



Departamento de Microbiología  
Facultad de Biología  
Universidad de Barcelona

## **Caracterización del lipopolisacárido de *Aeromonas* mesófilas**

Memoria presentada por Natalia Jiménez Blasco  
para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona

Programa de Doctorado  
Microbiología Ambiental y Biotecnología  
Bienio: 2003-2005

VºBº del director

VºBº de la codirectora

La doctoranda

Dr. Juan Tomás Magaña

Dra. Susana Merino Montero

Natalia Jiménez Blasco

Barcelona, mayo 2008

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3.1 Cepas bacterianas

Cepa	Características principales <sup>1</sup>	Procedencia
<b><i>Aeromonas</i> spp.</b>		
AH-3	<i>Aeromonas hydrophila</i> O:34	Merino <i>et al.</i> , 1988
AH-405	Mutante espontáneo de AH-3 resistente a la rifampicina	Merino <i>et al.</i> , 1996d
AH-3005	Mutante de AH-405 por inserción del mini-Tn5::Km1 en el gen <i>wahD</i> ( <i>orf</i> 6.1), Rif <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-3006	Mutante de AH-405 por inserción del mini-Tn5::Km1 en el gen <i>waaE</i> ( <i>orf</i> 3.2), Rif <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-3007	Mutante de AH-405 por inserción del mini-Tn5::Km1 en el gen <i>waaC</i> ( <i>orf</i> 1.3), Rif <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-3Δ2.1	Mutante de AH-405 en el gen <i>wahA</i> ( <i>orf</i> 2.1) por doble recombinación con pDM4Δ2.1, Rif <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-3Δ3.1	Mutante de AH-405 en el gen <i>waaL</i> ( <i>orf</i> 3.1) por doble recombinación con pDM4Δ3.1, Rif <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-3Δ4.1	Mutante de AH-405 en el gen <i>wahB</i> ( <i>orf</i> 4.1) por doble recombinación con pDM4Δ4.1, Rif <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-3Δ5.1	Mutante de AH-405 en el gen <i>wahC</i> ( <i>orf</i> 5.1) por doble recombinación con pDM4Δ5.1, Rif <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-3Δ2.2	Mutante de AH-405 en el gen <i>wahF</i> ( <i>orf</i> 2.2) por doble recombinación con pDM4Δ2.2, Rif <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-3Δ7.1	Mutante de AH-405 en el gen <i>wahE</i> ( <i>orf</i> 7.1) por recombinación en un punto con pFS-7.1, Rif <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-3Δ4.2	Mutante de AH-405 en el gen <i>waaF</i> ( <i>orf</i> 4.2) por recombinación en un punto con pFS-4.2, Rif <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-405Δ <i>wecA</i>	Mutante de AH-405 en el gen <i>wecA</i> por doble recombinación con pDM4- <i>wecA</i> , Rif <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-405Δ <i>wzy</i>	Mutante de AH-405 en el gen <i>wzy</i> por doble recombinación con pDM4- <i>wzy</i> , Rif <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-405Δ <i>wzz</i>	Mutante de AH-405 en el gen <i>wzz</i> por doble recombinación con pDM4- <i>wzz</i> , Rif <sup>r</sup>	Este trabajo
PPD134/91	<i>Aeromonas hydrophila</i> O:18	Zhang <i>et al.</i> , 2002
O:1, ... O:44	Diferentes serotipos de <i>Aeromonas</i> spp. mesófilas	Sakazaki y Shimada, 1984
A450	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	Munn <i>et al.</i> , 1982
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH5α	F <sup>-</sup> <i>endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 thi-1 recA1 relA1 gyr-A96</i> Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15	Hanahan <i>et al.</i> , 1983
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> (F' <i>proAB lacI</i> <sup>+</sup> ΔM15 Tn10), Tc <sup>r</sup>	Stratagene
MC1061λpir	<i>thi thr1 leu6 proA2 his4 argE2 lacY1 galK2 ara14 xyl5 supE44</i> , λpir	Rubires <i>et al.</i> , 1997
HB101	<i>pro leu thi lacY endoI recA</i> , Str <sup>r</sup>	Ditta <i>et al.</i> , 1985
S <sub>17-1</sub> λpir mini-Tn5:: Km1	<i>thi thr leu tonA lacY supE recA</i> ::RP4-2-Tc::Mu λpir, contiene el plásmido pUTmini-Tn5::Km-1, Km <sup>r</sup>	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990
LMG194	F <sup>-</sup> Δ <i>lacX74 galE galK thi rpsL ΔphoA</i> (PvuII) Δ <i>ara714 leu</i> ::Tn10	Guzmán <i>et al.</i> , 1995
CJB26	<i>araD139Δ(ara-leu)7697 hsdR hsdM<sup>+</sup> waaA</i> :: <i>kan recA</i> , contiene el plásmido pJSC2, Km <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	Belunis <i>et al.</i> , 1995
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>		
52145	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , serotipo O1:K2	Nassif <i>et al.</i> , 1989
52145Δ <i>waaC</i>	Mutante de 52145 en el gen <i>waaC</i> por doble recombinación con pKO3- <i>waaC</i>	Izquierdo <i>et al.</i> , 2003a

52145 $\Delta$ <i>waaF</i>	Mutante de 52145 en el gen <i>waaF</i> por doble recombinación con pKO3- <i>waaF</i>	Izquierdo <i>et al.</i> , 2003a
52145 $\Delta$ <i>waaE</i> (NC16)	Mutante de 52145 en el gen <i>waaE</i> por doble recombinación con pKO3- <i>waaE</i>	Regué <i>et al.</i> , 2001
52145 $\Delta$ <i>waaQ</i> (NC19)	Mutante de 52145 en el gen <i>waaQ</i> por doble recombinación con pKO3- <i>waaQ</i>	Regué <i>et al.</i> , 2001

<sup>1</sup> Abreviaciones de los antibióticos: Amp, ampicilina; Cm, cloranfenicol; Km, kanamicina; Rif, rifampicina; Str, estreptomycinina; Spc, espectinomycinina; Tc, tetraciclina.

## 3.2 Bacteriófagos

Bacteriófago	Receptor	Procedencia
PM1	Antígeno O:34	Merino <i>et al.</i> , 1992b

## 3.3 Vectores

Vector	Características principales	Procedencia
pLA2917	Cósmido, Km <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	Allen y Hanson, 1985
COS-CORE2	pLA2917 con la región 2 del núcleo del LPS de <i>A. hydrophila</i> AH-3, procedente de una genoteca, Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
COS-CORE2b	pLA2917 con parte de la región 2 del núcleo del LPS de <i>A. hydrophila</i> AH-3, procedente de una genoteca, Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
COS-CORE3	pLA2917 con la región 3 del núcleo del LPS de <i>A. hydrophila</i> AH-3, procedente de una genoteca, Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
PGEM-T <i>easy</i>	Vector para clonaje de fragmentos obtenidos por PCR. Contiene el gen <i>lacZ</i> . Amp <sup>r</sup>	Promega
pGEMT-ORF1.2	pGEM-T con el gen <i>waaA</i> ( <i>orf 1.2</i> ) de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Amp <sup>r</sup>	Este trabajo
pGEMT-ORF2.3-1.2	pGEM-T con los genes <i>kdkA</i> ( <i>orf 2.3</i> ) y <i>waaA</i> ( <i>orf 1.2</i> ) de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Amp <sup>r</sup>	Este trabajo
pBCSK(+/-)	Vector de 3,4 Kb derivado de pUC19. Contiene el gen <i>lacZ</i> , Cm <sup>r</sup>	Stratagene
pRK2073	Plásmido derivado de pRK2013 facilitador de la conjugación, Spc <sup>r</sup>	Ditta <i>et al.</i> , 1985
pFS100	Plásmido suicida derivado del vector pGP704, $\lambda$ <i>pir</i> , Km <sup>r</sup>	Rubires <i>et al.</i> , 1997
pFS-7.1	pFS100 con un fragmento interno del gen <i>wahE</i> ( <i>orf 7.1</i> ) de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pFS-4.2	pFS100 con un fragmento interno del gen <i>waaF</i> ( <i>orf 4.2</i> ) de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pDM4	Plásmido suicida, $\lambda$ <i>pir</i> , genes <i>sacAB</i> , Cm <sup>r</sup>	Milton <i>et al.</i> , 1996
pDM4 $\Delta$ 2.1	pDM4 con un inserto deletado en pauta para mutar el gen <i>wahA</i> ( <i>orf 2.1</i> ) de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pDM4 $\Delta$ 3.1	pDM4 con un inserto deletado en pauta para mutar el gen <i>waaL</i> ( <i>orf 3.1</i> ) de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pDM4 $\Delta$ 4.1	pDM4 con un inserto deletado en pauta para mutar el gen <i>wahB</i> ( <i>orf 4.1</i> ) de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pDM4 $\Delta$ 5.1	pDM4 con un inserto deletado en pauta para mutar el gen <i>wahC</i> ( <i>orf 5.1</i> ) de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pDM4 $\Delta$ 2.2	pDM4 con un inserto deletado en pauta para mutar el gen <i>wahF</i> ( <i>orf 2.2</i> ) de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo

pDM4 $\Delta$ wecA	pDM4 con un inserto deleciónado en pauta para mutar el gen <i>wecA</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pDM4 $\Delta$ wzy	pDM4 con un inserto deleciónado en pauta para mutar el gen <i>wzy</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pDM4 $\Delta$ wzz	pDM4 con un inserto deleciónado en pauta para mutar el gen <i>wzz</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pBAD33	Vector de expresión inducible con arabinosa, contiene el promotor P <sub>BAD</sub> y el gen <i>araC</i> , Cm <sup>r</sup>	Guzmán <i>et al.</i> , 1995
pBAD-ORF2.1	pBAD33 con el gen <i>wahA</i> ( <i>orf 2.1</i> ) de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pBAD-ORF3.1	pBAD33 con el gen <i>waaL</i> ( <i>orf 3.1</i> ) de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pBAD-ORF4.1	pBAD33 con el gen <i>wahB</i> ( <i>orf 4.1</i> ) de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pBAD-ORF5.1	pBAD33 con el gen <i>wahC</i> ( <i>orf 5.1</i> ) de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pBAD-ORF6.1	pBAD33 con el gen <i>wahD</i> ( <i>orf 6.1</i> ) de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pBAD-ORF7.1	pBAD33 con el gen <i>wahE</i> ( <i>orf 7.1</i> ) de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pBAD-ORF2.2	pBAD33 con el gen <i>wahF</i> ( <i>orf 2.2</i> ) de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pBAD-ORF3.2	pBAD33 con el gen <i>waaE</i> ( <i>orf 3.2</i> ) de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pBAD-ORF4.2	pBAD33 con el gen <i>waaF</i> ( <i>orf 4.2</i> ) de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pBAD-ORF1.3	pBAD33 con el gen <i>waaC</i> ( <i>orf 1.3</i> ) de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pBAD- <i>wecA</i>	pBAD33 con el gen <i>wecA</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pBAD- <i>wzy</i>	pBAD33 con el gen <i>wzy</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pBAD- <i>wzz</i>	pBAD33 con el gen <i>wzz</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pRS550	<i>bla-kan-Tl4-BamHI-SmaI-EcoRI-lacZ</i> <sup>+</sup> , Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Simons <i>et al.</i> , 1987
pRS-PWZZA	pRS550 con la fusión transcripcional promotor <i>wzz</i> <sub>AH-3</sub> - <i>lacZ</i> , Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pRS-PWZZP	pRS550 con la fusión transcripcional promotor <i>wzz</i> <sub>PPD134/91</sub> - <i>lacZ</i> , Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pACYC184	Plásmido derivado del vector p15A1, Cm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	Chang y Cohen, 1978
pACYC184-PWZZA	pACYC184 con la fusión transcripcional promotor <i>wzz</i> <sub>AH-3</sub> - <i>lacZ</i> del vector pRS-PWZZA, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pACYC184-PWZZP	pACYC184 con la fusión transcripcional promotor <i>wzz</i> <sub>PPD134/91</sub> - <i>lacZ</i> del vector pRS-PWZZP, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pACYC184- <i>lacZ</i>	pACYC184 con el gen <i>lacZ</i> del vector pRS550, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo

### 3.4 Cebadores

Las siguientes tablas resumen los cebadores, sintetizados por Amersham Biosciences o Isogen Life Science y otros incluidos en *kits*, que fueron utilizados tanto en la amplificación de fragmentos de ADN por PCR, como en la secuenciación; la temperatura de hibridación a la que fueron usados; y su localización, si es el caso, dentro de las secuencias nucleotídicas incluidas en el anexo.

#### 3.4.1 Cebadores de los vectores

Nombre	Vector	5' Composición 3'	Temperatura de hibridación (°C)	Localización
CspLA	pLA2917	gactggcggtttatg	56	Diana Bg/II del vector
RpLA	pLA2917	ccatctgttcaatcatgca	58	Diana Bg/II del vector
Sp6	pGEM-T <i>easy</i>	tatttagtgacacatag	50	Lugar de clonaje del vector
M13for	pGEM-T <i>easy</i>	tgtaaacgacggccagt	54	Lugar de clonaje del vector

T3	pBCSK	aattaaccctcactaaaggg	56	Lugar de clonaje del vector
M13for	pBCSK	tgtaaacgcacggccagt	54	Lugar de clonaje del vector
pGPfor	pFS100	acggatcccaagcttctt	50	Diana <i>EcoRI</i> del vector
pGPrev	pFS100	agggatgtaacgcactgag	50	Diana <i>EcoRI</i> del vector
PBAD-F	pBAD33	atactcccgccattcagag	58	Lugar de clonaje del vector
PBAD-R	pBAD33	ggagaccccacactaccat	58	Lugar de clonaje del vector
PRSFI	pRS550	gatttgaacgttgcaagc	58	Lugar de clonaje del vector
PRSRI	pRS550	taagttgggtaacgccagg	58	Lugar de clonaje del vector

### 3.4.2 Cebadores del transposón mini-Tn5::Km1

Nombre	5' Composición 3'	Temperatura de hibridación (°C)	Localización
ISI	agatctgatcaagagacag	50	Extremo I
ISO	acttgtgtataagagtcag	50	Extremo O

### 3.4.3 Cebadores provistos en el kit 5' RACE System

Nombre	5' Composición 3'	Temperatura de hibridación (°C)
AAP	ggccacgcgtcgactagtagcgggiigggiigggiig	58
AUAP	ggccacgcgtcgactagtagc	55

### 3.4.4 Cebadores del gen *rrsA* del ARNr 16S de *Aeromonas hydrophila*

Nombre	5' Composición 3'	Temperatura de hibridación (°C)
rrsAF2	gcctaacacatgcaagtcgac	58
rrsAR2	gcggtattagcagtcggttcc	58

### 3.4.5 Cebadores de la región 1 *wa* del núcleo del lipopolisacárido de *Aeromonas hydrophila* AH-3

Nombre	5' Composición 3' <sup>1</sup>	Posición en la secuencia	T <sup>a</sup> de hibridación (°C)	Localización
<b>Cebadores para la secuenciación de la región 1 del núcleo del LPS</b>				
TetRF1	agcttgatctcggtgctgc	221	58	5' de <i>hldD</i>
TetRF2	aatgtggttggtggtgatgtt	361	58	5' de <i>hldD</i>
GmhDr3	gtcgtcccactettcaaac	803	58	<i>hldD</i>
GmhDr2	gaatgtactcgattgcccc	1407	58	<i>hldD</i>
GmhDf2	tcactcaggcagacatgac	1444	58	<i>hldD</i>
GmhDf3	tggttaccacggtacatgg	1905	58	<i>wahA</i>
GmhDf4	agagatagcaccgcatt	2497	58	<i>wahA</i>
WavLf1	actcatcccagggtgagc	3056	56	<i>wahA</i>
WavLf2	gttggactgaaagatcgcc	3548	58	<i>waaL</i>
WaaLF1	agatggctgcctagatgg	3872	56	<i>waaL</i>
WaaLR1	caccaatgcaacaaatccg	4378	56	<i>waaL</i>
WaaLF2	tttctggcctgcgctc	4382	58	<i>waaL</i>

WaaXF1	gaggaattgatcgtgc	4822	57	<i>wahB</i>
WaaXR1	aagatccacatccaggc	5195	57	<i>wahB</i>
WaaQF1	gtcattgcccgccattgc	5467	56	<i>wahC</i>
WaaQR1	acgaaatgatccggatgg	5844	56	<i>wahC</i>
WaaQF2	gctgatgaacaacgagtcc	6214	58	<i>wahC</i>
WaaQF5	aaccttccgctcttccgc	6292	58	<i>wahC</i>
WaaQF6	agaggtatgcacttctccg	6877	58	<i>wahD</i>
WaaQR2	caagatcatcgccaatccg	7653	58	<i>wahE</i>
WaaQF3	ttgtgctgttcgatgagcc	7891	58	<i>wahE</i>
WaaQF7	cgcgcaataatccatgacc	8400	58	<i>wahE</i>
YicCF1	actggagatgcacatcagc	8897	58	5' de <i>wahE</i>
WaaQF8	acgatttctgctcgatcc	8940	58	5' de <i>wahE</i>

### Cebadores para la construcción de mutantes

#### **Cebadores para la construcción del mutante AH-3Δ2.1**

2.1-A	acgcgtcgaccgtctatggctactccaagc	1016	62	<i>hldD</i>
2.1-B	cccatccactaaacttaacaaccacgtcgggtcaattcgt	1690	62	<i>wahA</i>
2.1-C	tgtttaagtttagtggatggggccatttccctcgtaccga	3289	62	<i>wahA</i>
2.1-D	acgcgtcgaccgtctgggagagataaagc	3953	62	<i>waaL</i>

#### **Cebadores para la construcción del mutante AH-3Δ3.1**

3.1-A	acgcgtcgaccgtatcaggacaacctgacg	2850	64	<i>wahA</i>
3.1-B	cccatccactaaacttaaacatgtgggtgtttatcgagca	3409	64	<i>waaL</i>
3.1-C	tgtttaagtttagtggatgggttcttggcctgcccgtc	4382	64	<i>waaL</i>
3.1-D	acgcgtcgaccagatctggcaagccgata	5003	64	<i>wahB</i>

#### **Cebadores para la construcción del mutante AH-3Δ4.1**

4.1-A	ggaagatctgtggaaatacgttgcggtag	4021	60	<i>waaL</i>
4.1-B	cccatccactaaacttaaacacatctgctgtacaacctcg	4644	60	<i>wahB</i>
4.1-C	tgtttaagtttagtggatgggccttcgattatctgactggt	5110	60	<i>wahB</i>
4.1-D	ggaagatctggtggccttttcgtgaaca	5809	60	<i>wahC</i>

#### **Cebadores para la construcción del mutante AH-3Δ5.1**

5.1-A	ggaagatctgttttggtagattggctgt	4763	58	<i>wahB</i>
5.1-B	cccatccactaaacttaaacacacggttccacttctgtt	5428	58	<i>wahC</i>
5.1-C	tgtttaagtttagtggatggggacaaccttccgctcttcc	6293	58	<i>wahC</i>
5.1-D	ggaagatctactccgagtcgattcaacag	6930	58	<i>wahD</i>

#### **Cebadores para la construcción del mutante AH-3Δ7.1**

7.1-F	cgctacatgaaagacctgc	8330	58	<i>wahE</i>
7.1-R	ctgatcaaacagcttccc	7791	58	<i>wahE</i>

### Cebadores para la complementación de mutantes

#### **Cebadores para la complementación del mutante AH-3Δ2.1**

2.1-F	tccccgggggttggatccccctctgac	1544	58	<i>hldD</i>
2.1-R	ctagtctagaatggtcaatgcaaacaggg	3429	58	<i>waaL</i>

#### **Cebadores para la complementación del mutante AH-3Δ3.1**

3.1-F	tccccggggttccctcgtaccgatgtt	3295	58	<i>wahA</i>
3.1-R	ctagtctagaacacttcttggccacgtc	4747	58	<i>wahB</i>

#### **Cebadores para la complementación del mutante AH-3Δ4.1**

4.1-F	tccccggggttctgcagggtactggt	4428	58	<i>waaL</i>
4.1-R	ctagtctagacgttggccacttctgttcc	5426	58	<i>wahC</i>

#### **Cebadores para la complementación del mutante AH-3Δ5.1**

5.1-F	tccccgggggattggggtcagtaaac	5258	58	5' de <i>wahC</i>
5.1-R	ctagtctagacttgagttgcaggtcgttg	6439	58	<i>wahD</i>

#### **Cebadores para la complementación del mutante AH-3Δ6.1**

6.1-F	tccccgggaaccttccgctcttccgc	6293	58	<i>wahC</i>
6.1-R	ctagtctagacaagatcatcgccaatccg	7653	58	<i>wahE</i>

**Cebadores para la complementación del mutante AH-3Δ7.1**

7.1-F2	<u>tccccgggg</u> gatgctcaacaacgacctc	8560	58	5' de <i>wahE</i>
7.1-R2	ctagt <u>ctagagc</u> gaacaggacatcaact	7410	58	<i>wahD</i>

**Cebadores para la construcción de sondas**

WaaXF1	gaggg <u>aattgatc</u> gctgc	4822	57	<i>wahB</i>
WaaXR1	aagagatccacatccaggc	5195	57	<i>wahB</i>
WaaQF1	gtcattgcccgcattgc	5467	56	<i>wahC</i>
WaaQR1	acgaaatgatcccgatgg	5844	56	<i>wahC</i>
WaaQF6	agaggtatgcacttctccg	6878	58	<i>wahD</i>
LBGBR1	gagttgatgtctgttcgc	7428	58	<i>wahD</i>
7.1-F	cgctacatgaaagacctgc	8330	58	<i>wahE</i>
7.1-R	ctgatcaaacacgcttccc	7791	58	<i>wahE</i>

<sup>1</sup> Las regiones subrayadas con una línea sencilla corresponden a la zona de complementariedad de ambos cebadores (ver apartado 3.8.13.3). Las regiones subrayadas con una doble línea corresponden a dianas para enzimas de restricción: A<sup>1</sup>GATCT (*Bgl*II), G<sup>1</sup>TCGAC (*Sal*I), CCC<sup>1</sup>GGG (*Sma*I), T<sup>1</sup>CTAGA (*Xba*I).

### 3.4.6 Cebadores de la región 2 *wa* del núcleo del lipopolisacárido de *Aeromonas hydrophila* AH-3

Nombre	5' Composición 3' <sup>1</sup>	Posición en la secuencia	T <sup>a</sup> de hibridación (°C)	Localización
<b>Cebadores para la secuenciación de la región 2 del núcleo del LPS</b>				
A3waaAR3	gctgttgtgctcaccat	93	54	5' de <i>waaA</i>
A3waaAR2	atcgccgagatagacctg	680	56	<i>waaA</i>
A3waaAR	acgaggtacaggccaagg	942	58	<i>waaA</i>
A3waaFR3	tacaacctgctgatccacc	1567	58	<i>waaA</i>
A3waaFR5	ttgaggtgaccgaacttg	1734	56	<i>wahF</i>
A3waaFR4	atcaggccggaatcattgg	1891	56	<i>wahF</i>
A3waaFR2	tgatgacatagctgctgc	1894	58	<i>wahF</i>
A3waaFf2	tgatggtggaagcctacct	2317	56	<i>wahF</i>
A3waaFR	tacgatcaggcgatcatcc	2462	58	<i>wahF</i>
A3waaFf	ctggccgagattatgcc	2744	58	5' de <i>waaE</i>
A3waaEF1	ccgcttctctgcaacc	3102	54	<i>waaE</i>
A3waaER	caccagcactcgtttag	3390	56	<i>waaE</i>
A3waaEF	caagaagggtccctcag	3537	58	<i>waaE</i>
A3waaER1	gcgtattgacgaaggtgg	3680	54	<i>waaE</i>
A3waaHR	cagtatgactgcaactcg	4178	56	<i>waaF</i>
A3waaHR2	atgccagcatgaagtcacc	4783	58	<i>waaF</i>
A3coaDrev	gtcgaggagatgaaggagt	5459	58	<i>coaD</i>

**Cebadores para la construcción de mutantes****Cebadores para la construcción del mutante AH-3Δ2.2**

2.2-A	acgc <u>gtcgac</u> gcacccattctgactggac	3184	62	<i>waaE</i>
2.2-B	cccateccactaaactaaacagaggctctgggacatcac	2643	62	<i>wahF</i>
2.2-C	<u>tgtttaagtttagtggatggcgccggagcaggtgatagag</u>	1715	62	<i>wahF</i>
2.2-D	acgc <u>gtcgac</u> gggcattgatgatggtcac	1126	62	<i>waaA</i>

**Cebadores para la construcción del mutante AH-3Δ4.2**

4.2-F	agtttgccatgctcaagc	4777	56	<i>waaF</i>
4.2-R	cagtatgactgcaactcg	4178	56	<i>waaF</i>



**Cebadores para el intento de construcción del mutante en el gen *waaA***

1.2-F2	<u>g</u> ccatcagtccttcattg	1396	54	<i>waaA</i>
1.2-R2	atcgccgagatagaccttg	671	54	<i>waaA</i>

**Cebadores para la complementación de mutantes****Cebadores para la complementación del mutante AH-3Δ2.2**

2.2-F	aaaag <u>t</u> actggcataatctcggccagt	2760	54	5' de <i>wahF</i>
2.2-R	ctag <u>t</u> ctagagggtcttcggctttaga	1503	54	<i>waaA</i>

**Cebadores para la complementación del mutante AH-3Δ3.2**

3.2-F	tcccc <u>g</u> ggaattcgagcatgcccgc	2896	56	5' de <i>waaE</i>
3.2-R	ctag <u>t</u> ctagagcgatcaccggaagaca	3888	56	<i>waaF</i>

**Cebadores para la complementación del mutante AH-3Δ4.2**

4.2-F2	tcccc <u>g</u> ggtccttcgattggtgacag	4874	58	5' de <i>waaF</i>
4.2-R2	ctag <u>t</u> ctagagtcaaatacggcgacctct	3670	58	<i>waaE</i>

**Cebadores para la complementación de la cepa de *E. coli* CJB26**

1.2-F	acgc <u>t</u> cgaccgatcgtgctgcaagtg	1658	58	<i>wahF</i>
1.2-R	acgc <u>t</u> cgaccacgaccttcagcgactc	159	58	3' de <i>waaA</i>

**Cebadores para la construcción de sondas**

A3waaEF1	ccgcttcttcgtaaccc	3102	54	<i>waaE</i>
A3waaER1	gcgtatttgacgaaggtgg	3680	54	<i>waaE</i>
4.2-F	agttttgccatgctcaagc	4777	56	<i>waaF</i>
4.2-R	cagtatgcactgcaactcg	4178	56	<i>waaF</i>

<sup>1</sup> Las regiones subrayadas con una línea sencilla corresponden a la zona de complementariedad de ambos cebadores (ver apartado 3.8.13.3). Las regiones subrayadas con una doble línea corresponden a dianas para enzimas de restricción: G<sup>1</sup>TCGAC (*SalI*), AGT<sup>1</sup>ACT (*ScaI*), CCC<sup>1</sup>GGG (*SmaI*), T<sup>1</sup>CTAGA (*XbaI*).

### 3.4.7 Cebadores de la región 3 *wa* del núcleo del lipopolisacárido de *Aeromonas hydrophila* AH-3

Nombre	5' Composición 3' <sup>1</sup>	Posición en la secuencia	T <sup>a</sup> de hibridación (°C)	Localización
<b>Cebadores para la secuenciación de la región 3 del núcleo del LPS</b>				
A3vpaR	cccttagggcacaagac	188	58	3' de <i>waaC</i>
A3waaCR	attgtgatggcgtagag	625	58	<i>waaC</i>
A3waaCF	cataacgacgctcggtatc	1183	58	<i>waaC</i>
A3kdkAF	cctcccccgagctgttga	1721	58	<i>kdkA</i>
A3kdkAF2	aaggtgtgggtgatcgatt	2195	56	<i>kdkA</i>
<b>Cebadores para el intento de construcción del mutante en el gen <i>kdkA</i></b>				
A3kdkAF	cctcccccgagctgttga	1721	58	<i>kdkA</i>
2.3-R2	aaatcgatcaccacacctt	2214	58	<i>kdkA</i>
<b>Cebadores para la complementación del mutante AH-3Δ1.3</b>				
1.3-F	aaaag <u>t</u> actcatccattttgccaccatt	1505	54	5' de <i>waaC</i>
1.3-R	ctag <u>t</u> ctagaggtagaggccagcaggtta	366	54	3' de <i>waaC</i>
<b>Cebadores para la complementación de la cepa de <i>E. coli</i> CJB26</b>				
2.3-F	gtgacaacaatccccgatg	1405	56	<i>waaC</i>
2.3-R	atcagcgccagatcaaact	2503	56	3' de <i>kdkA</i>

**Cebadores para la construcción de la sonda**

A3waaCF	<u>cataacgacgctcggatc</u>	1183	58	<i>waaC</i>
A3waaCR	<u>attgtgatgggcgtagag</u>	625	58	<i>waaC</i>

<sup>1</sup> Las regiones subrayadas con una doble línea corresponden a dianas para enzimas de restricción: AGT<sup>1</sup>ACT (*ScaI*), T<sup>1</sup>CTAGA (*XbaI*).

**3.4.8 Cebadores de la agrupación génica *wb* del antígeno O:34 del lipopolisacárido de *Aeromonas hydrophila* AH-3**

Nombre	5' Composición 3' <sup>1</sup>	Temperatura de hibridación (°C)	Localización
<b>Cebadores para la construcción de mutantes</b>			
<b>Cebadores para la construcción del mutante AH-405Δ<i>wecA</i></b>			
PA	<u>cgcgatcctgaactccccaagatttacc</u>	62	<i>manB</i>
PB	<u>cccatccactaaacttaaacaaaaatactcccaaatcccccac</u>	62	<i>wecA</i>
PC	<u>tgtttaagttagtgatgggggtgttcaaaactattcgacc</u>	62	<i>wecA</i>
PD	<u>cgcgatcctcagcaacgacaccaagagg</u>	62	<i>rmlD</i>
<b>Cebadores para la construcción del mutante AH-405Δ<i>wzy</i></b>			
YA	<u>acgcgtcgactatttgtagctggtgga</u>	62	<i>wbxD</i>
YB	<u>cccatccactaaacttaaacaccagcggagaatgatgat</u>	62	<i>wzy</i>
YC	<u>tgtttaagttagtgatggggcgtgggtatttcagtc</u>	62	<i>wzy</i>
YD	<u>acgcgtcgaccatcagatgctctgccgta</u>	62	<i>wbxE</i>
<b>Cebadores para la construcción del mutante AH-405Δ<i>wzz</i></b>			
ZA	<u>acgcgtcgacttctgaggtgagttggcc</u>	64	5' de <i>wzz</i>
ZB	<u>cccatccactaaacttaaacactgcggcaacatcttatcc</u>	64	<i>wzz</i>
ZC	<u>tgtttaagttagtgatgggactacctgcttggtggca</u>	64	<i>wzz</i>
ZD	<u>acgcgtcgacaacagcagaccggcaaac</u>	64	3' de <i>wzz</i>
<b>Cebadores para la complementación de mutantes</b>			
<b>Cebadores para la complementación del mutante AH-405Δ<i>wecA</i></b>			
PF	<u>aaaagtactgattatcaacgccgtcac</u>	58	5' de <i>wecA</i>
PR	<u>aaaactgcagcatcaactgccgataggc</u>	58	<i>rmlD</i>
<b>Cebadores para la complementación del mutante AH-405Δ<i>wzy</i></b>			
YF	<u>aaaagtactgcatcaagaaggtcgttag</u>	58	<i>wbxD</i>
YR	<u>aaaactgcagccgctccaagaaacgacta</u>	58	<i>wbxE</i>
<b>Cebadores para la complementación del mutante AH-405Δ<i>wzz</i></b>			
ZF	<u>aaaagtactacactagcgcgatcttgaggataa</u>	56	5' de <i>wzz</i>
ZR	<u>acgcgtcgacagagatgctcaccctttc</u>	56	3' de <i>wzz</i>
<b>Cebadores para el ensayo de RT-PCR</b>			
A3-B1	<u>aatccggtatccgcaagac</u>	54	<i>rmlB</i>
A3-TR4	<u>atgacattatcactacgg</u>	54	<i>wbxC</i>
A3-TR3	<u>gtaattgcattgtaggagc</u>	54	<i>wbxC</i>
A3-NR	<u>gataactgccgatgaac</u>	54	<i>wbxG</i>
A3-NF	<u>ccacaattgtaacgac</u>	56	<i>wbxG</i>
A3-RO4	<u>ggcaccataaacattgaga</u>	56	<i>rmlD</i>
A3-RO3	<u>acaggttgctattcgtgt</u>	54	<i>rmlD</i>
A3-PRP	<u>tcacatagagcacc</u>	54	<i>wzz</i>
GSP2-O34	<u>gtcgaagagctgaaaacgg</u>	58	<i>wzz</i>
GSP3-O34	<u>gctggctacatcagataatgag</u>	58	<i>wzz</i>
<b>Cebadores para el ensayo de RT-PCR semicuantitativa</b>			
A3-B1	<u>aatccggtatccgcaagac</u>	56	<i>rmlB</i>

A3-CF2	taacgcgcacatcctgatag	56	<i>rmlC</i>
GSP2-O34	gtcgaaagagctgaaaacgg	58	<i>wzz</i>
GSP3-O34	gctggctacatcagataatgag	58	<i>wzz</i>
<b><u>Cebadores para el ensayo de 5' RACE</u></b>			
GSP1-O34	ttatcttcgggtataaccagatgc	57	<i>wzz</i>
GSP2-O34	gtcgaaagagctgaaaacgg	58	<i>wzz</i>
A3-ROLF	tgcggcaacatcttatcc	55	<i>wzz</i>
<b><u>Cebadores para la construcción de la fusión transcripcional promotor <i>wzz<sub>AH-3</sub>-lacZ</i></u></b>			
P34wzzF1A	cgcggatccaggtgagtttggccctaaaa	58	5' de <i>wzz</i>
P34wzzR1A	ccggaattcgtacacagcaaggaaa	58	5' de <i>wzz</i>

<sup>1</sup> Las regiones subrayadas con una línea sencilla corresponden a la zona de complementariedad de ambos cebadores (ver apartado 3.8.13.3). Las regiones subrayadas con una doble línea corresponden a dianas para enzimas de restricción: G<sup>1</sup>GATCC (*Bam*HI), G<sup>1</sup>AATTC (*Eco*RI), GTGCA<sup>1</sup>G (*Pst*I), G<sup>1</sup>TCGAC (*Sal*I), AGT<sup>1</sup>ACT (*Scal*I).

### 3.4.9 Cebadores de la agrupación génica *wb* del antígeno O:18 del lipopolisacárido de *Aeromonas hydrophila* PPD134/91

Nombre	5' Composición 3' <sup>1</sup>	Temperatura de hibridación (°C)	Localización
<b><u>Cebadores para la construcción de la fusión transcripcional promotor <i>wzz<sub>PPD134/91</sub>-lacZ</i></u></b>			
PPwzzF	cgcggatccctcttgatgcaatcagaatcagc	58	5' de <i>wzz</i>
PPwzzR	ccggaattccaataacgacatgccacac	58	5' de <i>wzz</i>

<sup>1</sup> Las regiones subrayadas con una doble línea corresponden a dianas para enzimas de restricción: G<sup>1</sup>GATCC (*Bam*HI), G<sup>1</sup>AATTC (*Eco*RI).

## 3.5 Medios de cultivo y suplementos

El crecimiento de las cepas de *Aeromonas* se realizó en caldo de triptona y soja (TSB) o en agar de triptona y soja (TSA) a 30 °C, si no se indica otra temperatura, mientras que las cepas de *Escherichia coli* y de *Klebsiella pneumoniae* 52145 se hicieron crecer en medio LB (Luria-Bertani)-Miller o agar LB-Miller (LB + 1,5% de agar) a la temperatura adecuada de 30°C o 37°C, según la cepa. Los cultivos en medios líquidos se realizaron en agitación a 200 rpm.

Medio LB		Medio TSB	
Extracto de levadura	5 g/l	Peptona de caseína	10 g/l
Peptona tríptica de caseína	10 g/l	Peptona de soja	3 g/l
NaCl	10 g/l	NaCl	5 g/l
		Fosfato monopotásico	2,5 g/l
		Dextrosa	2,5 g/l

Cuando fue necesario, se añadieron diferentes antibióticos y otros suplementos a los medios de cultivo:

Antibióticos		Otros suplementos	
Ampicilina (Amp)	100 µg/ml	IPTG <sup>1</sup>	0,2 mM
Cloranfenicol (Cm)	25 µg/ml	X-Gal <sup>2</sup> (disuelto en DMF <sup>3</sup> )	40 µg/ml
Espectinomicina (Spc)	50 µg/ml	Sacarosa	15%
Kanamicina (Km)	50 µg/ml		
Rifampicina (Rif)	100 µg/ml		
Tetraciclina (Tc)	20 µg/ml		

<sup>1</sup> IPTG: Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido

<sup>2</sup> X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranosido

<sup>3</sup> DMF: dimetilformamida

### 3.6 Estudios con bacteriófagos

El ensayo de resistencia al bacteriófago PM1 de los mutantes por inserción del transposón mini-Tn5::Km1 de *Aeromonas hydrophila* AH-3 (ver apartado 3.8.13.1) se realizó mediante la técnica del test de la gota. Se llevó a cabo añadiendo, a 200 µl de cultivo en fase exponencial de la bacteria a analizar, 2 ml de TSB con un 0,6% de agar (agar blando) y, una vez mezclado, se extendió sobre las placas de TSA (1,5% de agar) con los suplementos correspondientes para obtener un crecimiento bacteriano confluyente. Tras la solidificación del agar blando, se depositó una gota de una suspensión del fago (10<sup>7</sup> ufp/ml) en el centro de la placa y se incubó a 30°C. Después de una incubación de 18 horas, se examinó la presencia o no de halos de lisis bacteriana.

### 3.7 Estudios de la superficie celular

#### 3.7.1 Obtención del lipopolisacárido (LPS)

##### 3.7.1.1 Aislamiento a gran escala del LPS

###### 3.7.1.1.1 Deshidratación de las células

Para aislar el LPS a gran escala, se partió de cultivos bacterianos líquidos de 10 l de crecimiento en fase estacionaria que fueron centrifugados a 8000 rpm durante 15 minutos, para obtener los sedimentos celulares, y lavados con agua fría para eliminar los restos del

medio de cultivo. Primeramente, era necesario deshidratar las células, y para ello, se resuspendieron en una solución de metanol y cloroformo al 50% (1:1) y se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos. Este proceso se repitió tres veces y, a continuación, se resuspendió el sedimento celular obtenido en etanol, manteniéndose durante 16-18 horas. Posteriormente, las células fueron centrifugadas y se realizaron tres lavados con acetona, centrifugando a 8000 rpm durante 10 minutos entre cada uno de ellos. Finalmente, las células se resuspendieron en dietiléter y se extendieron sobre un papel de filtro para permitir la evaporación del éter y el secado de las mismas.

### **3.7.1.1.2 Extracción del LPS por el método fenol-agua**

El LPS fue aislado y purificado según el método fenol-agua de Westphal modificado por Osborn (Westphal y Jann, 1965; Osborn, 1966) en el caso de las cepas que producían LPS con antígeno O, dada su mayor naturaleza hidrofílica.

Las células, una vez deshidratadas, se resuspendieron en tampón Tris-HCl 25 mM con  $\text{CaCl}_2$  2 mM a pH 7,63 (10 ml/g) y fueron tratadas a 37°C con DNAsa (1 mg/g) y RNAsa (1 mg/g) durante 24 horas y, posteriormente, con proteinasa K (1 mg/g) durante 36 horas. La suspensión fue dializada frente a agua desionizada durante 24 horas y liofilizada. Para la extracción del LPS, se resuspendió el liofilizado en una solución, a partes iguales, de agua y fenol al 90% y se mantuvo durante 20 minutos en un baño a 65°C con agitación. La mezcla se repartió en tubos de centrifuga de vidrio o teflón y se dejó enfriar antes de ser centrifugada durante 30 minutos a 4000 rpm a 4°C. Esta centrifugación permitió la formación de dos fases: una acuosa en la que se encontraba el LPS y que se guardó para su posterior procesado; y una fenólica que fue utilizada para realizar una segunda y una tercera extracción (añadiendo más agua y procediendo como se ha descrito hasta ahora). Las fases acuosas de las tres extracciones se dializaron juntas frente a agua desionizada durante 48 horas a 4°C, con el objetivo de eliminar los restos de fenol presentes en la fase acuosa. Posteriormente esta fase acuosa fue liofilizada y el liofilizado resuspendido en agua desionizada y ultracentrifugado a 100000 x g durante 4 horas. El precipitado obtenido contiene el LPS. El sobrenadante fue ultracentrifugado de nuevo (dos veces más, para aumentar el rendimiento del protocolo), y los tres precipitados obtenidos se resuspendieron en agua desionizada y se liofilizaron de nuevo.

### **3.7.1.1.3 Extracción del LPS por el método PCP**

El LPS fue aislado y purificado mediante el método fenol-cloroformo-éter de petróleo (método PCP) de Galanos (Galanos *et al.*, 1969) en el caso de las cepas que producían LPS sin antígeno O por su mayor naturaleza lipofílica.

Las células deshidratadas se disgregaron hasta la homogeneización en una solución de fenol, cloroformo y éter de petróleo, preparada en una proporción 2:5:8, y la mezcla se agitó durante 1 hora. Posteriormente, se distribuyó en tubos de teflón, que se centrifugaron durante 15 minutos a 7000 rpm y a 10°C, y se recogió la fase fenólica, la superior, en la que se encontraba el LPS. Con el sedimento, se volvió a repetir el proceso de extracción dos veces más, juntando las fases fenólicas obtenidas cada vez. A continuación, se evaporaron el cloroformo y el éter de petróleo que pudiesen quedar en las fases recogidas con un rotavapor a 40°C y a las presiones adecuadas. La precipitación del LPS se produjo al enfriar en hielo y añadir agua desionizada gota a gota a la muestra hasta que se observó una interfase de color blanco. La muestra se centrifugó a 7000 rpm durante 50 minutos a 26°C, formándose un precipitado en el fondo del tubo. Se realizaron nuevas centrifugaciones y se eliminó la fase fenólica cuando dejó de observarse un aumento en la cantidad del precipitado. El LPS recogido se lavó tres veces con fenol al 85% y, posteriormente, tres veces con acetona, centrifugando a 7000 rpm durante 10 minutos a 26°C y eliminando el sobrenadante cada vez. Finalmente, la muestra se secó por completo bajo flujo de aire, se resuspendió en agua desionizada, se congeló y se liofilizó.

### **3.7.1.2 Aislamiento a pequeña escala del LPS**

Con el fin de obtener el LPS de diversas cepas bacterianas de forma rápida y poder analizar muchas muestras mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, se utilizó la extracción de LPS descrita por Darveau y Hancock (Darveau y Hancock, 1983). El sedimento celular de 200 µl de crecimiento bacteriano en fase estacionaria se resuspendió en 25 µl de tampón de muestras 2X y se hirvió durante 10 minutos. Una vez frío, se añadieron 25 µl de proteinasa K (1 mg/ml) para degradar las proteínas, se incubó a 58°C durante 2 horas y se analizaron 10-15 µl de esta solución que contenía el LPS por SDS-PAGE (ver apartado 3.7.2.1).

Para obtener una mayor resolución de las fracciones de bajo peso molecular del LPS, se procedió de igual modo pero resuspendiendo en tampón de núcleo 2X, en vez de tampón

de muestras, y se utilizaron entre 3-4  $\mu$ l para el análisis por SDS-Tricine-PAGE (ver apartado 3.7.2.2).

<b>Tampón de muestras 2X</b>		<b>Tampón de núcleo 2X</b>	
Glicerol	10%	Glicerol	10%
SDS <sup>1</sup>	2,3%	Tris-HCl pH 8	2 mM
Tris-HCl pH 6,8	62,5 mM	EDTA <sup>2</sup>	0,2 mM
$\beta$ -mercaptoetanol	5%	SDS	0,02%
Azul de bromofenol	0,1%	$\beta$ -mercaptoetanol	8%
		Azul de bromofenol	0,1%

<sup>1</sup> SDS: dodecil sulfato sódico

<sup>2</sup> EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

### 3.7.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción del LPS

#### 3.7.2.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) en tampón Tris-Glicina-SDS

El estudio del perfil electroforético del LPS se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) siguiendo el método de Laemmli modificado por Ames (Laemmli, 1970; Ames *et al.*, 1974). Para la preparación de los geles, se utilizaron placas de vidrio y teflón de 8 x 10 cm de Amersham Biosciences. En la parte superior del gel (fase de compactación) se utilizó un porcentaje de acrilamida del 5% y en la parte inferior (fase de resolución), de un 12%.

Para la electroforesis, se usaron cubetas verticales modelo SE250 de Hoefer y tampón de electroforesis Tris-Glicina-SDS. Se aplicó una corriente de 10 mA (60 V) hasta que las muestras superaron la fase de compactación, y de 20 mA (150 V) durante el paso de las muestras a través de la fase de resolución.

<b>Fase de resolución</b> (12% de acrilamida)		<b>Fase de compactación</b> (5% de acrilamida)	
29,2% acrilamida / 0,8% bisacrilamida	2,4 ml	29,2% acrilamida / 0,8% bisacrilamida	425 $\mu$ l
Tampón de resolución 4X	1,56 ml	Tampón de compactación 4X	625 $\mu$ l
Agua desionizada	2 ml	Agua desionizada	1,45 ml
APS <sup>1</sup> 10%	40 $\mu$ l	APS 10%	17,5 $\mu$ l
TEMED <sup>2</sup>	9,3 $\mu$ l	TEMED	5 $\mu$ l

<sup>1</sup> APS: persulfato sódico

<sup>2</sup> TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletildiamina

<b>Tampón de compactación 4X</b>		<b>Tampón de resolución 4X</b>		<b>Tampón de electroforesis 10X</b>	
Tris-HCl	0,5 M	Tris-HCl	1,5 M	Tris	0,25 M
SDS	0,4%	SDS	0,4%	SDS	0,4%
Ajustar pH a 6,8		Ajustar pH a 8,8		Glicina	1,92 M
				pH 8,3 (no ajustado)	

### 3.7.2.2 Electroforesis en geles de poli(acrilamida) con SDS en tampón Tris-Tricina-SDS (SDS-Tricine-PAGE)

Para obtener una mejor resolución de las fracciones de bajo peso molecular del LPS se utilizaron geles de poli(acrilamida) en tampón de electroforesis Tris-Tricina-SDS (SDS-Tricine-PAGE), tal y como describen Pradel y Schnaitman (Pradel y Schnaitman, 1991). Se utilizó un 4,5% de acrilamida en la fase de compactación y un 15% en la fase de resolución y se realizó toda la electroforesis a 10 mA (60 V).

<b>Fase de resolución (15% de acrilamida)</b>		<b>Fase de compactación (4,5% de acrilamida)</b>	
49,5% acrilamida / 6% bisacrilamida	8,3 ml	49,5% acrilamida / 3% bisacrilamida	0,5 ml
Tampón de gel 3X	8,3 ml	Tampón de gel 3X	1,55 ml
Glicerol	2,6 ml	Agua desionizada	4,2 ml
Agua desionizada	5,75 ml	APS 10%	75 µl
APS 10%	100 µl	TEMED	7,5 µl
TEMED	10 µl		

<b>Tampón de gel 3X</b>		<b>Tampón de electroforesis Tris-Tricina-SDS 10X</b>	
Tris	3 M	Tris-HCl	0,1 M
SDS	0,3%	Tricina	0,1 M
Ajustar pH a 8,45		SDS	0,1%
		Ajustar pH a 8,25	

### 3.7.2.3 Tinción del LPS con nitrato de plata

Para el análisis del LPS, los geles de poli(acrilamida) fueron teñidos con nitrato de plata, según el método de Tsai y Frasch (Tsai y Frasch, 1982). Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente en agitación continua y las soluciones se prepararon al momento con agua desionizada.



El gel se sumergió en la solución de fijación durante un mínimo de 2 horas, a continuación se cambió esta solución por otra idéntica de oxidación a la que se le había añadido un 0,7% de ácido peryódico y se mantuvo durante 7 minutos. Posteriormente, se realizaron tres lavados con agua desionizada de 10 minutos cada uno, se sumergió el gel en la solución de tinción durante 10 minutos y se realizaron otros tres lavados con agua desionizada de 5 minutos cada uno. Por último, se añadió la solución de revelado y se detuvo la reacción con la solución de parada, en la cual se mantuvo durante 10 minutos antes de sumergirlo en agua desionizada.

Solución de fijación		Solución de tinción		Solución de revelado		Solución de parada	
Etanol	40%	NaOH	0,02 M	Citrato sódico	0,005%	Metilamina	10%
Ácido acético	5%	Hidróxido de amonio	0,4%	Formaldehído	0,02%		
		Nitrato de plata	0,6%				

### 3.7.3 Análisis químico del LPS

Los análisis químicos del LPS fueron realizados por el grupo del Dr. Yuriy A. Knirel del Instituto de Química Orgánica N.D. Zelinsky de la Academia de Ciencias de Rusia en Moscú.

#### 3.7.3.1 Hidrólisis ácida del LPS

La hidrólisis suave del LPS con ácido acético permite la ruptura del enlace entre la glucosamina del lípido A y el Kdo del núcleo (y también entre dos moléculas de Kdo, entre otros), liberándose así la fracción polisacáridica del LPS. Para realizar este procedimiento, se añadió ácido acético al 2% a una fracción de unos 50 mg de LPS purificado mediante el método fenol-agua (ver apartado 3.7.1.1.2). La mezcla se incubó a 100°C en agitación constante durante, aproximadamente, 45 minutos, hasta observar la formación de un precipitado (la parte lipídica). A continuación, se centrifugó la muestra a 13000 x g durante 20 minutos a 4°C para eliminar la mayor parte del precipitado y, posteriormente, el sobrenadante se centrifugó de nuevo. El sobrenadante resultante de esta última centrifugación (parte polisacáridica) se recogió y se liofilizó para su fraccionamiento posterior mediante cromatografía de filtración en gel (ver apartado 3.7.3.2).

### **3.7.3.2 Cromatografía de filtración en gel (GPC)**

La cromatografía de filtración en gel o cromatografía de exclusión molecular se utilizó para separar las diferentes fracciones de la parte polisacáridica del LPS obtenida por hidrólisis con ácido acético (ver apartado 3.7.3.1). En este caso, se usó una columna de Sephadex G-50 (S) (56 x 2,6 cm) que contenía gel de dextrano (GE Healthcare) acoplada a un refractómetro diferencial (Knauer) para facilitar la recolección de las diferentes fracciones: una fracción polisacáridica de elevado peso molecular correspondiente al antígeno O y una fracción oligosacáridica de menor peso, que se correspondía con el núcleo del LPS. El flujo en la columna fue de 1 ml/min y se utilizó como eluyente una solución de acetato de piridina 0,05 M a pH 4,5. Las fracciones correspondientes a la fracción oligosacáridica del núcleo del LPS se reunieron, se confirmaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, y la muestra se secó bajo flujo de aire para ser analizada, posteriormente, mediante espectrometría de masas con ionización por *electrospray* (ESI-MS) (ver apartado 3.7.3.5).

Este tipo de cromatografía también se utilizó para desalar la muestra obtenida como resultado de la hidrólisis básica del LPS (ver apartado 3.7.3.3). En este caso, se usó una columna de Sephadex G-15 (80 x 1,6 cm) que contenía gel de dextrano (GE Healthcare). El flujo en la columna fue de 20 ml/h y se utilizó agua desionizada como eluyente. La muestra se secó bajo flujo de aire y se analizó también mediante ESI-MS (ver apartado 3.7.3.5).

### **3.7.3.3 Hidrólisis básica del LPS**

La hidrólisis básica del LPS implica su completa desacilación, quedando libre de los ácidos grasos del lípido A. Esta hidrólisis del LPS, purificado mediante el método PCP (ver apartado 3.7.1.1.3), se realizó en dos pasos: primero se llevó a cabo una *O*-desacilación y, posteriormente, una *N*-desacilación.

#### **3.7.3.3.1 *O*-desacilación del LPS: hidrazinolisis**

Con el fin de romper el enlace éster de los ácidos grasos secundarios del lípido A del LPS, se realizó la hidrólisis con 1 ml de hidrazina anhidra de unos 20 mg de LPS purificado mediante el método PCP durante 1 hora a 50°C en agitación. La mezcla se enfrió en hielo, se añadieron 200 ml de acetona fría y se centrifugó a 7000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado formado se recogió después de

dos lavados más con acetona en los que se procedió de la misma manera. Finalmente, se resuspendió en agua desionizada y se liofilizó.

#### **3.7.3.3.2 *N*-desacilación del LPS: tratamiento alcalino fuerte**

Para obtener una desacilación completa del lípido A del LPS, se procedió a la eliminación de los ácidos grasos unidos mediante un enlace amida al dímero de glucosamina que lo constituye. En este proceso, se resuspendió el liofilizado obtenido de la *O*-desacilación del LPS (ver apartado 3.7.3.3.1) en 4 ml de KOH 4 M en presencia de NaBH<sub>4</sub> (20 mg) y la hidrólisis se llevó a cabo a 120°C durante 16 horas. A continuación, se neutralizó la mezcla con HCl 4 M, se añadió igual volumen de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se centrifugó a 7000 rpm durante 20 minutos. Se recogió la fase acuosa que contenía el oligosacárido y se volvió a añadir CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> realizando dos lavados más de igual manera. Finalmente, la muestra obtenida se desaló mediante cromatografía de filtración en gel (ver apartado 3.7.3.2).

#### **3.7.3.4 Análisis de metilación de monosacáridos**

Para realizar el análisis cuantitativo y cualitativo de los monosacáridos que constituían el LPS, se obtuvieron dos tipos de derivados metilados más volátiles y de mayor estabilidad térmica: metilglicósidos acetilados y acetatos de alditol parcialmente metilados, que fueron analizados posteriormente por cromatografía de gas-líquido (GLC) y por cromatografía de gas-líquido acoplada a espectrometría de masas (GLC-MS).

##### **3.7.3.4.1 Obtención de metilglicósidos acetilados**

La derivatización de los monosacáridos a metilglicósidos acetilados se realizó hidrolizando y metilando con 1 ml de HCl 1 M en metanol una muestra de 1 mg de LPS purificado a 80°C durante 20 horas en un proceso llamado metanolisis. De esta manera, se forman *O*-metilglicósidos en los que el hidroxilo anomérico ha sido sustituido por un metil. A continuación, para eliminar los ácidos grasos, se añadió 1 ml de hexano y se centrifugó durante 3 minutos a 3000 rpm. La fase superior, correspondiente a la lipídica, se descartó y, a la fase orgánica, se le volvió a añadir hexano y se volvió a centrifugar, repitiendo el proceso dos veces más. Finalmente, la fase orgánica se secó bajo flujo de aire para su posterior análisis.

A continuación, se pasó a realizar la peracetilación de los metilglicósidos. Para ello, se trató la muestra con una solución de anhídrido acético (0,1 ml) en piridina (0,2 ml)

durante 30 minutos a 100°C. Tras secar la muestra con una corriente de nitrógeno, se resuspendió en 0,8 ml de cloroformo, se añadió el mismo volumen de agua desionizada y se centrifugó 3 minutos a 3000 rpm y se descartó la fase superior acuosa. Añadiendo de nuevo agua desionizada se realizaron dos nuevos lavados y el producto final se secó con una corriente de nitrógeno. La muestra se resuspendió finalmente en 40 µl de metanol y se utilizó 1 µl para su análisis por GLC y GLC-MS.

#### **3.7.3.4.2 Obtención de acetatos de alditol parcialmente metilados**

Para realizar la derivatización de los azúcares neutros a acetatos de alditol parcialmente metilados, se utilizó un método que permite conocer las posiciones implicadas en los enlaces de los azúcares para formar el oligosacárido. Una muestra de 0,5 mg de LPS purificado se disolvió en 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) y se añadió un exceso de NaOH en polvo. A continuación, se insufló nitrógeno seco, se precintó y se agitó durante 1 hora a 20°C para alcalinizar la muestra. La permetilación de los hidroxilos libres se llevó a cabo añadiendo, a continuación, 0,5 ml de CH<sub>3</sub>I frío y manteniendo la muestra en agitación a 20°C durante 1 hora más. Se añadió agua desionizada y los productos metilados se obtuvieron añadiendo igual volumen de cloroformo a la muestra, centrifugando a 3000 rpm durante 3 minutos y descartando la fase acuosa superior. Se realizaron dos lavados más de la fase orgánica añadiendo igual volumen de agua desionizada y centrifugando de la misma manera, y el extracto final se secó con una corriente de nitrógeno seco.

Los oligosacáridos metilados obtenidos se hidrolizaron con ácido trifluoroacético (TFA) 2 M durante 2 horas a 120°C, el cual se evaporó después con una corriente de nitrógeno hasta secar la muestra. A continuación, se procedió a la reducción con NaBH<sub>4</sub> del grupo carbonilo de la forma abierta de los monosacáridos, el cual da lugar al carbono anomérico de la correspondiente forma hemiacetálica, de manera que los monosacáridos se reducen a alditoles. Para ello, se resuspendió la muestra en 0,5 ml de agua desionizada y se añadieron 2 mg de NaBH<sub>4</sub>. Tras 4 horas a 25°C, para eliminar el exceso de agente reductor, se añadió 1 ml de ácido acético y se secó la muestra con una corriente de nitrógeno. A continuación, se realizaron tres lavados con ácido acético al 5% en metanol y dos lavados con metanol, agitando en cada lavado y secando cada vez con una corriente de nitrógeno para eliminar el ácido bórico.

Posteriormente, se llevó a cabo la acetilación de los alditoles obtenidos, para lo cual se trató la muestra con una solución de anhídrido acético en piridina y se procedió de la misma manera que para la acetilación de los metilglicósidos (ver apartado 3.7.3.4.1).

La muestra también se resuspendió en 40  $\mu$ l de metanol y se utilizó 1  $\mu$ l para su análisis por GLC y GLC-MS.

#### **3.7.3.4.3 Cromatografía de gas-líquido (GLC)**

Las muestras preparadas tal y como se ha descrito en los apartados anteriores (3.7.3.4.1 y 3.7.3.4.2) se analizaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5880 equipado con una columna capilar HP-5ms de sílice fundida (30 m x 0,25 mm; 0,25 $\mu$ m de grosor de película) y un detector de ionización de llama, utilizando He como gas portador. El programa de temperaturas fue de 150°C durante 3 minutos y, a continuación, 5°C/minuto hasta 320°C.

#### **3.7.3.4.4 Cromatografía de gas-líquido acoplada a espectrometría de masas (GLC-MS)**

Las muestras preparadas tal y como se ha descrito en los apartados anteriores (3.7.3.4.1 y 3.7.3.4.2) se analizaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5989 A equipado con una columna capilar HP-5ms de sílice fundida (30 m x 0,25 mm; 0,25 $\mu$ m de grosor de película), utilizando He como gas portador y el siguiente programa de temperaturas: 150°C durante 3 minutos y, a continuación, 5°C/minuto hasta 320°C. La detección se realizó, en este caso, mediante el espectrómetro de masas NERMAG R10-10L, con analizador de cuadrupolo, acoplado al cromatógrafo, en el cual se llevó a cabo la ionización de la muestra mediante impacto electrónico a 70 eV.

#### **3.7.3.5 Espectrometría de masas con ionización por *electrospray* (ESI-MS)**

Un espectrómetro de masas consta de tres componentes básicos: una fuente de iones, que ioniza la muestra, un analizador, que separa mediante un campo magnético o eléctrico fuerte los iones que han sido generados de acuerdo con su relación masa/carga ( $m/z$ ), y un detector, que produce una señal eléctrica proporcional al número de iones que llegan.

Los análisis se realizaron mediante espectrometría de masas con ionización por *electrospray* (electronebulización) (ESI-MS). Este tipo de ionización suave de la muestra permite obtener iones moleculares gaseosos altamente cargados y produce poca

fragmentación. Los iones se forman por desolvatación de diminutas gotas cargadas eléctricamente generadas a partir de la solución del analito que es sometida a un fuerte campo eléctrico.

Se utilizó un espectrómetro de masas APEX II (Bruker Daltonics) con transformada de Fourier y analizador de resonancia de iones-ciclotrón (FT-ICR-MS) equipado con un imán blindado de intensidad de campo de 7 teslas (T) y una fuente de ionización por *electrospray* Apollo. En los analizadores de resonancia de iones-ciclotrón, los iones en órbita atrapados en una celda bajo influencia de un campo magnético, al ser sometidos a una energía de radiofrecuencia, inducen una señal cuya frecuencia es inversamente proporcional a los valores  $m/z$ . Las frecuencias se descodifican matemáticamente mediante técnicas de transformada de Fourier y se mejora la relación señal/ruido.

La muestra oligosacáridica obtenida a partir del fraccionamiento mediante GPC de los productos de la hidrólisis ácida (ver apartado 3.7.3.1) del LPS (ver apartado 3.7.3.2) y la muestra obtenida de la hidrólisis básica (ver apartado 3.7.3.3) del LPS una vez desalada (ver apartado 3.7.3.2), se resuspendieron en una mezcla de 2-propanol, agua y trietilamina (50:50:0,001) a una concentración de unos 10 ng/ $\mu$ l. El flujo de muestra inyectada en el capilar fue de 2  $\mu$ l/min, el voltaje de la entrada del capilar fue de 3,8 kV, la temperatura del gas de secado se ajustó a 150°C y el voltaje de la salida del capilar fue de -100 V y, en ocasiones, de -200 V, para conseguir una mejor intensidad de señal.

Los espectros de masas se obtuvieron utilizando patrones provistos por el fabricante y la escala de masas se calibró por medio de LPS de tipo R con estructuras conocidas.

La espectrometría de masas se llevó a cabo en modo negativo y, para facilitar la interpretación, los espectros que mostraban varios estados de carga para cada componente fueron simplificados mediante el programa *XMASS 6.0.0* suministrado por Bruker (deconvolución de las cargas), de manera que los números que se muestran hacen referencia a las masas moleculares monoisotópicas calculadas por el programa.

### **3.7.4 Métodos inmunológicos**

#### **3.7.4.1 Transferencia a nivel colonial e inmunodetección del LPS**

Los mutantes por inserción del transposón mini-Tn5::Km1 de *A. hydrophila* AH-3 (ver apartado 3.8.13.1) se sembraron ordenadamente en placas de TSA con kanamicina y

se incubaron a 30°C durante 6 horas. Transcurrido este tiempo, se mantuvieron 30 minutos a 4°C para facilitar la posterior transferencia de las colonias, la cual se llevó a cabo por simple contacto (1 min) a membranas de nitrocelulosa de 85 mm de diámetro y 0,45 µm de tamaño de poro (Millipore). Una vez transferidas las colonias, se secaron las membranas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Todas las incubaciones y lavados que siguieron se llevaron a cabo en agitación suave y a temperatura ambiente. Los lugares de unión inespecífica se bloquearon incubando las membranas con tampón de bloqueo durante 1 hora. Después de dos lavados de 10 minutos cada uno con tampón de lavado, las membranas se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo primario (suero anti-O:34, (Merino *et al.*, 1992c)), diluido 1:1000 en tampón de bloqueo al que se le añadió 0,5% de Tween-20 (USB), y, seguidamente, se efectuaron tres lavados de 10 minutos con tampón de lavado para eliminar el anticuerpo no unido. A continuación, se sumergieron, durante 1 hora, en una solución que contenía el anticuerpo secundario, inmunoglobulina G de cabra anti-conejo conjugada con fosfatasa alcalina, diluido 1:1000 en tampón de bloqueo con Tween-20 al 0,5%, y se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con tampón de lavado. Para proceder al revelado, se realizaron tres lavados de 5 minutos con tampón TBS 1X y otros tres con tampón 3 para alcalinizar el medio. La reacción cromática de la fosfatasa alcalina se produjo por adición de los sustratos NBT (disodio-nitroazul tetrazolio) (USB) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) (AppliChem). Para ello, las membranas se sumergieron en una solución formada por 10 ml de tampón 3 con 33 µl de solución BCIP y 44 µl de solución NBT y se protegieron de la luz. La reacción se detuvo mediante la adición de tampón de parada.

<b>Tampón TBS 10X</b>		<b>Tampón de bloqueo</b>		<b>Tampón de lavado</b>	
Tris-HCl pH 7,5	0,5 M	Tampón TBS	1X	Tampón TBS	1X
NaCl	1,5 M	BSA <sup>1</sup>	1%	Tween-20	0,5%

<sup>1</sup> BSA: albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich)

<b>Tampón 3</b>		<b>Solución BCIP</b>		<b>Solución NBT</b>		<b>Tampón de parada</b>	
Tris-HCl pH 9,5	0,1 M	BCIP <sup>1</sup>	50 mg/ml	NBT <sup>2</sup>	75 mg/ml	EDTA	5 mM
NaCl	0,1 M					Tris-HCl pH 7,5	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM						

<sup>1</sup> BCIP: disuelto en DMF

<sup>2</sup> NBT: disuelto en 70% de DMF y 30% de agua.

## **3.8 Técnicas de genética molecular**

### **3.8.1 Aislamiento de ácidos nucleicos**

#### **3.8.1.1 Aislamiento del ADN genómico**

Para el aislamiento de ADN genómico se utilizaron dos métodos en función de la cantidad y la pureza requeridas. La obtención de gran cantidad de ADN genómico se llevó a cabo según el método descrito por Marmur (Marmur, 1961) basado en una lisis celular con SDS y una posterior precipitación con perclorato sódico 5 M. En el caso de requerirse una elevada pureza, se utilizó el *kit* de Invitrogen para aislamiento de ADN genómico (*Easy-DNA Kit, Genomic DNA Isolation*), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

#### **3.8.1.2 Aislamiento del ADN plasmídico**

Para el aislamiento de ADN plasmídico se emplearon diferentes métodos según el número de copias del plásmido, la cepa portadora y la pureza requerida para los procedimientos posteriores.

Para aislar el ADN plasmídico de *Aeromonas* y para obtener plásmidos de medio o bajo número de copias de otras cepas, sin requerir una elevada pureza, se utilizó el método basado en la lisis alcalina de Birnboim y Doly, 1979, descrito por Maniatis (Maniatis *et al.*, 1982), con las modificaciones añadidas por Martínez y de la Cruz, 1988. En las extracciones de elevada pureza, empleando frecuentemente a *E. coli* como cepa hospedadora, se utilizaron columnas de purificación de ADN plasmídico *GFX Micro Plasmid Prep Kit* (GE Healthcare), para plásmidos de medio o alto número de copias, y *Qiagen Plasmid Midi-Prep Preparations* (Qiagen), para plásmidos de bajo número de copias o para obtener gran cantidad de ADN, siguiendo, en ambos casos, las recomendaciones de las casas comerciales.

#### **3.8.1.3 Aislamiento del ARN**

El aislamiento del ARN total se realizó mediante el método del reactivo TRIzol<sup>®</sup> (isotiocianato de guanidina/fenol) (Chomczynski, 1993) de Invitrogen siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial.



El ARN obtenido se trató con DNasa I RNasa-*free Amplification Grade* (Invitrogen) para eliminar los posibles restos de ADN de la muestra, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Por último, la ausencia de ADN contaminante en la muestra de ARN se determinó mediante una PCR control con cebadores específicos.

### 3.8.2 Purificación del ADN mediante extracción fenólica

La fenolización del ADN, en la que se extrae la contaminación proteica, se utilizó cuando se obtuvo el ADN genómico mediante el método de Marmur o al obtener el ADN plasmídico por lisis alcalina (ver apartado 3.8.1.2). Para ello, se resuspendieron las muestras en tampón TE 1X y se añadió el mismo volumen de fenol equilibrado a pH 7,9, agitando suavemente hasta obtener una emulsión. Tras separar las dos fases mediante centrifugación a 13000 x g durante 3 minutos, se recuperó la fase superior (acuosa) a la que se añadió igual volumen de una mezcla 1:1 fenol:cloroformo (el cloroformo mezclado con isoamilalcohol en una proporción 24:1), se agitó y se centrifugó de igual manera que en el paso anterior. Recuperada de nuevo la fase acuosa, se repitió el proceso añadiendo igual volumen de cloroformo (cloroformo:isoamilalcohol 24:1). La última fase acuosa se sometió a un proceso de precipitación del ADN (ver apartado 3.8.3).

#### **Tampón TE 1X**

Tris-HCl pH 7,5	10 mM
EDTA pH 8	1 mM

### 3.8.3 Precipitación del ADN

La precipitación del ADN se realizó mediante el procedimiento descrito por Maniatis (Maniatis *et al.*, 1982). Se añadió acetato sódico 3 M, pH 4,8 en una proporción 1:10 respecto al volumen en el que se encontraba disuelto el ADN y, al volumen resultante, se le añadió etanol absoluto frío en una relación 2:1. Se mezcló suavemente y se mantuvo durante un mínimo de 2 horas a una temperatura de -20°C. A continuación, se centrifugó a 13000 x g durante 15 minutos a una temperatura de 4°C y se descartó el sobrenadante. Después de dos lavados de 10 minutos con etanol 70% frío, se secó la muestra en una centrífuga de vacío (*Speed-Vac* modelo SPD 101B-230, Savant Instruments Inc.).

### 3.8.4 Electroforesis del ADN en geles de agarosa

Para la electroforesis del ADN, se utilizaron geles con un porcentaje del 0,5 al 2% de agarosa, en función del tamaño de los fragmentos de ADN a separar (Maniatis *et al.*, 1982). La agarosa se disolvió en tampón TAE 1X, que también fue usado en las cubetas de electroforesis. Para visualizar el ADN, se añadió bromuro de etidio (agente intercalante) al gel, a una concentración de 0,5 µg/ml. Las muestras de ADN se mezclaron con el tampón de muestras 6X en una proporción 5:1 para su carga en el gel. Junto con ellas, también se cargaron marcadores de peso molecular: Fago  $\lambda$  *Hind*III de Bioron y/o Ecoladder de Ecogen o 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen.

La electroforesis se realizó en cubetas horizontales *Mini* de Ecogen aplicando voltajes de entre 5 y 10 V/cm (Lewis, 1986). Los geles se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador de luz ultravioleta ( $\lambda= 302$  nm; *Image Master*<sup>®</sup> *VDS* de Pharmacia Biotech).

Tampón TAE 50X		Tampón de muestras 6X	
Tris	2 M	Sacarosa	40%
EDTA pH 8	50 mM	Azul de bromofenol	0,25%
Ácido acético glacial	1 M		

### 3.8.5 Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación del ADN, dependiendo de la precisión deseada, se realizó mediante dos métodos distintos: la visualización de la intensidad de fluorescencia en un gel de agarosa o la valoración espectrofotométrica. La cuantificación del ARN, por requerir una mayor precisión, se llevó a cabo, únicamente, mediante éste último método.

#### 3.8.5.1 Cuantificación en geles de agarosa

La cuantificación del ADN se realizó a partir de la intensidad de fluorescencia emitida por el bromuro de etidio intercalado entre sus bases cuando es irradiado con luz ultravioleta, la cual es directamente proporcional a la masa total de ADN. En un mismo gel de agarosa, se cargaron las muestras de ADN y marcadores de ADN de peso molecular y concentración conocidos (Fago  $\lambda$  *Hind*III de Bioron y/o Ecoladder de Ecogen). La

concentración de ADN fue cuantificada por comparación entre la intensidad de las bandas de las muestras respecto a las del marcador.

### 3.8.5.2 Cuantificación espectrofotométrica

Cuando fue necesaria una cuantificación más precisa, se utilizó el espectrofotómetro modelo *GeneQuant pro* de Amersham Biosciences. Se realizaron medidas de absorbancia a 260 y 280 nm. La relación entre los valores obtenidos a estas longitudes de onda da una idea de la pureza de la muestra de ADN o de ARN.

Si  $DO_{260}/DO_{280} < 1,8$  o  $< 2$ , según si la muestra es de ADN o de ARN, respectivamente, indica que hay impurezas en la muestra y que la cuantificación no es precisa.

Si  $DO_{260}/DO_{280} \geq 1,8$  o  $\geq 2$ , indica que la muestra de ADN o de ARN, respectivamente, es pura y permite calcular la concentración, teniendo en cuenta que, en una cubeta de longitud de paso de 10 mm:

1 Unidad de  $DO_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$  de ADN

1 Unidad de  $DO_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$  de ARN

### 3.8.6 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Tras la electroforesis en geles de agarosa, se recortaron las bandas deseadas y se purificó el ADN mediante el *kit QIAEX* (Qiagen), según las recomendaciones del fabricante.

### 3.8.7 Procesamiento enzimático del ADN

#### 3.8.7.1 Restricciones

Se siguieron las condiciones de restricción e inactivación recomendadas por la casa comercial suministradora de la enzima de restricción, GE Healthcare o Bioron. En general, la cantidad a digerir de ADN se resuspendió en agua desionizada y se añadió el tampón de restricción a la concentración indicada y la enzima correspondiente. Después, se incubó a la temperatura adecuada, generalmente  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 2 horas.

### **3.8.7.2 Desfosforilación de vectores**

Con el fin de eliminar los grupos fosfato 5' terminales de los vectores digeridos y evitar su recircularización en las reacciones de ligación, se les realizó un tratamiento previo con fosfatasa alcalina (USB) según las condiciones descritas por Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989).

### **3.8.7.3 Ligación**

Las reacciones de ligación se realizaron en una relación 3:1 (inserto:vector), aumentándola con el tamaño del inserto o en el caso de fragmentos de ADN con extremos romos hasta 5:1. La mezcla de inserto y vector se incubó a 65°C durante 5 minutos para relajar el ADN, se puso en hielo y se añadió la T4 ADN ligasa y el tampón de ligación (Invitrogen). Las incubaciones se realizaron toda la noche a 16-20°C o a 4°C en el caso de reacciones de más de 24 horas. Las reacciones de ligación a pGEM-T *easy* se realizaron según las instrucciones de la casa comercial (Promega). Para ligaciones más rápidas y eficientes, se utilizó la *Fast-Link*<sup>TM</sup> ADN ligasa (Epicentre® Biotechnologies), según las recomendaciones de la casa comercial.

### **3.8.7.4 Obtención de extremos romos**

Para obtener extremos romos a partir de moléculas de ADN con extremos 5' protuberantes, se utilizó el fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa (USB), según las indicaciones de la casa comercial.

## **3.8.8 Métodos de transferencia del ADN plasmídico**

La transferencia de ADN plasmídico a las cepas de *Aeromonas* spp. se realizó mediante procesos de conjugación triparental y la transferencia de ADN plasmídico a cepas de *E. coli* y de *K. pneumoniae* 52145 se realizó mediante transformación por electroporación.

### **3.8.8.1 Conjugación en medio sólido**

La conjugación triparental se llevó a cabo mezclando, en una placa de LB, crecimientos en fase estacionaria de la cepa receptora, la cepa facilitadora de la conjugación (*E. coli* HB101 con el plásmido pRK2073) y la cepa donadora en una proporción 5:1:1 (volumen de cultivo). La placa se incubó un mínimo de 6 horas a 30°C o toda la noche si se quería aumentar la eficiencia de la conjugación. Las bacterias se

recogieron en 1 ml de TSB, se sembraron diversas diluciones en placas de TSA suplementadas con los antibióticos necesarios para la selección de los transconjugantes, y se incubaron a la temperatura óptima de la cepa receptora.

### **3.8.8.2 Transformación por electroporación**

Las cepas bacterianas de *E. coli* y de *K. pneumoniae* 52145 se prepararon para ser electrotransformadas siguiendo el método descrito por Dower (Dower *et al.*, 1988) y, a continuación, se mezclaron con el ADN. Se utilizó el electroporador modelo *Electro Cell Manipulator 600 (BTX Electroporation System)* y cubetas *BTX* de 2 mm (Biotechnologies & Experimental Research Inc.) y se aplicó un voltaje de descarga de 2 kV y una resistencia de 129  $\Omega$  durante 5 milisegundos. Las células se recogieron en 1 ml de LB y se incubaron 1 hora a la temperatura adecuada, según la cepa y/o plásmido introducido, para facilitar la expresión de los marcadores fenotípicos transmitidos. Transcurrido este tiempo, se sembraron diferentes diluciones en placas de LB con los antibióticos y/o suplementos necesarios para la selección de las células transformadas.

### **3.8.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Todas las reacciones de amplificación se realizaron en termocicladores *GeneAmp PCR System 2400* de Perkin Elmer o *Primus 96 Advanced Gradient* de PeqLab Biotechnologie GmbH.

#### **3.8.9.1 Amplificación de fragmentos de ADN**

Para amplificar fragmentos de ADN de hasta 4 Kb se utilizó la *EcoTaq* ADN polimerasa de Ecogen y los tampones proporcionados, una mezcla de dNTP suministrada por Bioron y agua desionizada tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) de Gibco. Como molde, se utilizó ADN purificado (ver apartados 3.8.1.1 y 3.8.1.2) o colonias lisadas mediante el *kit* de lisis *Colony Fast-Screen<sup>TM</sup> kit (PCR-Screen)* de Epicentre® Biotechnologies.

La composición de la mezcla de reacción de PCR y el programa de amplificación se detallan en la siguiente tabla:

Mezcla de la reacción de PCR	Programa de amplificación
50-100 ng de ADN molde purificado	1 CICLO:
0,5 µM cebador (cada uno)	- 3 minutos a 94°C (desnaturalización del ADN)
Tampón de PCR 1X	30-35 CICLOS:
2 mM <sup>1</sup> MgCl <sub>2</sub>	- 45 segundos a 94°C (desnaturalización del ADN)
0,2 mM mezcla de dNTP	- 30 segundos a T <sub>m</sub> <sup>3</sup> (hibridación ADN/cebador)
0,5 U <i>Taq</i> ADN polimerasa	- 1 minuto/ Kb de ADN a amplificar a 72°C
5% DMSO <sup>2</sup>	1 CICLO:
Agua desionizada DEPC hasta 50 µl	- 10 minutos a 72°C

<sup>1</sup> La concentración de MgCl<sub>2</sub> se optimizó en algunas ocasiones.

<sup>2</sup> Se añadió un 5% de DMSO para evitar la formación de estructuras secundarias del ADN en algunos casos.

<sup>3</sup> Temperatura de hibridación ADN/cebador, dependiente de los cebadores utilizados.

Para la amplificación de fragmentos mayores de 4 Kb, o cuando se necesitó una mayor especificidad y fidelidad de secuencia, se usó la *AccuPrime<sup>TM</sup> Taq* ADN polimerasa *High Fidelity* de Invitrogen y las condiciones siguientes:

Mezcla de la reacción de PCR	Programa de amplificación
50-100 ng de ADN molde purificado	1 CICLO:
0,5 µM cebador (cada uno)	- 2 minutos a 94°C (desnaturalización del ADN)
Tampón I <i>AccuPrime<sup>TM</sup></i> 1X	35 CICLOS:
1 U <i>AccuPrime<sup>TM</sup> Taq High Fidelity</i>	- 30 segundos a 94°C (desnaturalización del ADN)
Agua desionizada DEPC hasta 50 µl	- 30 segundos a T <sub>m</sub> <sup>2</sup> (hibridación ADN/cebador)
	- 1 minuto/ Kb de ADN a amplificar a 72°C

<sup>1</sup> El tampón I *AccuPrime<sup>TM</sup>* 10X lleva incorporados la mezcla de dNTP 2 mM, quedando la concentración final a 0,2 mM, y el MgSO<sub>4</sub> 20 mM, quedando a una concentración final de 2 mM. En caso de tener que optimizar la cantidad de MgSO<sub>4</sub>, el *kit* incluye una solución a 50 mM.

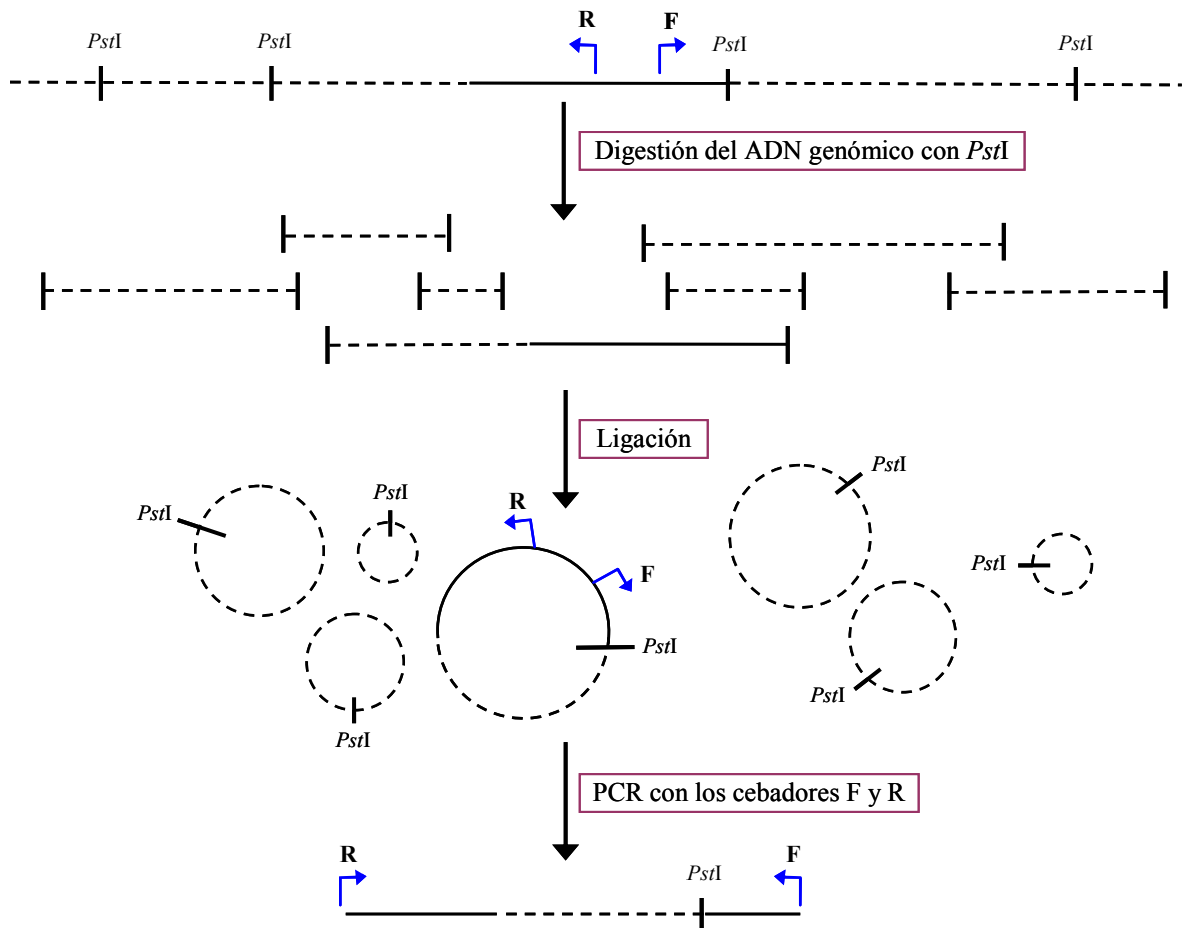
<sup>2</sup> Temperatura de hibridación ADN/cebador, en función de los cebadores utilizados.

### 3.8.9.1.1 Amplificación de fragmentos de ADN por PCR directa

La síntesis de fragmentos de ADN *in vitro* se realizó, normalmente, mediante PCR directa, la cual consiste en la amplificación de una zona central de la secuencia de ADN localizada entre dos cebadores externos, directo y reverso, cuya extensión avanza hacia el centro de la molécula.

### 3.8.9.1.2 Amplificación de fragmentos de ADN por PCR inversa

La técnica de la PCR inversa (IPCR) se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Ochman (Ochman *et al.*, 1988). Permite la amplificación de un fragmento de ADN del que solamente se conoce parte de su secuencia interna.



**Figura 3.1.** Esquema del procedimiento de la IPCR. En el ejemplo, el ADN genómico es digerido con *PstI*. El ADN de secuencia conocida se representa con una línea continua y la secuencia desconocida se ha marcado en línea

Primeramente, se realizó una digestión total del ADN genómico con la enzima de restricción adecuada y, una vez precipitado y lavado, se resuspendió en agua desionizada y se religó, sin realizar la incubación a 65°C, con el fin de obtener moléculas circulares de ADN ligadas sobre sí mismas (ver apartado 3.8.7.3). Tras precipitar, lavar y resuspender en agua desionizada, este material genómico se utilizó como ADN molde en una PCR realizada con dos cebadores divergentes diseñados de manera que su extensión avance hacia el exterior de la molécula de ADN. De este modo, se realiza la amplificación de un fragmento que incluye las secuencias localizadas a 5' y a 3' de la región en la que se hallan los cebadores (Fig. 3.1). Esta PCR se realizó con la *AccuPrime<sup>TM</sup> Taq* ADN polimerasa

con un tiempo máximo de extensión de 10 minutos al desconocer el tamaño de los fragmentos que se amplificarían (ver apartado 3.8.9.1). Entre los cebadores divergentes diseñados para la PCR no debe estar presente la diana de restricción para la enzima seleccionada.

Este sistema se empleó con el fin de secuenciar el producto de la IPCR e ir completando la secuencia a 5' y a 3' a partir de una región de ADN conocida (ver apartado 3.8.9.2).

### 3.8.9.2 Secuenciación de fragmentos de ADN

Para la secuenciación de fragmentos de ADN, se utilizó el protocolo descrito en *ABI PRISM Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* de Applied Biosystems y el sistema analítico CEQ™ 8000 (Beckman-Coulter) disponible en los Servicios Científico-Técnicos (SCT) de la Universidad de Barcelona. Este sistema se basa en el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977), que consiste en la síntesis de moléculas de ADN en presencia de didesoxinucleótidos (ddNTP) marcados con diferentes fluorocromos y que terminan la síntesis de ADN. Como molde, se utilizaron fragmentos de ADN purificados a partir de geles de agarosa (ver apartado 3.8.6) o ADN plasmídico (ver apartado 3.8.1.2) y, en caso de necesitarse, se usó agua desionizada tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC) de Gibco. La composición de la mezcla de reacción y el programa utilizado para la secuenciación se especifican en la siguiente tabla:

Mezcla de la reacción de secuenciación	Programa de amplificación
25-500 ng de ADN molde purificado	1 CICLO:
3,2 pmol cebador	- 4 minutos a 96°C
2 µl <i>Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Ready Reaction premix</i> <sup>1</sup>	25 CICLOS:
Agua desionizada DEPC hasta 10 µl	- 30 segundos a 96°C
	- 15 segundos a T <sub>m</sub> <sup>2</sup>
	- 4 minutos a 60°C

<sup>1</sup> Contiene ADN polimerasa termoestable, tampón, mezcla de dNTP y ddNTP.

<sup>2</sup> La temperatura de hibridación ADN/cebador se determinó generalmente según la siguiente fórmula:  
 $[2 \times (A+T)] + [4 \times (G+C)]$

El cromatograma se visualizó con el programa *Chromas v. 1.43* (C. McCarthy, *School of Biomolecular and Biomedical Sciences*, Brisbane, Australia).



### 3.8.9.3 Transcripción reversa y PCR (RT-PCR)

Para la realización de RT-PCR, se utilizó ARN total tratado con DNasa I RNasa-free *Amplification Grade* (Invitrogen) (ver apartado 3.8.1.3) y se siguió el protocolo indicado en el kit *ThermoScript™ RT-PCR System* de Invitrogen.

La síntesis del ADN complementario (ADNc) se llevó a cabo utilizando las mezclas de reacción y los programas de temperatura siguientes:

Mezcla de la reacción de RT	Programa de amplificación
1 µg de ARN	
50 ng del cebador <i>random</i>	5 minutos a 65°C (desnaturalización del ARN)
Agua desionizada DEPC hasta 10 µl	
↓	↓
1 mM dNTP <i>Mix</i>	
Tampón de síntesis de ADNc 1X	10 minutos a 25°C
5 mM DTT <sup>1</sup>	45 minutos a 50°C (temperatura de hibridación ARN/cebador)
40 U <i>RNaseOUT™</i>	5 minutos a 85°C (inactivación de la retrotranscriptasa)
15 U retrotranscriptasa <i>ThermoScript™ RT</i>	
Agua desionizada DEPC hasta 20 µl	
↓	↓
2 U RNasaH	20 minutos a 37°C (degradación del ARN)

<sup>1</sup> DTT: ditioneitol

Como control negativo, se realizó en paralelo una reacción de RT en la que sólo se añadió el ARN y agua desionizada tratada con DEPC.

Una décima parte del ADNc sintetizado (100 ng) fue amplificado, posteriormente, mediante la *AccuPrime™ Taq* ADN polimerasa *High Fidelity* de Invitrogen (ver apartado 3.8.9.1) utilizando cebadores específicos para la amplificación de los ARNm de interés.

El control negativo de la reacción de RT también fue sometido a la reacción de PCR.

#### 3.8.9.3.1 RT-PCR semicuantitativa

Para la realización de RT-PCR semicuantitativa, se llevó a cabo la reacción de RT (ver apartado 3.8.9.3) junto con un control negativo al que sólo se añadió ARN y agua desionizada tratada con DEPC.

Para la PCR semicuantitativa, una décima parte del ADNc sintetizado (100 ng) fue amplificado, posteriormente, mediante la *AccuPrime<sup>TM</sup> Taq* ADN polimerasa *High Fidelity* de Invitrogen en un volumen final de 100 µl (ver apartado 3.8.9.1) utilizando cebadores específicos para la amplificación de los ARNm de interés. Para analizar la cantidad de ADNc amplificado, se obtuvieron alícuotas de 15 µl en los ciclos 15, 20, 25, 30 y 35 de la PCR de cada una de las muestras.

Como control de los niveles de transcripción, se utilizaron cebadores del gen *rrsA* que codifica el ARNr 16S de *A. hydrophila*. En este caso, se utilizó una cantidad de ADNc equivalente a 0,10 ng y se obtuvieron alícuotas en los ciclos 10, 15, 20 y 25 de la PCR, respectivamente.

El control negativo de la reacción de RT también fue sometido a una PCR de 35 ciclos, tanto con los cebadores específicos como con los cebadores del gen *rrsA*.

Las alícuotas de los productos de PCR obtenidos en cada ciclo fueron analizadas mediante electroforesis en un gel de agarosa y se estimó la intensidad de las bandas de forma comparativa en los ciclos de amplificación en los que la reacción no estaba saturada, dentro de la fase exponencial. De esta manera, se pueden detectar variaciones de intensidad debidas a cambios en los niveles de transcripción que no aparecen en las bandas del control con el gen *rrsA*.

#### **3.8.9.4 Amplificación rápida de extremos 5' del ADNc (5' RACE)**

Con el fin de hallar el inicio de transcripción del gen *wzz* de *A. hydrophila* AH-3, se utilizó la metodología descrita en el *kit 5' RACE System Version 2.0* de Invitrogen.

Se obtuvo ARN total tratado con DNasa I RNasa-free *Amplification Grade* (Invitrogen) (ver apartado 3.8.1.3) y se sintetizó la primera cadena de ADNc, según el protocolo indicado en el *kit ThermoScript<sup>TM</sup> RT-PCR System* de Invitrogen, utilizando un cebador específico diseñado dentro del gen (GSP1).

En este caso, la mezcla de reacción y los programas de temperatura de la RT fueron los siguientes:

Mezcla de la reacción de RT	Programa de amplificación
0,5 µg de ARN	
0,5 µM del cebador GSP1	5 minutos a 65°C (desnaturalización del ARN)
Agua desionizada DEPC hasta 10 µl	
↓	↓
1 mM dNTP <i>Mix</i>	
Tampón de síntesis de ADNc	
5 mM DTT	45 minutos a 57°C (temperatura de hibridación ARN/cebador)
40 U <i>RNaseOUT</i> <sup>TM</sup>	5 minutos a 85°C (inactivación de la retrotranscriptasa)
15 U retrotranscriptasa <i>ThermoScript</i> <sup>TM</sup> RT	
Agua desionizada DEPC hasta 20 µl	
↓	↓
2 U RNasaH	20 minutos a 37°C (degradación del ARN)

A continuación, el ADNc obtenido fue purificado de la mezcla mediante las columnas S.N.A.P<sup>TM</sup> suministradas y, seguidamente, sometido al proceso de adición de una cola de citosinas en su extremo 3', utilizando la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) y dCTP según las instrucciones de la casa comercial.

Una quinta parte del ADNc resultante fue amplificado, posteriormente, mediante la *AccuPrime*<sup>TM</sup> Taq ADN polimerasa *High Fidelity* de Invitrogen (ver apartado 3.8.9.1) utilizando una concentración de 0,4 µM de cada cebador: un cebador específico dentro del gen anidado al cebador GSP1 (GSP2) y el cebador AAP (*Abridged Anchor Primer*) suministrado con el *kit*, cuya secuencia a 3', constituida por guaninas e inosinas, es complementaria a la cola de citosinas.

Por último, se realizó una segunda PCR anidada utilizando una dilución 1:100 de la PCR anterior y una concentración de 0,5 µM de los cebadores: un cebador específico anidado al cebador GSP2 (GSP3) y el cebador AUAP (*Abridged Universal Amplification Primer*) proporcionado con el *kit*, cuya secuencia es complementaria a la región 5' del cebador AAP (Fig. 3.2). El producto de esta PCR, una vez purificado, fue secuenciado con el cebador GSP3.

Después de cada paso, se comprobó mediante una PCR interna, utilizando la *EcoTaq* ADN polimerasa de Ecogen (ver apartado 3.8.9.1), que el ADNc estaba presente en la muestra y, antes de realizar la amplificación del ADNc con la cola de citosinas, también se

verificó que los cebadores AAP y AUAP del *kit* no presentaban uniones inespecíficas realizando una PCR con cada uno de ellos y un cebador interno del gen.

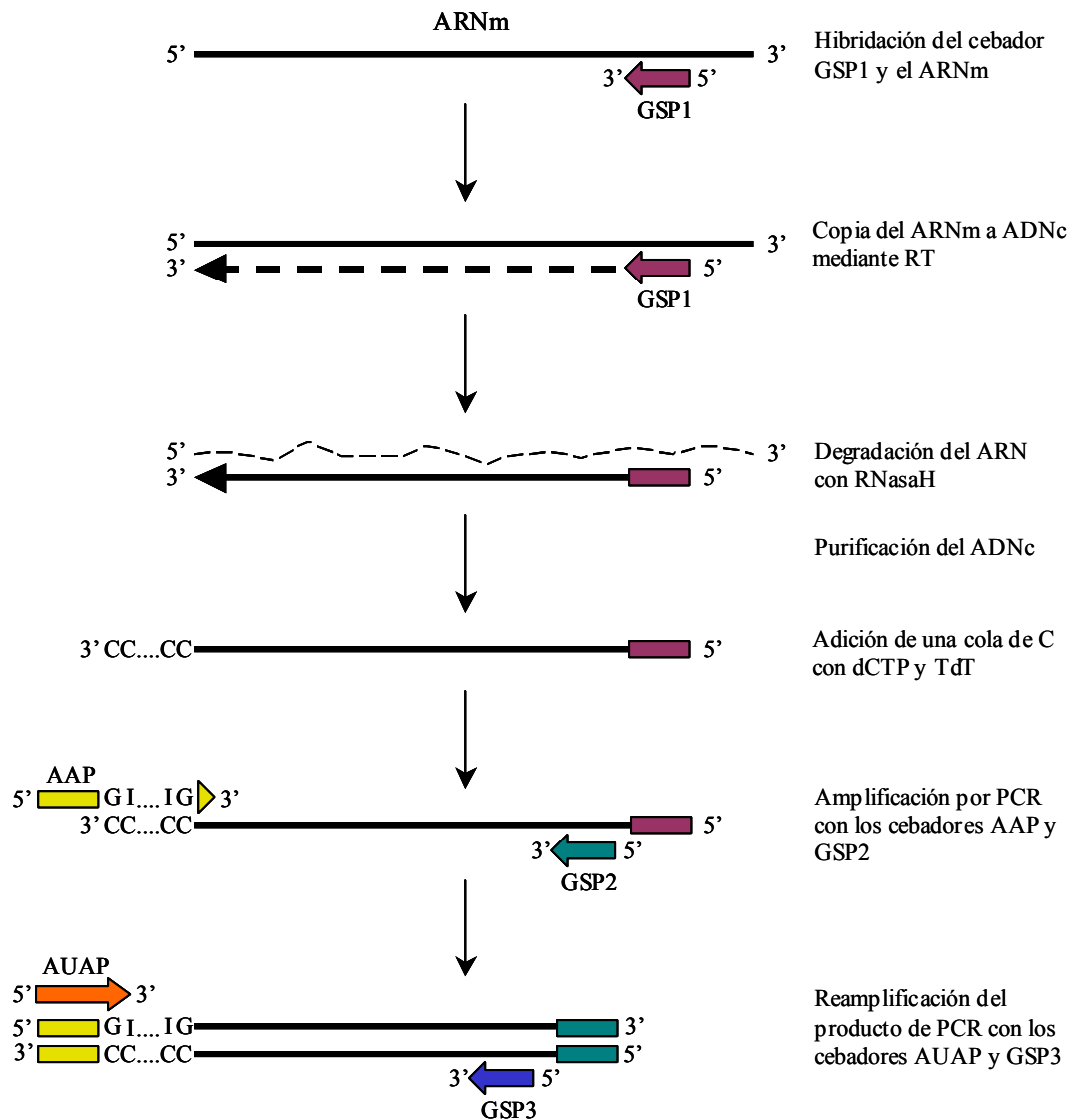


Figura 3.2. Esquema del protocolo de 5' RACE. Figura adaptada del manual *5' RACE System Version 2.0* de Invitrogen.

### 3.8.10 Programas informáticos utilizados para el análisis de secuencias

Para el estudio y análisis de las secuencias obtenidas se utilizaron diferentes programas informáticos. Se utilizó el programa informático *GCG (Wisconsin Package Version 9.0, Genetic Computer Group, Madison, Wisconsin)* para la localización de dianas para enzimas de restricción, detección de secuencias terminadoras y diseño de cebadores,

así como el programa *Seqaid II v. 3.81* (D. D. Rhoads y D. J. Roufa, *Molecular Genetics Laboratory, Center for basic Cancer Research, Kansas State University*, 1991). Para la detección de dianas para enzimas de restricción y la edición de las secuencias en general, también se usó el programa *BioEdit v. 7.0.1* (Hall, 1999). Para el diseño de cebadores también se empleó el programa *Primer3* (Rozen y Skaletsky, 2000) y para la traducción de secuencias de ADN a proteína se utilizaron los programas: *Vector NTI Advance 9.1.0* (Invitrogen) y *FramePlot v. 2.3.2 y 3.0beta* (Ishikawa y Hotta, 1999), con los que también se analizaron las pautas abiertas de lectura, las posibles secuencias de unión a ribosomas y el contenido de guaninas y citosinas (G+C) de la secuencia.

La búsqueda de secuencias de ADN y proteínas homólogas en las bases de datos GenBank, EMBL y *Protein Identification Resource* se realizó mediante el programa *BLAST* (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997) y los alineamientos entre secuencias se llevaron a cabo mediante el programa *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1994). La búsqueda de putativos promotores procarióticos  $\sigma^{70}$  se llevó a cabo con el programa para la predicción de promotores basado en el método NNPP (*Neural Network Promoter Prediction* (Reese, 2001) o con el algoritmo BPROM de Softberry (Softberry, Inc.).

Con el programa *ProtParam* de ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2005) se analizaron las principales características de las proteínas. Su agrupación en familias, según sus dominios conservados, se llevó a cabo con el programa *Pfam* de Sanger Center (Bateman *et al.*, 2002). La búsqueda de dominios conservados se realizó también mediante los programas *CD-Search* (Marchler-Bauer y Bryant, 2004) y *ProDom* (Servant *et al.*, 2002). Los perfiles de hidrofobicidad se obtuvieron según el método de Kyte y Doolittle, 1982, gracias a los programas *PSORTb v. 2.0* (Gardy *et al.*, 2005) y *TMHMM v. 2.0* (Krogh *et al.*, 2001), ambos de ExPASy, que detectaban la localización celular de la proteína y sus posibles regiones transmembrana, respectivamente. Mediante el programa *HMMTOP v. 2.0*, también de ExPASy, se determinaron los putativos dominios transmembrana de las proteínas en base a la distribución aminoacídica a lo largo de la secuencia proteica (Tusnady y Simon, 1998).

### **3.8.11 Construcción de una librería genómica**

Se realizó la digestión parcial del ADN cromosómico de la cepa *A. hydrophila* AH-3 con la enzima de restricción *Sau3A*. Se escogió esta enzima porque su frecuencia de

restricción es elevada al presentar una diana de 4 pb y, además, genera extremos cohesivos compatibles con los generados por las enzimas *Bam*HI y *Bg*III. La digestión parcial se realizó diluyendo a la mitad de manera seriada la cantidad de enzima añadida en cada reacción, manteniendo la cantidad de ADN genómico e incubando las mezclas durante 30 minutos a 37°C.

Tras el análisis de las restricciones mediante electroforesis en geles de agarosa, se escogieron aquellos fragmentos cuyo tamaño estaba comprendido entre 15-20 Kb y se ligaron al cósmido pLA2917 digerido con *Bg*III y desfosforilado. El posterior empaquetamiento *in vitro* en el fago  $\lambda$  e infección de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  se llevó a cabo según el protocolo del *kit* de empaquetamiento (*Gigapack III Gold Packaging Extract* de Stratagene).

### **3.8.12 Inmunodetección de fragmentos de ADN**

#### **3.8.12.1 Preparación de sondas**

El marcaje de las sondas se obtuvo, generalmente, mediante amplificación por PCR utilizando dNTP marcados con digoxigenina (Roche), una electroforesis del producto de la PCR en geles de agarosa y una posterior purificación del ADN amplificado a partir del gel. Alternativamente, se partió de fragmentos de ADN purificados a partir de geles de agarosa (ver apartado 3.8.6) y se marcaron mediante la incorporación al azar de dUTP-digoxigenina según la técnica del *random primer*, para lo cual se utilizaron las condiciones descritas en el *kit* de marcaje y detección de sondas no radioactivas de Amersham Biosciences.

#### **3.8.12.2 Colony blot**

Las colonias procedentes de una genoteca en pLA2917 se sembraron ordenadamente en placas de LB suplementadas con tetraciclina y se incubaron a 37°C durante 5-6 horas. Después, se mantuvieron 30 minutos a 4°C para facilitar la transferencia de las colonias por simple contacto (1 minuto) a membranas de nylon cargadas positivamente de 82 mm de diámetro y 1,2  $\mu$ m de poro (Boehringer Mannheim). Posteriormente, se secaron las membranas a temperatura ambiente durante 15 minutos y se realizaron, de forma secuencial, incubaciones de 3 minutos en SDS 10%, 15 minutos en solución desnaturizante, 15 minutos en solución neutralizante y 10 minutos en SSC 2X. Seguidamente, se fijó el ADN por iluminación ultravioleta en un *UV Crosslinker* de

Hoefer. Una vez fijado el ADN, se añadió sobre cada membrana una solución de 2 mg/ml de proteinasa K (Merk) en SSC 2X y se incubaron 1 hora a 37°C para eliminar los restos celulares. Transcurrido este tiempo, se colocaron las membranas entre papeles de filtro humedecidos con agua y, efectuando una cierta presión, los restos celulares se transfirieron al papel de filtro. Por último, se procedió a la hibridación y al revelado de las membranas según el método descrito en el *kit* de marcaje y detección de sondas de ADN no radioactivas de Boehringer Mannheim; las moléculas marcadas se detectan mediante inmunoensayo mediante un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche) que da lugar a una reacción cromática tras la adición de los sustratos NBT y BCIP. La reacción de revelado se realizó tal y como se describe en el apartado 3.7.4.1.

Solución desnaturalizante		Solución neutralizante		SSC 20X	
NaOH	0,5 M	NaCl	1,5 M	NaCl	3 M
NaCl	1,5 M	Tris-HCl	1 M	Na-citrato	0,3 M
		Ajustar pH a 7,4		Ajustar pH a 7	

### 3.8.12.3 *Dot blot*

El ADN se desnaturalizó 10 minutos a 100°C, se mantuvo en hielo 5 minutos y se depositó la muestra sobre membranas de nylon de 0,45 µm de poro, Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham Biosciences), dejándolas secar al aire antes de la fijación del ADN por iluminación ultravioleta en un *UV Crosslinker* de Hoefer. La hibridación y el revelado se realizaron según el método descrito en el *kit* de marcaje y detección de sondas de ADN no radioactivas de Boehringer Mannheim (ver apartado 3.8.12.2).

### 3.8.12.4 *Southern blot*

Las muestras de ADN que se pretendían hibridar con las sondas se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 0,7% en tampón TBE 1X de grosor menor al habitual para facilitar y minimizar el tiempo de transferencia. La transferencia a membranas de nylon de 0,45 µm de poro, Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham Biosciences), se llevó a cabo mediante el *Vacuum Blotting System* de Pharmacia Biotech y según las instrucciones de los fabricantes, tras lo cual, se procedió a la hibridación y al revelado siguiendo el método descrito en el *kit* de marcaje y detección de sondas de ADN no radioactivas de Boehringer Mannheim (ver apartado 3.8.12.2).

**Tampón TBE 1X**

Tris	89 mM
Ácido bórico	89 mM
EDTA pH 8,3	2 mM

### 3.8.13 Técnicas de mutagénesis

#### 3.8.13.1 Mutagénesis por inserción del transposón mini-Tn5::Km1

Para obtener mutantes por inserción del transposón mini-Tn5::Km1, se realizó la transferencia del transposón mediante conjugación triparental (ver apartado 3.8.8.1) entre la cepa portadora S<sub>17-1</sub>  $\lambda$ pir mini-Tn5::Km1, la receptora AH-405 (mutante espontáneo de AH-3 resistente a la rifampicina) y la cepa HB101 portadora del plásmido pRK2073 facilitador de la conjugación, seleccionándose los mutantes a 30°C en placas de TSA con rifampicina y kanamicina. El ADN flanqueante al mini-Tn5::Km1 de cada uno de los mutantes fue recuperado mediante digestiones con *EcoRI* (una diana en un extremo del transposón), *PstI* (una diana en el otro extremo) o *EcoRV* (el transposón no posee dianas) y ligado al vector pBCSK para secuenciarlo con cebadores de cada uno de los extremos del plásmido (M13for y T3) y de los extremos del transposón (ISI o ISO), con el fin de identificar el gen mutado.

#### 3.8.13.2 Mutagénesis dirigida por recombinación en un punto

La obtención de mutantes por recombinación en un punto se basó en clonar un fragmento interno de la región codificante del gen a mutar en el vector suicida pFS100 (Rubires *et al.*, 1997), un derivado Km<sup>r</sup> del plásmido pGP704 (Miller y Mekalanos, 1988), el cual codifica la región *mob* del plásmido pRP4, de manera que puede ser movilizado por conjugación, y cuyo origen de replicación (R6K) depende de la proteína  $\lambda$ pir. La construcción se transformó por electroporación a la cepa de *E. coli* MC1061 ( $\lambda$ pir), la cual sería utilizada para movilizarla a la cepa a mutar, resistente a rifampicina, mediante conjugación triparental (ver apartado 3.8.8.1). Al seleccionar las bacterias con rifampicina y kanamicina, y dado que el plásmido no puede replicarse en cepas que carecen de la proteína  $\lambda$ pir, las colonias resistentes presentaban, en su mayoría, el plásmido integrado en el cromosoma mediante recombinación homóloga. Esta recombinación en un punto genera en el cromosoma del microorganismo dos copias incompletas del gen a mutar (Fig. 3.3).



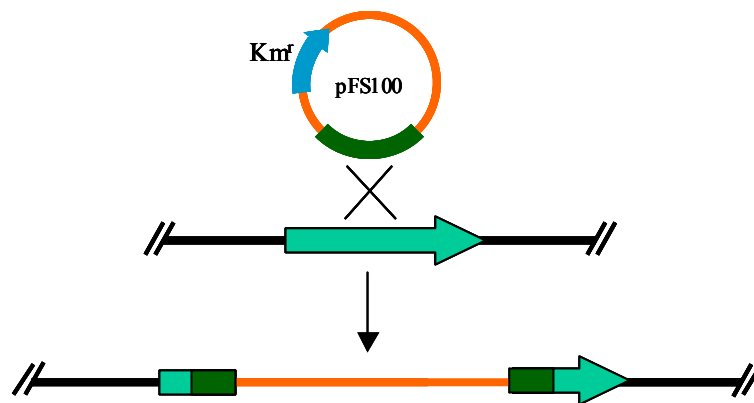


Figura 3.3. Esquema del funcionamiento del sistema de recombinación en un punto.

### 3.8.13.3 Mutagénesis dirigida por doble recombinación

Para generar mutaciones dirigidas pero minimizando los posibles efectos polares que la mutación pudiera provocar en la expresión del resto de los genes de una agrupación, se recurrió a la mutagénesis cromosómica dirigida por doble recombinación produciéndose la deleción de un fragmento interno del gen a mutar de manera que se mantuviera la pauta de lectura. Para ello, se utilizó el sistema basado en el vector suicida pDM4 con replicación dependiente de la proteína  $\lambda$ pir (Milton *et al.*, 1996). Se utilizaron dos parejas de cebadores para sintetizar *in vitro* una copia delecionada del gen a mutar manteniendo la pauta de lectura del gen. Una pareja de cebadores, denominados A y B, amplificaba la región inmediatamente anterior al gen y los primeros tripletes completos de éste. Los cebadores C y D amplificaban la región inmediatamente

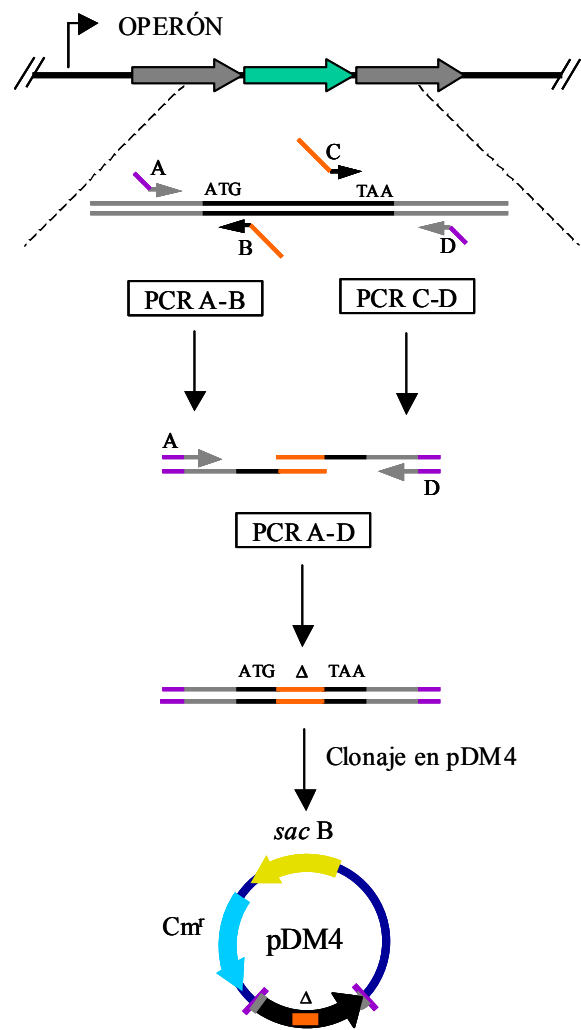
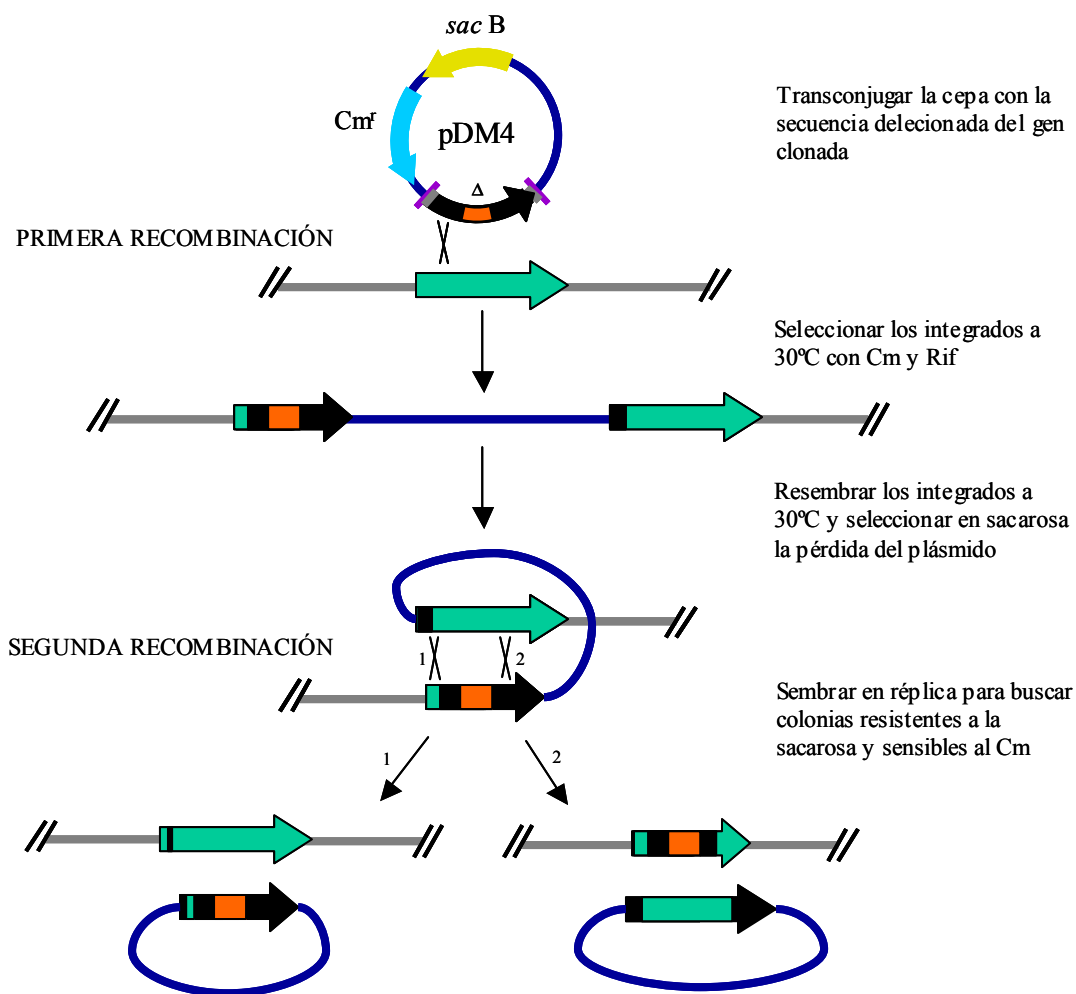


Figura 3.4. Diseño de construcciones delecionadas en pauta. Figura adaptada de Link *et al.*, 1997.

posterior al gen y los últimos tripletes de éste. Los cebadores B y C fueron diseñados de manera que en su extremo 5' presentaran una "cola" de 21 pb complementarias carentes de señales de terminación, y los cebadores A y D, con una diana de restricción.

Se realizaron dos PCR asimétricas independientes con las parejas de cebadores A-B y C-D, respectivamente. Los productos de amplificación se utilizaron como molde para una última PCR con los cebadores A y D y el fragmento obtenido, una vez purificado y digerido con la enzima correspondiente a la diana de los cebadores A y D, fue clonado en el plásmido pDM4 (Fig. 3.4).



**Figura 3.5.** Protocolo utilizado para sustituir secuencias salvajes del cromosoma por secuencias delecionadas *in vitro*.

Esta construcción en pDM4 se transformó mediante electroporación a la cepa *E. coli* MC1061 ( $\lambda$ pir) y se seleccionaron los transformantes en LB-agar con cloranfenicol. Los plásmidos recombinantes se transfirieron a la cepa a mutar, resistente a la rifampicina, en

una posterior conjugación triparental (ver apartado 3.8.8.1). La selección a 30°C en TSA con rifampicina y cloranfenicol y la falta del sistema  $\lambda$ pir permite el crecimiento de aquellas bacterias que hayan integrado el plásmido en su cromosoma mediante una primera recombinación homóloga, presentando una copia delecionada del gen a mutar y una copia correcta (Fig. 3.5).

Posteriormente, estos transconjugantes se hicieron crecer en placas de TSA suplementadas con sacarosa al 15% a 30°C (Blomfield *et al.*, 1991) y, dado que el pDM4 contiene el gen *sacB*, letal para la bacteria cuando crece en sacarosa, las cepas resistentes a la sacarosa (y sensibles al cloranfenicol) habían eliminado el plásmido integrado mediante una segunda recombinación homóloga. Tras la cual, en el cromosoma bacteriano, quedaba una copia del gen, que podía ser la salvaje o la delecionada, lo cual se determinó por PCR con los cebadores A y D, además de secuenciar la región delecionada de los mutantes, producto de la amplificación, para comprobar que se mantuviera la pauta (Fig. 3.5).

### **3.8.14 Estudio de la expresión génica mediante el gen indicador *lacZ***

Con el fin de analizar la regulación de putativas secuencias promotoras, se escogió el gen indicador *lacZ* para realizar fusiones transcripcionales con las regiones reguladoras a estudiar, llevar a cabo ensayos de expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa y poder correlacionar, así, la actividad de dicha enzima con el nivel de expresión del gen.

#### **3.8.14.1 Construcción de fusiones transcripcionales promotor-*lacZ***

Para realizar las fusiones transcripcionales promotor-*lacZ* se utilizó el plásmido pRS550 (Simons *et al.*, 1987) que contiene el operón *lac* sin promotor y genes que confieren resistencia a kanamicina y ampicilina. Los fragmentos de ADN correspondientes a las putativas regiones promotoras del gen *wzz* de las cepas de *A. hydrophila* AH-3 y *A. hydrophila* PPD134/91 se amplificaron mediante PCR de ADN cromosómico utilizando cebadores que incluían las dianas de restricción *Bam*HI (el directo) y *Eco*RI (el reverso). Los productos de las PCR se purificaron, se digirieron con *Bam*HI y *Eco*RI, y se ligaron al vector pRS550 digerido con las mismas enzimas, de manera que los insertos quedaban en la orientación correcta.

Las construcciones se transformaron a la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  por electroporación y se seleccionaron los transformantes a 37°C en placas de LB con ampicilina y kanamicina, los cuales fueron confirmados mediante PCR del ADN plasmídico con cebadores

específicos de las regiones introducidas y con los cebadores PRSFI y PRSRI del vector, que también se usaron para confirmar la orientación del inserto mediante la secuenciación del plásmido. Estas construcciones sirvieron para realizar el ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Con el fin de poder llevar a cabo el ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en *A. hydrophila* AH-405, mutante de AH-3 resistente a la rifampicina, las construcciones anteriores fueron digeridas con la enzima *StuI* y las bandas obtenidas de unas 6,3 Kb que contenían las fusiones transcripcionales de los promotores con el gen *lacZ* se purificaron y ligaron al vector pACYC184, previamente digerido con *HindIII* y *SalI*, tratado con el fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa y desfosforilado. Como control negativo también se ligó al mismo vector el fragmento de 6,1 Kb obtenido de la digestión con *StuI* del plásmido pRS550 que contenía el gen *lacZ*. Los productos de las ligaciones se electroporaron en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  y las células transformantes se seleccionaron a 37°C en placas de LB con cloranfenicol. Las colonias que resultaron ser sensibles a la tetraciclina fueron confirmadas mediante PCR del ADN plasmídico con cebadores específicos de cada inserto. Finalmente, las construcciones fueron movilizadas a la cepa AH-405 mediante conjugación triparental (ver apartado 3.8.8.1). La selección se realizó a 30°C en TSA con rifampicina y cloranfenicol y se confirmaron los transconjugantes mediante la extracción del plásmido y la PCR específica de los insertos.

#### **3.8.14.2 Ensayo de la actividad $\beta$ -galactosidasa**

La medida de la actividad  $\beta$ -galactosidasa del gen *lacZ* se llevó a cabo en células permeabilizadas según el método descrito por Miller (Miller, 1972). Este ensayo se basa en la reacción colorimétrica en la que el *o*-nitrofenol- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG), sustrato incoloro de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, es hidrolizado a galactosa y *o*-nitrofenol (ONP), cromóforo de color amarillo cuya concentración puede determinarse mediante espectrofotometría. Para ello, se siguió el protocolo descrito por Haase (Haase *et al.*, 2003). Se incubaron los cultivos celulares en LB a la temperatura de estudio durante toda la noche, se realizó una dilución 1:200 en medio fresco y se incubaron de nuevo en agitación hasta una DO<sub>600</sub> de, aproximadamente, 0,4.

A continuación, se añadieron 1500  $\mu$ l de cultivo a una mezcla de 1435,5  $\mu$ l de tampón Z 2X, 13,5  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol, 1  $\mu$ l de SDS 10% y 50  $\mu$ l de cloroformo, estos tres últimos incorporados al momento. Cada una de las muestras se analizó por triplicado.

Los tubos se agitaron unos 5 segundos y se incubaron durante toda la noche a 4°C con el fin de obtener una permeabilización celular máxima. Posteriormente, se agitaron durante unos 10 segundos y se dejaron reposar para asentar el cloroformo.

Para el análisis, se recogió 1 ml de cada muestra y se precalentó a 28°C. La reacción se inició añadiendo 0,2 ml de ONPG (Ecogen) (4mg/ml en tampón Z 1X, pH 7) precalentado, también, a 28°C. Las muestras se incubaron a 28°C durante 20 minutos, tiempo que podía variar según la aparición del color amarillo, y se paró la reacción con 0,5 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M, al producirse un aumento del pH. A continuación, se eliminaron los restos celulares mediante centrifugación a 12000 x g y se valoró la DO<sub>420</sub> de 1 ml del sobrenadante. Cuando fue necesario, previa adición del ONPG, se cogió menos volumen de muestra y se diluyó en tampón Z 1X en un volumen final de 1 ml, con el fin de obtener valores de DO<sub>420</sub> entre 0,1 y 0,8, dentro de los cuales el ensayo es lineal.

La actividad β-galactosidasa, expresada en unidades de Miller (UM), se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$UM = \frac{1000 \times DO_{420}}{t \times V \times DO_{600}}$$

t = tiempo de la reacción (minutos)  
V = volumen de cultivo ensayado en la reacción (ml)

<b>Tampón Z 2X</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	120 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	80 mM
KCl	20 mM
MgSO <sub>4</sub>	2 mM

### 3.8.15 Ensayos de complementación

#### 3.8.15.1 Análisis de complementación de mutantes

Los estudios de complementación de mutantes de *A. hydrophila* AH-3 y de *K. pneumoniae* 52145 se llevaron a cabo mediante el plásmido pBAD33 (Guzmán *et al.*, 1995) que contiene el promotor P<sub>BAD</sub> del operón arabinosa y su gen regulador, *araC*. En presencia de arabinosa se induce la transcripción a partir de dicho promotor y, en ausencia, se reduce a muy bajo nivel, pudiendo reducirse todavía más mediante el crecimiento en presencia de glucosa. Para realizar las construcciones, genes de *A. hydrophila* AH-3 se

amplificaron a partir de ADN cromosómico por PCR utilizando cebadores específicos con dianas para enzimas de restricción, de manera que no quedase incluida ninguna posible región promotora, en el caso de que la hubiese, pero sí se amplificara el putativo sitio de unión al ribosoma (RBS, *Ribosome Binding Site*). Los productos amplificados se digirieron con las enzimas de restricción correspondientes a las dianas diseñadas en los cebadores utilizados y se ligaron al vector pBAD33 digerido con las mismas enzimas o con enzimas que creasen dianas compatibles, de modo que se asegurase la correcta orientación de cada uno de los genes salvajes bajo el control del promotor P<sub>BAD</sub>. Cada una de las construcciones fue transformada a la cepa de *E. coli* LMG194 mediante electroporación y se seleccionaron los transformantes a 30°C en placas de LB con cloranfenicol, los cuales fueron confirmados mediante PCR con cebadores específicos del vector (PBAD-F y PBAD-R), que también se utilizaron para secuenciar el plásmido y verificar la orientación del inserto.

Una vez obtenidas las construcciones necesarias, éstas fueron transferidas al mutante de la cepa AH-3 correspondiente mediante conjugación triparental (ver apartado 3.8.8.1). Los transconjugantes fueron seleccionados a 30°C en placas de TSA con cloranfenicol y rifampicina. En el caso de la complementación de mutantes de *K. pneumoniae* 52145, las construcciones en pBAD33 con los genes de *A. hydrophila* AH-3 correspondientes se transfirieron a los mutantes mediante electroporación y los transformantes se seleccionaron a 37°C en placas de LB con cloranfenicol. En ambos casos, se confirmaron mediante PCR del plásmido purificado.

En el ensayo de complementación, los cultivos se incubaron durante 18h a 30°C en medio TSB, en el caso de los mutantes de la cepa AH-3, o a 37°C en LB, en el caso de los mutantes de la cepa 52145 con cloranfenicol y 0,2% de glucosa. Posteriormente, se hizo una dilución 1:100 en medio fresco sin glucosa y se incubaron hasta que alcanzaron una DO<sub>600</sub> de, aproximadamente, 0,2. Seguidamente, se añadió un 0,2% de L-arabinosa y se cultivaron durante dos horas más antes de proceder al estudio de la recuperación del fenotipo salvaje. Paralelamente, se realizaron cultivos control que se mantuvieron reprimidos con glucosa.

### **3.8.15.2 Análisis de complementación de la cepa de *E. coli* CJB26**

El ensayo de complementación de la cepa de *E. coli* CJB26, la cual presenta un marcador para la resistencia a la kanamicina insertado en su gen *waaA* y una copia salvaje

del gen en un plásmido sensible a la temperatura (vector recombinante pJSC2) que permite el crecimiento de la bacteria a 30°C pero no a 44°C (Belunis *et al.*, 1995), se llevó a cabo con dos construcciones.

Para realizar la primera construcción, pGEMT-ORF1.2, se amplificó el gen *waaA* de la cepa AH-3 con los cebadores 1.2-F y 1.2-R (1520 pb), se ligó a pGEM-T *easy* y se transformó a la cepa de *E. coli* XL1-Blue por electroporación. Los transformantes se seleccionaron en placas de LB suplementadas con ampicilina, X-Gal e IPTG y se eligieron las colonias blancas para purificar el plásmido y digerirlo con *EcoRI* para comprobar la presencia del inserto. Además, se secuenció con los cebadores SP6 y M13for del vector para asegurar que la transcripción del gen quedase bajo el control del promotor del gen *lacZ*.

La segunda construcción, pGEMT-ORF2.3-1.2, se obtuvo clonando, en primer lugar, de la misma manera en pGEM-T *easy* el gen *kdkA* de la cepa AH-3 y su putativo promotor, para lo cual se realizó su amplificación con los cebadores 2.3-F y 2.3-R (1099 pb) y se comprobó su inserción mediante digestión con *EcoRI* del plásmido purificado (pGEMT-ORF2.3). A continuación, se ligó el producto de PCR correspondiente al gen *waaA* digerido con la enzima *SaI* (cuya diana se había incluido en el diseño de los cebadores) a la construcción pGEMT-ORF2.3 obtenida, previamente digerida con esta misma enzima, cuya diana está en el vector pGEM-T *easy*, y desfosforilada. De esta forma, la transcripción del gen *waaA* quedaba, en esta segunda construcción, bajo el control del promotor del gen *lacZ* tras comprobar su orientación mediante secuenciación con el cebador SP6.

El análisis de complementación se realizó electroporando cada una de las construcciones plasmídicas por separado en la cepa CJB26. Se seleccionaron los transformantes en placas de LB suplementadas con kanamicina y ampicilina a 30°C y posteriormente, se escogieron aquellos que fueron capaces de crecer a 44°C, temperatura no permisiva para el plásmido. Se comprobó la incapacidad de estas colonias para crecer en placas de LB suplementadas con cloranfenicol, se aisló el ADN plasmídico y se realizó un ensayo de restricción para comprobar la presencia de la construcción introducida y la ausencia del plásmido pJSC2.