



Universidad
Zaragoza



TRABAJO FIN GRADO: Grado en Biotecnología

CONSTRUCCIÓN DE HERRAMIENTAS GENÉTICAS PARA EL ESTUDIO DEL TRANSPOSÓN IS6110 DE *MYCOBACTERIUM* *TUBERCULOSIS*

Silvia Romero Tamayo

Julio 2015

Directores:

Jesús Ángel Gonzalo Asensio

Carlos Martín Montañés

VISTO BUENO DE LOS DIRECTORES

Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública. Grupo Genética de Micobacterias.

Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza

Memoria presentada por Silvia Romero Tamayo
bajo la dirección de los Drs. Jesús Ángel Gonzalo Asensio
Carlos Martín Montañés

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA
ZARAGOZA, JULIO 2015

Los Doctores Jesús Ángel Gonzalo Asensio y Carlos Martín Montañés, como directores del trabajo de fin de grado " CONSTRUCCIÓN DE HERRAMIENTAS GENÉTICAS PARA EL ESTUDIO DEL TRANSPOSÓN IS6110 DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*", acreditan su idoneidad y otorgan el V.º B.º a su contenido para ir a Tribunal de Trabajo fin de Grado.

Fdo. Jesús Ángel Gonzalo Asensio

Fdo. Carlos Martín Montañés

"LA DIFERENCIA ENTRE LO
POSIBLE Y LO IMPOSIBLE ES LA
VOLUNTAD HUMANA."

Louis Pasteur

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera dedicar estas líneas, para agradecer a todas las personas que han hecho posible este trabajo:

Así cabe destacar al grupo Genética de Micobacterias, por esta oportunidad única, y por hacer de este trabajo una experiencia más que enriquecedora. Agradecer a mis directores Jesús Gonzalo y Carlos Martín por todo el tiempo que han tenido que dedicar a este proyecto y a todos los miembros del laboratorio.

A mis padres, por tener que soportarme siempre, y hacerlo tan bien. A ellos y a Víctor les agradezco su apoyo y cariño en las alegrías y en las penas, en los buenos momentos y en los malos.

INDICE

Abreviaturas	1
Figuras.....	1
Resumen.....	2
Antecedentes.....	3
Objetivos.....	4
Materiales y Métodos.....	4
Resultados.....	5
Construcciones genéticas.....	5
Construcción de cepa pMV361+ IS6110 Wt en <i>E.coli</i>	
Construcción de cepa pMV361+ IS6110 Fs en <i>E.coli</i>	
Transformación de pMV361+ IS6110 Wt en <i>M.smegmatis</i>	
Transformación de pMV361+ IS6110 Fs en <i>M.smegmatis</i>	
Experimento de transposición	17
Construcción de cepa pMV361+ IS6110 Wt +pIR Km en <i>M.smegmatis</i>	
Construcción de cepa pMV361+ IS6110 Fs + pIR Km en <i>M.smegmatis</i>	
Frecuencias de transposición	
Conclusiones.....	22
Bibliografía	24
Anexos	25
I MATERIAL Y METODOS	
Materiales	
Cepas bacterianas y plásmidos utilizados	
Medios y condiciones de cultivo	
Métodos	
Extracción de DNA plasmídico (miniprep)	
visualización de DNA por medio de geles de agarosa	
purificación de DNA de banda geles agarosa	
Conservación de cepas bacterianas	
Cuantificación espectrofotométrica de DNA	
PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	
Preparación de células electrocompetentes	
Digestión de plásmidos con Ez de restricción	
Reacciones de ligación	
Electroporación	
II SECUENCIA IS 6110 WT	
III SECUENCIA IS 6110 FS	
IV SECUENCIACIÓN pMV 361 en <i>Escherichia coli</i>	
V SECUENCIACIÓN pMV 361 en <i>Mycobacterium smegmatis</i>	

ABREVIATURAS

Wt	Wild type
Fs	Frameshift
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
EtOH	Etanol
bp	Pares de bases
°C	Grados Celsius
mRNA	RNA mensajero
ORF	Marco abierto de lectura
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
ng	Nanogramos
Hyg	Hygromicina
Sac	Sacarosa
μl	Microlitros
Km	Kanamicina
μg	Microgramos
IR	Repetición invertida
IS	Secuencia inserción

FIGURAS

1	Mecanismo de retroceso del ribosoma
2	Construcciones genéticas
3	PCR solapante
4	Cebadores para amplificación IS6110 Wt
5	Cebadores y su lugar de unión para amplificar ORFA y ORFB
6	Amplificación de la IS6110 Wt y de los ORFs. Y amplificación IS6110 Fs
7	Vector pMV361 digerido con el enzima de restricción <i>NheI</i>
8	Construcciones genéticas, vectores pMV361
9	Tamaño esperado de los productos de PCR en función de los oligos empleados
10	Productos de amplificación de PCR
11	Construcción IS6110 Fs e IS6110 Wt en pMV361 digeridos con <i>NsiI</i> para retirar la Km del plasmido. pYUB 854 digerido con <i>PstI</i> para obtener el cassette de Hyg
12	Plásmidos obtenidos tras la ligación
13	Comprobación de IS6110 Wt
14	Comprobación de IS6110 Fs
15	Secuenciación
16	Análisis Wt y Fs en <i>M.smegmatis</i>
17	Construcción bacteriana en <i>M.smegmatis</i>
18	Plasmido pIR Km
19	Construcción final <i>M.smegmatis</i>
20	Ejemplo colonias obtenidas en el experimento de trasposición
21	Comprobación transformación con pIRKm
22	Esquema- resumen de todos los pasos seguidos
23	Experimento transposición

RESUMEN

La secuencia de inserción específica de *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 pertenece a la familia de secuencias de inserción IS3 (McAdam *et al.*; 1990; Thierry *et al.* 1990.) Las secuencias de inserción son fragmentos de DNA capaces de movilizarse desde unas moléculas de DNA a otras, bien al azar o bien mediante determinadas secuencias diana que permiten su integración, sin necesidad de que exista una homología de secuencia (Chandler and Fayet 1993).

IS6110 está presente en múltiples copias en la mayoría de las cepas de *M. tuberculosis*. La variación en el número de copias y la ubicación de este elemento en el genoma de *M. tuberculosis* hace que sea una herramienta ideal para la tipificación de cepas de *M. tuberculosis* mediante el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Hermans *et al.* 1991; Van Embden *et al.* 1993).

La transposición de IS6110 está altamente regulada y puede ser sensible al estado fisiológico de la célula huésped, que a su vez se ve afectada por las condiciones ambientales (Iida, 1983). La transposasa (enzima que cataliza la movilización del transposón a otra localización del genoma por mecanismos replicativos o no replicativos de transposición) de IS6110 está codificada por un único marco de lectura, aunque en el genoma de *M. tuberculosis* aparece anotada en dos genes denominados ORFA y ORFB que solapan parcialmente. La transposasa activa se traduce mediante un cambio en la pauta de lectura provocada por el retroceso del ribosoma en 1 nucleótido en la secuencia heptanucleotida, TTAAAG, situada dentro de la región de solapamiento entre ORFA y ORFB de IS6110 (McAdam *et al.* 1990).

Los objetivos de este trabajo son i) confirmar que la secuencia wild type de la IS6110 codifica para una transposasa inactiva, impidiendo la transposición y ii) que el cambio en la pauta de lectura en una secuencia determinada permita la traducción de una transposasa activa.

ABSTRACT

The *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence IS6110, belongs to the IS3 family (McAdam *et al.* to, 1990.; Thierry *et al.* to, 1990a.) Insertion sequences are DNA fragments able to mobilize between DNA molecules. This process occurs randomly or mediated by specific sequence targets that allow IS6110 integration, without need for sequence homology (Chandler and Fayet 1993).

This element is present in variable number of copies in *M. tuberculosis*. Variations in either the copy number or its location in the *M. tuberculosis* genome, make this element an useful genetic tool for the classification and differentiation of *M. tuberculosis* species by using Restriction Fragments Length Polymorphism (RFLP) (Hermans et al. to., 1991; Embden et goes to., 1993).

Transposition of IS6110 is thightly regulated in response to the physiological status of the bacteria, that is otherwise affected by the environmental conditions (Iida, 1983).

IS6110 transposase (the enzyme that promotes transposon movilization by replicative or non-replicative mechanisms) is coded by a unique Open Readin Frame althought in the *M. tuberculosis* genome is anotated as two overlapping ORFs named ORFA and ORFB. The active transposase is produced by translational slippery of the ribosome in 1 nucleotide within the heptanuclotetide TTAAAG sequence placed in the overlapping región between ORFA and ORFB (McAdam et to., 1990).

The objectives of this work are: i) to confirm that wild type IS6110 sequence codes for an inactive transposase thus avoiding transposition ii) that specific changes within a specific sequence allow translation of an active transposase.

ANTECEDENTES:

Los transposones o secuencias de inserción pueden encontrarse integrados en cualquier elemento genético replicativo o replicón, tanto en cromosomas como en plásmidos. Todos los transposones poseen al menos la capacidad de provocar su transposición o salto hacia otro elemento genético porque poseen entre otros el gen que codifica una transposasa, enzima clave para permitir la integración del transposón. A veces la transposición es replicativa y una copia del transposón permanece en su localización original, mientras otra se incluye en la diana. Otras veces no se replica sino que se libera de un replicón y se integra en otra región. Algunos transposones incluyen genes de resistencia a antibióticos que se extienden así del cromosoma a los plásmidos o de un plásmido a otro lo que favorece enormemente su diseminación entre diversas especies de bacterias patógenas (Annette S. de Boer et al. oct. 1999).

La IS6110 es uno de los transposones más simples, solo codifica el gen de la transposasa. Hay secuencias de inserción de diferentes tamaños (780-1500 pares de bases), siempre flanqueadas por dos extremos cortos repetidos pero en sentido inverso (15-25 pares de bases). La información incluida entre estos extremos repetidos codifica para la transposasa (Abbie Coros 2008)

La traducción de la transposasa inactiva de la IS6110 comienza y prosigue hasta una secuencia heptanucleótida TTAAAG que provoca el cambio de marco de lectura del ribosoma, al retroceder 1 nt. Este cambio en la pauta de lectura origina un único marco de lectura resultante de la traducción del ORFA, seguido del cambio de marco de lectura en la secuencia heptanucleótida anteriormente mencionada y la consecuente traducción del ORFB (Caliskan et al. all 2015).

OBJETIVOS:

La hipótesis de la que parte este trabajo es el cambio programado que se produce en el marco de lectura de la transposasa de la IS6110. Este cambio, origina dos ORFs, que codifican una transposasa inactiva evitando así la transposición. Para demostrarlo se plantearon los siguientes objetivos:

- 1- Identificación de los marcos de lectura de la transposasa IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis*.** Se diseñaron los oligos para la amplificación de la IS6110 wild type (que tiene dos ORFs) y para obtener la IS6110 frameshift (cambiando el marco de lectura para que de un único ORF)
- 2- Construcción de vectores y construcciones genéticas para analizar la actividad transposasa de la IS6110.** Empleando PCR y PCR “overlapping”
- 3- Medida de la actividad transposasa en la bacteria no patógena y crecimiento rápido *Mycobacterium smegmatis*.** Empleando esas construcciones génicas

MATERIAL Y METODOS:

Extracción de DNA plasmídico (miniprep)
Visualización de DNA por medio de geles de agarosa
Purificación de DNA de banda geles agarosa
Conservación de cepas bacterianas
Cuantificación espectrofotométrica de DNA mediante Nanodrop
Amplificación de DNA mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
Preparación de células electrocompetentes
Digestión de plásmidos con enzimas de restricción
Reacciones de ligación
Electroporación
(ver anexos para más información)

RESULTADOS

CONSTRUCCIONES GENÉTICAS:

Como hemos enunciado con anterioridad, la IS6110 wt al traducirse, origina dos ORFs. ORF1 326pb y ORF2 986pb, puesto que esta codificado así en su genoma. mediante un "ribosomal frameshifting" programado en una secuencia heptanucleotida presente en la región donde solapan los dos ORFs originando una transposasa inactiva. (Fig1)

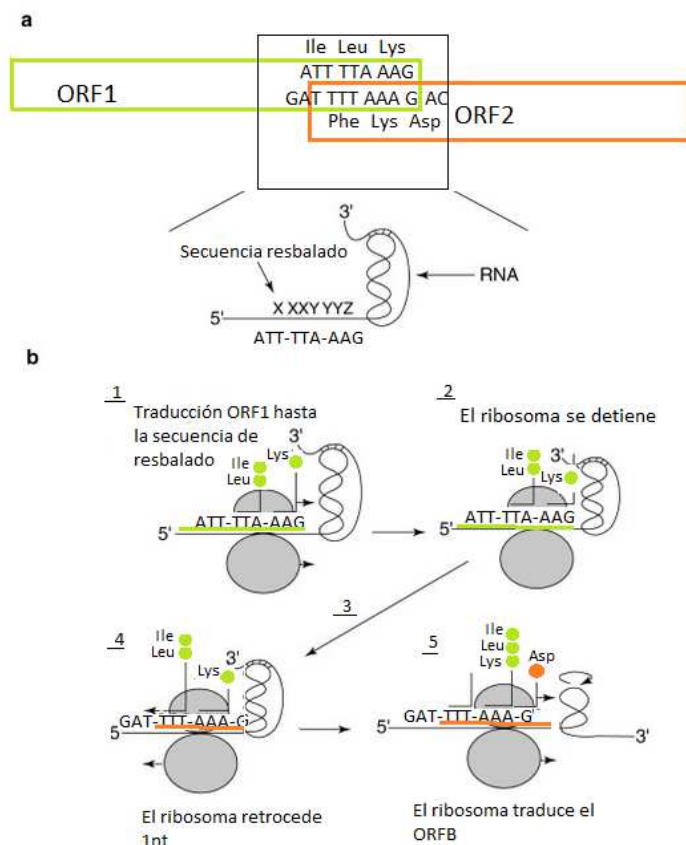


Fig 1: a) Zona de solapamiento entre las secuencias de los dos ORFs de la IS6110 en la que se indica la secuencia heptanucleotida, dónde se produce el solapamiento y los aminoácidos implicados de cada ORF, (ORF1 en verde, ORF2 en naranja)

b) Mecanismo por el que se produce el deslizamiento hacia atrás del ribosoma en la secuencia Wt de la IS6110 por la secuencia heptanucleotida TTTTAAA.

- 1-El ribosoma traduce el ORF1, los codones ATT-TTA-AAG- e incorpora Ile (isoleucina), Leu (leucina), Lys (lisina) (verde)
- 2-La secuencia TTTTAAA provoca la detención de la traducción por parte del ribosoma
- 3- El ribosoma retrocede 1 nt en la secuencia
- 4- Al darse ese retroceso, provoca el cambio en el marco de lectura
- 5- Al retomar la traducción, traduciendo el ORF2 GAT-TTT-AAA-GAC incorporando los aa' ya leídos y prosiguiendo en el siguiente codón del ORF B incorporando Aspártico (naranja) en lugar de Threonina

Para aseverar que la secuencia "wild type" de forma natural posee esos dos ORFs que codifican la transposasa inactiva, se introdujo una mutación en la secuencia que evita el desplazamiento hacia atrás del ribosoma. Cambiando así el marco de lectura y traduciendo directamente la secuencia como un único marco de lectura, y codifique un único ORF que originará una transposasa activa. (Fig2)

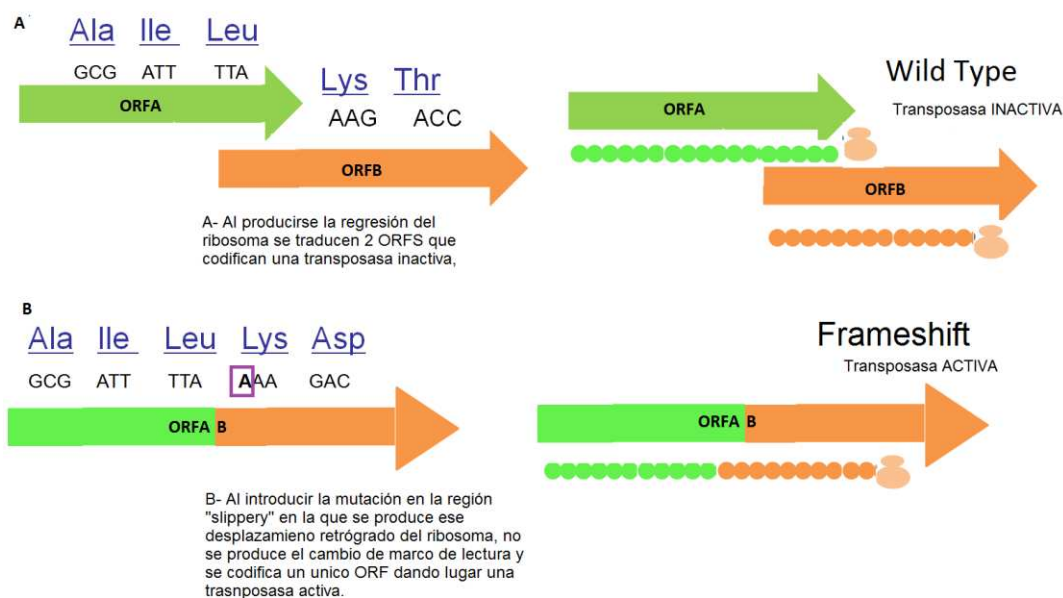


Fig.2 Construcciones genéticas

A- Wt: secuencia en la que se ven los 2 ORFS, los aminoácidos que codifica cada codón y la secuencia de solapamiento

B- mutación introducida (resaltada en morado) para obtener el Frameshift y que no se dé el cambio en el marco de lectura leyéndose así como un único ORF (Fs)

Para comprobar las variaciones en la frecuencia de transposición se realizaron varios clonajes, como se explica a continuación, para construir las secuencias descritas en las imágenes anteriores, que nos permitirán realizar el experimento final de transposición.

Para obtener las 2 construcciones se tuvo que realizar la técnica de la PCR y PCR solapante.

PCR SOLAPANTE. (overlapping PCR)

Las mutaciones deseadas se han introducido mediante la técnica de mutagénesis dirigida por PCR solapante o de overlapping (Ho et al., 1989). Consistente en la generación de un fragmento de PCR que contiene la mutación. Se hace una primera PCR en el que uno dos de los cebadores utilizados tiene la mutación, luego se realiza otra PCR en la que solapa con un segundo fragmento con otro cebador con la mutación y finalmente se hace una PCR utilizando sólo los cebadores de los extremos, como se muestra en la figura3.

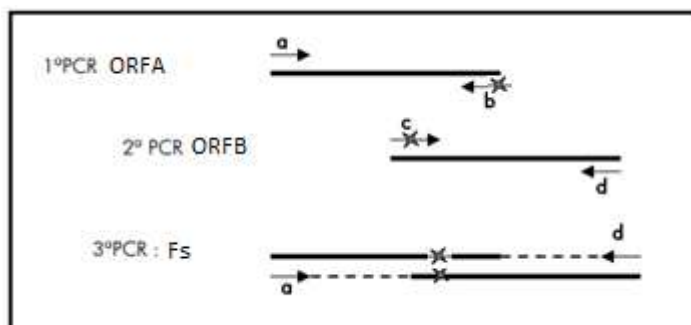


Fig3: Esquema de los pasos seguidos en la realización de una PCR solapante (overlapping). El cebador c porta la mutación a introducir. En la PCR final se usan como molde PCR 1 y 2 y como cebadores a y d.

En este trabajo nosotros aplicamos esta técnica de la siguiente manera.

Para amplificar la IS6110Wt, fue más sencillo, puesto que ya había constancia de la secuencia de genética de la IS y solamente se tuvo que tomar parte de la secuencia inicial del ORF1 para un cebador al que se añadió el sitio de restricción *NheI* y el final del ORF2 al que también se le añadió el mismo sitio de restricción para su posterior corte e introducción en el vector pMV361. (Figura 4)

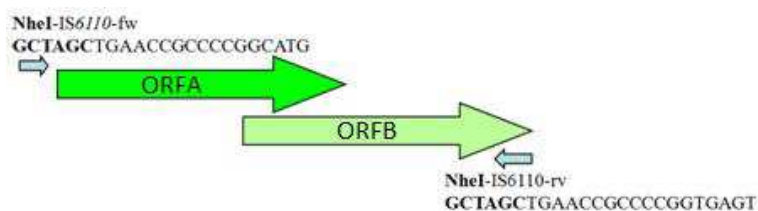


Fig 4: Cebadores para amplificación IS6110 Wt

Para amplificar la IS6110Fs se tuvo que realizar una PCR solapante, como hemos descrito anteriormente. Para ello se diseñaron dos cebadores en donde se quiere introducir la mutación, que contenga el codón mutado en la mitad del cebador.

IS6110-frameshift-fw

ACGCGATTTTAAAAGACCGCGTCG

IS6110-frameshift-rv

CGACGCGGTCTTTTAAAATCGCGT

Para realizar la PCR solapante, primero se tuvo que amplificar cada ORF por separado, con un cebador con la secuencia de restricción y el otro con la mutación usando las siguientes parejas de oligos (Figura 5)

ORFA

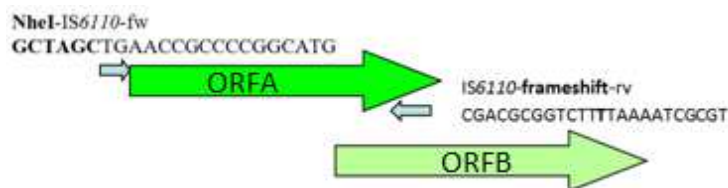
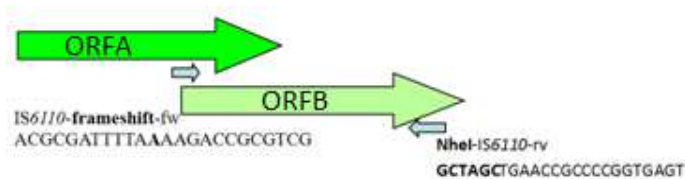


Fig 5: Cebadores y su lugar de unión para amplificar ORFA (arriba) y ORFB (abajo)

ORFB



Una vez tuvimos los ORFs amplificados se realizó otra PCR en la que se emplea como DNA molde esos productos anteriores purificados y como cebadores, los que contienen el sitio de restricción en los extremos.



Al realizar la PCR solapante obtuvimos la transposasa codificada en un único ORF

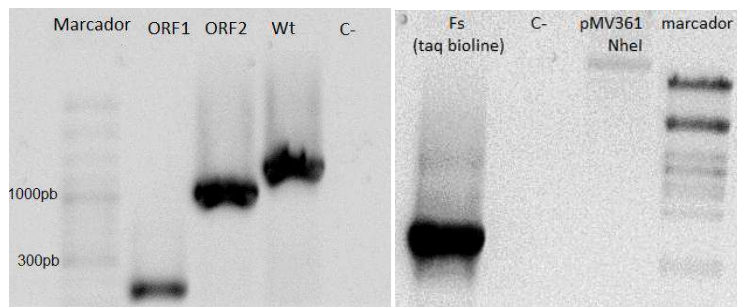


Fig. 6: A la izquierda, productos de amplificación de la IS6110 Wt y de los ORFs. A la derecha amplificación IS6110Fs

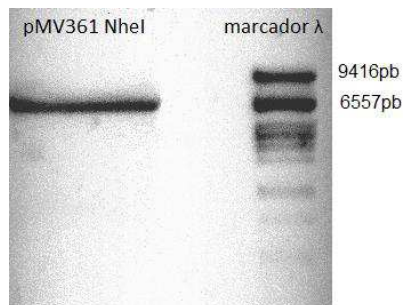
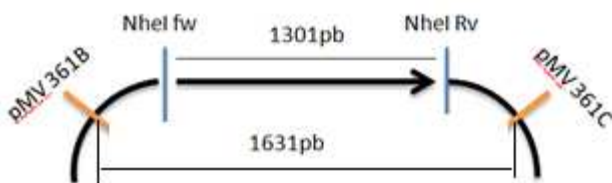


Fig: 7: vector pMV361 digerido con el enzima de restricción *NheI*

Paralelamente digerimos el plásmido pMV361 con la enzima de restricción *NheI* para realizar los clonajes una vez purificadas las dos secuencias de Inserción.

Una vez obtuvimos los dos insertos los purificamos con etanol-acetato y el vector digerido con *NheI* lo cargamos en un gel para purificarlo de banda siguiendo el protocolo (ver material y métodos)

Los tamaños de banda analizados con los oligos de los extremos (*Nhe* I fw- rv) era 1301pb. Si empleamos los oligos que se encuentran en el vector pMV361C-B el tamaño del inserto es de 1632pb. ya hay que sumarle la distancia entre ambos oligos (331pb) al tamaño del inserto como se ve en la figura(9)



10

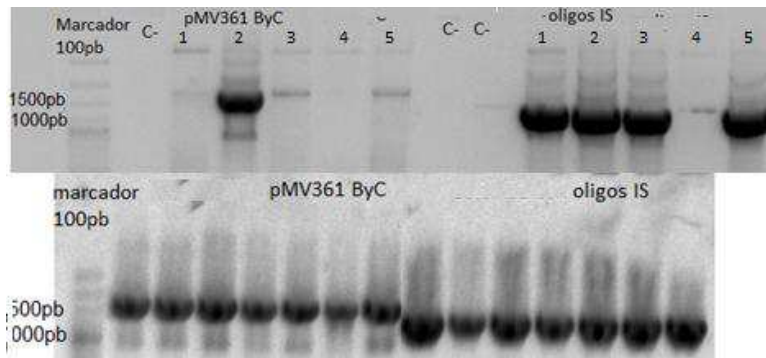


Fig10: Productos de amplificación de PCR analizados con los oligos IS *NheI* Fw-Rv y con los oligos pMV361 B-C de las colonias transformadas con las ligaciones IS6110 Fs + pMV361 (imagen superior) e IS6110 Wt+ pMV361 (imagen inferior)

Una vez comprobado que las colonias tenían el inserto tomamos 2 colonias y las inoculamos en medio líquido para conservar cepa a -80°C *E.Coli* DH5 pMV361 IS6110 Wt y *E.Coli* DH5 pMV361 IS6110 y se enviaron a secuenciar para corroborarlo. (ver anexo IV)

Tras incubar las bacterias que se transformaron con el vector, en medio líquido y que estuvieran crecidas a saturación, realizamos una miniprep para obtener el plásmido y reemplazar el cassette de Km por un cassette de Hygromicina (requeridos en los experimentos posteriores). Para ello cortamos la Km con *NsiI* que es compatible con *PstI*. (Enzima con la que se cortó el cassette de Hyg que se encontraba en el plásmido pYUB854)

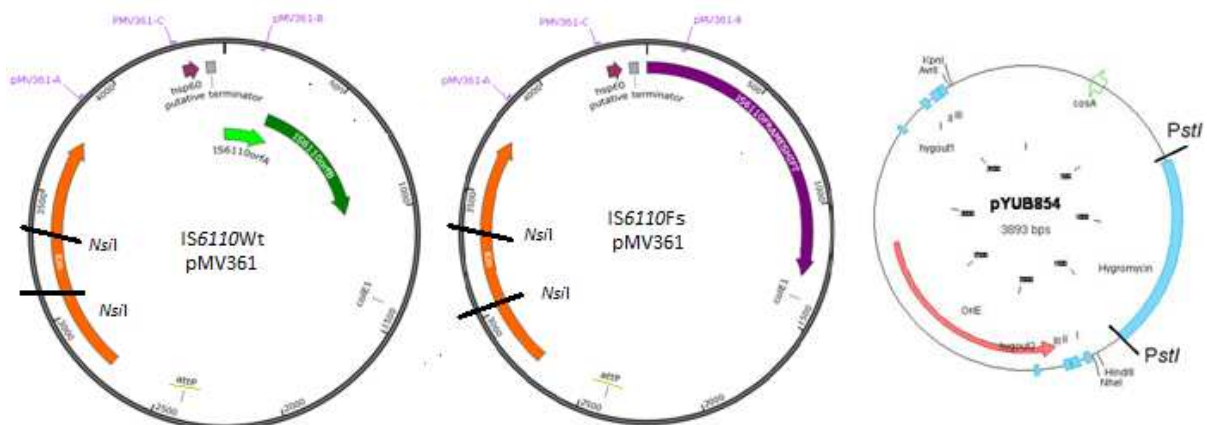


Fig 11 (De Izquierda a derecha) construcción IS6110 Fs e IS6110 Wt en pMV361 digeridos con *NsiI* para sustituir la Km del plásmido. pYUB 854 digerido con *PstI* para obtener el cassette de Hyg

Tras la digestión con las enzimas de restricción, se realizó una reacción de ligación para sustituir la Km por la Hyg y obtener las construcciones del pMV361 con cada IS6110 y la Hyg. (Figura 12)

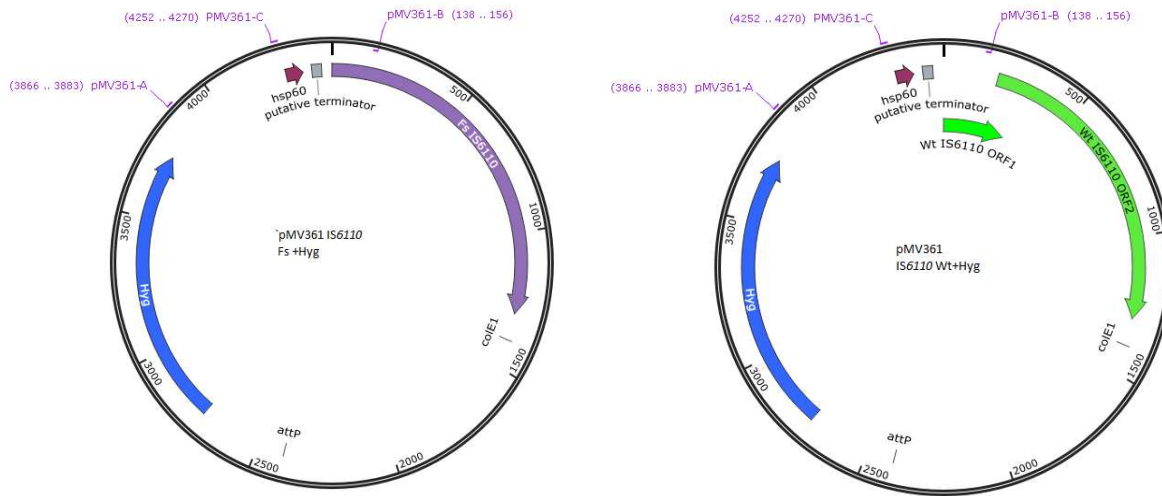


Fig 12: Plásmidos obtenidos tras la ligación de las digestiones explicadas anteriormente con el cassette de Hyg. (Izquierda Fs+ Hyg derecha Wt+Hyg)

Tras hacer la ligación se transformó *E.coli* DH5 α y se plaqueó en LB+Hyg para su selección por la resistencia a Hyg que se incorporó al plásmido y se analizaron las colonias que crecieron, y se comprobó con PCR que eran positivas. Los cebadores para la PCR que se emplearon amplificaban un fragmento de la IS6110 y el cassette de Hyg.

Para la IS6110 Wt primero se comprobó con los oligos para la IS6110 *NheI* y pMV361 y luego se comprobó con unos oligos que amplificaron una secuencia intermedia en tamaño (IS RT Fw1/ Rv2) con otros oligos: (IS RT Fw1 /IS RT Rv2) da un producto de 650pb y con los oligos (Hyg Fw/ Rv) 500pb

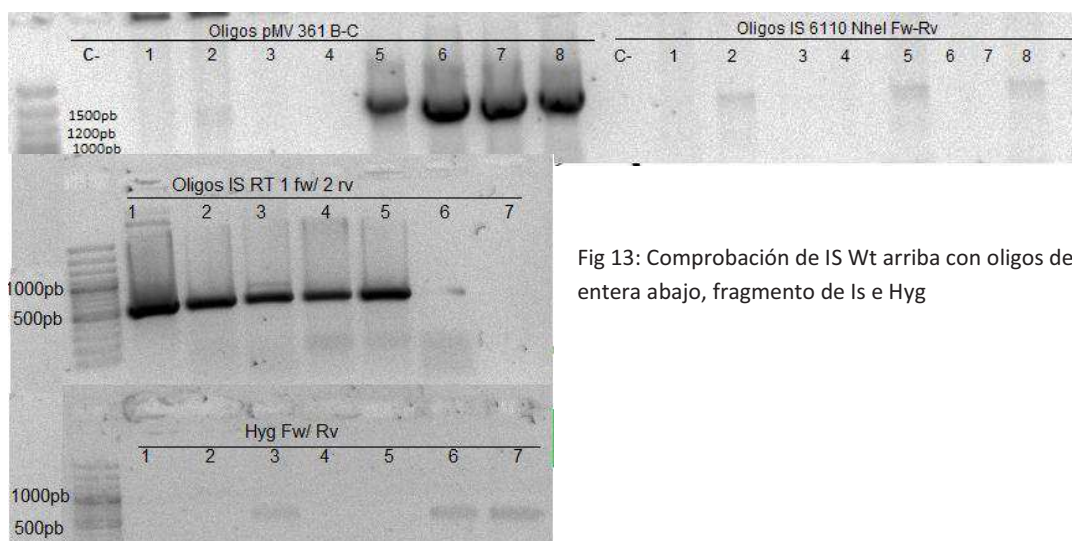


Fig 13: Comprobación de IS Wt arriba con oligos de la IS entera abajo, fragmento de Is e Hyg

Del mismo modo se comprobó el éxito en la ligación para la IS6110 frameshift

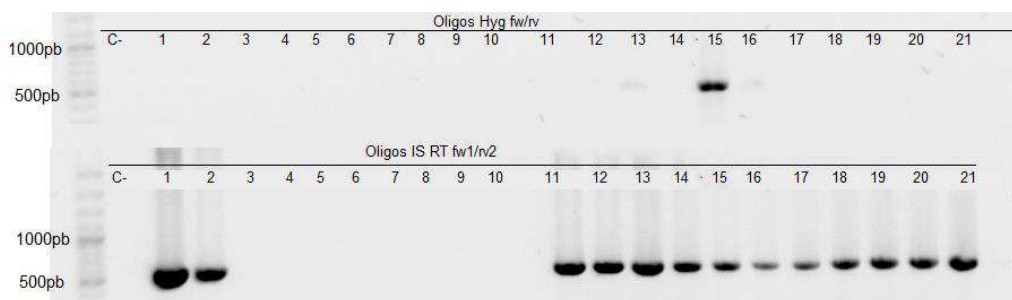


Fig 14: Arriba PCR para amplificar Hyg. Abajo amplificación IS6110 Fs

Tras las comprobaciones, se guardó cepa: *E.Coli* DH5 α pMV361 IS6110 Wt+Hyg y *E.Coli* XL1 blue pMV361 IS6110 Fs+Hyg Y se enviaron a secuenciar para comprobar que la IS6110 mantenía la mutación. (Anexo V)

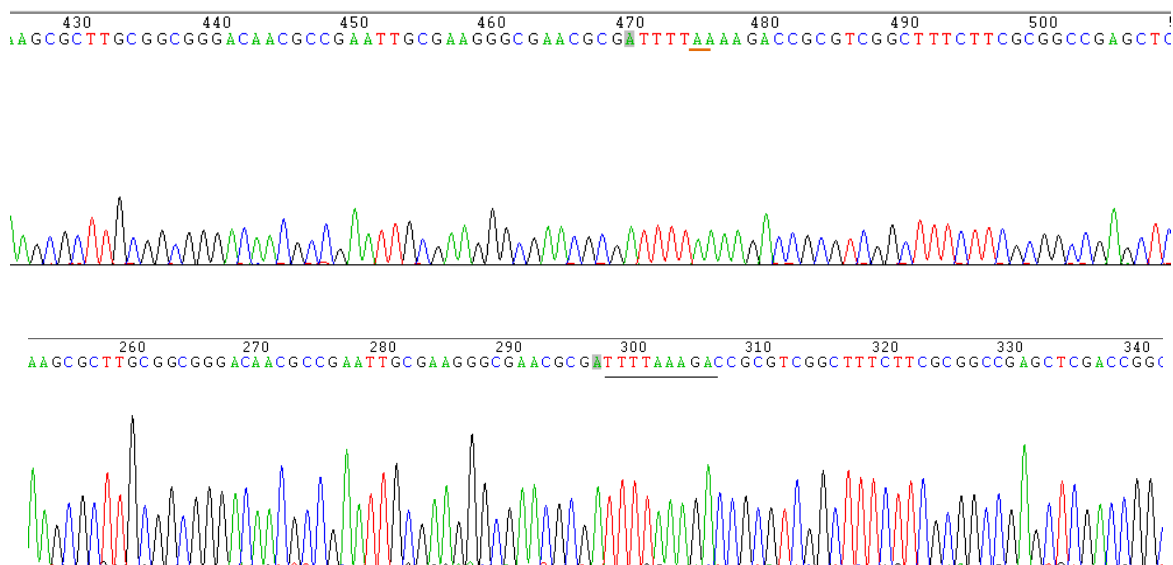


Fig15: Secuenciación para corroborar que los insertos se mantienen en el plásmido y conserva la mutación arriba secuencia IS6110Fs abajo IS6110Wt (subrayada la secuencia carente de mutación)

Tras realizar la miniprep para conseguir el plásmido anteriormente dibujado, se transformo en *M.smegmatis*, puesto que el plásmido pMV361 es integrativo y así tendríamos integrado en el cromosoma de *M.smegmatis* la IS6110 Wt como la IS6110 Fs y una resistencia a Hygromicina, para selección.

Se transformó y se incubó en 7H9+ADC+Hyg en agitación a 37°C overnight. Al día siguiente se plaqueó en 7H10+ADC+Hyg y tras 2 días de incubación se analizaron las colonias con los cebadores: Hyg Fw/ Rv RTIS6110 fw1/Rv2

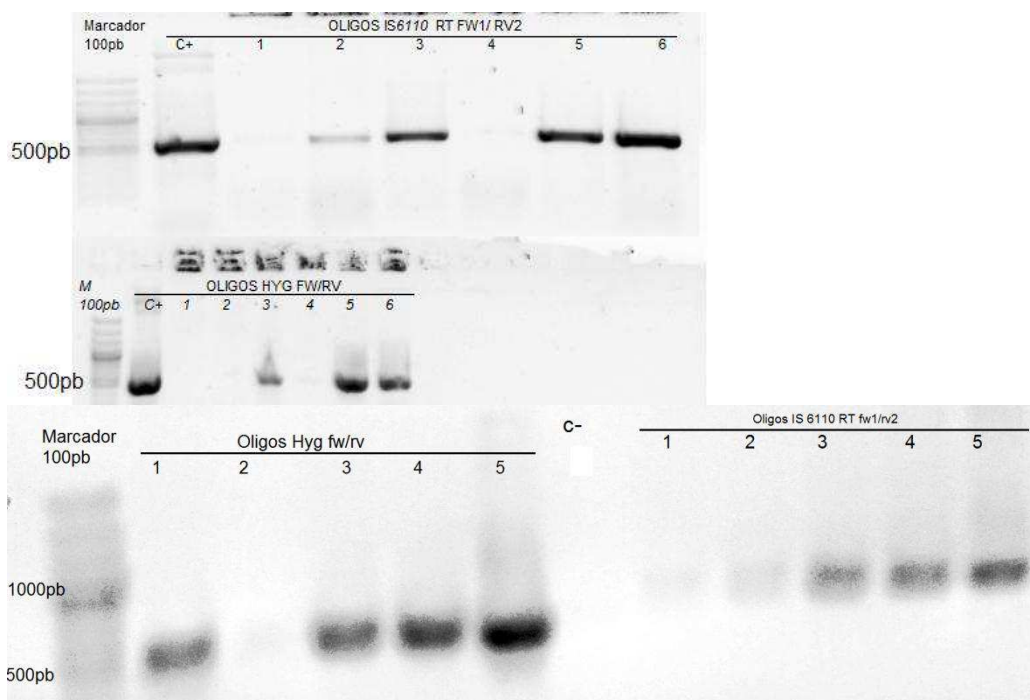


Fig 16: Arriba Wt analizada con oligos Hyg, e IS RT Fw1 Rv2. Abajo Fs analizada con los mismos oligos.

Las bandas salieron a la altura correspondiente, por tanto obtuvimos los clonajes que necesitábamos .

Al tratarse de un plasmido integrativo, obtuvimos la siguiente construcción bacteriana en *M.smegmatis*

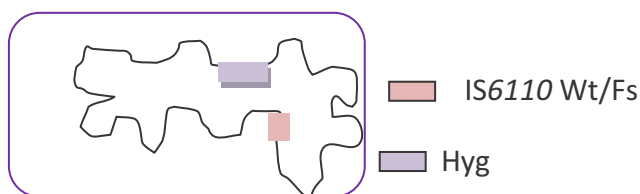


Fig: 17 construcción bacteriana en *M.smegmatis*

Las positivas se crecieron en medio 7H9+ADC+Hyg para realizar bacterias competentes de estas cepas y para guardar cepa. *M.Smegmatis* mc²155 pMV361 IS6110 Wt +Hyg y *M.Smegmatis* mc²155 pMV361 IS6110 Fs +Hyg

Una vez se obtuvieron las bacterias competentes se transformaron con el plasmido pIR km: (Posee el cassette de Km flanqueado por secuencias repetidas invertidas, un gen letal a sacarosa, en presencia de este gen y con sacarosa en el medio resulta letal para

la bacteria, no puede desarrollarse y un origen termo sensible, por encima de 40°C no permite el desarrollo de la bacteria)

y se paquearon en 7H10+Km y tras incubarse 5 días a 30°C se analizaron las colonias con los cebadores, para ver la presencia del inserto, de la higromicina y de la Km, para obtener la construcción final que queríamos obtener al principio.

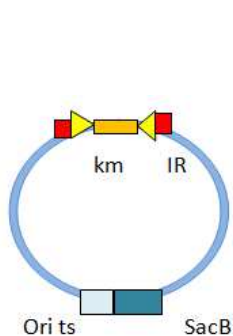


Fig 18: Plásmido pIR Km

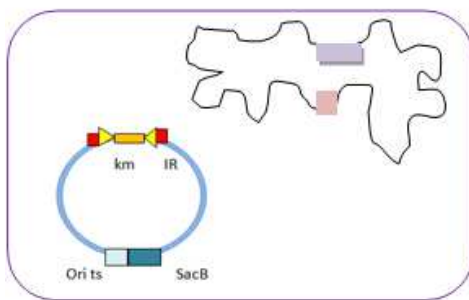


Fig 19: Construcción final *M. smegmatis*

Se comprobó con los cebadores RTIS6110 Fw1/Rv2 Hyg Fw/Rv P1/P2. En el caso de la IS6110 Fs, al haberse conseguido la construcción por cootransformación con 2 plásmidos el pMV361 Fs+ Hyg y el pIR Km. Se tuvo que emplear los cebadores P1 y pKD km out1 para amplificar la Km.

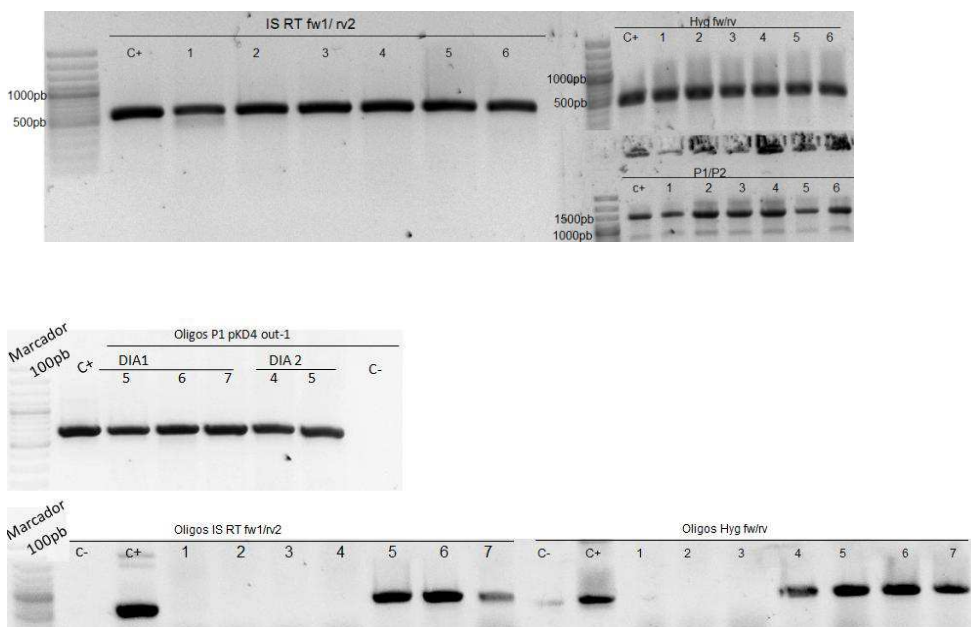


Fig 20: Arriba Wt analizada con las tras parejas de primers para amplificar la IS6110 Wt, Km e Hyg, todas positivas. Abajo IS6110 Fs para amplificar los 3 elementos IS, Km, Hyg

En resumen, los pasos que hemos seguido hasta este punto y las construcciones que hemos realizado han sido las siguientes.

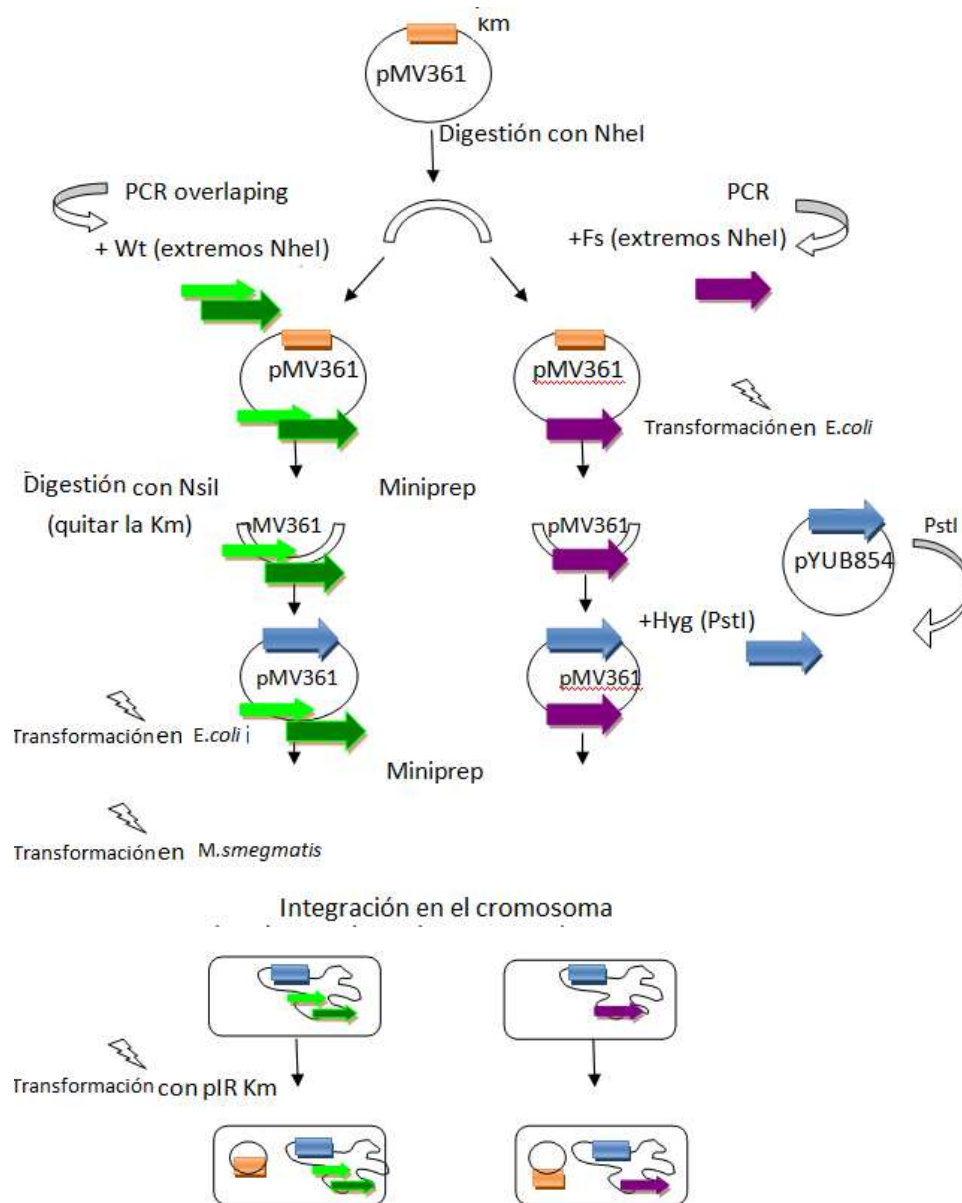


Fig 21: Esquema- resumen de todos los pasos seguidos para obtener las bacterias finales (*IS6110* Wt y Fs + Hyg + el plásmido pIR con resistencia a Km). Se digirió con *NheI* en plásmido pMV361, se introdujeron nuestros insertos Wt/Fs aprovechando que tenían ese sitio de restricción en sus extremos.

Luego se cambió la Km por la Hyg siguiendo el mismo procedimiento: se digirió la Hyg con *PstI* y la Km con *NsiI* (extremos compatibles) por tanto luego se pudo introducir la Hyg.

Una vez se tuvieron estas construcciones en *E. coli*, se transformaron en *M. smegmatis* para que se integraran en el cromosoma. Finalmente, las transformamos con el plásmido pIRKm para el experimento de transposición.

EXPERIMENTO DE TRANSPOSICIÓN

Una vez obtenidas estas construcciones, objetivo primario de este trabajo, nos dispusimos a realizar los experimentos de transposición:

Empleando la construcción anterior, vemos que tenemos dos tipos de selección que podemos emplear para nuestras colonias.

Selección positiva: Empleando Km y el origen de replicación termo sensible. Añadiendo Km o empleando una Tª a 30°C (para que el origen de replicación sea funcional) sobreviven todas las bacterias que tengan la resistencia.

Selección negativa : Gen sac B y el origen de replicación termo sensible ya que añadiendo sacarosa a una concentración al 10% (Vladimir Pelicic et al. all. 1997). y sobrepasando una Tª de 42°C las bacterias al tener este plásmido con estos dos elementos , no sobreviven. Solo sobreviven las bacterias de nuestro interés, las que sufran el fenómeno de transposición.

Aprovechamos esas selecciones para nuestro experimento de transposición. Ya que seleccionaremos en Km con sacarosa y a 42°C. El experimento lo realizamos con 3 cultivos de la construcción Wt y uno del frameshift, por tanto los resultados no son concluyentes al no realizarse en paralelo ni por triplicado.

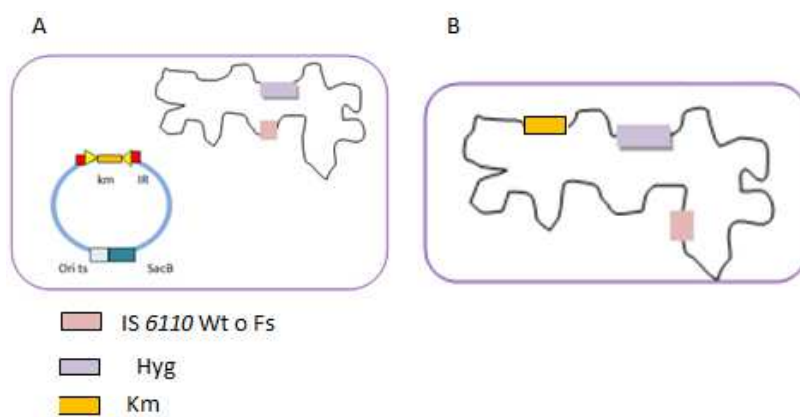


Fig 19: A-) tras la transformación se obtuvo la bacteria a la que incorporamos el plásmido pIR Km. Por ello es resistente a Km y tiene el origen termo sensible y gen letal de sacarosa. Se usará para determinar el crecimiento normal de cultivo seleccionándolas a 30°C sin sacarosa y con Km. Así solo se emplea la selección positiva, no se induce la letalidad de ninguno de los genes

B-) al incubar a 42°C con Km y sacarosa al 10% se favorece la transposición de la Km y se detectarán aquellas que hayan sufrido la transposición de la Km.

Este fenómeno de transposición con el cambio de marco de lectura ocurre en una frecuencia de 10^{-7} - 10^{-5} . (Caliskan et al. all 2015). Por eso lo que cabría esperar es que en la Wt la frecuencia de transposición se redujera considerablemente.

Para realizar el experimento preparamos un cultivo de 5ml de cada cepa en 7H9+ADC+Km y lo cultivamos 4 días a 30°C hasta una concentración aproximada de 10^9 cfu/ml

Para calcular el nº de cfu exacto diluimos los cultivos (-5,-6,-7,-8) y las plaquemos 200µl en 7H10+ADC+Km a 30°C para poder contar colonias totales. Para poder medir la transposición, plaquemos 200µl de las diluciones, (-1,-2,-3,-4) en 7H10+Km+10%sacarosa (Vladimir Pelicic et al. all. 1997). y se incubó a 42°C para contar el nº de colonias viables (aquellas en las que se haya dado el fenómeno de trasposición) y la Km se incorpore. (La sacarosa y la Tª sirven para perder el plásmido y la Km nos favorece la selección de aquellas bacterias en las que se haya dado el fenómeno de transposición para la Km)

Debido a la presión de la selección negativa, las bacterias tienden a forzar su supervivencia, por tanto solo aquellas que fueren su transposición serán las que sobrevivan y así se medirá la frecuencia de transposición. Se comparará el crecimiento normal y los eventos de transposición. Puesto que en condiciones de selección negativa, los eventos de transposición, se correlacionan con el numero de colonias que podemos contar en las placas ya aquellas que sobrevivan adquirirán la resistencia a Km y podremos contar colonias.

RESULTADOS: FRECUENCIAS OBTENIDAS

Las colonias obtenidas, en todos los experimentos eran similares a las que se muestran a continuación. Cambiaba el nº de colonias pero se muestra esta imagen a modo de resumen para ver como se analizaron los resultados, de todos los experimentos. de esta cepa eran similares a las mostradas a continuación (sólo se muestra a modo de resumen)

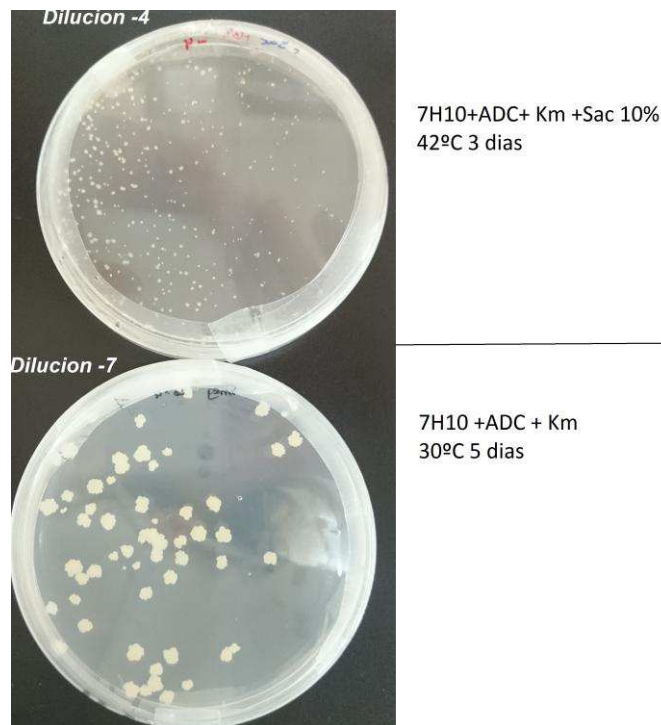


Fig 20: cepa mc² IS6110Wt+Hyg+plRKm arriba dilución ,-4 en condiciones de selección negativa, para forzar transposición. Abajo misma cepa dilucio,-7 en condiciones de selección positiva para su crecimiento normal

Lo que hicimos con todos los cultivos fue, incubar las diluciones en condiciones de selección negativa y selección positiva y se analizaron los datos para ver las diferencias entre IS6110Wt e IS6110Fs.

El numero de colonias obtenido fue el representado en las siguientes tablas

Crecimiento para cuantificación de cfu totales 30°C+ Km

Dilución	FRAMESHIFT C.6	WILD TYPEC.1	WILD TYPEC.3	WILD TYPE
-5	40	123	174	
-6	4	18	18	119
-7	0	2	2	63
-8	0	0	0	19

Crecimiento a 42°C +10% sacarosa +Km

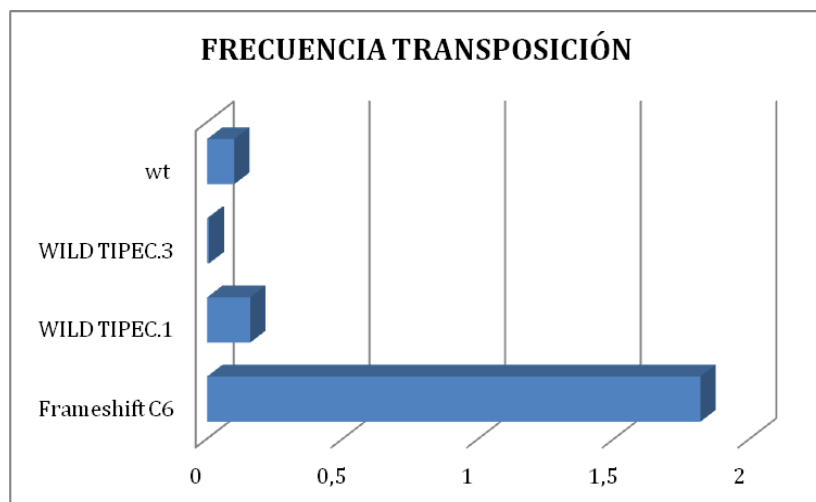
Dilución	FRAMESHIFT C.6	WILD TYPEC.1	WILD TYPEC.3	WILD TYPE
-3			1	
-4	2	2		1

Para calcular, correctamente la frecuencia de transposición de cada cepa se tuvo que calcular el número exacto de colonias. Considerando que partíamos de un cultivo de 5ml, se incubaron 200 µl y las distintas diluciones. Una vez calculado el número de colonias totales de cada cepa y en cada condición se calculó la frecuencia de transposición como:

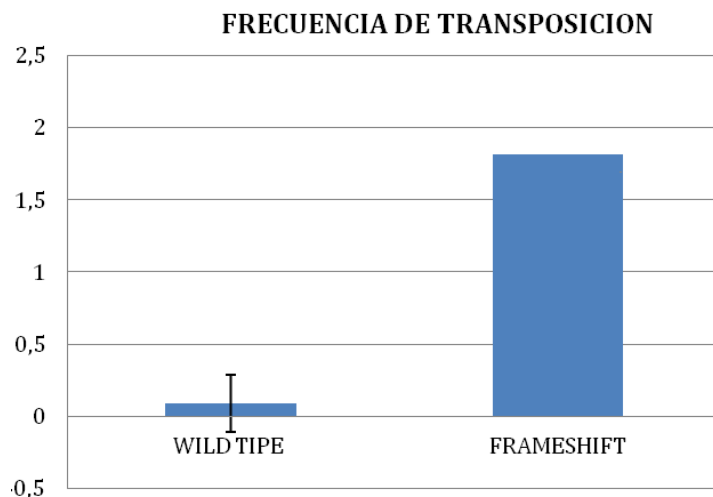
$$\left(\frac{n^{\circ}\text{cfu (sac 10\%+Km 42}^{\circ}\text{C)}}{n^{\circ}\text{cfu (km a 30}^{\circ}\text{C)}} \right) \times 100$$

los resultados para cada cepa fueron:

Frameshift C6	WILD TYPE C.1	WILD TYPE C.3	Wt
1,81%	0,15%	0,007%	0,1%



Tras ver que los resultados de las 3 cepas de Wt eran similares, próximas a 0, se promediaron y se analizó su desviación típica, y así evitar variaciones entre la misma cepa y poder comparar los resultados entre la bacteria wild type y la bacteria que poseía el frameshift.



Al promediar la wild type vemos que su frecuencia de transposición es de 0.0888% y que la frecuencia de transposición obtenida con el frameshift es 1.81%.

Estos datos lo que representan es un aumento de un 20% en la frecuencia de transposición de la construcción IS6110 Fs respecto a la construcción IS6110 Wt.

Como se ha reflejado tanto en el gráfico como en el número de colonias de obtenido, las colonias de la cepa IS6110 Wt crecidas crecen en un orden de magnitud de 1000 veces menos que en crecimiento normal. Para la cepa con el frameshift, esa reducción en los eventos de transposición, no es tal, por tanto es razonable pensar que con la mutación y al codificar la transposasa como un único marco de lectura es activa, facilitando así la transposición y por ende la supervivencia de las bacterias en esas condiciones. Lo que demuestra la implicación del cambio en la pauta del marco de lectura en el mecanismo de transposición.

CONCLUSIONES

En este trabajo se consiguió realizar la construcción de la IS6110Wt empleando la técnica de PRC solapante

Se obtuvieron también los clonajes de ambas cepas, Wt y Fs tanto en *E.coli* como en *M. smegmatis*

Mediante la utilización del plasmido pIRKm y las condiciones vistas a lo largo de este trabajo se pudo realizar el experimento para calcular la frecuencia de transposición.

Se observa que, la frecuencia de transposición aumenta un 20% más en la transposasa, traducida con un único marco de lectura. (frameshift) respecto a la wild type.

lo que corroboraría la hipótesis inicial de que la secuencia wild type debido al desplazamiento hacia tras del ribosoma codifica para una transposasa inactiva y baja su eficacia en transposición. En cambio al mutar la secuencia y que se traduzca como un único ORF origina una transposasa activa y así se ve en el aumento de colonias visto anteriormente. Lo que demuestra la implicación del cambio en la pauta del marco de lectura en el mecanismo de transposición.

Pese a que los resultados sean positivos, no se pueden aseverar ya que los datos obtenidos para la cepa frameshift, no se analizaron por triplicado, ni en paralelo, por tanto estamos ante unos resultados orientativos.

Además los experimentos de frecuencia de transposición, han sido corroborados en *M.smegmatis*, para poder asegurar que este mecanismo se observe en *M.tuberculosis* habría que realizar los experimentos en *M.tuberculosis*.

CONCLUSIONS

In this work we used the overlapping PCR technique to construct a mutated IS6110 allele named IS6110-Fs, carrying a translational frameshifting that produces an active transposase.

Both the Wt IS6110 and the IS6110-Fs alleles were cloned in integrative vector for mycobacteria using *E. coli* strains.

The aforementioned constructions were introduced in the surrogate host *M. smegmatis* by electroporation

Using a previously constructed pIRKm vector and the above mentioned constructions, it was posible to calculate transposition frequencies for IS6110-Wt and IS6110-Fs alleles.

Transposition frequency is 20 fold higher for the IS6110 allele compared to the IS6110-Wt.

These results demonstrate that ribosomal frameshifting is responsible for translation of an active transposase. Also, this work also demonstrates that under normal conditions transposition frequency is almost undetectable.

These are preliminary results since we would need to perform these experiments in triplicate using parallel cultures of IS6110-Wt and IS6110-Fs.

Further, due to biosecurity reasons, these experiments were performed in the non-pathogenic bacteria *M. smegmatis*. In order to confirm these results, it would be recommended to use constructions developed in this work to study transposition frequencies in the wild type host *M. tuberculosis*.

BIBLIOGRAFIA

Abbie Coros, Erin DeConno, and Keith M. Derbyshire

IS6110, a *Mycobacterium tuberculosis* Complex-Specific Insertion Sequence, Is Also Present in the Genome of *Mycobacterium smegmatis*, Suggestive of Lateral Gene Transfer among Mycobacterial Species

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, May 2008, p. 3408–3410 Vol. 190, No. 9

Annette S. de Boer, Martien W. Borgdorff, Petra E. W. de Haas, Nico J. D. Nagelkerke, Jan D. A. van Embden, and Dick van Soolingen

Analysis of Rate of Change of IS6110 RFLP Patterns of *Mycobacterium tuberculosis* Based on Serial Patient Isolates

JID 1999;180 (October)

Catty, D. & van Embden, J. D. A.

Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis.

J Clin Microbiol 28, 205 1-2058. (1990)

Hermans, W. M., van Soolingen, D., Dale, J. W., Schuitema, A. R., McAdam, R. A.,

On the origin of the chloramphenicol resistance transposon Tn9.

J Gen Microbiol 129: 1217±1225. (1983)

Iida, S.

Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology.

J Clin Microbiol. 1993 Feb;31(2):406-9.

McAdam, R. A., Hermans, P. W. M., van Soolingen, D., Zainuddin, Z. F., Catty, D., van Embden, J. D. A. & Dale, J. W.

Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family.

Mol Microbiol 4, 1607- 1613. (1990)

McFadden, J. & Sajduda, A. Application of molecular methods to the epidemiology of tuberculosis and other mycobacteriosis. *Med Microbiol Lett* 5, 394-399. (1996).

Michael Chandler and Olivier Fayet

Translational frameshifting in the control of transposition in bacteria

Molecular Microbiology (1993) 7(4), 497-503 MicroReview

Neva Caliskan, Frank Peske, and Marina V. Rodnina

Changed in translation: mRNA recoding by S1 programmed ribosomal frameshifting

Trends in Biochemical Sciences May 2015, Vol. 40, No. 5

Thierry, D., Brisson-Noel, A., Vincent-Levy-Frebault, V., Ngueyen, S., Guesdon, 1. L. & Gicquel, B. Characterization of a Mycobacterium tuberculosis insertion sequence, IS61 10, and its application in diagnosis.

J Clin Microbiol 28, 2668-2673. (1990a).

van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, et al.

Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology.

J Clin Microbiol. 1993 Feb;31(2):406-9.

VLADIMIR PELICIC†, MARY JACKSON, JEAN-MARC REYRAT, WILLIAM R. JACOBS, JR.‡, BRIGITTE GICQUEL, AND CHRISTOPHE GUILHOT

Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in Mycobacterium tuberculosis

College of Medicine, New York, NY 10461

Edited by John R. Roth, University of Utah, Salt Lake City, UT, and approved July 17, 1997

(received for review March 10, 1997)

ANEXOS

I MATERIAL Y METODOS

1-CEPAS, CONDICIONES DE CULTIVO

Las características de las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo se encuentran descritas en la Tabla 1. La cepa de *E. coli* denominada XL1-blue fue utilizada como hospedadora para realizar la construcción, selección, mantenimiento y amplificación de los clones recombinantes. La cepa *Mycobacterium smegmatis* mc²155 fue el modelo de estudio para el experimento de transposición.

Tabla I. Genotipos de las cepas bacterianas

Cepa	Genotipo	Resistencia	Origen
E. coli XL1-blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq ΔM15 Tn10].	Tetraciclina (Tet)	Bullock y col., 1987
E.coli DH5α			
M.Smegmatis mc²155	Cepa mutante de <i>M.Smegmatis</i> derivada de la cepa silvestre mc26, caracterizada por su alta eficiencia de transformación	Ninguna	Snapper y col., 1990
M. smegmatis mc2155 +pMV361 Is6110 Wt+Hyg	Derivada de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 +pMV361 Is6110 Wt+Hyg	Higromicina	Este proyecto
M. smegmatis mc2155 +pMV361 Is6110 Wt+Hyg+pIRkm	Derivada de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 +pMV361 Is6110 Wt+Hyg+pIRkm	Higromicina +Km	Este proyecto
M. smegmatis mc2155 +pMV361 Is6110Fs+Hyg	Derivada de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 +pMV361 Is6110Fs+Hyg	Higromicina	Este proyecto
M. smegmatis mc2155 +pMV361 Is6110 Fs+Hyg+pIRkm	Derivada de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 +pMV361 Is6110 Fs+Hyg+pIRkm	Higromicina +Km	Este proyecto

Medios y condiciones para el cultivo bacteriano.

Para el cultivo de *E. coli XL1-blue* se utilizó el medio Luria Bertani- LB, bien sea líquido o sólido. En el caso de *Mycobacterium smegmatis* mc2155 se utilizó medio líquido Middlebrook 7H9 o medio sólido Middlebrook 7H10 suplementado con glicerol (0,5%) y OAD (10%) (NaCl 0,85%, Albúmina Sérica Bovina 5%, Ácido Oléico 5% y NaOH 0,2N 1%). La composición de los medios se muestra en la tabla II. En ambas bacterias las condiciones de cultivo son las mismas, incubación a 37 °C con agitación.

Tabla II. Componentes de los medios de cultivo utilizados.

Medio	Componentes
7H9 (medio líquido)	Citrato de sodio, sulfato de amonio, ácido L-glutámico, OAD 10%, fosfato monopotásico, sulfato de zinc, citrato de amonio férrico, piridoxina, biotina, fosfato disódico, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, sulfato de cobre, Tween 80 0,05% y pH 6,6 a 25 °C.
7H10 (medio sólido)	Ácido L-glutámico, citrato de sodio, piridoxina, biotina, fosfato disódico, fosfato monopotásico, sulfato de amonio, sulfato de zinc, citrato de amonio férrico, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, sulfato de cobre, verde de malaquita, agar, OAD 10%, Tween 80 0,05% y pH 6,6 a 25 °C.
Caldo LB (Luria- Bertani) Medio líquido o sólido	Cloruro de sodio, extracto de levadura, caseína y peptona y para medio sólido, añadir 15 gramos de agar por cada litro de caldo LB.

Conservación de cepas

Las cepas se guardaron empleando glicerol 10% (300µl) y cultivo bacteriano a guardar saturado. (700µl)

2-PLASMIDOS

Tabla III. Determinantes de resistencia de los plásmidos utilizados.

pMV631	plasmido de expresión en <i>E. coli</i> e integrativo en <i>M. Smegmatis</i>	resistencia a Km
pYUB854		Resistencia a Hyg
pIR-Km		resistencia a Km
pMV631+Wt	plasmido de expresión en <i>E. coli</i> e integrativo en <i>M. Smegmatis</i> + secuencia IS6110 Wt	resistencia a Km

pMV631+Fs	plasmido de expresión en <i>E.coli</i> e integrativo en <i>M.Smegmatis</i> + secuencia IS6110 Fs	resistencia a Km
pMV631+Wt+Hyg	plasmido de expresión en <i>E.coli</i> e integrativo en <i>M.Smegmatis</i> + secuencia IS6110 Wt	Resistencia a Hyg
pMV631+Fs+Hyg	plasmido de expresión en <i>E.coli</i> e integrativo en <i>M.Smegmatis</i> + secuencia IS6110 Fs	Resistencia a Hyg
pMV631+Wt+Hyg+Km	plasmido de expresión en <i>E.coli</i> e integrativo en <i>M.Smegmatis</i> + secuencia IS6110 Wt	Resistencia a Hyg +Km
pMV631+Fs+Hyg+Km	plasmido de expresión en <i>E.coli</i> e integrativo en <i>M.Smegmatis</i> + secuencia IS6110 Fs	Resistencia a Hyg +Km

3-REACTIVOS

Todas las soluciones fueron adquiridas de las casas comerciales Sigma Chemical Co (USA), Difco, Gibco, Invitrogen, Promega y Qiagen. Cuando fue necesario, las soluciones y medios de cultivo se esterilizaron por filtración o en autoclave a 121 °C durante 60 minutos.

4- ANTIBIOTICOS

Cada uno de los antibióticos se esterilizó por filtración y fueron almacenados en alícuotas a -20°C.

Tabla IV. Concentraciones de antibióticos utilizadas para *E. coli* XL1-blue y *M. smegmatis* mc2155.

Antibiótico	<i>M. smegmatis</i> mc2155	<i>E. coli</i> XL1-blue
Kanamicina (100 mg/mL)	20 µg/mL	20 µg/mL
Higromicina (100 mg/mL)	20 µg/mL	50 µg/mL

5-ENZIMAS

Se emplearon las endonucleasas de restricción *NsiI*, *NheI*, *PstI* (New England Biolabs y PROMEGA),

T4 DNA ligasa (New England Biolabs), Y DNA Polimerasa My Taq (Bioline) Todas fueron empleadas siguiendo las especificaciones de la respectiva casa comercial.

6-ESTUCHES COMERCIALES

Durante la realización de este trabajo se emplearon los siguientes estuches comerciales ® PCR Purification kit (ROCHE) ® Hid Purification Miniprep kit (ROCHE). Todos los estuches comerciales se utilizaron según las indicaciones de su fabricante.

7- MINIPREP

Se parte de un cultivo en medio líquido y se pasa a un Eppendorf

- 1- Centrifugar a 10000 rpm durante 5min y eliminar el sobrenadante con micropipeta
 - 2- Resuspender con vórtex en 100µl de solución I* (recién preparada o conservada en frío) y dejar 5min a temperatura ambiente para romper la pared bacteriana
 - 3- Añadir 200µl de solución II y mezclar suavemente invirtiendo el tubo hasta que el contenido quede viscoso para lisar las bacterias y mantener en hielo durante 5 minutos nunca más tiempo (ya que puede degradar las muestras por hidrólisis ácida)
 - 4- Añadir 150µl de solución III* fría y mezclar el contenido del tubo en un vórtex dejándolo en hielo 5 minutos para que precipite el DNA cromosómico
 - 5**- Centrifugar a 12000rpm 5' en microfuga y volcando el tubo pasar el sobrenadante a un tubo limpio
 - 6- Añadir un volumen igual al del sobrenadante (500µl) de cloroformo-alcohol isoamílico y mezclar bien sin vórtex durante 2 min. Para desproteinizar
 - 7**- Centrifugar 3' en microfuga y pasar el sobrenadante a un tubo limpio sin tocar la interfase (proteínas)
 - 8- Repetir 6y7 hasta que la interfase quede limpia
 - 9- Añadir 0.1vol de acetato sodico3M y 2 Vol. de EtOH absoluto agitar suavemente para mezclar y mantener a -20°C media hora (precipitación de los plásmidos)
 - 10- Centrifugar a 12000rpm durante 30' a 4°C en microfuga y eliminar el EtOH por decantación
 - 11- Añadir EtOH 70% y se lava suavemente el precipitado y se centrifuga a 12000rpm 5' y se elimina el EtOH también por decantación
 - 12- Secar el precipitado a vacío durante 15' 20'
 - 13- Resuspender en 50µl de agua miliQ
 - 14- Añadir 1µl de RNasa y se incuba 15 min a 37°C
 - 15- Conservar a -20°C
- ** para falcon 4000rpm 10'

***SOLUCIONES para 50ml**

Solución I

200mg lisozima
1,25ml TRIS HCl pH8 1M
5ml glucosa 0.5M
1ml EDTA 0,5M
42,75ml H₂O

Solución II

35ml H₂O
10ml NaOH 1N
5ML SDS 10% (No enfriar)

Solución III

30ml KAc 5M
5,75ml HAc glacial
14,25m H₂O

8-MINIPREP KIT

- 1º Centrifugar el cultivo crecido a saturación (5ml)
- 2º Resuspender el pellet en 250µl de la suspensión Buffer/RNasa
- 3º Añadir 250µl de lysis buffer
- 4º Vortear para mezclar bien y se incuba 5 min a Tª ambiente
- 5º Añadir 350µl del chilled binding buffer
- 6º Vortear para mezclar bien y se incuba 5 min en hielo y se centrifuga 10min a 12000rpm (descartar el pellet)
- 7º Transferir el sobrenadante a un tubo con filtro con colector y se centrifuga 1' a la max.velocidad.
- 8º Descartar el sobrenadante y se añade 500µl del tampón de lavado I
- 9º Centrifugar 1min a 13000xg y descarto el sobrenadante
- 10º Añadir 700µl del tampón de lavado II y se centrifuga 1min a 13000xg
- 11º Añadir 50µl de H₂O y se centrifuga 1 min a máxima velocidad para tener la primera elución
- 12º Repetir el paso anterior empleando 30 µl de H₂O para tener la 2ª elución

9- ELECTROFORESIS

Para visualizar la integridad y el rendimiento del DNA se prepararon geles de agarosa cuya concentración era del 0,8% en buffer TBE 1X (Tris-HCl 89 mmoles/l, Ácido bórico 89 mmoles/l, EDTA 2 mmoles.L⁻¹ pH 8,0) con bromuro de etidio. Posteriormente, el gel se sumergió en la cámara de electroforesis, conteniendo solución tampón TBE (1X) y se cargaron las muestras de DNA previamente mezcladas con una solución de carga (azul de bromofenol 0,25%, xilencianol 0,25%, glicerol 0,50%) en los pocillos del gel. Se utilizó el Marcador de Peso Molecular 100pb ladder o λ PstI de la casa comercial Fermentas Life Sciences (Figura1). Se aplicó una diferencia de voltaje de 90 Voltios y finalmente se llevó a cabo la observación de los geles en un transiluminador de luz ultravioleta (UV y procesadas con el programa photoshop, para digitalización y análisis de imágenes.

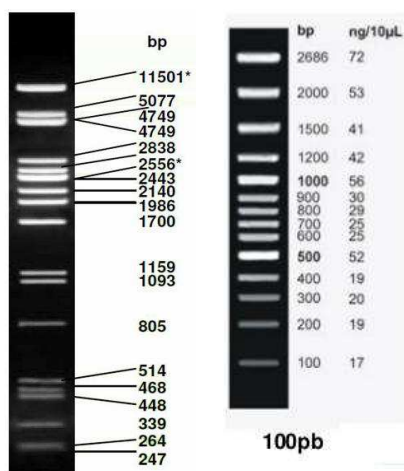


Fig 1: Marcadores de peso molecular: λ digerido con PstI y marcador de peso molecular de 100pb

10-PURIFICACION BANDA EN GEL AGAROSA

Tras cargar en un gel en un pocillo doble toda la muestra que se quiera purificar y que se haya separado bien, con un bisturí separamos las bandas intentando coger la menor cantidad de agarosa posible y la introducimos en un Eppendorf. Empleamos el kit quigen[®]

Añadir 300µl de binding buffer por cada 100mg de agarosa que hayamos cogido con la banda.

Disolver el gel para liberar el DNA, se vortea durante 15-30 segundos para resuspenderlo en el buffer mientras se incuba 10' a 56°C vortear cada 2-3'

Una vez la agarosa está completamente disuelta añadir 150µl de isopropanol por cada 100mg agarosa y vortear para mezclar

Traspasar el contenido a una columna de purificación (sin que exceda de 700µl)

Centrifugar 1' máxima velocidad y descartar el sobrenadante.

Añadir 500µl del wash buffer y se centrifuga 1' a la máxima velocidad

Descartar el sobrenadante y añadir 200µl del wash buffer y se vuelve a centrifugar 1' a la máxima velocidad.

Desechar el sobre nadante, eluir con 50µl de H₂O la 1ª elución y centrifugar un 1' a la máxima velocidad

Y para la segunda elución repetir el proceso anterior solo que con 30µl

11- CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE DNA MEDIANTE NANODROP

Para cuantificar Ac.Nucleicos

realiza medidas de absorbancia a 260nm y a 280nm y se calcula un ratio que nos da la pureza y la concentración de DNA en nuestra muestra.

12- PCR

Programa: *Colonias TAQ*

Condiciones Termociclador:

Hibridación	95°C 10 min 1 ciclo	
Elongación	95°C 0.45 min	30ciclos
	58°C 1 min	
	72°C 0.45 min	
Terminación	72°C 5min 1 ciclo	

Condiciones de PCR: 1 muestra

- ✓ 2 µL de Buffer
- ✓ 0.15 Primerfw
- ✓ 0.15 µL Primer rv
- ✓ 0.075 µL Taq
- ✓ 6.625µL H₂O
- ✓ 1 µL DNA

Cebadores

Tabla V. Cebadores empleados en la reacción en cadena de la polimerasa.

Nombre del cebador	Secuencia	Enzima restricción	Producto
<i>NheI</i> -IS6110-fw	<u>GCTAGCT</u> GAACCGCCCCGGCATG	<i>NheI</i>	IS6110
<i>NheI</i> -IS6110-rv	<u>GCTAGCT</u> GAACCGCCCCGGTGAGT	<i>NheI</i>	
IS6110-frameshift-fw	ACGCGATTTTAAAGACCGCGTCG		
IS6110-frameshift-rv	CGACGCGGTCTTITAAAATCGCGT		
<i>NheI</i> -IS6110-fw	<u>GCTAGCT</u> GAACCGCCCCGGCATG	<i>NheI</i>	ORF1
IS6110-frameshift-rv	CGACGCGGTCTTITAAAATCGCGT		
IS6110-frameshift-fw	ACGCGATTTTAAAGACCGCGTCG		ORF2
<i>NheI</i> -IS6110-rv	<u>GCTAGCT</u> GAACCGCCCCGGTGAGT	<i>NheI</i>	
Hyg fw	CTGCGGAACGACCAGGAATTC		Cassette Hyg
Hyg rv	GACCTCGGAATGGGGGG		
IS RT Fw1	TCAGCACGATTCGGAGTGG		Fragmento de IS6110
IS RT Rv2	GCATCTGGCCACCTCGAT		
P1	GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC		Cassette Km
P2	CATATGAATATCCTCCTTAGT		

13-DIGESTIÓN CON ENZIMA DE RESTRICCIÓN

El DNA fue digerido con endonucleasas de restricción de las casas comerciales New England Biolabs y Promega. El volumen de reacción utilizado fue de 20 μ L y las cantidades de enzima y de buffer de reacción (1X) se agregaron según las especificaciones de los fabricantes

14-REACCIONES DE LIGACIÓN INSERTO-VECTOR

Para llevar a cabo las reacciones de ligamiento entre el vector y los productos de PCR previamente tratados con las enzimas de restricción correspondientes, se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs) en una proporción molar 3:1 (Inserto: Vector). Se efectuó una mezcla que contenía los siguientes componentes: DNA del inserto y DNA del vector (ambos tratados previamente con las mismas enzimas de restricción), buffer de T4 DNA ligasa (1X) y T4 DNA ligasa. Se incubó esta reacción toda la noche en nevera.

15-PREPARACIÓN DE BACTERIAS ELECTROCOMPETENTES mc2155

Inicialmente se ponen dos preinóculos de 5ml (y que crezcan a saturación 2 días)

El día en el que se vayan a realizar las competentes a primera hora se inocula 100ml de medio (7H9+0.05%+ADC) atemperado desde el día anterior. Y se espera a que el cultivo alcance una D.O entre 0.5-0.6

Durante todo el proceso se trabaja a 4°C:

1º Introducir 30 min en hielo y se separan los 100ml en 2 falcon de 50ml

2º Centrifugar a 4°C 10' a 4000rpm y se decanta

3º Resuspender 25ml de H₂O

4º Centrifugar a 4°C 10' a 4000rpm y se decanta

5º Resuspender en 12.5ml de glicerol al 10%

6º Centrifugar a 4°C 10' a 4000rpm y se decanta

7º Resuspender en 6ml de glicerol al 10%

8º Centrifugar a 4°C 10' a 4000rpm y se decanta

9º Resuspender en 3ml de glicerol al 10%

10º Centrifugar a 4°C 10' a 4000rpm y se decanta

11º Resuspender en 1.5ml de glicerol al 10%

12º Centrifugar a 4°C 10' a 4000rpm y se decanta

13º Resuspender en 0.5ml de glicerol al 10%

14º Alicuotar ese volumen en Eppendorf con 100 μ l de células competentes

16- TRANSFORMAR BACTERIAS ELECTROCOMPETENTES

Agregar aproximadamente 0,1-0,5 µg de DNA libre de sales a 100 µL de células electrocompetentes e incubar 10 minutos en hielo, resuspendiendo muy bien las células.

Posteriormente, colocar la mezcla en una cubeta de electroporación previamente puesta en hielo. Insertar la cubeta en la cámara de seguridad del electroporador asegurándose que la cubeta estuviera en contacto con los electrodos de la cámara para posteriormente dar el pulso eléctrico para *M. Segmatis* (2,5KV, 100Ω, 25µF). Para *E.coli* (2,5KV, 200Ω, 25µF) Seguidamente, incubar las células 10 minutos en hielo, luego transferir la mezcla a un tubo con 1mL del medio 7H9 (*M. Smegmatis*)/LB(*E. Coli*) e incubar durante 3 horas a 37 °C o 1h para *E. Coli*. Finalmente, sembrar una alícuota de 300 µL del cultivo, en placas de medio.

17- PURIFICACIÓN DNA POR PURIFICACION CON EtOH-ACETATO

- 1º Llevar la PCR a un volumen de 200µl
- 2º Añadir 0.1vol de AcNa 3M pH5.5
y 2vol EtOH absoluto
- 3º Precipitar 30' a -20°C
- 4º Centrifugar 30' a 12000rpm a 4°C
- 5º Eliminar el EtOH decantando
- 6º Lavar el pellet con EtOH al 70% (400-500µl)
- 7º Centrifugar 5' a 12000rpm a Tª ambiente
- 8º Eliminar el EtOH decantando
- 9º Secar el pellet en speed back
- 10º Resuspender en 50µl de H₂O

II - SECUENCIA IS6110 Wt

tgaaccgccccggcatgtccggagactccagttcttgaaaggatggggtcatgtcaggtggtcatcgaggaggtaccgcg
cggagctgcgtgagcgggcggtgcggatggtcgagagatccgcggtcagcacgattcggagtgggcagcgatcagtga
gtcgcccgttacttggtgttggtgcgcggagacggtgcgtaagtgggtgcgccaggcgcaggtcgatgccggcgacgg
cccgggaccacgaccgaagaatccgctgagctgaagcgcttgccggcggaacgccgaattcggaaggcggaacgcga
ttttaagaccgcgtcggctttcttcgcggccgagctcgaccggccagcacgctaattaccggttcatcgccgatcatcagg
gccaccgcgagggccccgatggtttgcggtggggtgtcgagtcgatctgcacacagctgaccgagctgggtgtgccgatcg
ccccatgcacctactacgaccacatcaaccgggagcccagccgcgagctgcgcgatggcgaactcaaggagcacatc
agccgcgtccacgccccaactacggtgtttacggtgcccgcaaagtgtggctaaccctgaaccgtgagggcatcgaggtg
gccgatgcaccgtcgaacggctgatgaccaaactcggcctgtccgggaccacccgcggcaaagcccgcaggaccacgat

cgctgatccggccacagcccgtcccgcgatctcgtccagcgccgttcggaccaccagcacctaaccggctgtgggtagca
gacctcacctatgtgtcgacctgggcaggggttcgcctacgtggcctttgtcaccgacgcctacgctcgcaggatcctgggctg
gctgggtcgcttccacgatggccacctccatggctcgtcgcgatcgagcaagccatctggaccgccaacaagaaggcgt
actcgacctgaaagacgttatccaccatacggataggggatctcagtacacatcgatccggttcagcgagcggctcgccga
ggcaggcatccaaccgtcggtcggagcggtcggaagctcctatgacaatgcactagccgagacgatcaacggcctataca
agaccgagctgatcaaaccggcaagccctggcgggtccatcgaggatgtcgagttggccaccgcgcgtgggtcgactgggt
tcaacctcgccgcctctaccagtactgcggcgacgtcccgcgggtcgaaactcgagggtgcctactacgtcaacgccagag
accagccgcccggctgaggtctcagatcagagagtctccggactcaccggggcggttca

III- SECUENCIA IS6110 FS

tgaaccgccccggcatgtccggagactccagttcttgaaaggatggggcatgtcaggtggttcacgaggaggtacccgccggagct
gcgtgagcgggcggtgcggatggctgcagagatccgcggtcagcacgattcggagtgggcagcgatcagtgaggtcgccgtctactt
gggtgttgctgcgcggagacgggtcgtaagtgggtgcgccaggcgaggtcgatccggcgacggccccgggaccacgaccgaaga
tccgtgagctgaagcgcttgcggcgggacaacgccgaattgcgaaggcgaaacgcgattttaaagacgcgtcggctttcttcgcg
ccgagctcgaccggccagcacgctaattaccgggttcacgccgatcatcaggggccaccgcgaggggccccgatggtttcggtggggtg
tcgagtcgatctgcacacagctgaccgagctgggtgtgcgatcgcccatcgacactactacgaccacatcaaccgggagcccagccg
ccgcgagctgcgcgatggcgaaactcaaggagcacatcagccgcgtccacgcccgaactacggtgttacggtgcccgaagtgtgg
ctaacctgaaccgtgagggcatcaggtggccagatgcaccgtcgaacgggtgatgacaaactcggcctgtccgggaccaccgcg
gcaaagcccgaggaccacgatcgctgatccggccacagcccgtcccgcgatctcgtccagcgccgcttcggaccaccagcacctaa
ccggctgtgggtagcagacctcacctatgtgtcgacctgggcaggggttcgcctacgtggcctttgtcaccgacgcctacgctcgcaggat
cctgggctggcgggtcgcttccacgatggccacctcattgtcctcgcgatcgagcaagccatctggaccgccaacaagaaggc
gtactcgacctgaaagacgttatccaccatacggataggggatctcagtacacatcgatccggttcagcgagcggctcgccgaggcag
gcatccaaccgtcggtcggagcggtcggaagctcctatgacaatgcactagccgagacgatcaacggcctatacaagaccgagctgat
caaaccggcaagccctggcgggtccatcgaggatgtcgagttggccaccgcgcgtgggtcgactggttcaacctcgccgcctctacc
agtactgcggcgacgtcccgcgggtcgaaactcgagggtgcctactacgtcaacgccagagaccagccgcccggctgaggtctcagatc
agagagtctccggactcaccggggcggttca



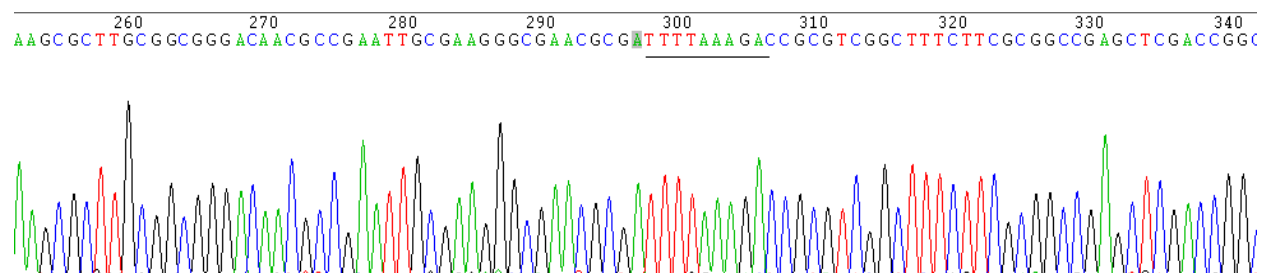
mutación introducida

ALINEAMIENTO DE AMBAS SECUENCIAS PARA DETECTAR LA MUTACIÓN

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	2497 bits(1352)	0.0	1355/1356(99%)	1/1356(0%)	Plus/Plu
Query 1	TGAACCGCCCCGGCATGTCCGGAGACTCCAGTTCTTGGAAGGATGGGGTCATGTCAGGT				60
Sbjct 1	TGAACCGCCCCGGCATGTCCGGAGACTCCAGTTCTTGGAAGGATGGGGTCATGTCAGGT				60
Query 61	GGTTTCATCGAGGAGGTACCCGCCGAGCTGCGTGAGCGGGCGGTGCGGATGGTCGCAGAG				120
Sbjct 61	GGTTTCATCGAGGAGGTACCCGCCGAGCTGCGTGAGCGGGCGGTGCGGATGGTCGCAGAG				120
Query 121	ATCCGCGGTGAGCAGGATTCCGAGTGGGACGATCAGTGAGGTGCGCCGTCTACTTGGT				180
Sbjct 121	ATCCGCGGTGAGCAGGATTCCGAGTGGGACGATCAGTGAGGTGCGCCGTCTACTTGGT				180
Query 181	GTTGGCTGCGCGGAGACGGTGCCTAAGTGGGTGCGCCAGGCGAGGTGATGCCGGCGCA				240
Sbjct 181	GTTGGCTGCGCGGAGACGGTGCCTAAGTGGGTGCGCCAGGCGAGGTGATGCCGGCGCA				240
Query 241	CGGCCCGGGACACGACCGAAGAATCCGCTGAGCTGAAGCGCTTGGCGGGGACACGCC				300
Sbjct 241	CGGCCCGGGACACGACCGAAGAATCCGCTGAGCTGAAGCGCTTGGCGGGGACACGCC				300
Query 301	GAATTGCGAAGGGCGAACGCGATTTT-AAAGACCGCGTCGGCTTTCTTCGCGCGAGCT				359
Sbjct 301	GAATTGCGAAGGGCGAACGCGATTTTAAAGACCGCGTCGGCTTTCTTCGCGCGAGCT				360
Query 360	CGACCGGCGAGCAGCTAATTACCGGTTTCATCGCCGATCATCAGGGCCACCGCGAGGGC				419
Sbjct 361	CGACCGGCGAGCAGCTAATTACCGGTTTCATCGCCGATCATCAGGGCCACCGCGAGGGC				420
Query 420	CCCGATGGTTTGCAGTGGGGTGTGAGTCGATCTGCACACAGCTGACCGAGCTGGGTGTG				479
Sbjct 421	CCCGATGGTTTGCAGTGGGGTGTGAGTCGATCTGCACACAGCTGACCGAGCTGGGTGTG				480
Query 480	CCGATCGCCCCATCGACCTACTACGACCATCAACCAGGAGCCAGCCGCCGCGAGCTG				539
Sbjct 481	CCGATCGCCCCATCGACCTACTACGACCATCAACCAGGAGCCAGCCGCCGCGAGCTG				540
Query 540	CGCGATGGCGAACTCAAGGAGCACATCAGCCGCTCCACGCCCACTACGGTGTTTAC				599
Sbjct 541	CGCGATGGCGAACTCAAGGAGCACATCAGCCGCTCCACGCCCACTACGGTGTTTAC				600
Query 600	GGTGCCCGCAAAGTGTGGCTAACCTGAACCGTGAGGGCATCGAGGTGGCCAGATGCACC				659
Sbjct 601	GGTGCCCGCAAAGTGTGGCTAACCTGAACCGTGAGGGCATCGAGGTGGCCAGATGCACC				660
Query 660	GTCGAACGGCTGATGACCAAACTCGGCTGTCCGGGACACCCGCGGCAAGCCCGCAGG				719
Sbjct 661	GTCGAACGGCTGATGACCAAACTCGGCTGTCCGGGACACCCGCGGCAAGCCCGCAGG				720

SECUENCIACIONES

IV WILD TYPE EN *E.coli* DH5 -α



V FRAMESHIFT EN *E.coli* XL1 blue

