las transformantes obtenidas utilizando los oligonucleótidos delantero y reverso del locus de *rsmA*, en donde observaríamos como resultado un amplificado de 2 kb para el alelo mutante y de 900 pb para el alelo silvestre (Fig. 21).

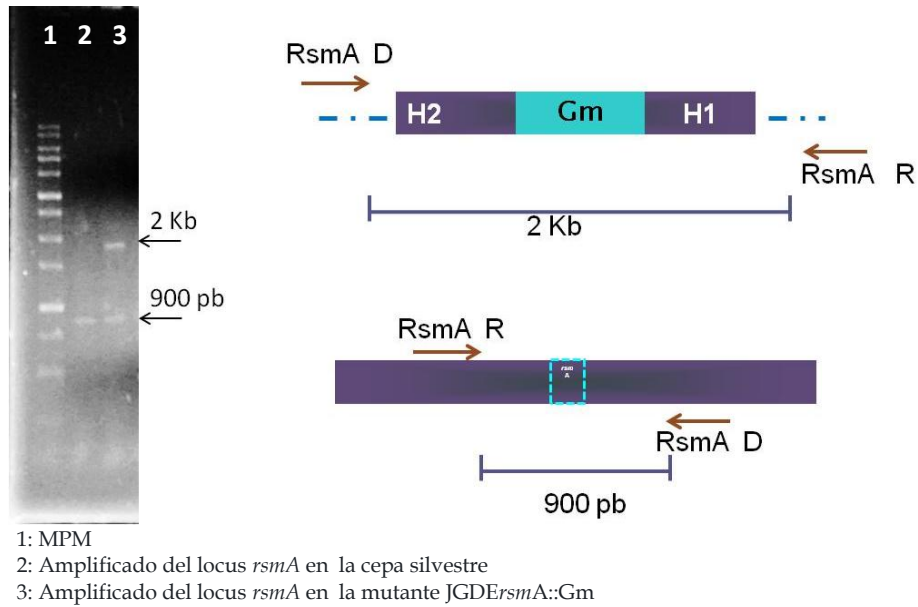


Figura 21

Amplificación de los alelos silvestre y mutante del locus *rsmA*, en la cepa JGDE y JGDE*rsmA::Gm* usando los oligonucleótidos RsmAR y RsmAD

Una vez corroborada la doble recombinación, pudimos determinar que seguíamos obteniendo mutantes merodiploides y además que el fenotipo mucoide se repetía (Fig. 22).

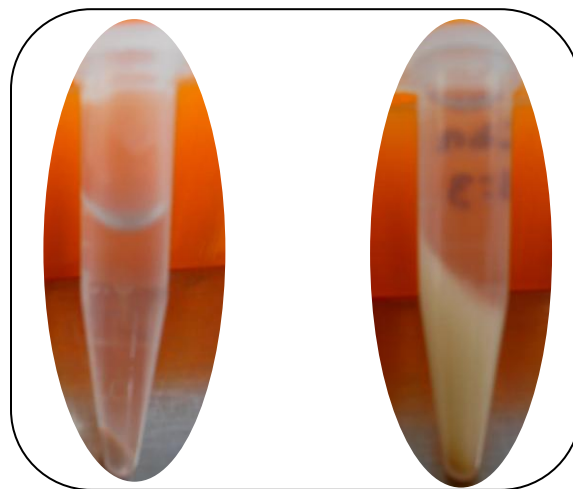


Figura 22 Fenotipo mucoide de la cepa JGDE y JGDE*rsmA::Gm*

Izquierda -JGDE , Derecha -JGDE*rsmA::Gm*

Algo importante de puntualizar es que la mutante JGDE*rsmA::Gm* crecía normalmente en medio mínimo Burk-Sacarosa sólido; sin embargo le costaba

crecer en medio líquido, se observó que a las 48 horas presentaba un crecimiento casi nulo y floculado.

El fenotipo descrito se corroboró determinando la producción de alginato en medio Burk-Sacarosa sólido (Fig. 23).

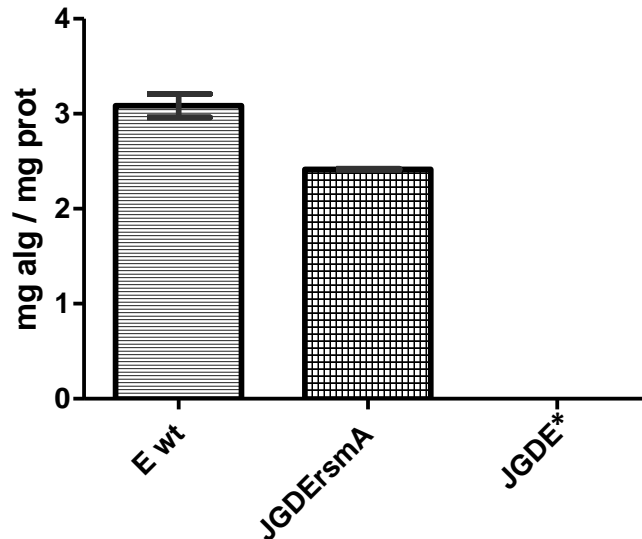


Figura 23
Producción de alginato en las cepas E, JGDE y JGDErsmA
*No Detectado

Al analizar la manera en la que se generó la mutante JGDE pudimos establecer que la mutación generada por la inserción del casete de resistencia a Kanamicina se encontraba en un sitio de reconocimiento para la enzima *Scal* justo, entre el subdominio catalítico y el subdominio de pegado a sustrato (Fig. 24). Lo anterior nos hizo pensar que la inserción del casete de resistencia podría dejar una proteína parcialmente funcional, que en condiciones basales de expresión su actividad no es suficiente para sintetizar alginato, sin embargo al mutar a *rsmA* la posible sobreexpresión compensaría su función defectiva haciendo posible nuevamente la producción de alginato. Debido a este resultado nos dimos a la tarea de construir una mutante nula $E\Delta algD$ en donde se removería la región catalítica del gen.

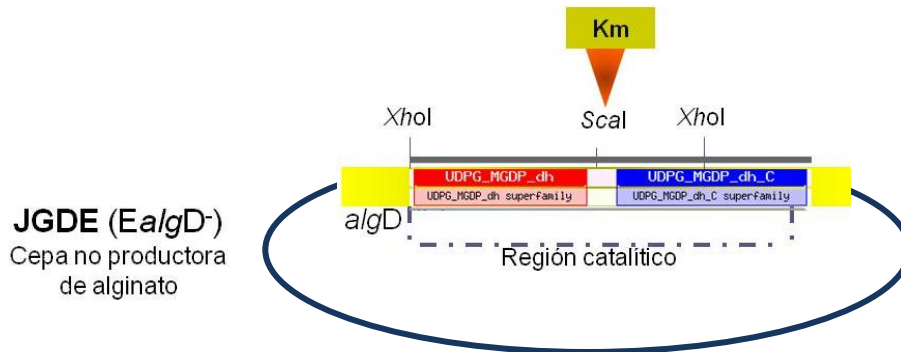


Figura 24
Representación de los dominios catalíticos codificados en el gen *algD*

Generación de la nueva mutante $E\Delta algD$

Se diseñó una nueva estrategia (Fig. 25), en la que utilizamos un par de oligonucleótidos previamente diseñado en el grupo (Tabla 4) para amplificar un locus que contiene en su parte central al gen *algD*.

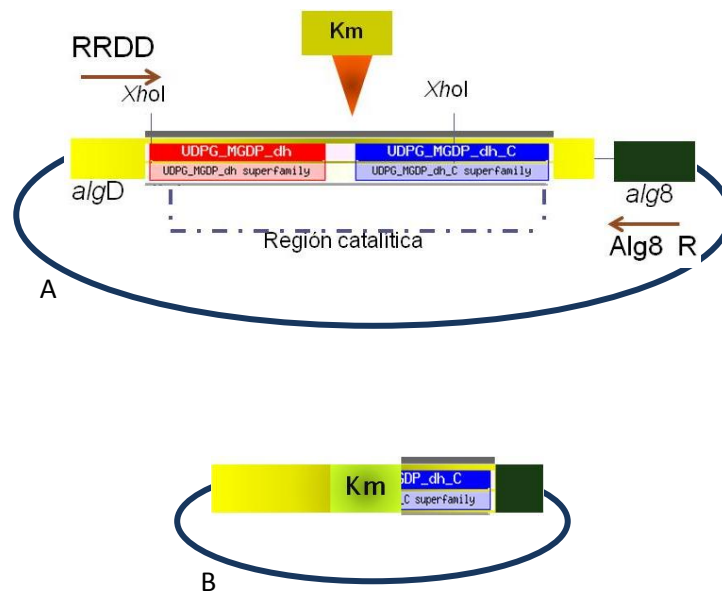


Figura 25

- A.** Amplificación del locus *algD*-*alg8*
Rojo - Región catalítica **Azul** - Sitio de pegado a sustrato
B. Construcción de *algD* removiendo casi por completo la región catalítica

Tabla 4
Oligonucleótidos utilizados para la generación de pGEM Δ algD

Secuencia		T _m	T° óptima
RRDD	5' GAC TGA CGT CGC GTG ATG 3'	66.3°C	54°C
Alg8	5' GTC GGG CAT GTG GCG GGA GAT 3'	58°C	

Este *locus* contiene la región reguladora del gen *algD* y parte del gen aledaño *alg8*, obteniendo un amplificado de 2.4 Kb. (Fig 26 A) El amplicón fue clonado en el vector pGEMT Easy (pGEMalgD), verificamos la clona por patrón de restricción con la enzima *EcoRI*, en donde se liberó una banda de 3 Kb correspondiente al vector pGEMT Easy y una de 2.4 Kb del producto de PCR (Fig. 26 B). Una vez obtenida la clona proseguimos a remover con la enzima *XhoI* gran parte de la región catalítica y parte del sitio de pegado a sustrato del gen *algD*, para abatir por completo la actividad de la enzima GDP manosa deshidrogenasa. La remoción realizada con *XhoI* libera una banda de 600 pb y el resto del plásmido de 4.8 Kb (Fig. 26 C).

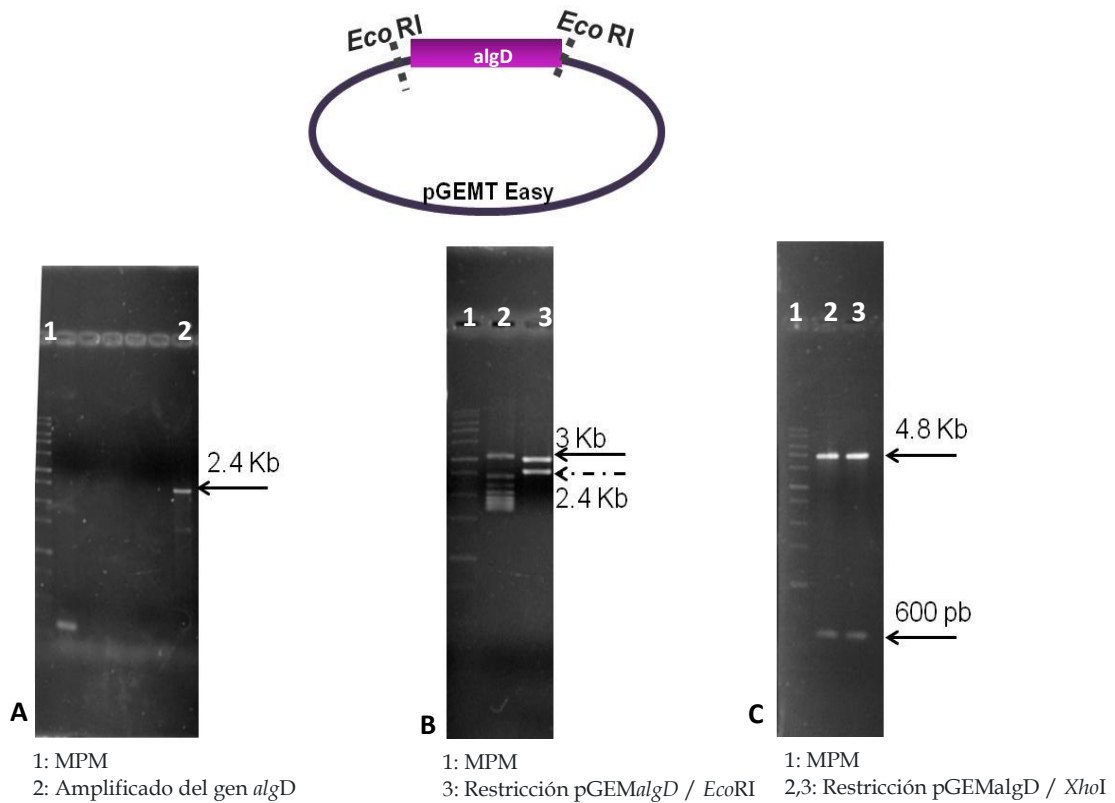


Figura 26

A. Amplificado del gen *algD*

B. Patrón de restricción del pGEM*algD* con la enzima *EcoRI*

C. Remoción con la enzima *XhoI* de la región catalítica de *algD* contenido en el plásmido pGEM*algD*

Posteriormente proseguimos a ligar el casete de resistencia a Kanamicina en el plásmido digerido por *XhoI*. La construcción obtenida se verificó con la enzima *KpnI* liberando el casete de resistencia a Kanamicina, al plásmido se le llamó pGEM Δ *algD* (Fig. 27).

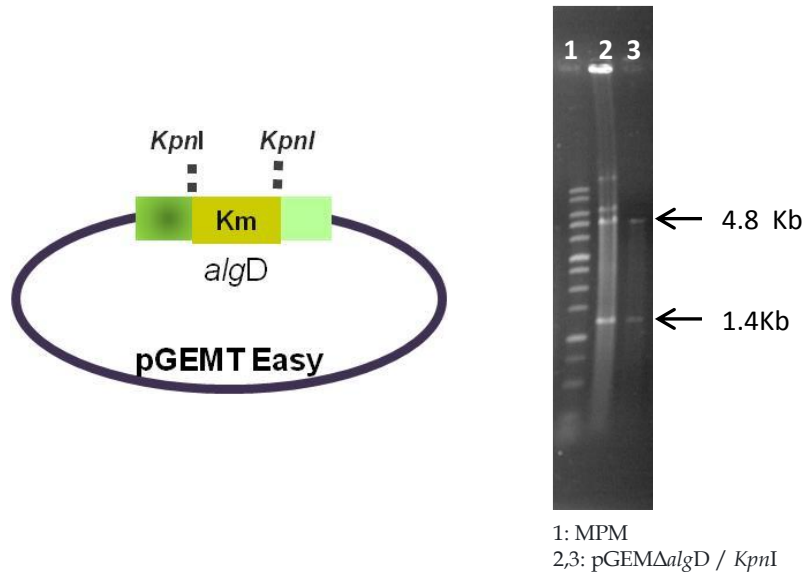


Figura 27

Verificación de la liberación del casete de Kanamicina (1.4Kb) con la enzima de restricción *KpnI* en el pGEM Δ *algD*

Una vez obtenido el pGEM Δ *algD*, proseguimos a transformarlo en la cepa silvestre E. Para verificar que se hubiera presentado el proceso doble recombinación homóloga amplificamos el *locus algD* de las transformantes con los oligonucleótidos que aparean en la la región reguladora de *algD* y el gen aledaño *alg8*, esperando un amplificado de 2.4 Kb para el alelo silvestre y de 3.2 para el alelo mutante (Fig 28. A); la mutante obtenida se le llamo E Δ *algD*.

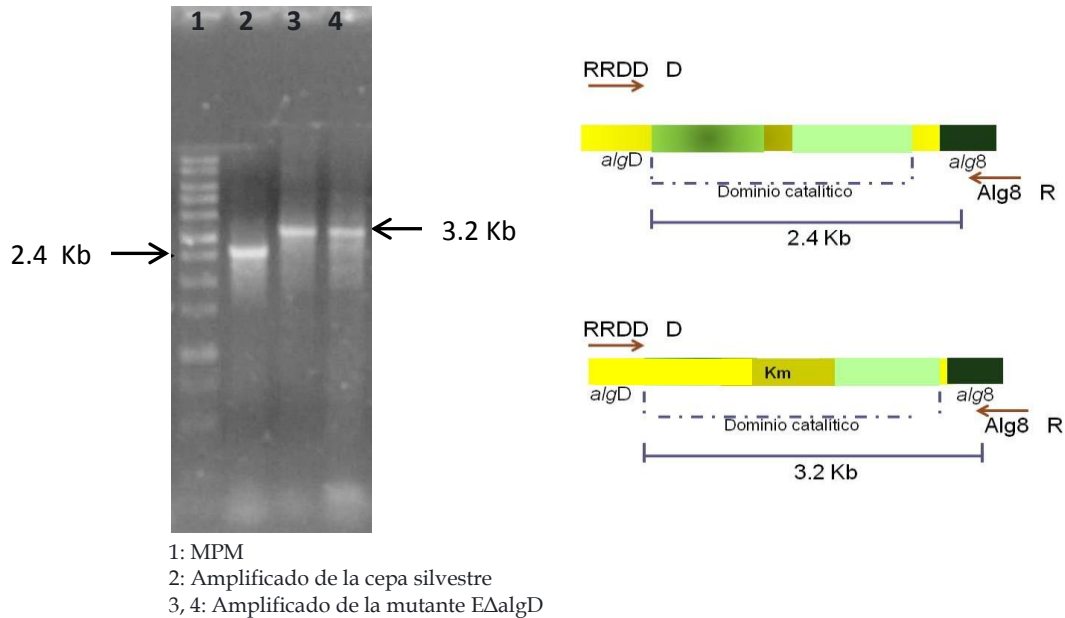


Figura 28

Verificación por PCR de la mutante E Δ *algD*

Una vez verificada la mutante $E\Delta algD$ procedimos a transformar las construcciones en las que se mutó el gen *rsmA* en el extremo carboxilo terminal. En las transformantes obtenidas se verificó la doble recombinación homóloga mediante PCR usando un par de oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 0.9 kb del locus *rsmA* para el caso del alelo silvestre; para la mutación por inserción un amplificado de 2 kb y para la mutación por remoción-inserción un amplificado de 1.9 Kb.

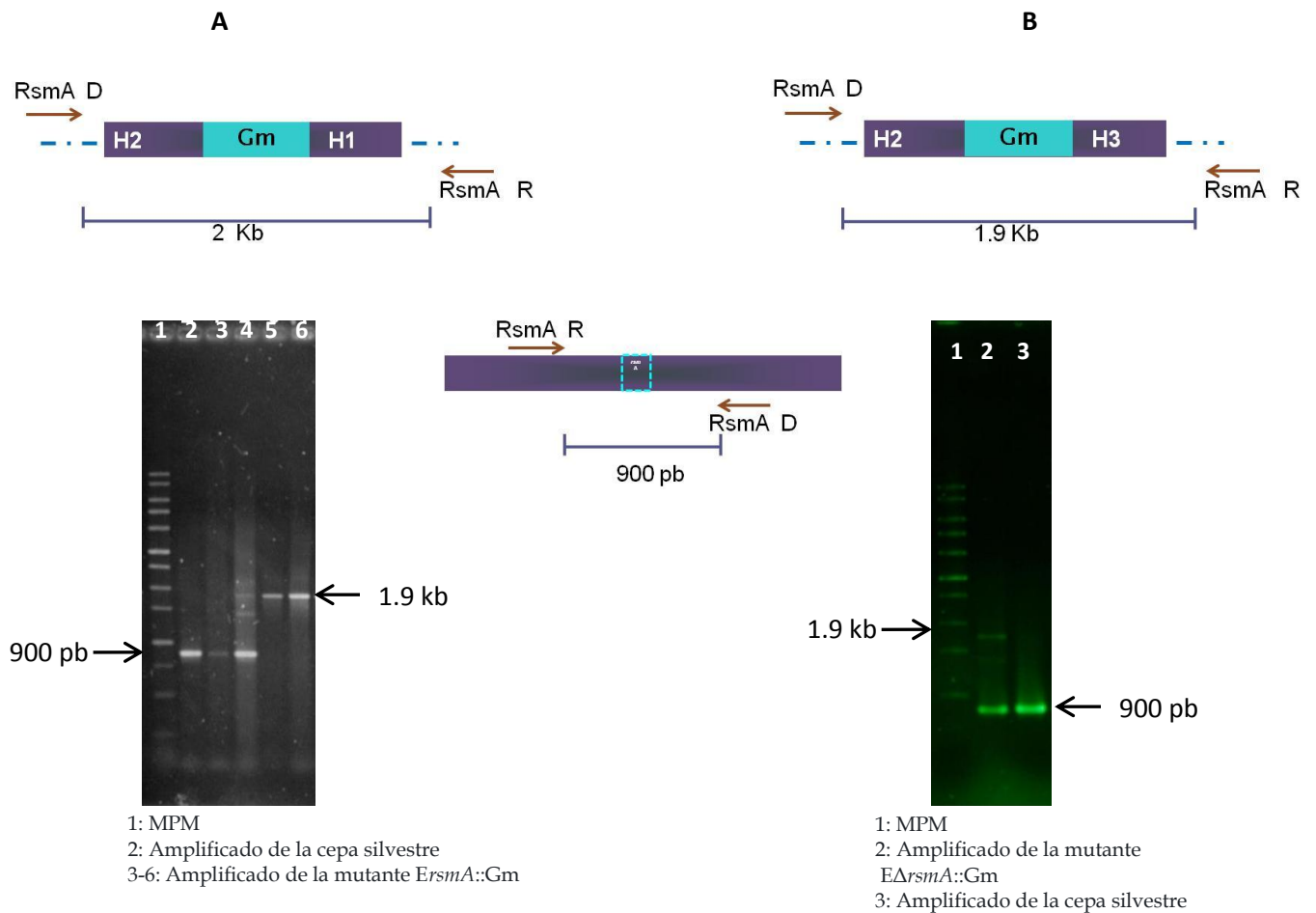


Figura 29

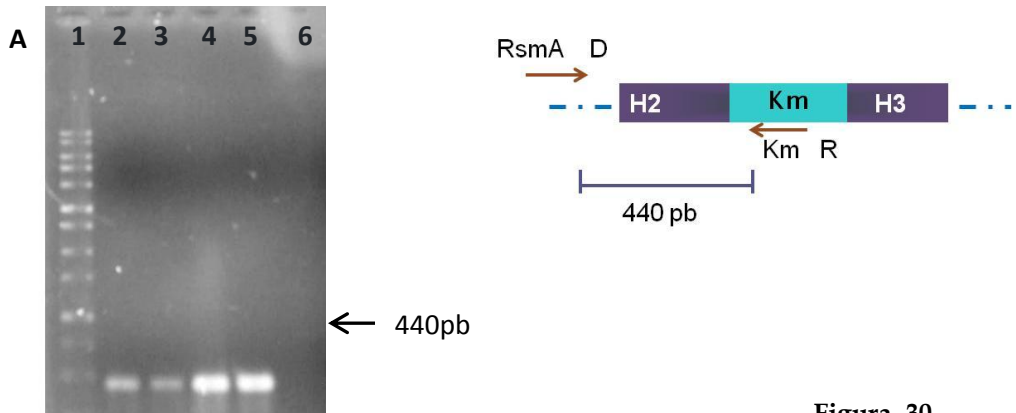
A. Verificación por PCR de las transformantes $E\Delta algD rsmA::Gm$
 B. Verificación por PCR de transformantes $E\Delta algD\Delta rsmA::Gm$

La doble recombinación de la mutación por inserción fue exitosa (Fig. 29A), y algo importante a destacar es que en los carril 5 y 6 observamos sólo el

amplificado del alelo mutante poniendo de manifiesto la obtención de mutantes nulas. A diferencia del caso anterior podemos observar que la doble recombinación entre la construcción de la mutación por remoción y el gen silvestre, sólo se dio en algunas copias del cromosoma pudiéndose observar aún copias silvestres del *locus*(Fig. 29 B).

Obtención de mutantes *rsmA* en la cepa silvestre E de *A. vinelandii*

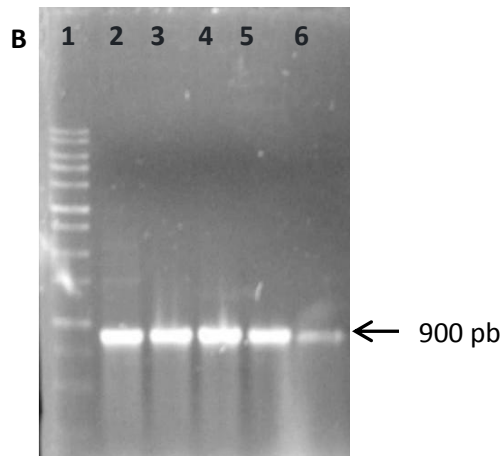
Con las construcciones descritas anteriormente proseguimos a transformar inicialmente el pGEM $\Delta rsmA::Km$ la construcción por remoción del extremo carboxilo terminal (pGEM $\Delta rsmA::Km$) en la cepa silvestre E. A las transformantes recuperadas se les verificó la doble recombinación usando un oligonucleótido delantero que aparearía arriba del gen *rsmA* y uno reverso que lo hace en el casete de Km. La presencia de la remoción-inserción nos daría un amplicon de 440 pb (Fig. 30 A). Por otro parte para determinar la presencia del alelo silvestre de *rsmA* utilizamos los oligonucleótidos delantero y reverso del *locus* de *rsmA*. En el caso de que todavía tuviera copias silvestres se amplificaría un fragmento de 900 pb, (Fig. 30 B) lo que evidenció en el experimento.



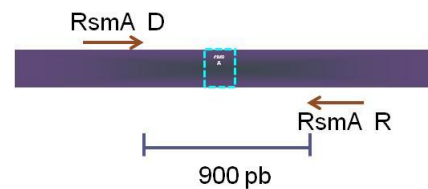
1: MPM
 2-5: Amplificación de transformantes $\Delta rsmA$
 6: Amplificación de la cepa silvestre

Figura 30

- A. Amplificación del *locus rsmA::km* en las transformantes obtenidas con los oligonucleótidos *rsmAD* y *Km R*
- B. Amplificación del *locus silvestre rsmA* las transformantes obtenidas con los oligonucleótidos *RsmAD* y *rsmAR*



1: MPM
 2-5: Amplificación de de transformantes $\Delta rsmA$
 6: Amplificación de la cepa silvestre



De manera interesante, las transformantes obtenidas y probadas presentaban fenotipos variables respecto a la mucoidia, con un rango cualitativo que iban desde cepas no mucoides hasta cepas con una mucoidia mayor que la de la cepa silvestre. Una de las mutantes con un fenotipo de mayor mucoidia fue crecida en cantidades crecientes de antibiótico desde la concentración inicial de Km 4 mg/ml hasta Km 40 mg/ml esperando que se segregara la mutación a las copias silvestres del cromosoma de *A. vinelandii*. Observamos que desde concentración de 8 mg/ml hasta la de 12 mg/ml la mutante perdía la mucoidia (Fig. 31 A).

Para monitorear la segregación de la mutación se realizó un PCR con los oligonucleótidos delantero y reverso del *locus* de *rsmA*. El alelo silvestre se conservó (Fig. 31 B).

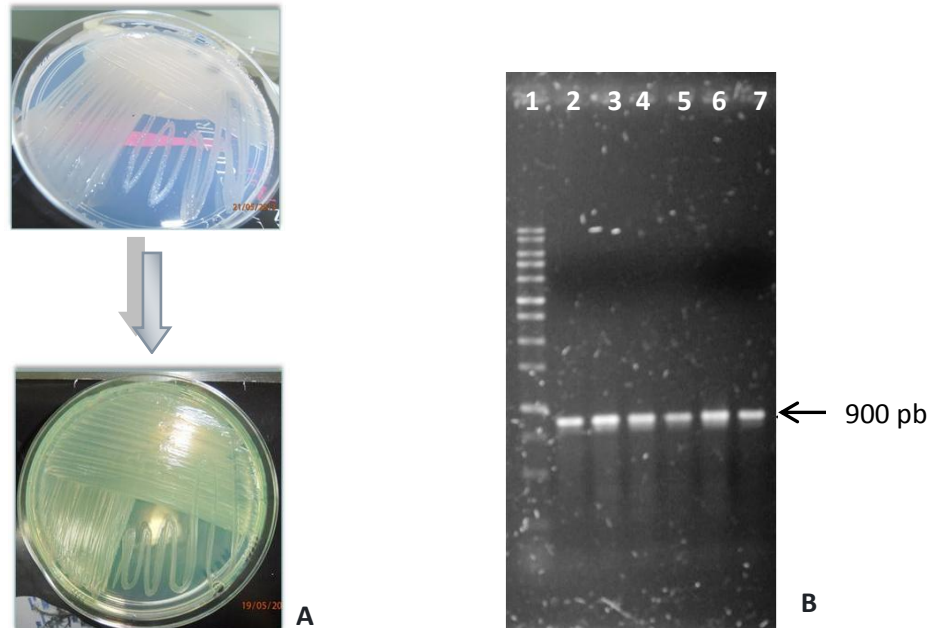


Figura 31

A. Fenotipo de la mutante merodiploide $\Delta rsmArsmA$ en BS Km de 8 mg/ml y BS Km 12 mg/ml

B. PCR de la mutante $\Delta rsmA/rsmA$ crecida a concentraciones crecientes de Km:

Carril 1 MPM

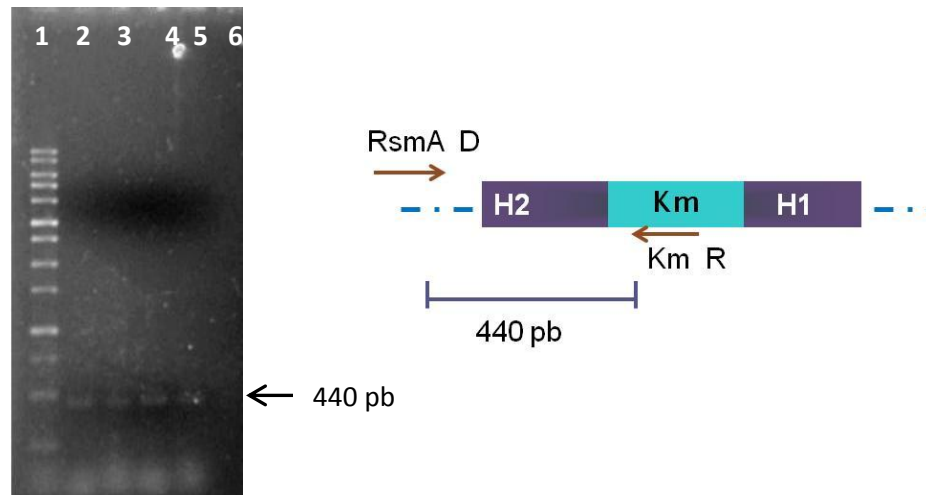
Carril 2 concentración de Km 4 mg/ml

Carril 3 concentración de Km 8 mg/ml

Carril 4 concentración de Km 12 mg/ml

Carril 5 concentración de Km 20 mg/ml

Una vez que obtuvimos la mutante por remoción del extremo carboxilo terminal, proseguimos a obtener la mutante por inserción del extremo carboxilo terminal, para ésto transformamos el plásmido pGEM*rsmA*::Km en la cepa E de *A. vinelandii*. Las transformantes fueron verificadas siguiendo el procedimiento explicado anteriormente. Utilizamos el oligonucleótido reverso del gen de resistencia a Km y el delantero del *locus* de *rsmA* (Fig. 32).

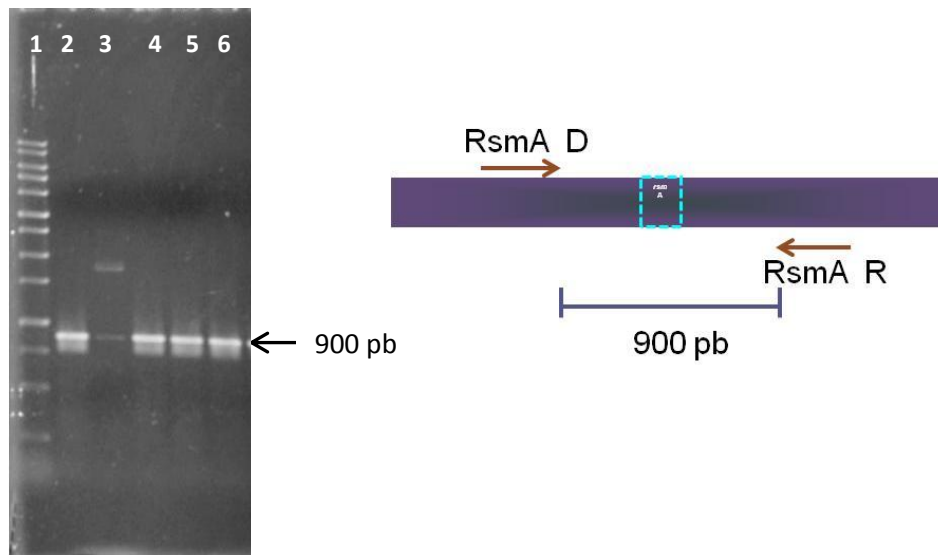


1: MPM
 2-5: Amplificación del *locus rsmA::Km* en las transformantes seleccionadas mutante *rsmA::Km*
 6: Cepa silvestre

Figura 32

Verificación por PCR del alelo *rsmA::Km*, amplificando el *locus rsmA* en que se insertó el casete de resistencia a Km, utilizando los oligonucleótidos *rsmA D* y *Km R* en transformantes de la cepa F.

Se puede observar (Fig. 32) la presencia de la inserción del gen de resistencia a Km en el extremo 3' del gen *rsmA*. Para verificar que la doble recombinación homóloga no presentara copias silvestres, se amplificó por PCR el *locus* del gen *rsmA*, para ello se utilizaron los oligonucleótidos *rsmAD* y *rsmAR*. El *locus* silvestre tiene una longitud de 900pb (Fig. 33).



- 1: MPM
- 2-5: Amplificación del *locus rsmA* silvestre en las transformantes seleccionadas
- 6: Amplificación del *locus rsmA* a partir de la cepa silvestre

Figura 33

Verificación por PCR del alelo silvestre del *locus rsmA* con los oligonucleótidos RsmA D y RsmA R en las transformantes obtenidas a partir de la cepa E

Al observar fenotípicamente estas mutantes no observamos mayor cambio en la mucoidia con respecto a la cepa silvestre (Fig. 34).



Figura 34

Fenotipo de una mutante *ErsmA::Km*

8. DISCUSION

En estudios anteriores (Cocotl Yáñez, 2006 y Reyes Valencia, 2009) se reportó la dificultad de obtener mutantes nulas del gen *rsmA* en la cepa silvestre E. Debido a la poliploidía de *A. vinelandii* es común que al tratar de mutar un gen importante, se conserve en una misma célula el alelo mutante con el marcador de resistencia (usado para su selección) y el alelo silvestre, estableciéndose un fenómeno de merodiploidia. En los estudios antes citados, sólo se obtuvieron cepas merodiploides y no se pudo segregar la mutación a todos los cromosomas de la cepa.

En *E.coli*, CrsA está involucrado en la regulación negativa de la síntesis de glucógeno, por lo que en mutantes de *csrA* se favorece la síntesis de glucógeno, disminuyendo el flujo de carbono a Ciclo de Krebs, impactando también de manera negativa a las vías glucolíticas. Por lo anterior una mutante *csrA* nula presenta dificultades para crecer en medios con fuentes de carbono glucolíticas. Esta condicionalidad de crecimiento fue superada cuando además de mutar a *csrA* se mutó el gen *glgC* implicado en la síntesis de glucógeno (Timmermans y Melderer, 2009). Ante la imposibilidad de obtener mutantes *rsmA* en *A. vinelandii* nos planteamos la posibilidad de que el alginato jugara un papel semejante al del glucógeno en *E. coli*, por lo que planteamos tratar de mutar a *rsmA* en un fondo genético no productor de alginato. Para ello se eligió a la mutante JGDE, una derivada de la cepa E con una mutación generada por inserción en el gen *algD*. De manera interesante al mutar el gen *rsmA*, tanto por remoción total como parcial, la mutante JGDE recuperó su capacidad de producir alginato. Como se mencionó la inserción del casete de resistencia a Km en la mutante JGDE se localizó a la mitad de sus subdominios catalíticos pudiendo dejar una proteína parcialmente funcional, la que en condiciones basales de expresión probablemente su actividad no es suficiente para sintetizar alginato. Sin embargo al mutar a *rsmA* la posible sobreexpresión del gen *algD::Km* compensaría su función defectiva haciendo posible nuevamente la producción del polímero. Para probar lo anterior se podría medir la actividad enzimática de la GDP-manosa

deshidrogenasa (AlgD) en las mutantes JGDE *rsmA* esperando que la enzima se mantenga activa a pesar de la inserción que porta. Estos datos de manera general apuntalan la idea de que RsmA es un regulador muy importante de la biosíntesis del exopolisacárido controlando la expresión del gen *algD*.

Debido a que la cepa JGDE no nos fue útil para alcanzar el objetivo planteado originalmente, construimos otra mutante en el gen *algD* en el que se removió su centro catalítico y se sustituyó por un casete que confiere resistencia a Km. En esta mutante fue posible mutar el gen *rsmA* sin restaurar la síntesis de alginato, lo cual indirectamente apoya la hipótesis de que la enzima con actividad parcial en la mutante JGDE original se activa por sobre-expresión.

En *E. coli* originalmente se caracterizó el gen *csrA* al estudiar una mutante generada por mutagénesis al azar con un transposón. La inserción del transposón se localizó en el extremo 3' que codifica para el C-terminal de la proteína. Esta mutación afecta sólo parcialmente la función de la proteína, no presentando la condicionalidad de crecimiento de las mutantes generadas por remoción total del gen (Romeo *et al.*, 1993). De acuerdo a esto, generamos dos mutaciones que afectan el C-terminal RsmA, una por inserción y otra por inserción/remoción. Originalmente planteamos que estas mutaciones se podrían segregar completamente en cepas mucoides y no mucoides. Sin embargo sólo logramos obtener cepas con el alelo mutante completamente segregado en el fondo no mucoide. Estos resultados sugieren que tanto la remoción completa del gen como la alteración del extremo 3' afectan de manera similar a las bacterias productoras de alginato.

Las mutantes merodiploides derivadas de la cepa E, presentaban fenotipos variables; desde cepas más mucoides que la silvestre, con mucoidia similar a la cepa madre y las que no presentaban mucoidia alguna. Ésto posiblemente podría deberse a las diferentes proporciones de los alelos mutante y silvestre que posee cada cepa. Tratando de segregar la mutación en las cepas merodiploides mucoides, se aumentó la concentración de antibiótico en resiembras sucesivas. Al hacer ésto sorprendentemente las mutantes perdieron el fenotipo mucoide. En relación a la segregación de la mutación se siguieron observando copias

silvestres. Una posible explicación a la pérdida de mucoidia es que la mutación en *rsmA* podría promover una sobreproducción de alginato que sería deletérea para la bacteria y que posiblemente estaría forzando la selección de revertantes no productoras de alginato.

Finalmente pudimos obtener cepas con la mutación completamente segregada en el fondo de la cepa en la que se removió la región catalítica del gen *algD*. La mutación integrada en el cromosoma de esta cepa es la mutación generada por inserción en el extremo 3' del gen. Queda pendiente establecer si la mutación por remoción/inserción del extremo 3' y la remoción total del gen se comportan de manera semejante.

Solo se pudieron construir mutantes nulas de *rsmA* en el fondo de la cepa $\Delta algD::Km$ no productora de alginato, esto impide la caracterización del regulador de RsmA sobre la producción del polímero. Sin embargo esta mutante podría ser útil para estudiar la regulación de múltiples blancos y fenotipos. En un trabajo previo se encontraron por predicción bioinformática cerca de 300 genes con una caja consenso de pegado para RsmA que podrían ser estudiados en esta mutante (López Pliego, 2011). Esto contribuirá al entendimiento de la función que juega no solo RsmA sino el Sistema de regulación GacS/GacA-Rsm en la fisiología de *A. vinelandii*, (Fig.35).

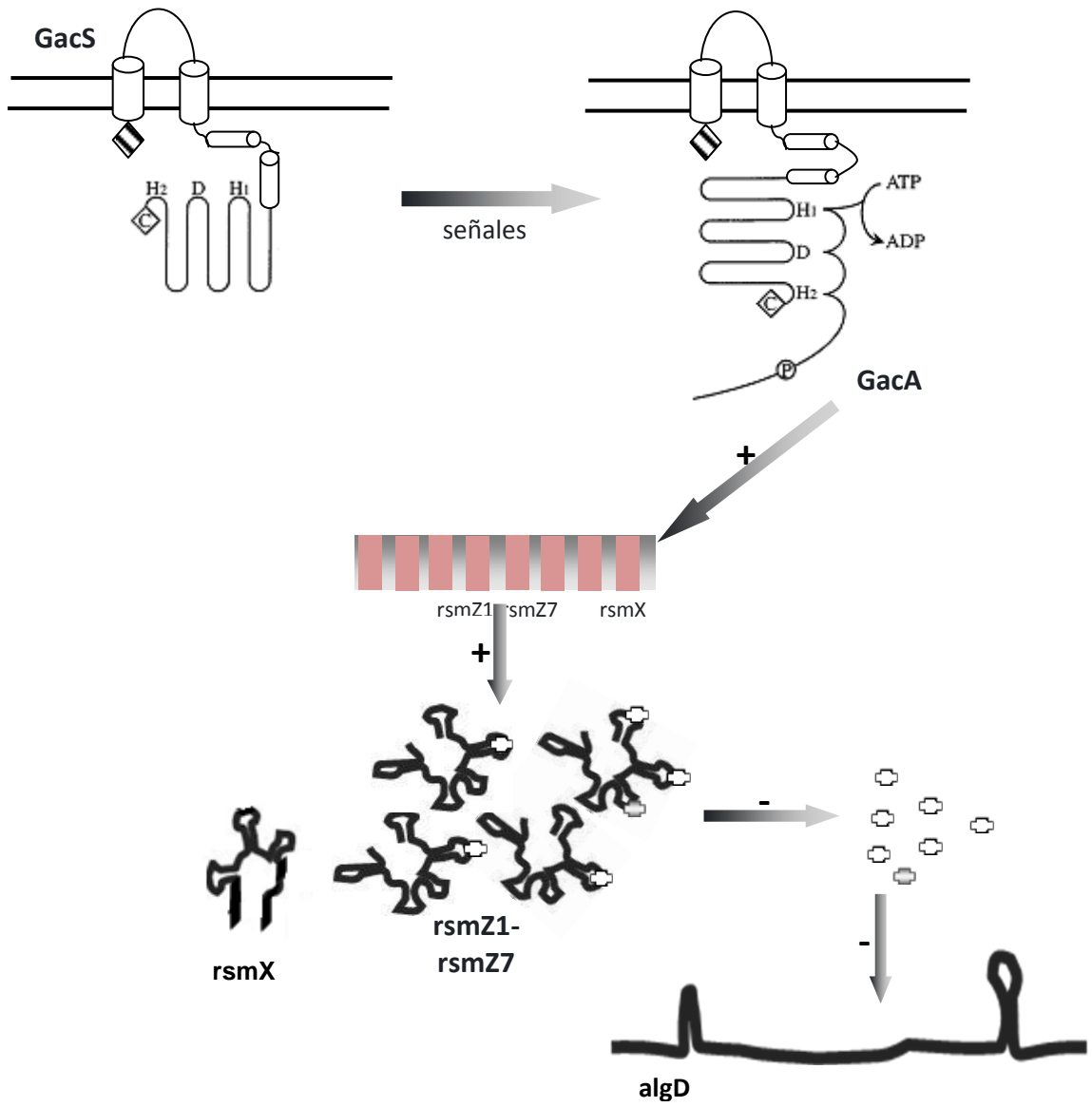


Figura 35
Esquema propuesto del papel que juega *rsmA* en *A. vinelandii*

9. CONCLUSIÓN

- Se pueden obtener mutantes nulas de *rsmA* en fondos genéticos no productores de alginato.

10. PERSPECTIVAS

- Medir la actividad de la enzima GDP-Manosa deshidrogenasa en las mutantes JGDE *rsmA*
- Estudiar la regulación de algunos genes que presentan una caja consenso de pegado para RsmA y sus fenotipos

11. BIBLIOGRAFÍA

- **Aarons S., Abbas A., Adams C., Fenton A., O'Gara F.** (2000). A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *J Bacteriol.* 14:3913-3919.
- **Beale J.M. Jr and Foster J.L.** (1996). Carbohydrate fluxes into alginate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* NCIB 8789: NMR investigations of the triose pools. *Biochemistry.* 35:4492-501
- **Blumenkrantz N. and Asbone-Hansen G.** (1973). New method for quantitative determinations of uronic acids. *Anal Biochem.* 54:484-489.
- **Bustillos R.** (2004). Estudio de la regulación transcripcional del gen *rsmB* en *Azotobacter vinelandii* Tesis de Maestría en Microbiología. Centro de investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- **Campos M.E., Martínez-Salazar J.M., Lloret L., Moreno S., Nuñez C., Espín G., Soberón-Chávez G.** (1996). Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 178:1793-1799.
- **Castañeda M.** (2000). Caracterización y estudio del sistema regulador de dos componentes GacS/GacA en la biosíntesis de polímeros en *Azotobacter vinelandii*. Tesis Doctoral. Instituto de Biotecnología UNAM.
- **Castañeda, M., Guzmán J., Moreno S., Espín G.** (2000). The GacS sensor kinase regulates alginate and poli- β -Hidroxybutirate production in *Azotobacter vinalandii*. *J. Bacteriol.* 182:2624-2628.
- **Castañeda M., Sánchez J., Moreno S., Núñez C., Espín G.** (2001). The global regulators GacA and σ^S form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 183:6787-6793.
- **Clementi F.** (1998). Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Crit. Rev. Biotech.* 17:327-361.
- **Cocotl M.** (2007). Caracterización del gen *rsmA* involucrado en la síntesis de alginato y PHB en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Licenciatura en Microbiología. Centro de investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

- **Corbell N. and Loper J.E.** (1995). A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J Bacteriol.* 177:6230-6
- **Costerton, W.J., Cheng K.J., Gessey G.G., Ladd T.I., Nickel J.C., Disgupta M., Marrie T.J.** (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. rev. Microbiol.* 41: 435-464.
- **Cui Y., Chatterjee A., Chatterjee A.K.** (2001). Effects of the two-component system comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the production of global regulatory rsmB RNA, extracellular enzymes, and harpin *Ecc.* *Mol Plant Microbe Interact.* 14:516-26
- **Espín G.** (2001). Cap. 6. Biología de *Azotobacter vinelandii*. *Microbios en línea.* Editores: Dra. Esperanza Martínez Romero y Julio César Martínez Romero. ISBN968-36-8879-9. (<http://www.biblioweb.dgscs.unam.mx/libros/microbios/Cap6/>)
- **Franklin M.J., Nivens D.E., Wedge J.T. and Howell P.I.** (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol.* 2011; 22:2:167
- **Gacesa P.** (1998). Bacterial alginate biosynthesis: recent progress and future prospects. *Microbiol.* 144:1133-1143
- **Gao R. and Stock A.M.,** (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol.* 2009;63:133-54.
- **Goodier R.I. and Ahmer B.M.** (2001). SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol* 183:2249-58
- **Haug, A., Laand B., Smidsrod O.** (1974). Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carb. Res.* 32:217-225
- **Haug A. and Larsen B.** (1971). Biosynthesis of alginate: Composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Carbohydrate Res.* 17: 287-296.
- **Heeb S. and Haas D.** (2001). Regulatory roles of the GacS/GacA two component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact.* 14:1351-1363. Review.
- **Heeb S., Blumer C., Haas D.** (2002). Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol.* 184:1046-56.
- **Heeb S., Valverde C., Gigot-Bonnefoy C., Haas D.** (2005). Role of the stress sigma factor RpoS in GacA/RsmA-controlled secondary metabolism and resistance to

- oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 FEMS Microbiology Letters 243 - 1, 251–258.
- **Innis M.A., Gelfald D.H., Sninsky J.J., White T.J.** (1990). PCR Protocols. A guide to methods and applications. Academic Press.
 - **Jetta J.E. and Groisman E.** (2003). Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems, Trends in Microbiology. 359-366.
 - **Lowry H.O., Nira J.R. and Lewis A.F.** (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 193:265-275.
 - **Lin L.P. and Sadoff H.A.** (1969). Chemical composition of *Azotobacter vinelandii* cysts. J. Bacteriol. 100: 480-486.
 - **Jian-Feng L.L. and Sheen J.** (2010). Protocol: a rapid and economical procedure for purification of plasmid or plant DNA with diverse applications in plant biology. Plant Methods 6:1.
 - **López L.** (2011). Búsqueda de sitios consenso de unión de la proteína RsmA en el genoma de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría en Centro de investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
 - **Manzo J., Cocotl-Yañez M., Tzontecomani T., Martínez V.M., Bustillos R. Velásquez C., Goiz Y., Solís Y., López L., Fuentes L.E., Nuñez C., Segura D., Espín G., Castañeda M.** (2011). Post-Transcriptional Regulation of the Alginate Biosynthetic Gene *algD* by the Gac/Rsm System in *Azotobacter vinelandii*. J. Mol Microbiol Biotechnol. En prensa.
 - **Martínez N.B.** (2004). Caracterización del gen *rsmA* de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Licenciatura un Biomedicina Facultad de Medicina, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
 - **Moreno S., Najera R., Guzman J., Soberon-Chavez G., Espin G.** (1998). Role of Alternative s Factor AlgU in Encystment of *Azotobacter vinelandii*. Journal of bacteriology, p. 2766–2769.
 - **Nagpal P.J.** (1989). Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacterial, 171:3133-3138.
 - **Page W.** (1982). Optimal conditions for induction of competence in nitrogen-fixing *Azotobacter vinelandii*. J. Microbiol. 28: 389-397.

- **Parkinson J.S. and Kofoed E.C.** (1992). Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* 26: 71-112.
- **Pessi G., Williams F., Hindle Z., Heurlier K., Holden M. T. G., Cámara M., Haas D., Williams P.** (2001). The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 183:6676-6683
- **Romeo T.** (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol* 29:1321-30
- **Sabra W., Zeng A.P. and Deckwer W.D.** (2001). Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56:315-25.
- **Sadoff H.L.** (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol. Rev.* 39:516-539.
- **Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T.** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ed 3. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory.
- **Timmermans J. and Melderer L.V.** (2009). Conditional Essentiality of the *csrA* Gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 191:5 1722-1724.
- **Valverde C., Heeb S., Keel C. and Haas D.** (2003). RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Microbiol.*50:1361-79.
- **Vázquez A., Moreno S., Guzmán J., Alvarado A., Espín G.** (1999). Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* *algGXLVIFA* genes: characterization of *algF* mutants. *Gene.* 232: 217-219.
- **Wilson K.J., Sessitsch A., Corbo J.C., Giller K. E., Akkermans A. D. and Jefferson R.A.** (1995). beta-Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Microbiology.* 141:1691-705.
- **Yihe G., Shude Y., Yanyu F., Runya Y., Daiying M., Jinpeng C., Lu W.** (2006). RpoS as an intermediate in RsmA-dependent regulation of secondary antifungal metabolites biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18. *FEMS Microbiol Lett* xx. 1-7.
- **Zuker M., Jaeger J.A. and Turner D.H.** (1991). A comparison of optimal and suboptimal RNA secondary structure predicted by free energy minimisation with structures determined by phylogenetic comparison. *Nucleic Acids Res.* 19:2707-2714.

ANEXO

Medios De Cultivo

Medio LB (Luria Bertani)

Reactivos	Volumen			
	1 lt	500 ml	250 ml	
Agua destilada	1 lt	500 ml	250 ml	Medio líquido
Peptona de caseína	10 g	5 g	2.5 g	
Extracto de Levadura	5 g	2.5 g	1.25 g	
NaCl	10 g	5 g	2.5 g	
Agar Bacteriológico	15 g	7.5 g	3.75 g	Medio sólido

E. coli se cultiva en medio LB a una temperatura de 37°C; en medio líquido se coloca además en agitación a 200 rpm.

Medio Burk Sacarosa:

Reactivos	g/L
K ₂ HPO ₄ *	0.8
KH ₂ PO ₄ *	0.2
Sacarosa	0.2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.073
Na ₂ SO ₄	0.183
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.005
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.0002
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.16
Acetato de amonio 1.5 M	0.01156
Cloruro de amonio 1.5 M	0.00802
Acetato de potasio 1.5 M	0.0147
Agar (g)	15
Agua (ml)	1000

Reactivos (ml)	BS	CM
Buffer fosfatos	100	100
Sacarosa	100	100
CaCl ₂	10	10
Na ₂ SO ₄	10	10
MgCl ₂	1	1
**Na ₂ MoO ₄	1	-
**FeSO ₄	1	-
Acetato de amonio	10	-
Cloruro de amonio	10	-
Acetato de potasio	10	-
Agar (g)	15	15
Agua (ml)	800	800

* Se disuelven ambos reactivos y se ajusta aun pH 7.0 para obtener una solución de Buffer fosfatos

** No se adicionan en el medio CM.

Se agrega agar bacteriológico (15 g/L) en el caso de que se quiere solidificar el medio. *A. vinelandii* fue crecido en medio BS y/o CM según las necesidades.

El medio CM no contiene Hierro ni Molibdeno y permite crecer a la bacteria y ser competente para la transformación.

Enzimas de Restricción. Enzimas ocupadas para la realización de este proyecto:

<i>Enzima</i>	<i>Temperatura de actividad(°C)</i>
<i>HindIII</i>	37
<i>Sall</i>	37
<i>EcoRI</i>	37
<i>XhoI</i>	37
<i>KpnI</i>	37

Preparación de antibióticos

<i>ANTIBIOTICO</i>	<i>SOLVENTE</i>	<i>E. coli (mg/ml)</i>	<i>A. vinelandii (mg/ml)</i>
Estreptomicina (Sm)	Agua	20	2
Kanamicina (Km)	Agua	20	4
Acido Nalidixico (Axl)	Agua	---	10
Ampicilina (Amp)	Agua	100	-----
Gentamicina (Gm)	Agua	10	1.5

Se adiciona 1 µ de antibiótico por ml de medio de cultivo.